



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

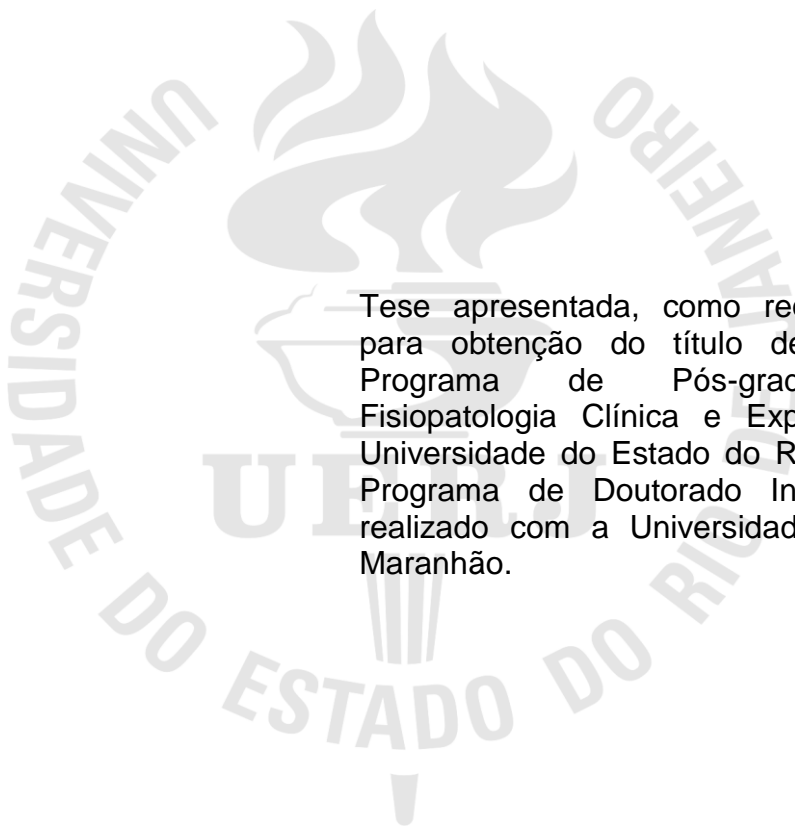
Dulcelena Ferreira Silva

**Análise da citotoxicidade do extrato do fruto de juçara (*Euterpe oleracea* Mart.) do Maranhão em células malignas humanas**

Rio de Janeiro  
2013

Dulcelena Ferreira Silva

**Análise da citotoxicidade do extrato do fruto de juçara (*Euterpe oleracea* Mart.)  
do Maranhão em células malignas humanas**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Moura

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CB/A

S586 Silva, Dulcelena Ferreira  
Análise da citotoxicidade do extrato do fruto de juçara (*Euterpe oleracea* Mart.) do Maranhão em células malignas humanas/  
Dulcelena Ferreira Silva. Rio de Janeiro, 2013.  
102 f.

Orientador: Roberto Soares de Moura  
Coorientadora: Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão

1. Juçara - Extrato. 2. *Euterpe oleracea* Mart. 3. Polifenóis. 4. MCF - 7. 5. Citotoxicidade. 6. Autofagia. I. Moura, Roberto Soares. II. Nascimento, Maria do Desterro Soares Brandão. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV Título.

CDU 612 - 092.18:582.521.11

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese/dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Dulcelena Ferreira Silva

**Análise da citotoxicidade do extrato do fruto de juçara (*Euterpe oleracea* Mart.)  
do Maranhão em células malignas humanas**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão.

Aprovada em 20 de março de 2013.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento  
Universidade Federal do Maranhão

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Roberto Soares de Moura (Orientador)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Marisa Maria Dreyer Breitenbach  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria do Rosário da Silva Ramos Costa  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Carolina Stumbo Machado  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2013

## DEDICATÓRIA

À minha mãe Dulce (*in memoriam*).

Aos meus filhos Dulce Cristiane e Junior e aos meus netos Vinicius e Pedro Arthur.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me ter permitido chegar até aqui.

Aos meus filhos, pelo incentivo permanente.

À Universidade Federal do Maranhão (UFMA), que a mim oportunizou a ampliação de conhecimentos a este nível, em especial ao Hospital Universitário da UFMA, minha gratidão.

À Coordenação do Programa de Pós – Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental (FISCLINEX) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), em especial, aos professores Doutores: Egberto Gaspar de Moura, Eliete Bouskela, Alex Christian Manhães e Patricia Cristina Lisboa.

Ao Prof. Dr. Roberto Soares de Moura da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), por ter me aceito como orientanda acreditando em minha capacidade de honrar compromissos.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, agradecimento todo especial por sua incansável missão de transmitir experiências e conhecimentos e que a mim muito orgulha tê-la como amiga e Co - orientadora.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria do Rosário da Silva Ramos Costa, Coordenadora pela Instituição receptora do DINTER/FISCLINEX - UERJ/UFMA., pelo apoio a todos nós doutorandos.

Ao Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz do Centro de Pesquisa da Divisão de Biologia Celular do Grupo de Biologia Estrutural do Núcleo de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA) por ter me proporcionado apoio incondicional na realização dos ensaios experimentais deste trabalho.

À Dra. Nise Hitomi Yamaguchi, médica imunologista e pesquisadora em farmacogenética do Instituto Avanços em Medicina - São Paulo, motivadora no desenvolvimento deste trabalho científico na área da Oncologia.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Claudia Vitoria de Moura Gallo do Grupo de Pesquisa da Biologia Molecular de Tumores da UERJ pela disponibilidade no acondicionamento inicial do liofilizado dos extratos da juçara.

À Dra. Flavia Castello Branco Vidal, colaboradora da equipe de pesquisadores do INCA e integrante do Programa Nacional de Pós – Doutorado PNPD/CAPES/UFMA, pela colaboração na caracterização dos eventos experimentais. “minha mãe de bancada”.

À Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) pela concessão do laudo da exsicata da juçara pelo Herbário Rosa Mochel.

Às Prof.<sup>as</sup> Dras. Maria Célia Pires Costa e Prof<sup>a</sup> Débora Santos, pela reconhecida colaboração na elaboração da exsicata.

À equipe do Laboratório de Farmacologia e Psicobiologia da UERJ, em especial ao Dr. Marcelo, pela colaboração na obtenção dos extratos hidroalcoólicos de Juçara.

Aos integrantes, do Grupo de Biologia Estrutural do Núcleo de Pesquisa do INCA pelo companheirismo, em especial, Waldemir Souza.

À professora Maria Carminda Arruda Guimarães do Centro Educacional Sagrados Corações (CESCO), pela colaboração na coleta da palmeira *Euterpe oleracea* Mart, material necessário para a execução da Exsicata da Juçara.

À Simone e à Patrícia pela ajuda na Microscopia Eletrônica de Transmissão do Laboratório do Núcleo de Pesquisa do INCA

Aos acadêmicos do curso de Medicina, bolsistas de iniciação científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FAPEMA) e CNPq/UFMA, como também da Pró-Reitoria de Extensão (PROEX/UFMA, Hugo, Isadora, Juliete, Adriana, Marcos Antonio, Thiago Mubárack, Thaise e demais voluntários pela colaboração.

À Rosália Aires, minha cunhada, por me ter apoiado e protegido durante o estágio doutoral.

Ao Sr. Domingos Santos, pela colaboração nos caminhos da digitação e formatação.

A todos que participaram indiretamente da realização deste trabalho. e que não foram por mim aqui mencionados.

Tudo está pronto se nossas mentes estão prontas.

*William Shakespeare*

## RESUMO

SILVA, Dulcelena Ferreira. **Análise da citotoxicidade do extrato do fruto de juçara (*Euterpe oleracea* Mart.) do Maranhão em células malignas humanas**. 2013. 102 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro e Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2013.

A juçara, *Euterpe oleracea* Mart., fruta indígena da Amazônia Legal, é rica em fitoquímicos com atividades anti-oxidante, antiinflamatória e anti-câncer. Este estudo tem por objetivo analisar os efeitos do extrato hidroalcoólico da casca, caroço e fruto total da juçara em diferentes linhagens de células malignas humana. Os frutos foram coletados no Parque da Juçara, localizado no Maracanã, município de São Luís, seguida da confecção da excisata que se mantém registrada no Herbário Rosa Mochel do Núcleo de Estudos Biológicos da Universidade Estadual do Maranhão. Os extratos hidroalcoólicos da casca, caroço e fruto total foram extraídos no Laboratório de Farmacologia e Psicobiologia da UERJ. As linhagens celulares utilizadas nos ensaios foram MCF-7 (adenocarcinoma de mama), CACO-2 e HT-20 (adenocarcinoma colo retal) e adenocarcinoma na mama (MDA-MB-468). As linhagens foram tratadas com 10, 20 e 40µg/mL dos extratos por 24 e 48 horas e feitas às análises. Células MCF-7 controle apresentaram núcleo proeminente com nucléolos evidentes. Após tratamento com o extrato hidroalcoólico da casca da juçara, as células mostraram morfologia arredondada com retração do citoplasma. O ensaio de viabilidade com MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) demonstrou uma redução na viabilidade das células. Após 48 horas, o tratamento das células com 20µg/mL do extrato da casca reduziu a viabilidade sendo que o efeito citotóxico do tratamento com 40µg/mL do extrato da casca foi potencializado. Células tratadas com 10µg/mL do extrato do caroço de juçara apresentavam-se arredondadas com consequente redução no volume celular. A concentração 20µg/mL de extrato hidroalcoólico do caroço, causou severa redução no volume das células e ocasionou o surgimento de vacúolos intracelulares. O mesmo foi observado após tratamento com 40µg/mL. O tratamento com 40µg/mL do extrato hidroalcoólico do fruto total, modificou drasticamente a morfologia das células MCF-7 causando vacuolização e aparente lise com perda do conteúdo citoplasmático e o ensaio da viabilidade com MTT demonstrou redução na viabilidade das células MCF-7 tratadas com 20 e 40µg/mL após 24 horas de tratamento. Análises por MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão) demonstraram o surgimento de vesículas autofágicas, cuja comprovação deu-se com a identificação da expressão da proteína LC3BII na membrana do autofagossoma pela técnica de Western Blotting. Mediante o demonstrado pelos experimentos, com as linhagens MCF-7 e MDA-MB-468, confirma-se que as frações isoladas do extrato do caroço da juçara, promove modificações celulares indicativas de autofagia a partir de 10µg/mL, em 24 horas. O núcleo permaneceu íntegro, não apresentando características de núcleo apoptótico. Os dados são conclusivos para ocorrência de morte celular por autofagia em linhagem celulares de carcinoma de mama MCF-7 quando tratadas com extrato hidroalcoólico da casca, caroço e fruto total da juçara do Maranhão, agente quimiopreventivo no câncer de mama estrogênio-dependente.

Palavras-chave: *Euterpe oleracea* Mart. Juçara. Polifenóis. MCF - 7. Citotoxicidade. Autofagia.

## ABSTRACT

Juçara, *Euterpe oleracea* Mart., an indigenous fruit from Amazon, is rich in phytochemicals with antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activity. This study aims to analyze the effects of the hydroalcoholic extract of the bark, seed and total fruit of juçara in different human malignant cell lines. Fruits were collected at the Maracana Ecological Park, in São Luís, followed by excicata manufacturing that remains registered in the Herbarium Rosa Mochel from the Nucleus of Biological Studies at the State University of Maranhão. The hydroalcoholic extracts of bark, seed and fruit were all obtained in the Laboratory of Pharmacology and Psychobiology UERJ. The cell lines used in the tests were MCF-7 and MDA-MB-468 (breast adenocarcinoma) and CACO-2 and HT-20 (colorectal adenocarcinoma). Strains were treated with 10, 20 and 40µg/mL of extracts for 24 and 48 hours. Control MCF-7 cells showed prominent nucleus with evident nucleoli. After treatment with the hydroalcoholic extract from the bark of juçara, the cells showed rounded morphology with retraction of the cytoplasm. The MTT viability assay showed a reduction in cell viability. After 48 hours, treatment of cells with 20µg/mL of bark extract reduced cell viability and the cytotoxic effect of treatment with 40µg/mL extract of the bark was potentiated. Cells treated with 10µg/mL of the bark extract were rounded with consequent reduction in cell volume. The concentration of 20µg/mL of bark extract caused severe reduction in volume of the cells and caused the appearance of intracellular vacuoles. The same was observed after treatment with 40µg/mL. Treatment with 40µg/mL of the hydroalcoholic extract of total fruit dramatically changed the morphology of the MCF-7 cells causing vacuolization and lysis with apparent loss of cytoplasmic contents. MTT assay showed a reduction in viability of MCF-7 cells treated with 20 and 40µg/mL after 24 hours of treatment. Analysis by electron microscopy showed the appearance of autophagic vacuoles. Autophagosome protein LC3BII was identified by Western Blotting technique. It is confirmed that the isolated fractions of the bark extract from juçara promotes cellular changes indicative of autophagy from 10µg/mL in 24 hours. The nuclei remained intact, showing no apoptotic features. The data are conclusive for the occurrence of autophagy in carcinoma cell line MCF-7 breast treated with hydroalcoholic bark, seed and fruit from juçara.

Keywords: *Euterpe oleracea* Mart. Juçara. Polyphenols. MCF - 7. Cytotoxicity. Autophagy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fitoquímicos dietéticos que bloqueiam ou suprimem vários estágios da carcinogênese.....	33
Figura 2 -	Fitoquímicos quimiopreventivos e suas fontes dietéticas.....	35
Figura 3 -	Outros fitoquímicos quimiopreventivos e suas fontes dietéticas..	36
Figura 4 -	Efeito de fitoquímicos na activação de NF-kB e AP1.....	37
Figura 5 -	Vias representativas de sinalização oncogênica.....	42
Figura 6 -	Mapa da Ilha de São Luís - MA evidenciando o Parque da Juçara, Barro do Maracanã – área de juçarais.....	47
Figura 7 -	Áreas de juçarais do estado do Maranhão evidenciando o município de São Luís, Parque Ecológico do Maracanã.....	48
Figura 8A -	Exsicata da <i>Euterpe oleracea</i> Mart., demonstrando a base, meio e ápice da palma da juçareira.....	50
Figura 8B -	<i>Euterpe oleracea</i> Mart., demonstrando diferentes aspectos da palmácea identificada no Parque Ecológico do Maracanã	51
Figura 9 -	Avaliação da citotoxicidade dos extratos de juçara nas linhagens de adenocarcinoma colo-retal humano CACO-2 (A)..	59
Figura 10 -	Avaliação da citotoxicidade dos extratos de juçara em células da linhagem MCF-7 através do ensaio de viabilidade com MTT.....	60
Figura 11 -	Comparação de citotoxicidade em MCF-7 entre os extratos de juçara.....	62
Figura 12 -	A - Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos dos extratos de juçara na linhagem celular CACO-2.....	64
Figura 12 -	B - Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos dos extratos de juçara na linhagem celular CACO-2.....	65

Figura 12 -	C - Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos dos extratos de juçara na linhagem celular CACO-2.....	66
Figura 13 -	Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos dos extratos de juçara na linhagem celular HT-29....	67
Figura 14 -	A- Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos dos extratos de juçara na linhagem celular MCF-7...	69
Figura 14 -	B - Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos dos extratos de juçara na linhagem celular MCF-7...	70
Figura 14 -	C- Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos dos extratos de juçara na linhagem celular MCF-7.....	71
Figura 15 -	A - Análise morfológica do núcleo das células MCF-7 corados com DAPI após tratamento com os extratos de juçara.....	72
Figura 15 -	B - Análise morfológica do núcleo das células MCF-7 corados com DAPI após tratamento com os extratos de juçara.....	73
Figura 15 -	C - Análise morfológica do núcleo das células MCF-7 corados com DAPI após tratamento com os extratos de juçara.....	74
Figura 16 -	Avaliação da atividade da caspase 7 nas células MCF-7 após tratamento com os extratos de juçara.....	75
Figura 17 -	Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão das células MCF-7 após tratamento com o extrato do caroço de juçara.....	77
Figura 18 -	Análise da expressão da proteína LC3-B II através da técnica de Western Blotting.....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química e valor nutricional do açaí ( <i>Euterpe oleracea</i> Mart.).....	19
Tabela 2 - Descrição da composição química em ácidos graxos do pericarpo, endocarpo e dos frutos íntegros do açaí.....	27
Tabela 3 - Exemplos de fitoquímicos e seus alvos moleculares.....	39
Tabela 4 - Análise comparativa da quantificação de polifenóis do fruto da juçara do Maranhão e do açaí do Pará.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA	Área de Proteção Ambiental
ATCC	American Type Culture Collection
CACO-2	Colon carcinoma cell line
CESCO	Centro Educacional Sagrados Corações
DAPI	(4',6-diamidino-2-phenylindole)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ER	Receptor de Estrogênio
HT-29	Colon cancer cell line
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em câncer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor I
LC3B	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (ATG8F)
MCF-7	Breast Cancer Cell Line
MDA-MB-468	Breast adenocarcinoma cell line
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NF-kB	Factor Nuclear kappa-light-chain-enhancer de células B activadas
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PPAR	Receptor De Proliferação de Peroxissomos
ROS	Reactive Oxygen Species
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	24
1.1	<b><i>Euterpe oleracea</i> Mart.</b> .....	24
1.1.1	<u>Caracterização do fruto juçara e das frações fitoquímicas</u> .....	26
1.2	<b>Polifenóis</b> .....	27
1.2.1	<u>Quimioprevenção e o câncer</u> .....	29
1.2.2	<u>Drogas antineoplásicas derivadas de plantas</u> .....	38
1.3	<b>Epidemiologia do câncer de mama</b> .....	42
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	45
2.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	45
2.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	45
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	46
3.1	<b>Área da pesquisa</b> .....	46
3.2	<b>Caracterização taxonômica do fruto juçara</b> .....	49
3.3	<b>Obtenção do extrato hidroalcoólico liofilizado do fruto total, casca e caroço de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.</b> .....	51
3.4	<b>Linhagens celulares</b> .....	52
3.5	<b>Tratamentos com os extratos hidroalcoólicos de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.</b> .....	53
3.6	<b>Ensaio de Viabilidade Celular</b> .....	53
3.7	<b>Análise morfológica por microscopia de luz e microscopia eletrônica</b> .....	54
3.8	<b>Coloração por DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)</b> .....	55
3.9	<b>Ensaio luminescente Caspase-Glo® 3/7</b> .....	55
3.10	<b>Extração total de proteínas e Western Blotting</b> .....	55
3.11	<b>Análise estatística</b> .....	56
4	<b>RESULTADOS</b> .....	57
4.1	<b>Quantificação dos polifenóis de frutos de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.</b> .....	57
4.2	<b>Efeito dos extratos hidroalcoólicos de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.</b> .....	57

	<b>na viabilidade de linhagens tumorais humanas.....</b>	
4.3	<b>Análise morfológica das células após tratamento com os extratos de juçara.....</b>	<b>63</b>
4.4	<b>Análise do potencial apoptótico do extrato de juçara.....</b>	<b>72</b>
4.5	<b>Indução de autofagia na linhagem MCF-7 após tratamentos com o extrato hidroalcoólico do caroço de juçara.....</b>	<b>76</b>
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>
	<b>ANEXO – O laudo do fruto da Exsicata.....</b>	<b>102</b>

## INTRODUÇÃO

*Euterpe oleracea* é espécie vegetal, pertence a família *Arecaceae* que engloba aproximadamente 200 gêneros e cerca de 2.600 espécies. Sua distribuição é predominantemente tropical e subtropical (JONES, 1995). Na Amazônia, esta família está representada por 39 gêneros e um número de espécies estimadas entre 150 e 180 (KAHN, 1997). A taxonomia identificada pelo sistema de classificação de Cronquist (1981), mostrou que, o açazeiro está ordenado na seguinte sequência hierárquica:

**Divisão:** *Magnoliophyta*

**Classe:** *Liliopsida*

**Subclasse:** *Arecidae*

**Ordem:** *Arecales*

**Família:** *Arecaceae*,

**Subfamília:** *Arecoidae*

**Gênero:** *Euterpe*

**Espécie:** *Euterpe oleracea*

No gênero *Euterpe* presente na Amazônia brasileira possui as seguintes espécies e variedades são identificadas: *E. oleracea*, *E. precatoria* var. *precatoria*, *E. precatoria* var. *longevaginata*, *E. catinga* var. *catinga*, *E. catinga* var. *roraimae* e *E. longibracteata*. Dentro das espécies nativas do Brasil as mais importantes, do ponto de vista agroindustrial são *E. oleracea*, *E. edulis* e, bem secundariamente, *E. precatoria*. UHL; DRANSFIELD, 1986; HENDERSON; GALEANO, 1996)

*Euterpe oleracea* Mart. é uma espécie monocotiledônea nativa da várzea da região amazônica, especificamente dos seguintes países: Venezuela, Colômbia, Equador, Guianas Suriname e Brasil, principalmente nos estados do Amazonas, Amapá, Pará, Maranhão, Rondônia, Acre e Tocantins. É conhecida popularmente como açai, açai do pará, açai do baixo amazonas, açai de touceira, açai de planta, juçara e juçara de touceira (CALZAVARA, 1972; CAVALCANTE, 1991; VILLACHICA et al., 1996). As duas últimas denominações citadas são bastante comuns no Estado do Maranhão.

*Euterpe oleracea* Mart. é nativa da Amazônia brasileira e o Estado do Pará é o principal centro de dispersão natural dessa palmácea e da América Central. No entanto, é na região do estuário do Rio Amazonas que se encontram as maiores e mais densas populações naturais dessa palmeira, adaptada às condições elevadas de temperatura, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar (GAMA *et al.*, 2010; EMBRAPA, 2006).

A produção de frutos do açazeiro no Estado do Pará cresceu de 92.021 toneladas, em 1997, para 122.322 toneladas, em 2002, um aumento de quase 33%. Em 2003, a produção foi de 160.000 toneladas. No Maranhão, em 2010, foram coletadas 10.930 toneladas, demonstrando um aumento de quase 49% (FEITOSA; TROVÃO, 2006; IBGE, 2010).

No Brasil a quantidade produzida de frutos alimentícios, conforme o IBGE (2010), demonstra ser o açaí um dos principais produtos de extração vegetal, perdendo apenas para erva mate. Ainda em 2010 a quantidade produzida e acumulada de açaí no Maranhão mostrou que Luís Domingues e Carutapera da mesorregião oeste maranhense estão entre os 20 maiores municípios produtores com suas respectivas Unidades da Federação Brasileira.

No Estado do Maranhão *Euterpe oleracea* Mart. foi também registrada na mesorregião norte maranhense, especificamente, nos municípios de Alcântara, Cururupu, Guimarães e Mirinzal, como também na mesorregião oeste maranhense em Maracaçumé, Santa Inez, Santa Luzia, Turiaçu e Zé Doca (OLIVEIRA; CARVALHO; NASCIMENTO, 2000).

As plantas contêm compostos naturais que exibem importantes propriedades bioativas, cujos compostos podem fornecer alternativas aos medicamentos atuais propiciando novas descobertas de drogas (MOHANTY; COCK, 2012; LIEDO *et al.*, 2012).

Segundo estudos realizados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (2006) o açaí é considerado um alimento de alto valor calórico e nutricional, com elevado percentual de lipídeos, proteínas e minerais. O açaí representa a principal base alimentar da população ribeirinha, da região do estuário do Rio Amazonas.

Amostras de açaí foram estudadas por Mulabagal, Keller e Calderón (2012), demonstraram ter cianidina 3-glucósido, cianidina 3-sambubioside, cianidina 3-rutinoside, e 3-peonidina rutinoside. O açaí possui elevada concentração de

antocianinas (1,02 g/100 g de sólidos secos), cujo teor nos frutos está relacionado à prevenção e redução das doenças cancerígenas, cardiovasculares e circulatórias, devido aos radicais livres.

Os fitoquímicos são compostos presentes nos alimentos derivados de plantas, incluindo a soja, cereais, sementes e polpas, em especial as de juçara, que podem ser agrupadas em famílias com base em similaridades da estrutura química: dos flavonóides (isoflavonas, flavonas, flavonóis, flavan-3-ols, flavanonas e antocianinas), lignanas (secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol e pinoresinol) e ácido cinâmico. Em sendo assim, os polifenóis têm atividades antioxidantes, antiproliferativa e antiangiogênica, sendo que alguns destes têm atividade estrogênica (MANACH *et al.*, 2004; WEBB; MCCULLOUGH, 2005; SEERAM, 2008a).

Kwon *et al.*, (2007) demonstraram experimentalmente em camundongos transgênicos que certos fitoquímicos consumidos na dieta podem ter efeitos protetores contra o câncer, tendo sido também mostrado em modelos de cânceres mediados por agentes cancerígenos como irradiações e agentes derivados de fontes exógenas ou endógenas. A proteção por fitoquímicos na dieta contra o câncer são devidos à indução do sistema de defesa celular, incluindo antioxidantes, desintoxicação, ativação de enzimas anti-inflamatórias, bem como vias de sinalização que culminam na parada do ciclo celular e / ou morte celular.

Rogez (2000) descreveu a composição química e o valor nutricional do fruto açaí (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição química e valor nutricional do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.).

COMPOSIÇÃO	UNIDADE	QUANTIDADE NA MATÉRIA SECA
pH	-	5,80
Matéria seca	%	15,00
Proteínas	g/100 g(1)	13,00
Lipídios totais	g/100 g(1)	48,00
Açúcares totais	g/100 g(1)	1,50
Açúcares redutores	g/100 g(1)	1,50
Frutose	g/100 g(1)	0,00
Glicose	g/100 g(1)	1,50
Sacarose	g/100 g(1)	0,00
Fibras Brutas	g/100 g(1)	34,00
Energia	Kcal/100g	66,30
Cinzas	g/100 g(1)	3,50
Sódio	mg/100 g(2)	56,40
Potássio	mg/100 g(2)	932,00
Cálcio	mg/100 g(2)	286,00
Magnésio	mg/100 g(2)	174,00
Ferro	mg/100 g(2)	1,50
Cobre	mg/100 g(2)	1,70
Zinco	mg/100 g(2)	7,00
Fósforo	mg/100 g(2)	124,00
Vitamina B1	mg/100 g(2)	0,25
$\alpha$ -Tocoferol (vitamina E)	mg/100 g(2)	45,00

(1) Matéria seca; (2) Cálculo por diferença.

Fonte: Adaptado de Rogez (2000)

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai/paginas/composicao.htm>.

Sanabria e Sangronis (2007), realizaram também a caracterização da *Euterpe oleracea* Mart. determinando a composição centesimal, o perfil de ácidos graxos, o conteúdo de minerais, taninos, polifenóis, antocianinas, capacidade antioxidante e da cor da polpa de açaí em duas colheitas na Amazônia venezuelana e indicaram que açaí tem um teor de lipídeos elevado (49,4% e 33,1%), proteínas (13,8% e 9,3%), cinzas (5,2% e 2,2%) e fibra dietética total (27,3% e 18,0%). Destaca-se que 71% da gordura do açaí é constituída por ácido oléico; polifenóis 5,02 e 2,20 g/100 g; taninos 0,70 e 1,37 g/100g ; antocianinas 0,73 e 1,60 g/100 g e a capacidade antioxidante 88,03 e 87,87%, os quais concluíram que o fruto tem um alto valor nutricional e contém compostos antioxidantes.

Muitos pesquisadores estabeleceram que o consumo de frutas, contendo antocianinas, intituladas de berry, tem um impacto positivo e profundo sobre a saúde humana e desempenho sobre doenças (SEERAM, 2008a).

Laslo *et al.*, (2012) demonstraram que a polpa de açaí seco pode promover o envelhecimento saudável e a redução do dano oxidativo fundamentando melhor a viabilidade da utilização de açaí como uma intervenção eficaz na dieta para aliviar os sintomas de doenças com um alto nível de estresse oxidativo.

Willcox *et al.*, (2009), relataram que a dieta com baixa caloria, baixa carga glicêmica, rica em nutrientes e antioxidantes tem implicações para a saúde. Esses autores verificaram que as taxas de mortalidade por doença coronariana e câncer diminuíram nos japoneses e norte-americanos, os quais evidenciaram retardo no surgimento das principais doenças associadas à idade, tais como câncer, acidente vascular cerebral e diabetes.

O câncer é um problema de saúde crescente em todo o mundo devendo-se ao aumento da expectativa de vida, urbanização e as subseqüentes mudanças de condições ambientais. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência global é de 12,7 milhões e a mortalidade global conta com 7,6 milhões, sendo que os cânceres mais comuns em países desenvolvidos incluem a mama, próstata e colorretal, os quais estão relacionados à longevidade (WHO, 2008). Outros cânceres com prognóstico reservado (fígado, estômago e esôfago) são mais comuns em países menos desenvolvidos (FERLAY *et al.*, 2008).

No Brasil a distribuição proporcional dos cânceres em ambos os sexos mostra predomínio do câncer de mama, colo de útero e colo-retal no sexo feminino, enquanto que no sexo masculino inclui próstata, traquéia, brônquios e pulmão. A distribuição do câncer colorretal é igual nos dois gêneros (INCA, 2011).

Estima-se que mais de dois terços dos cânceres humanos poderiam ser evitados através de adequada modificação de estilo de vida. Doll e Peto (1981) relataram que 10-70% (média de 35%) da mortalidade por câncer é atribuível a dieta. Suas observações são baseadas em dados estatísticos e epidemiológicos, relacionados principalmente a fatores dietéticos que aumentam o risco. Embora a porcentagem exata seja incerta, existem várias linhas de evidências convincentes de estudos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais que apontam para o risco de câncer está relacionado aos fatores nutricionais.

A grande diversidade vegetal do Brasil possibilita a contribuição como fonte natural de fármacos e também a utilização de plantas medicinais como um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e que vem

crescendo junto à comunidade médica como fonte de pesquisa para a quimioterapia do câncer e outras patologias (NEWMAN; CRAGG, 2007).

A carcinogênese é geralmente reconhecida como uma de várias etapas no processo, onde ocorrem distintas alterações moleculares e celulares, podendo os fitoquímicos bloquearem ou reverterem o estágio pré-maligno, na iniciação e promoção (WATTENBERG, 1985).

O aumento do consumo de frutas e vegetais é uma prioridade global na prevenção do câncer. Nos Estados Unidos em 2003 foi demonstrado que, cerca de 1,3 milhões de novos casos de câncer serão diagnosticados, e mais de 550 mil pessoas irão morrer de câncer (SURH, 2003)

Aproximadamente 25% de todos os medicamentos atualmente em uso são originalmente derivados de plantas. Newman, Cragg e Snader (2003) demonstraram em suas pesquisas que cerca de 75% de novas drogas anticâncer comercializadas entre 1981 e 2006 são derivadas de fitoquímicos. Das 250 mil espécies catalogadas por Newman e Cragg (2007), apenas 10% em todo o mundo têm sido rastreadas para quaisquer bioatividades. As plantas produzem uma grande variedade de compostos biologicamente ativos que exibem um conjunto de propriedades a serem definidas. Dada a natureza diversa da flora é surpreendente que mais pesquisas necessitem ser feitas para evidenciar seu potencial farmacológico.

O stress oxidativo pode induzir a morte celular por apoptose, danificando o DNA causando câncer e outras doenças. Os indivíduos com elevada ingestão dietética de antioxidantes não-enzimáticos, tais como vitaminas A, C, e E são menos propensos ao adoecimento por câncer, doenças cardiovasculares e diabetes (GEY, 1995). Suplementos antioxidantes, ou alimentos contendo altos níveis de antioxidantes, podem ser úteis na redução do surgimento de doenças e/ou sinais e sintomas relacionados (COCK; MOHANTY, 2011).

Muitos mecanismos moleculares demonstraram ações anticarcinogênicas focadas em cascatas de sinalização intracelulares, muito comuns alvos moleculares de compostos fitoquímicos quimiopreventivos (SURH, 2003; TORRES-SANCHEZ *et al.*, 2008).

A correlação entre a inibição do crescimento celular por extratos fenólicos totais e por antocianinas monoméricas totais fundamentaram de forma complexa a influência da bioatividade desses compostos fitoquímicos no ciclo celular (SURH, 2003; JOHNSON *et al.*, 2011).

Estudos acerca do consumo de frutas e hortaliças realizados por Brown *et al.*, (2011) demonstraram que a diminuição do risco de vários cânceres está associado com estes alimentos, possivelmente ligados ao seu teor de fitoquímicos, que é de interesse devido a vários benefícios propostos à saúde, incluindo o potencial de atividade anticâncer.

A prevenção do câncer pelo uso dos recursos naturais ou compostos sintéticos tem sido descritos como quimioprevenção, ou seja, compostos quimiopreventivos poderiam alvejar a fase de iniciação da carcinogênese, ou interromper a promoção e progressão do câncer ou de suas combinações (HANAUSEK; WALASZEK; SLAGA, 2003). Por outro lado, compostos quimiopreventivos também poderiam suprimir a progressão e a promoção de carcinogênese, interferindo em várias vias de sinalização envolvendo estresse oxidativo, inflamação e a proliferação celular, induzindo a parada do ciclo celular e a apoptose, portanto, eles poderiam ter como alvo, todos os diferentes estágios da carcinogênese (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004).

Vários estudos têm demonstrado que muitos compostos dietéticos naturais podem modular potencialmente os alvos moleculares, envolvidos na prevenção, em especial da iniciação, promoção, e progressão do câncer, incluindo-se as frutas e legumes da dieta, que têm sido considerados como fontes ricas de compostos quimiopreventivos, os quais são amplamente investigados devido à sua baixa toxicidade (JEONG; KONG, 2005; VOON; KONG, 2011).

A valorização dos frutos silvestres, pequenos e comestíveis deve-se ao potencial contido nas polpas com numerosos compostos bioativos, importantes na redução e no reparo de danos celulares que promovem stress e inflamação. Experimentos utilizando compostos bioativos de *berries* mostraram que dietas com esses frutos suprimem significativamente o tumor mamário. As polpas desses frutos podem diminuir a incidência tumoral, latência, volume e proliferação, devido aos níveis de enzimas que participam da carcinogênese demonstrado pelo efeito da dieta que contem ácido elágico, provando que são consistentemente eficazes na prevenção de tumores mamários estrogênio-induzidos (AIYER; GUPTA, 2010).

Neida e Elba (2007), demonstraram que o açaí tem valor nutricional e contem compostos antioxidantes. Pacheco-Palencia *et al.*, (2008) também evidenciaram que extratos polifenólicos de vários frutos e vegetais tem efeito

inibidor em cultura de células, cujo atividade biológica é limitada e crítica quanto ao entendimento dos seus potenciais efeitos.

Segundo Marcason (2009), os benefícios do açaí para a saúde estão parcialmente comprovados, sendo os efeitos antioxidante também observados em outros frutos e vegetais.

O papel dos polifenóis na regulação das funções celulares é conhecido através de mecanismos de desacetilação de proteínas histonas e não-histonas, incluindo fatores de transcrição do metabolismo, com efeitos na resistência à tensão, sobrevivência celular, senescência celular/envelhecimento, inflamação, função imunológica, funções endoteliais e ritmos circadianos. Polifenóis de ocorrência natural, como o resveratrol, curcumina, quercetina e catequinas, exercem atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, através de propriedades moduladoras de diferentes vias, tais como o NF- $\kappa$ B e mitogênio de proteína-quinase dependente de vias ativadas de sinalização (CHUNG *et al.*, 2010).

As plantas são ricas em agentes quimiopreventivos que têm um grande potencial para ser utilizado em quimioterapia para o câncer da mama dependente de hormônios, que pode servir como uma fonte para inibidores de aromatase (AI) natural. Os estudos sobre fitoquímicos como biochanina A, a genisteína, quercetina, isoliquiritigenin, resveratrol, relaciona o seu efeito na promoção da ativação da aromatase no câncer de mama e discutem o potencial inibitório da aromatase utilizado como agentes quimioterapêuticos mais seguros para o câncer de mama hormônio-dependente (KHAN, 2011).

Mediante os conhecimentos atuais frente aos agentes quimiopreventivos que têm um grande potencial para serem utilizados em quimioterapia para o câncer, analisa-se os efeitos dos extratos de juçara (*Euterpe oleracea* Mart.) nativa do Estado do Maranhão em diferentes linhagens de células malignas humanas, focando a promoção de morte celular.

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1. *Euterpe oleracea* Mart.

No Estado do Maranhão, *Euterpe oleracea* Mart., conhecida popularmente como juçara, faz parte da família botânica das palmáceas (SOUZA, 2003; NASCIMENTO; SILVA, 2005).

*Euterpe oleracea* Mart. (juçara) é uma baga globosa, fibrosa, contendo uma polpa oleaginosa e comestível, cuja semente possui o endocarpo duro e fibroso (DOS SANTOS *et al.*, 2008).

O Brasil se posiciona como maior produtor, consumidor e exportador de açaí, sendo os estados mais produtores, principalmente Pará, Maranhão, Acre e Rondônia, com expansão econômica para o sudoeste do país e alguns países da Europa, Estados Unidos, Japão e China (SOUTO, 2001; SILVA, 2002; MENEZES; TORRES; SRUR, 2008).

No Brasil, em 2010, a coleta do açaí registrou um total de 124. 421 toneladas, sendo que o Pará contribuiu com uma produção de 106. 562 (85,6%), seguindo-se o Maranhão com 10.930 (8,8%). Na região Nordeste, o Maranhão ocupa o 1º lugar na colheita de juçara, com um valor de quase 10 milhões de reais (IBGE, 2010).

O Maranhão apresenta um grande potencial extrativista vegetal, tendo a juçara ocupado o terceiro lugar em quantidade de coleta extrativa no Estado, perdendo apenas para o carvão vegetal e a amêndoa de babaçu (IBGE, 2010).

No Maranhão, as áreas de juçarais estão localizadas no Litoral Ocidental Norte, Baixada Ocidental e na Pré - Amazônia maranhense. A floresta ombrófila ocupa a porção noroeste do Estado do Maranhão, subdividindo-se em floresta ombrófila aluvial de platôs e submontana. Na primeira, encontram-se áreas mais úmidas dos vales onde se destacam as palmáceas (FEITOSA; TROVÃO, 2006).

O fruto da *Euterpe oleracea* Mart., palmeira indígena do Rio Amazonas, América do Sul, é comumente usado como alimentos e aditivos bem como na medicina popular (BAUMANN; WOOLERY-LLOYD; FRIEDMAN, 2009; PACHECO-PALENCIA *et al.*, 2008; PLOTKIN; BALICK, 1984; SABBE *et al.*, 2009).

Estudos fitoquímicos revelaram que o açaí contém numerosos tipos de compostos, particularmente, antocianinas, proantocianidinas e outros flavonóides (SCHAUSS *et al.*, 2006).

A polpa do açaí processada usualmente tem grande atividade antioxidante quando comparada com outras plantas comestíveis, particularmente contra radicais superóxidos e peróxidos (JENSEN *et al.*, 2008; SCHAUSS *et al.*, 2006).

As frações polifenólicas da polpa do açaí têm demonstrado redução da proliferação de células leucêmicas HL-60 através da ativação da caspase-3 que ativa a apoptose (DEL POZO-INSFRAN; PERCIVAL; TALCOTT, 2006).

A polpa do açaí pode diminuir a proliferação celular e o tamanho do tumor no câncer esofágico em modelos de roedores. Extratos hidroalcoólicos de açaí tem demonstrado efeito na dilatação do leito vascular. Contudo, os benefícios do extrato do fruto não têm sido demonstrados extensivamente *in vivo* em modelos animais nem propriamente os mecanismos de ação têm sido entendidos (STONER, 2009).

Os danos oxidativos de macromoléculas tende a se acumular na célula com o aumento na idade, sendo, portanto um fator causador do envelhecimento. Estratégias têm sido aplicadas para avaliar os polifenóis que tem propriedade de reduzir o dano oxidativo (COLAVITTI; FINKEL, 2005; PEREZ *et al.*, 2009).

Os frutos do açaí constituem suplemento nutricional popular que supostamente aumenta a função do sistema imunológico. Polifenóis semelhantes e frações de polissacarídeos são encontrados no açaí. Em experimentos *in vivo*, os polissacarídeos do açaí induzem o recrutamento de células mielóides e a produção de IL-12 (HOLDERNESS *et al.*, 2011).

Na medicina popular, a juçara é utilizada nas suas diferentes partes, como exemplos, o óleo do fruto como agente anti-diarreico (PLOTKIN; BALICK, 1984), a raiz em associação com *Carica papaya*, *Citrus* sp. (lemon) e *Quassia amara* como anti-malárico (VIGNERON *et al.*, 2005), e ainda como alimento funcional, dermocosméticos e até mesmo como nutracêutico (LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; COÏSSON *et al.*, 2005; AGRA *et al.*, 2007; LASLO *et al.*, 2012).

Além desses estudos, foi demonstrado que *Euterpe oleracea* possui um efeito vasodilatador, e que este efeito é dependente na ativação de via NO-GMPC e também pode envolver a liberação do fator de hiperpolarização, o que sugere uma possibilidade do uso do açaí como planta medicinal no tratamento de doenças cardiovasculares (ROCHA *et al.*, 2007).

### 1.1.1. Caracterização do fruto juçara e das frações fitoquímicas

Pessoa *et al.*, (2010) demonstraram que o mesocarpo do açaí (juçara) é constituído pela epiderme, parênquima externo, esclerênquima externa, parênquima de armazenamento e parênquima interno. Na compartimentalização do fruto, a epiderme e o parênquima externo são ricos em antocianinas e o parênquima de armazenamento é rico em lipídios. A epiderme e o parênquima externo representam a principal fonte das antocianinas e o parênquima interno de lipídeos. Estes autores, analisando histologicamente as secções em cortes transversais do fruto revelaram que as antocianinas na epiderme e no esclerênquima externo foram observadas através do microscópio por causa da sua cor natural.

Estudos realizados por Mulabagal e Calderón (2012), demonstraram que a análise de extratos de metanol do açaí, levou à identificação de ácidos fenólicos, antocianinas e polifenóis de não antocianina, cujos experimentos são úteis para a avaliação de autenticação e qualidade de suplementos alimentares deste fruto.

Mantovani, Fernandes e Menezes (2003), descreveram que a composição química do extrato hexânico do açaí não apresenta diferença química significativa na análise cromatográfica, demonstrando a predominância de ácidos graxos não saturados, especialmente o ácido oléico com 45,1%; 45,7%; 45,5% para pericarpo, endocarpo e fruto íntegro, respectivamente, seguido de ácido palmitoléico em menor grau (4,2%; 4,8%; 4,3% para pericarpo, endocarpo e fruto íntegro, compondo mais de 50% do total de ácidos graxos) (Tabela 2).

Tabela 2 - Descrição da composição química em ácidos graxos do pericarpo, endocarpo e dos frutos íntegros do açaí.

Parte do fruto	Substância	Concentração
pericarpo	Ácido Dodecanóico (C12:0)	3,6%
	Ácido Mirístico (C14:0)	4,4%
	Ácido Palmítico (C16:0)	9,7%
	Ácido Palmitoléico (C16:1)	4,2%
	Ácido Esteárico (C18:0)	10,6%
	Ácido Oléico (C18:1)	45,1%
endocarpo	Ácido Dodecanóico (C12:0)	3,5%
	Ácido Mirístico (C14:0)	4,7%
	Ácido Palmítico (C16:0)	9,3%
	Ácido Palmitoléico (C16:1)	4,8%
	Ácido Esteárico (C18:0)	10,2%
	Ácido Oléico (C18:1)	45,7%
frutos íntegros	Ácido Dodecanóico (C12:0)	3,7%
	Ácido Mirístico (C14:0)	4,2%
	Ácido Palmítico (C16:0)	9,5 %
	Ácido Palmitoléico (C16:1)	4,3%
	Ácido Esteárico (C18:0)	10,7%
	Ácido Oléico (C18:1)	45,5%

Fonte: Adaptado de Mantovani, Fernandes e Menezes (2003)

## 1.2. Polifenóis

Os polifenóis constituem um grupo heterogêneo, composto de várias classes de substâncias com propriedade antioxidante (SURH, 2003).

Os flavonóides representam o mais potente antioxidante entre os polifenóis (SCALBERT; WILLIANSO, 2000). Neste grupo encontram-se as antocianinas, flavonóis, flavonas, auronas, chalconas e isoflavonas dependendo do lugar, número e combinação da molécula (SCALBERT; WILLIANSO, 2000; SOARES DE MOURA, 2002). Os flavonóides são considerados os mais potentes antioxidantes entre os compostos fenólicos (SHAHID; JANITHA; WANASUNDARA, 1992; SOOBRAATTEE *et al.*, 2005). A sub-classe de flavonóides chamada de

antocianinas é responsável pela coloração vermelha, azul e roxa de muitas frutas e vegetais, flores e outros tecidos de plantas ou produtos (MAZZA, 2007).

Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativos produzidos naturalmente no organismo. Fatores ambientais como radiação, poluição e tabagismo, podem levar a formação de mais radicais livres, resultando em um estresse oxidativo (SURH, 2003).

Esse processo pode ser prejudicial à saúde, por causar a oxidação das células, podendo desenvolver diversas patologias tais como diabetes, câncer e aterosclerose. Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, inibindo os radicais livres e prevenindo a formação de doenças, contribuindo, dessa maneira, para uma maior longevidade. Desta forma, torna-se essencial o equilíbrio entre os radicais livres e o sistema de defesa antioxidante.

A quimioprevenção se refere à utilização de agentes que podem inibir, reverter ou retardar o processo de tumorigênese. Tem sido demonstrado que inúmeros agentes fitoquímicos derivados de plantas comestíveis possuem ação quimiopreventiva (SURH, 2003).

Diversos estudos populacionais caso-controle e de coorte demonstram que pessoas que consomem cerca de cinco porções de frutas e vegetais por dia têm aproximadamente metade do risco de desenvolver câncer em comparação com aquelas que consomem menos de duas porções (SURH, 2003).

O consumo de alimentos ricos em polifenóis, especialmente as antocianinas, foi associado com a boa saúde, mas os mecanismos que contribuem para estes efeitos salutares ainda não foram totalmente estabelecidos. Traustadóttir *et al.*, (2009), avaliaram que o consumo de suco de cereja contendo altos níveis de antocianinas melhorava a capacidade de idosos em resistir a danos durante o estresse oxidativo agudo.

A atividade antioxidante de compostos bioativos, em geral, tem recebido muita atenção dos pesquisadores. Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas naturalmente no organismo de mamíferos, como resultado do metabolismo oxidativo. Contudo, podem causar danos celulares às membranas e DNA, propiciando mutações que podem desencadear a carcinogênese. Além disso, pode ocorrer a oxidação de lipoproteína de baixa densidade, e, assim, pode ser considerada um dos principais fatores de promoção de doenças, participando da aterogênese (RAHMAN; ADCOCK, 2006).

Cada vez mais, buscam-se nos alimentos substâncias capazes de ajudar a combater processo oxidativo do organismo. Esse efeito protetor é atribuído aos compostos presentes em alguns alimentos, como na uva, destacando-se os polifenóis (VARGAS; HOELZEL; ROSA, 2008).

As atividades antiproliferativas e pró-apoptóticas da polpa integral do açaí foram avaliadas em células HL-60. Foram comparadas às frações fitoquímicas individuais do açaí para avaliar as propriedades bioativas gerais da polpa integral. As atividades citostáticas observadas foram comparadas com aglicona quercetina, um composto de polifenóis com forte atividade antiproliferativa em várias linhagens celulares de câncer. Estes autores avaliaram a hipótese de que as propriedades de cada extrato bioativo foram influenciados por diversos fatores, incluindo concentrações e formas de fitoquímicos individual, as interações entre componentes de frutas, e as propriedades da matriz alimentar (DEL POZO-INSFRAN; PERCIVAL; TALCOTT, 2006).

Outros estudos também relataram que importantes efeitos antagônicos, sinérgicos ou aditivos ocorreram quando misturas individuais dos polifenóis foram expostas juntas em sistemas biológicos e que, possivelmente, a mistura de diferentes fitoquímicos dos frutos e extratos vegetais integrais, formando fitocomplexo e não os compostos isolados podem ser os responsáveis pelos benefícios à saúde observados e relatados em estudos epidemiológicos e clínicos (DEL POZO-INSFRAN; PERCIVAL; TALCOTT, 2006).

### 1.2.1. Quimioprevenção e o câncer

Evidências sugerem que os pequenos frutos silvestres comestíveis têm efeitos benéficos contra vários tipos de cânceres humanos. O potencial anticancerígeno das polpas em geral foi relacionado, pelo menos em parte, aos numerosos fitoquímicos bioativos que estão contidos em frutas coloridas, incluindo os polifenóis (flavonóides, proantocianidinas, elagitaninos, galotaninos, ácidos fenólicos), estilbenóis, lignanas e triterpenóides (SEERAM, 2008a).

Estudos mostram que os efeitos anticancerígenos da polpa são parcialmente mediados através de suas habilidades para combater, reduzir, e

também reparar danos resultantes de estresse oxidativo e inflamação. Além disso, compostos bioativos da polpa também regulam enzimas do metabolismo de xenobióticos, transcrição e vários fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, e vias de sinalização da proliferação da célula cancerosa, apoptose e angiogênese do tumor (SEERAM, 2008b).

Compostos fitoquímicos sensibilizam as células tumorais aos quimioterápicos por vias que levam à inibição da resistência ao tratamento. Embora uma grande variedade de frutos vermelhos seja consumida em todo o mundo, na América do Norte são consumidos amoras, framboesas pretas, cerejas, framboesas vermelhas, e morangos. Grande número de estudo sobre compostos bioativos isolados purificados da polpa estão disponíveis, mas os estudos estão focados em “fruto inteiros” por si só, isto é, como extratos e frações purificadas da polpa. Os mecanismos potenciais de ação anticâncer e biodisponibilidade de compostos fenólicos da polpa demonstram ainda lacunas nos conhecimentos e recomendações para pesquisas futuras da polpa (SEERAM, 2008b).

As framboesas pretas foram testadas para inibir múltiplos estágios do câncer de boca, esôfago e cólon, com objetivo de avaliar a atividade antiproliferativa utilizando um modelo *in vitro* de células de câncer HT-29. A proliferação celular foi significativamente influenciada pelo cultivo, local de produção e estágio de maturidade do fruto. A falta de correlação entre a inibição do crescimento em extratos de fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais sugeriu bioatividade com influência de parâmetros hortícolas, de forma complexa que representa o controle de produção dos frutos (JOHNSON *et al.*, 2011).

A indução de apoptose por drogas demonstram principalmente efeitos de quimioprevenção. Os agentes quimiopreventivos podem ser considerados como compostos farmacológicos que interagem com diversos receptores biológicos, os quais podem reduzir o risco para o desenvolvimento do câncer e também causar outros efeitos devido ao impacto nas diversas atividades fisiológicas (PARKIN; FERNANDEZ, 2006).

Esta noção também se aplica para as substâncias aparentemente naturais que podem ser encontradas nos gêneros alimentícios que usam doses maiores do que as de consumo. Contudo, os ensaios têm sido montados para esclarecer realmente a atividade anticâncer sugerida por investigação básica e estudos observacionais (PARKIN; FERNANDEZ, 2006).

Segundo, Alink *et al.*, (2008), avaliando a segurança nutricional de plantas geneticamente modificadas e alimentos derivados destas, mostraram que vários elementos da segurança do procedimento e de avaliação nutricional de alimentos derivados de plantas e alimentos, tem em particular o potencial e as limitações de testes.

Os estudos acerca do consumo de frutas e hortaliças realizados por Brown *et al.*, (2011), demonstraram que a diminuição do risco de vários cânceres está associada com estes alimentos, especificamente o câncer colo retal, possivelmente ligados ao seu teor de fitoquímicos, que é de interesse devido a vários benefícios propostos à saúde, incluindo o potencial de atividade anticâncer. Dados epidemiológicos sugerem que os cânceres do aparelho digestivo são mais suscetíveis a modificação da dieta, possivelmente devido a estarem em contacto direto com os componentes bioativos de alimentos.

Os berries constituem elementos comuns nas dietas ocidentais. Estes frutos vermelhos são ricos em fitoquímicos bioativos, incluindo várias classes de compostos fenólicos como os flavonoides, embora existam poucos dados que ligam o risco do consumo da polpa à redução de câncer colorretal (OH, 2011).

As provas *in vitro* a partir de modelos que representam o câncer colorretal sugerem que os polifenóis da polpa podem modular processos celulares essenciais para a sobrevivência da célula cancerosa, como a proliferação e apoptose. Os mecanismos exatos e componentes da polpa responsável por estas atividades anticâncer em potencial permanecem desconhecidos, mas o uso de modelos *in vitro* fornece um meio para elucidar estas questões (BROWN *et al.*, 2011).

A carcinogênese é um processo longo que poderia levar de 10-30 anos para se desenvolver a partir de células iniciadas até o câncer avançado e metastático. É um evento de muitas etapas, composto por três diferentes fases, incluindo a iniciação, promoção, e progressão (CHEUNG; KONG, 2010).

Crescentes evidências epidemiológicas e de estudos patológicos sugerem que o câncer poderia ser evitado ou sua progressão poderia ser interrompida. Neste contexto, a prevenção do câncer pelo uso dos recursos naturais ou compostos sintéticos tem sido descrita como quimioprevenção, ou seja, compostos quimiopreventivos poderiam alvejar a fase de abertura de carcinogênese, ou interrompendo a promoção e progressão de câncer ou de suas combinações (HANAUSEK; WALASZEK; SLAGA, 2003).

Por outro lado, compostos quimiopreventivos também podem fazer a inibição da promoção e progressão da carcinogênese, interferindo em várias vias de sinalização envolvendo a diminuição do estresse oxidativo, inflamação e a proliferação celular (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004).

Vários estudos têm demonstrado que muitos compostos dietéticos naturais podem modular potencialmente os alvos moleculares, envolvidos na prevenção da iniciação do câncer, da promoção e progressão, incluindo-se as frutas e legumes na dieta, que tem sido considerados como fontes ricas de compostos quimiopreventivos, os quais são amplamente investigados devido à sua baixa toxicidade e significativa eficácia (JEONG; KONG, 2005).

Numerosos fitoquímicos têm demonstrado interferência nos estágios do processo da carcinogênese conforme visto na Figura 1 citada por Surh (2003), o qual evidencia que os agentes fitoterápicos podem promover detoxificação de agentes carcinógenos.

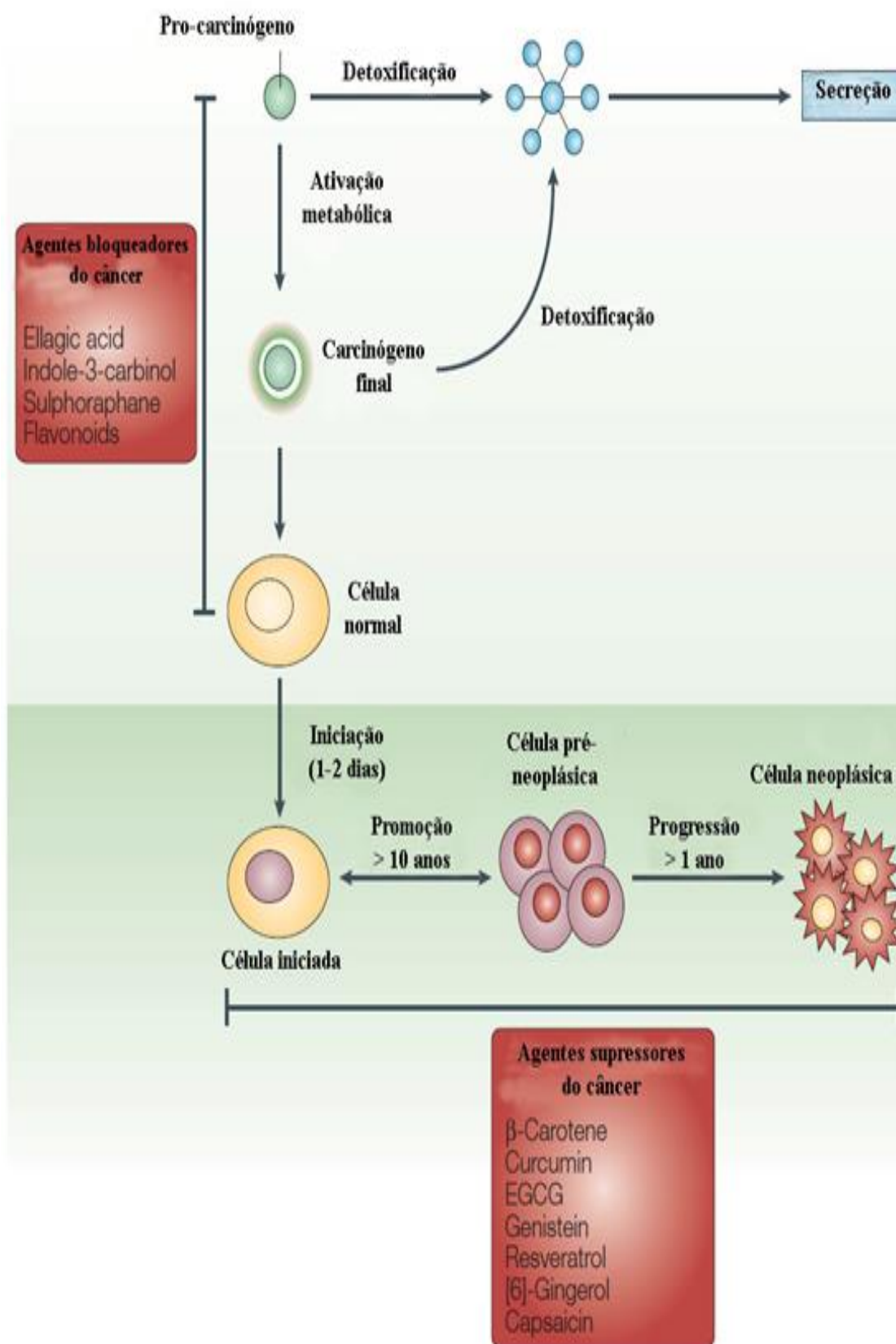
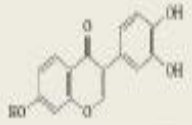
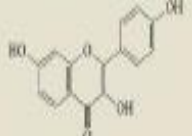
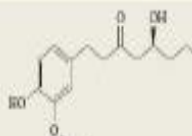
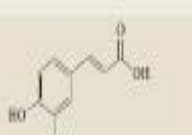
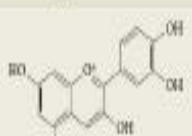
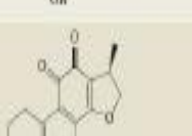

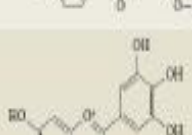
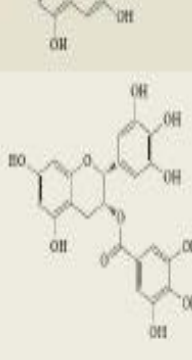


Figura 1 - Fitoquímicos dietéticos que bloqueiam ou suprimem vários estágios da carcinogênese. Adaptado de Surh, (2003).

Polifenóis inibem a proliferação celular, induzem apoptose, alteram a cinética do ciclo celular e interferem na transdução de sinal, *in vitro* em células de câncer. Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que lhes confere o poder antioxidante representam os compostos polifenólicos naturais ou sintéticos. Quando presentes em vegetais podem estar em formas livres ou formando complexos com açúcares e proteínas. Entre os quais destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os antioxidantes fenólicos mais comuns de fonte natural (SEERAM, 2008b).

Os mecanismos de quimioprevenção por fitoquímicos podem bloquear ou reverter estágios pré-maligno (iniciação e promoção) como demonstrado nas Figuras 2 e 3.

FITOQUÍMICO	ESTRUTURA QUÍMICA	ALVOS MOLECULARES	EFEITO QUIMIOPREVENTIVO
3',4',7-trihydroxyflavone		PI3K  Ciclina-dependente de quinase 2 e 4 (Cdk2 e 4)	Proliferação celular induzida por EGF
5-dicoumarilferol		SRC  Ribossomal S6 quinase 2 (RSK2)  PI3K	Carcinogênese induzida por radiação UVB.  Expressão de COX-2 e VEGF induzida por radiação UVB.
6-gingerol		Leucotrieno A <sub>2</sub> hidrolase (LTA <sub>4</sub> H)	Tumores induzidos por células da linhagem de câncer colo retal HCT-116.
Caffeic acid		FYN	Expressão de COX-2 induzida por radiação UVB.
Cyanidin		RAF  Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4)  MEK1	Expressão de COX-2 induzida por radiação UVB.
Cryptotanshinone		Signal transducer and activator of transcription 3	Proliferação de células de câncer de próstata
Deguelin		Heat shock protein 90	Tumores induzidos por células da linhagem de câncer colo retal HCT-116.
Delphinidin		FYN  RAF  MEK1  ERK2  MKK4  PI3K	Expressão de COX-2 induzida por TNF $\alpha$  Transformação celular induzida por TPA  Expressão de COX-2 induzida por radiação UVB.
(-)-Epigallocatechin gallate		FYN  Insulin-like growth factor 1 receptor  Glucose-regulated protein 78  Heat shock protein 90  $\zeta$ -chain-associated protein kinase 70  Rac-GTPase-activating protein 5H) domain-binding protein 1	Transformação celular induzida por EGF  Proliferação e transformação celular  Morte de células de câncer de mama e resistência à drogas induzida por etoposídeo  Indução de genes mediado por TCDD em células de hepatoma  Proliferação leucêmica  Crescimento independente de ancoragem de linhagens de câncer de mama

Fitoquímicos e seus alvos moleculares:

Gengibre



Chá verde

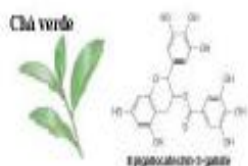
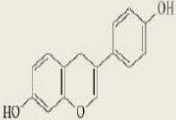
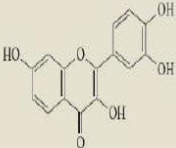
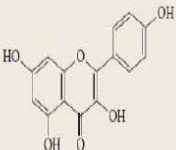
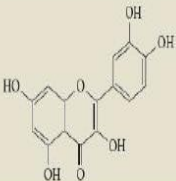
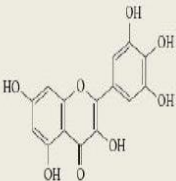
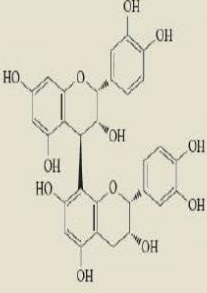
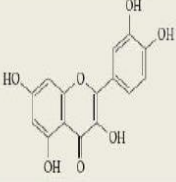
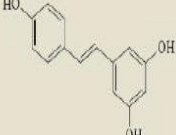


Figura 2 - Fitoquímicos quimiopreventivos e suas fontes dietéticas. Adaptado de: Lee, Bode e Dong (2011); Surh, (2003).

FITOQUÍMICO	ESTRUTURA QUÍMICA	ALVO MOLECULAR	EFEITO QUIMIOPREVENTIVO
Equol		MEK1	Transformação celular induzida por TPA
Fisetin		CDK6	Atividade quinase
Kaempferol		SRC	Carcinogênese induzida por radiação UVB
		RSK2	Proliferação de células tumorais mediada por RSK2
		PI3K	Transformação celular induzida por EGF
Luteolin		SRC	Carcinogênese induzida por radiação UVB
		Protein kinase C $\epsilon$	
Myricetin		FYN	Carcinogênese induzida por radiação UVB
		RAF	Expressão e atividade de MMP-9 induzida por radiação UVB
		MKK4	Expressão de VEGF induzida por TNF $\alpha$
		MEK1	Transformação celular induzida por EGF ou TPA
		PI3K	Angiogênese induzida por radiação UVB
Janus kinase 1	Transformação celular		
Procyanidin B2		MEK1	Transformação celular induzida por TPA
Quercetin		RAF	Transformação celular induzida por TPA
		MEK1	
		PI3K	Atividade de MMP-9 induzida por radiação TNF $\alpha$
			Expressão de COX-2 induzida por arsenito
Resveratrol		COX2	Proliferação de células de câncer colo-retal
		LTA $_4$ H	Volume do enxerto de células tumorais pancreáticas

Fitoquímicos e seus alvos moleculares:

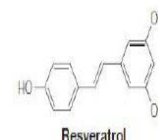


Figura 3 - Outros fitoquímicos quimiopreventivos e suas fontes dietéticas. Adaptado de: Lee; Bode; Dong., (2011) e Surh (2003).

Muitas alterações moleculares que estão associadas com a carcinogênese ocorrem nas vias de sinalização que regulam a diferenciação e proliferação celular, como observado na Figura 4.

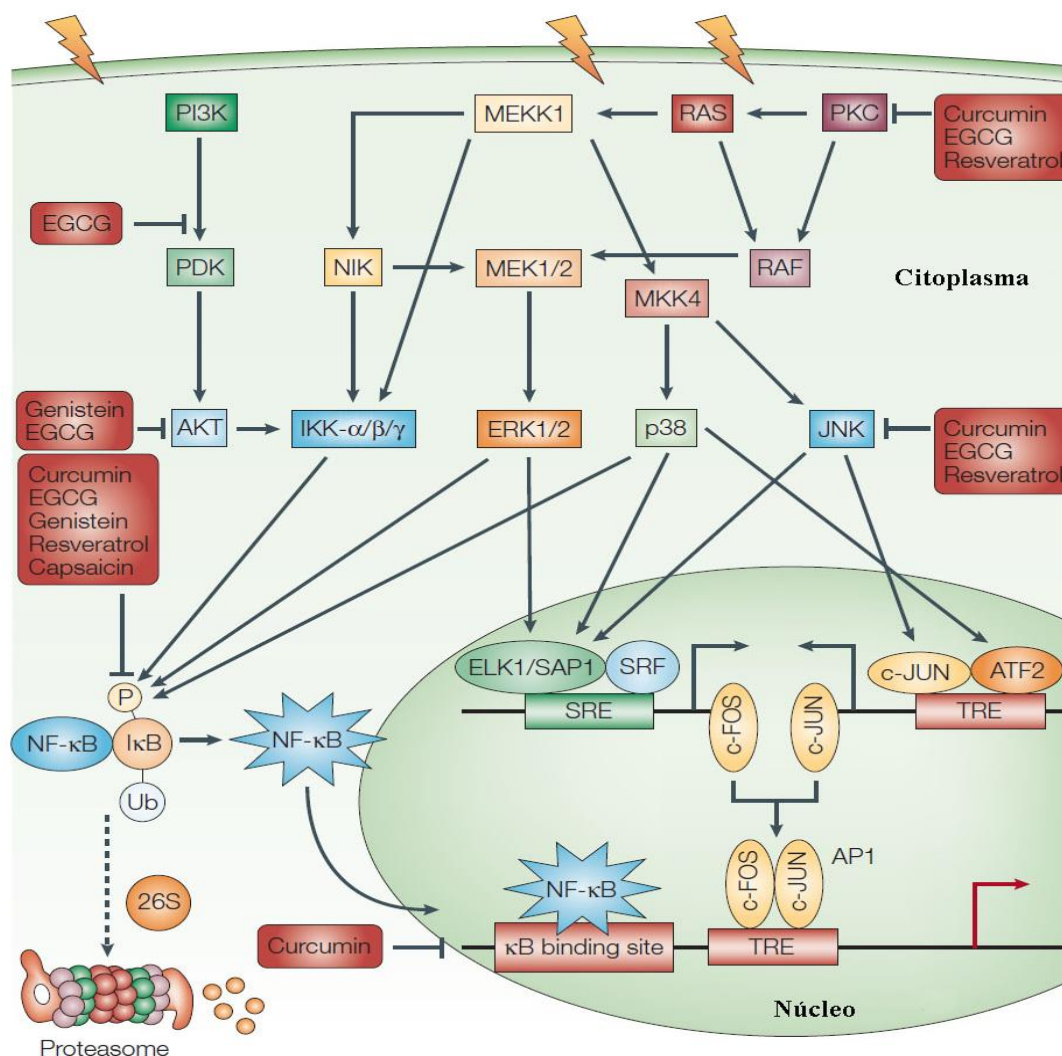


Figura 4 - Efeito de fitoquímicos na ativação de NF-κB e AP1. Adaptado de Surh (2003).

O crescimento e a aderência entre células segundo, Walsh e Damajanovski (2011), resulta da interação entre o IGF-1, uma molécula conhecida por ser elevada no câncer da mama como reguladora da atividade da metaloproteinase da matriz e o potencial invasivo de células MCF-7.

### 1.2.2. Drogas antineoplásicas derivadas de plantas

Os produtos naturais têm sido o esteio da quimioterapia antineoplásica nos últimos 40 anos. Com a aplicação da epigenética, o ritmo acelerado na identificação de genes, e o surgimento de novas tecnologias química, tem proporcionado o surgimento de uma gama de novas drogas totalmente sintéticas. De acordo com Mann (2002) e Cragg; Newman; Snader, (1997). O futuro da quimioterapia antineoplásica inclui os produtos naturais que compreendem cerca de 60% das drogas que são usados para o câncer.

Os agentes derivados de plantas, tais como o taxol, vincristina, vinblastina, e a camptotecina topotecan, irinotecan e etoposido estão em uso clínico globalmente (MOHANTY; COCK, 2012; SHOEB, 2006).

Um dos exemplos mais importantes de drogas antineoplásicas derivadas de plantas é o paclitaxel, isolado em 1967 da casca da espécie *Taxus brevifolia*. É um potente antimitótico atuando nos microtúbulos da célula impedindo que esta se divida (BRANDÃO *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2011). Similar ao paclitaxel, o docetaxel é um taxano derivado de *Taxus baccata* que age inibindo a polimerização da tubulina, impedindo a divisão celular. É utilizado no tratamento de diversas neoplasias malignas (LEE *et al.*, 2011).

O irinotecano é um derivado semi-sintético da camptotecina, um alcalóide extraído de árvores da espécie *Camptotheca acuminata* e *Nothapodytes foetida*. O irinotecano é um inibidor da topoisomerase e é indicado no tratamento de carcinomas metastáticos do cólon e reto (LEE *et al.*, 2011). Outro derivado semi-sintético da camptotecina é o cloridrato de topotecano, inibidor da topoisomerase utilizado no tratamento do câncer de ovário, cervical e câncer de pulmão de células pequenas (LEE *et al.*, 2011).

A droga etoposídeo é um derivado semi-sintético da podofilotoxina, toxina derivada de *Podophyllum peltatum*. É um inibidor da topoisomerase utilizado no tratamento de tumores testiculares e de tumores pulmonares de pequenas células (LEE *et al.*, 2011).

O vinorelbine, um alcaloide semi-sintético produzido a partir de extratos de *Catharanthus roseus* é um antineoplásico citostático inibidor da polimerização da tubulina (LEVÊQUE; JEHL, 1996; BODE; DONG, 2009; LEE *et al.* 2011). Também

extraído de *Catharanthus roseus*, a vinblastina é um alcalóide que inibe a polimerização das proteínas do fuso mitótico, parando a divisão celular na metáfase (BODE; DONG, 2009; LEE *et al.*, 2011).

A Tabela 3 resume algumas das drogas derivadas de plantas com os respectivos alvos moleculares e indicação terapêutica.

Diversas proteínas têm sido identificadas como alvos de substâncias fitoquímicas. Algumas destas proteínas pertencem a importantes vias de sinalização que quando alteradas favorecem o surgimento de neoplasias. Alguns exemplos destas vias de sinalização incluem a via da MAPK, via PI3K/AKT e proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular como as ciclinas e a proteína p53.

Tabela 3 - Exemplos de fitoquímicos e seus alvos moleculares.

<b>FITOQUÍMICO</b>	<b>ALVO MOLECULAR</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
CIANIDINA	RAF, MEK1, MKK4	Lazzè <i>et al.</i> , 2004; Kim <i>et al.</i> , 2010
DELFINIDINA	FYN, RAF, MEK1, ERKS, MKK4, PI3K	Hwang <i>et al.</i> , 2009; Kwon <i>et al.</i> , 2009
EQUOL	MEK1, ER	Kang <i>et al.</i> , 2007; Cavallini; Rossi, 2009
KAEMPFEROL	SRS, PI3K	Lee <i>et al.</i> , 2010a, Lee <i>et al.</i> , 2010b.
RESVERATROL	COX2, PPAR, eNOS	Oshima <i>et al.</i> , 1996, ; Subbaramaiah <i>et al.</i> , 1998; Nakata <i>et al.</i> , 2012
QUERCETINA	ERK, MEK 1 e Raf1	Lee <i>et al.</i> , 2008

Adaptado de Lee *et al.*, 2011

Desde o século XX houve um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais, no campo da oncologia, a qual vem propiciando a descoberta de alvos proteicos utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de novas drogas antineoplásicas envolve esforço multidisciplinar na descoberta de moléculas naturais bem como a otimização através da aplicação de técnicas de síntese, química combinatória e bioquímica, fundamentando os estudos biológicos (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

As antocianinas são compostos fitoquímicos abundantes em vegetais de coloração escura que vão do vermelho-alaranjado, ao vermelho vivo, roxo e azul. A cianidina, malvidina, peonidina, petunidina e delphinidina são exemplos de antocianinas que vem sendo reconhecidas por sua atividade anticancer e por outros efeitos benéficos para a saúde humana. Estão presentes em plantas como o açaí,

berinjela, romã, uva, cereja, jamelão, morango, amora, figo e cacau (DUTHIE, 2007; SEERAM, 2010; STONER, 2009).

Estudos demonstram que as antocianinas têm como alvo proteínas das vias de sinalização Notch, Wnt, MAPK e PI3K, vias estas que se encontram alteradas no câncer (KAUSAR *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2010).

O equol é um isoflavandiol metabolizado a partir da daidzeína, uma isoflavona que como outras isoflavonas, a exemplo da genisteína, está presente em alimentos a base de soja (CAVALLINI; ROSSI, 2009). É reconhecido os inúmeros efeitos benéficos das isoflavonas à saúde humana. Esta classe de compostos apresenta semelhança estrutural com o hormônio feminino estradiol e outros hormônios esteroidais, exercendo efeito protetor em relação às doenças hormônio-dependentes como a osteoporose, o câncer de mama e de próstata, podendo ser utilizada como uma alternativa natural de terapia hormonal para mulheres pré e pós-menopausadas (MESSINA, 2000; BRANCA, 2003; BEMIS *et al.*, 2004; SETCHELL, 2006).

O kaempferol é um flavonóide presente em diversas plantas comestíveis como brócolis, repolho, couve, feijão, escarola, alho-poró, tomate, morangos e uvas. Estudos epidemiológicos demonstraram uma associação positiva entre o consumo de alimentos ricos em kaempferol e o risco reduzido de desenvolvimento de câncer (LEE *et al.*, 2010a; LEE *et al.*, 2010b; CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011).

Estudos pré-clínicos demonstraram que o kaempferol possui uma gama de propriedades farmacológicas incluindo atividade antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana, anticâncer, cardioprotetora, neuroprotetora, antidiabética, antiestrogênica, ansiolítica, analgésica e antialérgica (LEE *et al.*, 2010a; LEE *et al.*, 2010b; CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011).

Lee *et al.*, (2010a) e (2010b) observaram o mecanismo de ação do antiinflamatório e verificaram que o kaempferol inibiu a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) induzidas por radiação UV em uma linhagem epidermal de pele de camundongos (JB6 P+). Esta inibição se deu pela diminuição da fosforilação de diferentes proteínas da via MAPK, incluindo ERK, p38, JNKs e Src. O mesmo autor demonstrou que o kaempferol inibiu a transformação neoplásica induzida pelo fator de crescimento epidermal (EGF) na linhagem JB6 P+ através da inibição da atividade da proteína PI3K.

O resveratrol é um polifenol que pode ser encontrado principalmente nas sementes de uvas, na película das uvas pretas e no vinho tinto. Possui reconhecido

potencial antihipertensivo e antitumorigênico (NAKATA; TAKAHASHI; INOUE, 2012; VASANTHI *et al.*, 2012). Seu potencial quimiopreventivo se dá através da inibição de COX2, ativação de PPAR (receptor de proliferação de peroxissomos), indução da enzima endotelial óxido nítrico sintetase (e NOS) e outros (OSHIMA *et al.*, 1996; SUBBARAMAIAH *et al.*, 1998; NAKATA; TAKAHASHI; INOUE, 2012).

Assim como o resveratrol, a quercetina é um polifenol de reconhecido potencial antihipertensivo e antitumorigênico (LEE *et al.*, 2008; RODRIGO *et al.*, 2012). É encontrado em alimentos como maçãs, cebolas, chá, brócolis e vinho tinto. Lee *et al.* (2008), observaram que o extrato bruto de vinho tinto e a quercetina inibiram as proteínas ERK, MEK 1 e Raf1 pertencentes a via MAPK atenuando a transformação tumoral induzida por TPA em linhagens de célula de camundongo. A quercetina se mostrou um inibidor de MEK1 mais potente do que seu inibidor farmacológico PD098059.

Na Figura 5 podem ser observadas algumas vias de sinalização que estão frequentemente alteradas em células tumorais. Estas vias são denominadas oncogênicas por estarem envolvidas com a progressão do câncer (LEE *et al.*, 2011). Como foi explicitado nos parágrafos anteriores, diversas substâncias fitoquímicas ou derivadas destas têm como alvo molecular proteínas que compõem estas vias de sinalização e, portanto, tem a capacidade de impedir ou prejudicar a progressão do tumor.

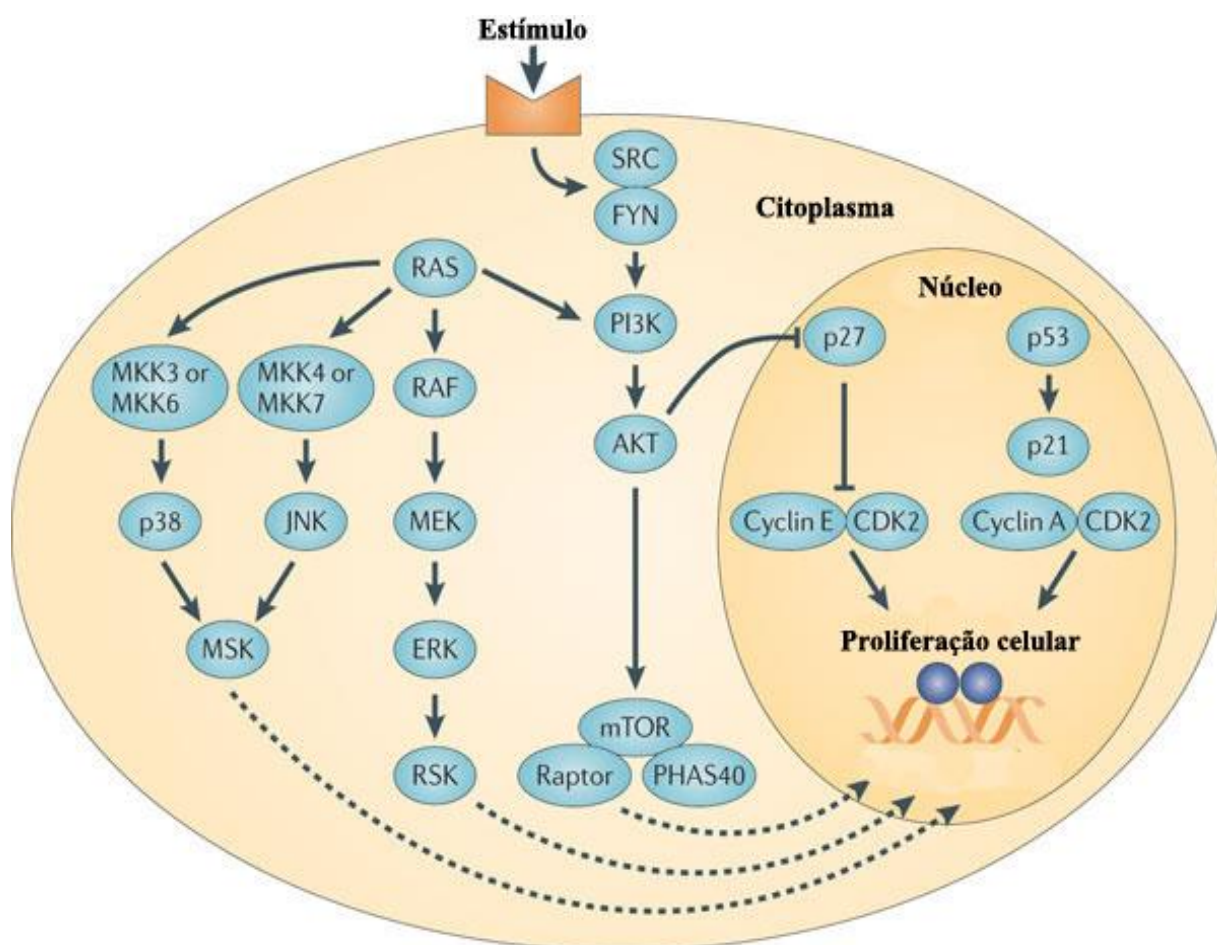


Figura 5 - Vias representativas de sinalização oncogênica. Adaptado de: Lee, Bode e Dong (2011).

### 1.3. Epidemiologia do câncer de mama

Cavalli (2006), baseado nas taxas mais recentes estimadas para incidência de câncer e a projetada demograficamente para o próximo meio século, os 11 milhões de casos de câncer diagnosticados em 2002 chegarão acerca de 17 milhões em 2020 e 27 milhões de 2050, sendo que dois terços dos casos de câncer previsto para 2050 ocorrerão em países de baixa renda. Apesar do intervalo de 20 anos, a proporção dos casos foi semelhante nos países desenvolvidos e nos em desenvolvimento.

Considerando-se a variabilidade dos tipos de cancer, o esperado aumento do risco será muito mais elevado do que 1% anualmente, especialmente em países de baixa renda (COLDITZ; SELLERS; TRAPIDO, 2006).

Bray e Moller (2006), verificaram que o risco de mortalidade por câncer, tumores relacionados a estilos de vida (o câncer de mama) e ligadas à pobreza (o câncer de colo uterino) elevou porque ocorreu aumento da expectativa de vida nos países em desenvolvimento. Em países de baixa renda e destes, alguns terão estrutura demográfica semelhante aos países ocidentais, demonstrando importância, para a estimativa de 2050 quando três em cada cinco casos de câncer ocorrerão em idosos, em comparação com dois em cinco no início deste século.

Danaie et al. (2005), demonstraram que as mortes atribuíveis à modificações de fatores de risco potencialmente comportamentais e ambientais se tornaram mais importantes em países de baixa renda, em comparação com regiões mais desenvolvidas.

A mais relevante diferença entre os países em desenvolvimento e os desenvolvidos encontra-se na detecção precoce e tratamento. A detecção precoce permanece indefinida para a maioria da população sem recursos apropriados (KATIKIREDDI, 2004).

Tirelli; de Castro; Awada, (2006), verificaram que as diferenças globais nos resultados dos dados epidemiológicos é cada vez crescente. Os sistemas de saúde de muitos países com poucos recursos econômicos sofrem profunda crise, o que torna o diagnóstico e o tratamento para a maioria dos tumores cada vez mais sofisticados e sobretudo de elevado custo.

A partir de estudos europeus verificou-se que a estimativa da redução da mortalidade por câncer de mama é de 25-31% para as mulheres convidadas para a triagem, e 38-48% para as mulheres realmente selecionadas. Grande parte da polêmica atual sobre o rastreamento do câncer da mama é devido ao uso inadequado de abordagens metodológicas que são incapazes de captar o verdadeiro efeito do rastreamento mamográfico (BROEDERS *et al.*, 2012).

O câncer da mama é o tipo de câncer que mais acomete às mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Cerca de 1,4 milhões de casos novos dessa neoplasia foram esperados para o ano de 2008 em todo o mundo, o que representa 23% de todos os tipos de câncer.

Anualmente, mais de 411.000 mortes são devido ao câncer de mama, representando mais de 1,6% de mortes por todas as causas no sexo feminino (BOILE; LEVIN, 2008).

Apesar dos grandes avanços científicos na gestão do câncer de mama, a maioria das nações do mundo enfrenta dificuldades que limitam a sua capacidade de melhorar a detecção precoce, diagnóstico e tratamento da doença (HISHAM; YIP, 2003).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, foram válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema de câncer no país (INCA, 2011).

Em 2012, estimava-se, para o Brasil, 52.680 casos novos de câncer da mama, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres sendo, esse tipo de câncer também o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste (69/100 mil), seguindo-se da região Sul (65/100 mil), Centro-Oeste (48/100 mil) e Nordeste (32/100 mil). Na região Norte é o segundo tumor mais incidente (19/100 mil) (INCA, 2011).

Estudos epidemiológicos vêm consistentemente aumentando o conhecimento sobre o benefício da ingestão de frutos e vegetais bem como a relação com a redução do risco no desenvolvimento do câncer. A investigação de novos agentes alternativos para a prevenção e tratamento do câncer de mama se torna necessário (SUN *et al.*, 2006). Estes autores estudaram o potencial da atividade antiproliferativa em células malignas, tendo verificado a associação da inibição na progressão do ciclo celular, dando suporte à continuidade das investigações da ingestão de vegetais, considerando o sinergismo dos mecanismos observados entre dieta e doenças crônicas como o câncer.

Mediante a revisão apresentada, expondo a importância da pesquisa em produtos naturais na promoção da saúde, ressalta-se neste estudo a análise dos efeitos citotóxicos dos extratos de juçara (*Euterpe oleracea* Mart.) nativa do Estado do Maranhão em diferentes linhagens de células malignas humanas com a perspectiva de mais um opção na quimioprevenção no câncer.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos citotóxicos dos extratos do fruto de juçara (*Euterpe oleracea* Mart.) nativa do Estado do Maranhão em diferentes linhagens de células malignas humanas.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Obter o extrato hidroalcoólico da casca, caroço e fruto total da juçara;
- Quantificar os polifenóis nos extratos da casca, caroço e fruto total da juçara;
- Avaliar a viabilidade das células, a morfologia e morte celular após o tratamento das linhagens celulares com os extratos de juçara.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Área da pesquisa

No Estado do Maranhão, o município de São Luís está localizado na porção centro-ocidental e sul da ilha de São Luís. Encontra-se na mesorregião Norte Maranhense e microrregião Aglomeração Urbana de São Luís, com uma extensão territorial aproximada de 835 Km<sup>2</sup>.

Por sua vez a população da cidade de São Luís é de 1.014.837 habitantes (IBGE, 2010).

No município de São Luís, encontra-se uma Área de Proteção Ambiental (APA) denominada Parque Ecológico do Maracanã, onde se localiza o Parque da Juçara, onde se encontram as principais áreas de juçarais (mesorregião norte maranhense; mesorregião oeste maranhense compreendendo a Baixada maranhense, Litoral ocidental norte e Pré-Amazônia maranhense) (RIOS, 2001; FEITOSA; TROVÃO, 2006). (Figura 6 e 7).

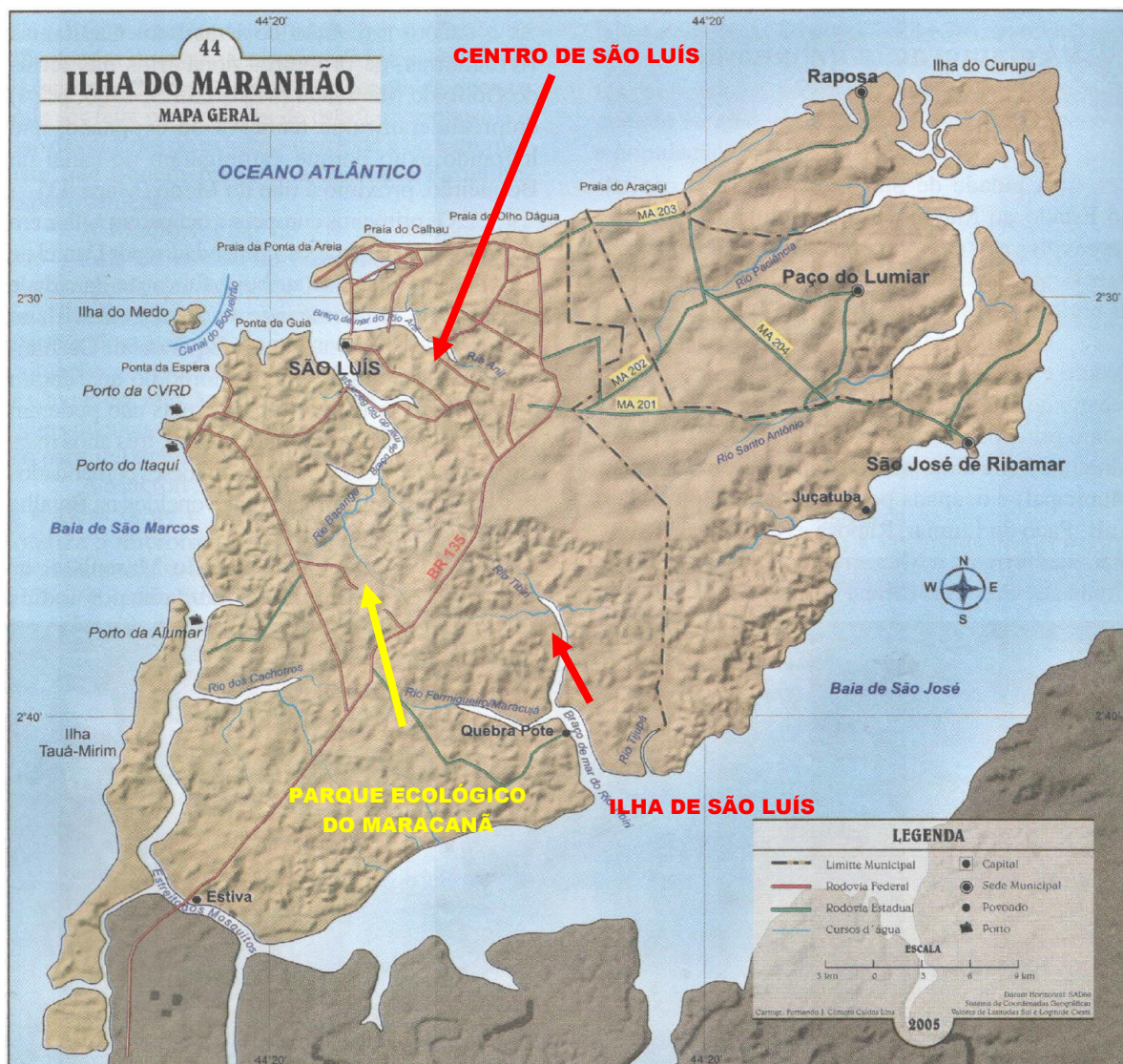


Figura 6 - Mapa da Ilha de São Luís - MA evidenciando o Parque da Juçara, Barro do Maracanã – área de juçarais. Adaptado de Feitosa e Trovão, 2006.

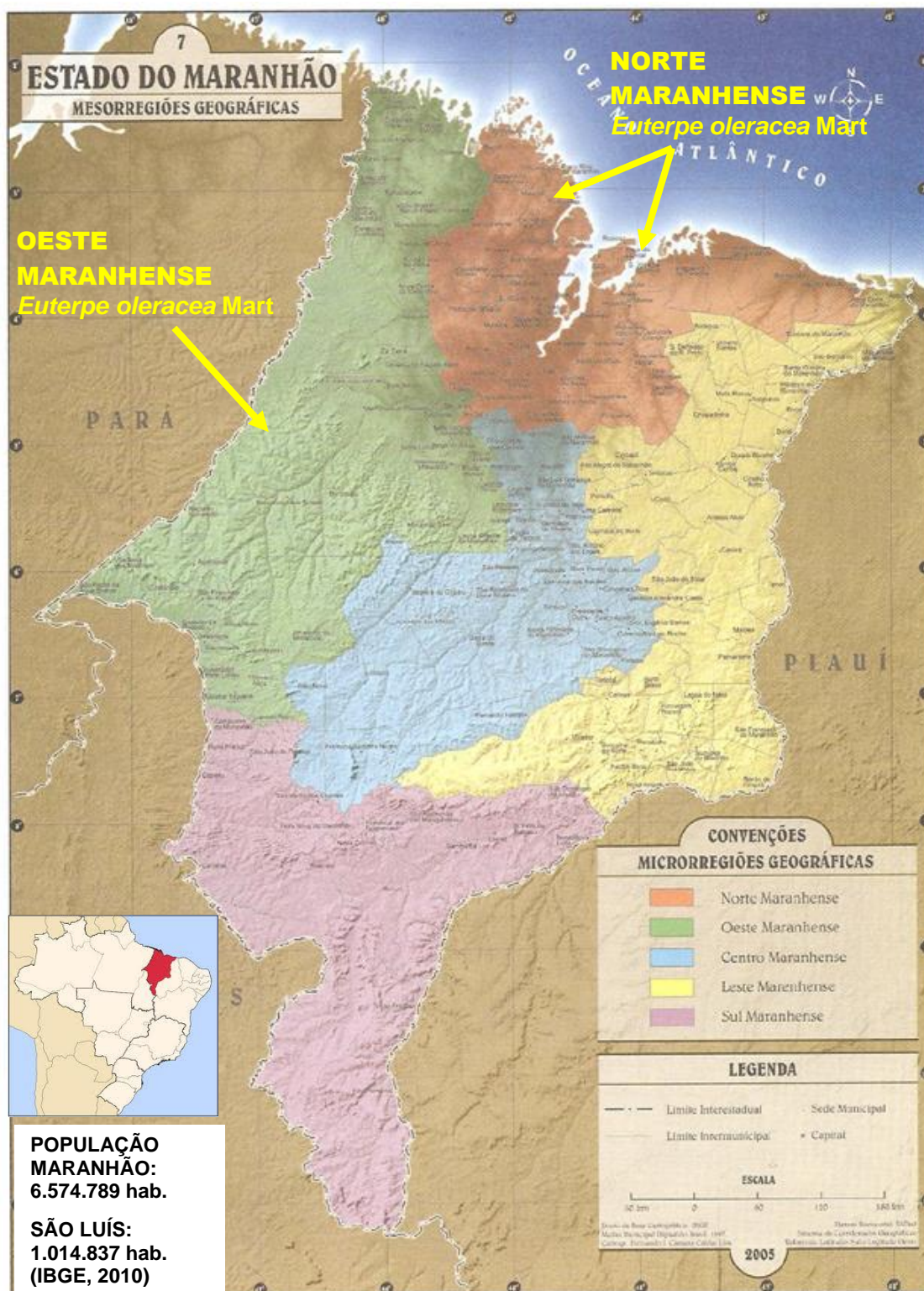


Figura 7 - Áreas de juçarais do estado do Maranhão evidenciando o município de São Luís, Parque Ecológico do Maracanã, local de coleta do fruto juçara, destacando as mesorregiões norte e oeste maranhense, domínios geoambientais da *Euterpe oleracea* Mart. Adaptado de Feitosa e Trovão, 2006; IBGE, 2010.

### 3.2. Caracterização taxonômica do fruto juçara

#### Exsicata da Juçara

Na comunidade Alegria que integra o Parque da Juçara, existe o Centro Educacional Sagrados Corações (CESCO), de natureza filantrópica, coordenado pela professora Maria Carminda Arruda Guimarães, que permitiu obter o material necessário para a realização da Exsicata da Juçara, visando o reconhecimento e caracterização da área da coleta.

A região em estudo apresenta características rurais, onde a arborização é exuberante existindo várzeas que possibilitam o desenvolvimento de plantas ornamentais, frutíferas e medicinais, entre elas: fruta-pão, jambo, juçara (açai), jaca, cupuaçu, sapoti, carambola, jenipapo, beribá, graviola, bacaba, coco, limão, abricó, cajá, banana, goiaba, tamarindo, acerola, pitanga e manga de várias espécies.

Na aplicação de recursos naturais pela Medicina Popular, Caseira ou Alternativa, existe na referida área um plantio de: capim-limão, erva-cidreira, boldo, santa quitéria, babosa, none e eucalipto.

A palmeira da juçara, selecionada para a Exsicata, apresentou 15 metros de altura com caule cuja base mediu 45 cm, sendo que a parte mediana foi de 39 cm e o ápice de 38 cm. Do segmento superior da palmeira retiraram-se duas palmas e um cacho com frutos maduros. As palmas foram segmentadas e identificadas em: ápice 1, meio 1, base 1; ápice 2, meio 2 e base 2, as quais foram acondicionadas em sacos plásticos.

O laudo do fruto da Exsicata, sob o número 30, foi expedido pelo Herbário Rosa Mochel do Núcleo de Estudos Biológicos da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), (ANEXO 1).

*Euterpe oleracea* Mart., conforme as características da taxonomia (Figura **8A**, a, b, c, d, e, f; **8B**, a, b, c, d).

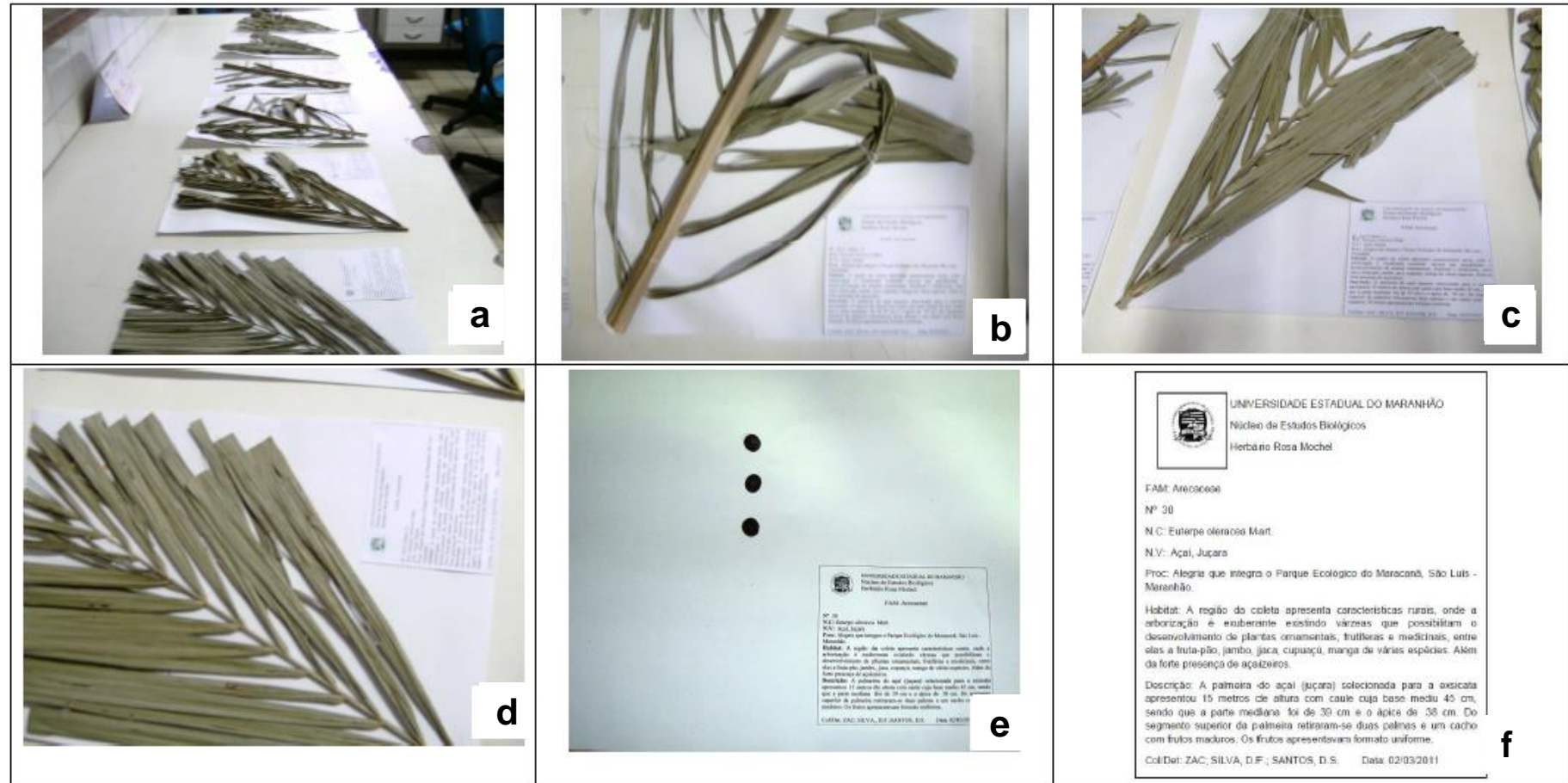


Figura 8A - Exsiccata da *Euterpe oleracea* Mart., demonstrando a base, meio e ápice da palma da juçareira. Parque Ecológico do Maracanã. São Luís /Maranhão / Brasil. a – Visão panorâmica das partes da juçara utilizada para os laudos da exsiccata. b – Exsiccata da base da palma da juçara. c – Exsiccata do médio da palma da juçara. d – Exsiccata do ápice da palma da juçara. e – Exsiccata do fruto da juçara. f – Etiqueta da exsiccata demonstrando o laudo da *Euterpe oleracea* Mart. Herbário Rosa Mochel/Núcleo de Estudos Biológicos/Universidade Estadual do Maranhão.



Figura 8B - *Euterpe oleracea* Mart., demonstrando diferentes aspectos da palmácea identificada no Parque Ecológico do Maracanã. São Luís /Maranhão / Brasil. a - Germinação. b - Touceira. c - Palmácea adulta. d - Fruto juçara.

### 3.3. Obtenção do extrato hidroalcoólico liofilizado do fruto total, casca e caroço de *Euterpe oleracea* Mart

Os frutos de juçara (*Euterpe oleracea* Mart) utilizados neste estudo foram oriundos do Parque da Juçara (São Luís, Maranhão, Brasil). Uma amostra do exemplar foi armazenada sob exsicata número 30 expedida pelo Herbário Rosa Mochel do Núcleo de Estudos Biológicos da Universidade Estadual do Maranhão

(UEMA) e depositado no World International Property Organization sob o registro nº PI0418614-1.

Os frutos foram previamente acondicionados sob refrigeração a -20°C no Laboratório de Farmacologia e Psicobiologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). Após descongelamento em temperatura ambiente, a amostra foi separada em três porções: casca, caroço e fruto total (casca + caroço). O processo de extração seguiu de acordo com a metodologia desenvolvida por Soares de Moura *et al.* (2011) e Soares de Moura *et al.*, (2012). Aproximadamente 360 g do fruto total casca e caroço de juçara, foram lavadas em água corrente e fervidas em água destilada por 5 a 10 minutos. Posteriormente, as porções foram trituradas e em seguida, homogeneizadas com 400 ml de etanol sob agitação por 2 h. Os extratos resultantes foram armazenados a 4°C protegidos da luz por 10 dias. Após esse período de maturação, os extratos hidroalcoólicos foram filtrados em papel de filtro #1 Whatman e a fase líquida concentrada em um evaporador rotatório de baixa pressão (Fisatom Equipamentos Científicos Ltda. São Paulo, São Paulo, Brasil) a aproximadamente 40°C e então liofilizados (LIOTOP modelo 202, Fisatom Equipamentos Científicos Ltda. São Paulo, São Paulo, Brasil) em temperatura de -30 a -40 °C e vácuo de 200 mm Hg. Os extratos foram mantidos a -20 °C até o dia de uso.

Posteriormente, foi analisada a quantidade total de polifenóis da juçara através do método de Folin Ciocalteu segundo Oliveira *et al.* (2009).

O Laboratório de Psicofarmacologia cedeu os extratos hidroalcoólicos do açaí do Estado do Pará (casca, caroço e fruto) cujas concentrações de polifenóis foram comparadas com as obtidas da juçara.

### **3.4. Linhagens celulares**

Foram utilizadas as linhagens celulares Caco-2 (ATCC, # HTB-37, Rockville, MD, EUA), HT-29 (ATCC, # HTB-38), ambas derivadas de um adenocarcinoma colorretal humano, MCF-7 (ATCC, # HTB-22) e MDA-MB-468 (ATCC, # HTB-132, Rockville, MD, EUA) derivadas de um adenocarcinoma mamário humano. As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio Dulbelcco's modificado (DMEN)

(Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 60 mg de estreptomicina e 100 mg de penicilina G, a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura era trocado duas vezes por semana para manutenção das células. Para os experimentos, as células em monocamada foram tripsinizadas com uma solução de tripsina 0,25% (w/v) – EDTA 0,03% (w/v).

### 3.5. Tratamentos com os extratos hidroalcoólicos de *Euterpe oleracea* Mart

Os extratos liofilizados foram dissolvidos em água Mili-Q, filtrados em filtros de seringa com poros de 0,2 µm e armazenados a -20°C. As células foram tratadas com 10, 20 e 40 µg/ml dos extratos por 24 e 48 horas.

### 3.6. Ensaio de Viabilidade Celular

As células foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer, e, uma alíquota de  $1 \times 10^4$  células/ml foi cultivada em placas de 96 poços na presença ou não dos extratos. Após 24 e 48 horas de tratamento, as placas foram centrifugadas por 3 minutos a 1500 rpm, as células foram lavadas em PBS e as placas centrifugadas novamente. O sobrenadante foi removido e 200 µl de meio novo contendo 10 µl de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) foi adicionado à cultura. As células foram reincubadas em estufa de CO<sub>2</sub> por 3 horas protegidas da luz. Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 1200 rpm, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 100 µl de DMSO (dimetilsulfóxido) foi adicionado a cada poço. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro de placa Spectra Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) utilizando um comprimento de onda de 538 nm.

### 3.7. Análise morfológica por microscopia de luz e microscopia eletrônica

A análise da morfologia das células por microscopia de luz após o tratamento com os extratos foi realizada por microscópio invertido Axio Observer Z1 equipado com uma câmara AxioCam HRc Ver.3. A análise das imagens foi feita através do software Axiovision Release 4.8.1 (Carl Zeiss Inc., Alemanha). As células foram cultivadas em placas de 96 poços na presença ou não dos extratos por 24 e 48 horas e após este período, observadas no microscópio.

Para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET) as células foram cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> e tratadas por 24 ou 48 horas com os diferentes extratos de juçara. Após os tratamentos, as células foram lavadas duas vezes em PBS e fixadas por 1 hora em fixador Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). As células foram retiradas da garrafa através da utilização do cell scraper (rodinho), transferidas para um tubo de 15 ml (TPP, Trasadingen, Switzerland) e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. Após centrifugação, as células foram lavadas por três vezes em tampão Caco 0,1M contendo sacarose 0,2M. A pós-fixação foi realizada com uma solução de ferrocianeto de potássio 0,8% e tetróxido de ósmio 1% por 45 minutos a 4°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 3000 rpm e lavadas por três vezes em tampão Caco 0,1M. Após nova centrifugação por 3 minutos a 3000 rpm, foi iniciada a desidratação das amostras em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) ficando as células por 10 minutos em cada solução. A infiltração foi iniciada com a incubação das amostras em solução de resina Epon e acetona 100% (1:1) overnight. Posteriormente, as amostras foram incubadas em Epon puro por 6 horas e incluídas em formas para polimerização em estufa a 60°C por 72 horas.

Os cortes ultrafinos (70nm) foram realizados no ultramicrotomo Leica-Reichert Ultracut (Wetzlar, Germany). A contrastação foi feita em acetato de uranila 4% e citrato de chumbo. A observação foi feita no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 906 (Oberkochen, Germany).

### 3.8. Coloração por DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

O corante 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) foi utilizado para observação do núcleo das células tratadas com os diferentes extratos de Juçara. Uma alíquota de  $2 \times 10^4$  células/ml foi cultivada em lamínulas redondas de 12mm (EMS, Hatfield, PA) em placas de 24 poços. Após os tratamentos, as células foram fixadas em metanol P.A por 20 minutos a  $-20^\circ\text{C}$  e posteriormente incubadas com uma solução de Triton-X-100 0,3% por 10 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS e incubadas com DAPI (1  $\mu\text{g/ml}$ ) por 1 minuto. A observação dos núcleos foi realizada em um microscópio invertido de fluorescência Axio Observer Z1 equipado com uma câmara AxioCam HRc Ver.3. A análise das imagens foi feita através do software Axiovision Release 4.8.1 (Carl Zeiss Inc., Alemanha).

### 3.9. Ensaio luminescente Caspase-Glo® 3/7

Uma alíquota de  $2 \times 10^3$  células/ml foi cultivada em placas de 96 poços e tratadas por 6 e 24 horas com os diferentes extratos de Juçara. Para avaliar uma possível atividade apoptótica dos extratos de juçara, foi utilizado o ensaio luminescente Caspase-Glo® 3/7 (Promega, WI, USA). Após os tratamentos, 10  $\mu\text{l}$  do reagente Caspase-Glo® 3/7 foram adicionados à cultura de células. Após 90 minutos, a luminescência foi lida no luminômetro Veritas Turner Biosystems (Madison, USA). O experimento foi feito em triplicata.

### 3.10. Extração total de proteínas e Western Blotting

O Western Blotting foi realizado conforme descrito por Albuquerque-Xavier et al. (2012). As células foram tratadas por 6 e 48 horas com o extrato de juçara e posteriormente, o conteúdo protéico extraído. O lisado total das células foi

obtido através da incubação das células com tampão de lise (1% Triton X-100, 0.5% deoxicolato de sódio, 0.2% SDS, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 10mM HEPES (pH 7.4) contendo 20mM NaF, 1mM ortovanadato e coquetel inibidor de protease (diluição 1:100) por 30 min a 4°C. Após centrifugação 10,000 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi removido e armazenado a -20°C até posterior utilização.

A quantificação das proteínas foi realizada pelo kit BCA (BioRad, Hercules, CA, USA). As proteínas (40µg/ml) foram separadas eletroforicamente por SDS-PAGE em géis de 13% e transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad) por 1h a 10V. Após o bloqueio com leite 5% por 1h, a membrana foi incubada overnight a 4°C com anticorpo anti-LC3B (1:1500). Posteriormente, a membrana foi lavada em tampão TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl e 0.1% Tween-20) e incubada por 1h com anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado a HRP (1:10000). As proteínas foram visualizadas através do kit de quimiluminescência (Amersham Biosciences GE, Buckinghamshire, UK). Todas as membranas foram reaproveitadas para marcação de  $\beta$ -actina para confirmação da aplicação da mesma quantidade de proteínas em todos os poços. A intensidade das bandas foi quantificada de acordo com sua através do programa LabWorks 4.6 (BioRad Laboratories, Hercules, CA).

### 3.11. Análise estatística

Para análise estatística dos dados, foi realizado o teste one-way analysis of variance (ANOVA), seguido pelos pós-testes de Dunnet ou Tukey's, de acordo com o tipo de análise. As diferenças foram consideradas significativas quando o  $p < 0,05$ . O programa utilizado para realização da análise estatística foi o GraphPad Prism versão 4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Quantificação dos polifenóis de frutos de *Euterpe oleracea* Mart

A análise da concentração de polifenóis da juçara do Maranhão demonstrou que a fração do caroço foi a mais rica em polifenóis, seguida da fração do fruto total e da casca, sendo esta com a menor concentração dessas substâncias (Tabela 4). Nesta tabela observa-se ainda a menor concentração de polifenóis no açaí do Pará.

Tabela 4 – Análise comparativa da quantificação de polifenóis do fruto da juçara do Maranhão e do açaí do Pará.

<b>Frações de <i>Euterpe oleracea</i> Mart</b>	<b>MARANHÃO</b>	<b>PARÁ</b>
Caroço	28,3 %	21,9%
Casca	15,7 %	8,7%
Fruto total	25,5 %	18,9%

### 4.2. Efeito dos extratos hidroalcoólicos de *Euterpe oleracea* Mart. na viabilidade de linhagens tumorais humanas

O efeito citotóxico dos extratos hidroalcoólicos de *E. oleraceae* Mart foi analisado através do ensaio de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em quatro linhagens celulares derivadas de tumores humanos. CACO-2 e HT-29 derivadas de um adenocarcinoma colo-retal e as linhagens MCF-7 e MDA-MB-468, derivadas de um adenocarcinoma mamário. As linhagens CACO-2 e HT-29, apesar de vindas de um mesmo tipo tumoral, possuem características distintas sendo a CACO-2 uma célula com fenótipo mais diferenciado e proliferação mais lenta quando comparada a linhagem HT-29 com fenótipo mais indiferenciado e proliferação mais rápida (COHEN *et al.*, 1999;

BUHRKE *et al.*, 2011). A principal diferença entre as linhagens de mama MCF-7 e MDA-MB-468 é o *status* do receptor hormonal para estrogênio e progesterona, sendo positivo e negativo, respectivamente (DAMPIER *et al.*, 2001).

Os efeitos do tratamento com os extratos de juçara na viabilidade das células foram distintos dependendo do tipo celular. Nenhum dos extratos mostrou-se citotóxico às linhagens de adenocarcinoma colo-retal humano CACO-2 e HT-29 (Figura 9A e 9B, respectivamente) e à linhagem de mama MDA-MB-468, negativa para os receptores hormonais (Figura 9C). Porém, na linhagem MCF-7, o ensaio com MTT demonstrou que os três extratos foram capazes de reduzir a viabilidade das células (Figura 10).

O tratamento com 20 µg/ml do extrato hidroalcoólico derivado da casca de juçara reduziu com significância a viabilidade das células MCF-7 após 48 horas de tratamento ( $p < 0,05$ ) quando comparado às células controle. A concentração de 40 µg/ml apresentou efeito citotóxico a partir de 24 horas de incubação ( $p < 0,05$ ) aumentando sua citotoxicidade após 48 horas de tratamento ( $p < 0,01$ ) (Figura 10A).

O extrato derivado do caroço de juçara mostrou-se citotóxico em concentrações de 10 µg/ml após 48 horas de tratamento ( $p < 0,05$ ). As concentrações de 20 e 40 µg/ml reduziram significativamente a viabilidade da linhagem MCF-7 ( $p < 0,01$ ) após tratamento por 24 e 48 horas (Figura 10B). A mesma resposta foi observada nas células tratadas com o extrato hidroalcoólico do fruto de juçara (Figura 10C).

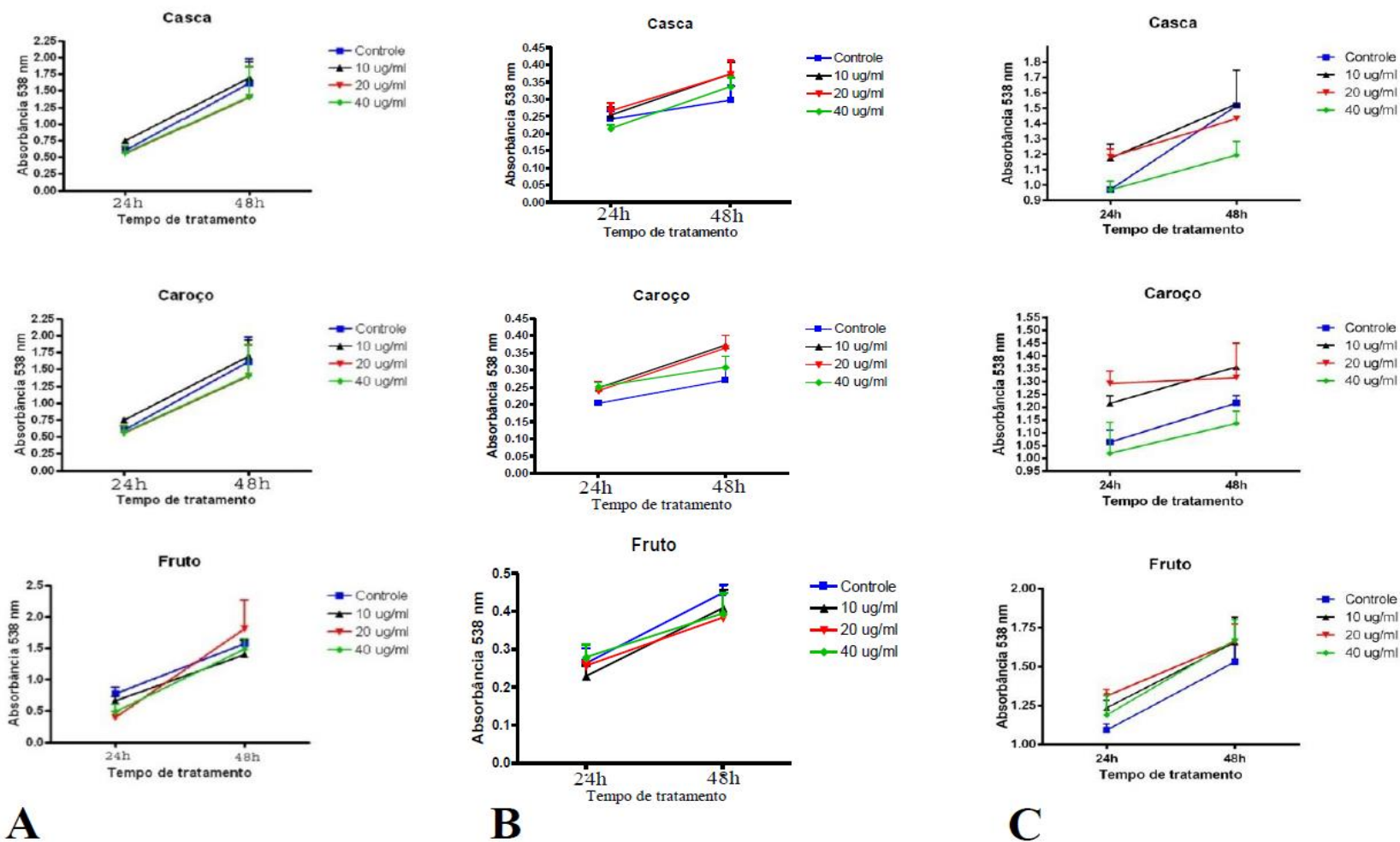


Figura 9 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de juçara nas linhagens de adenocarcinoma colo-retal humano CACO-2 (A) HT-29 (B) e na linhagem de adenocarcinoma mamário MDA-MB-468 (C) através do ensaio de viabilidade com MTT. Nenhum dos extratos hidroalcoólicos de juçara foi capaz de reduzir a viabilidade das células CACO-2 (A), HT-29 (B) e MDA-MB-468 (C).

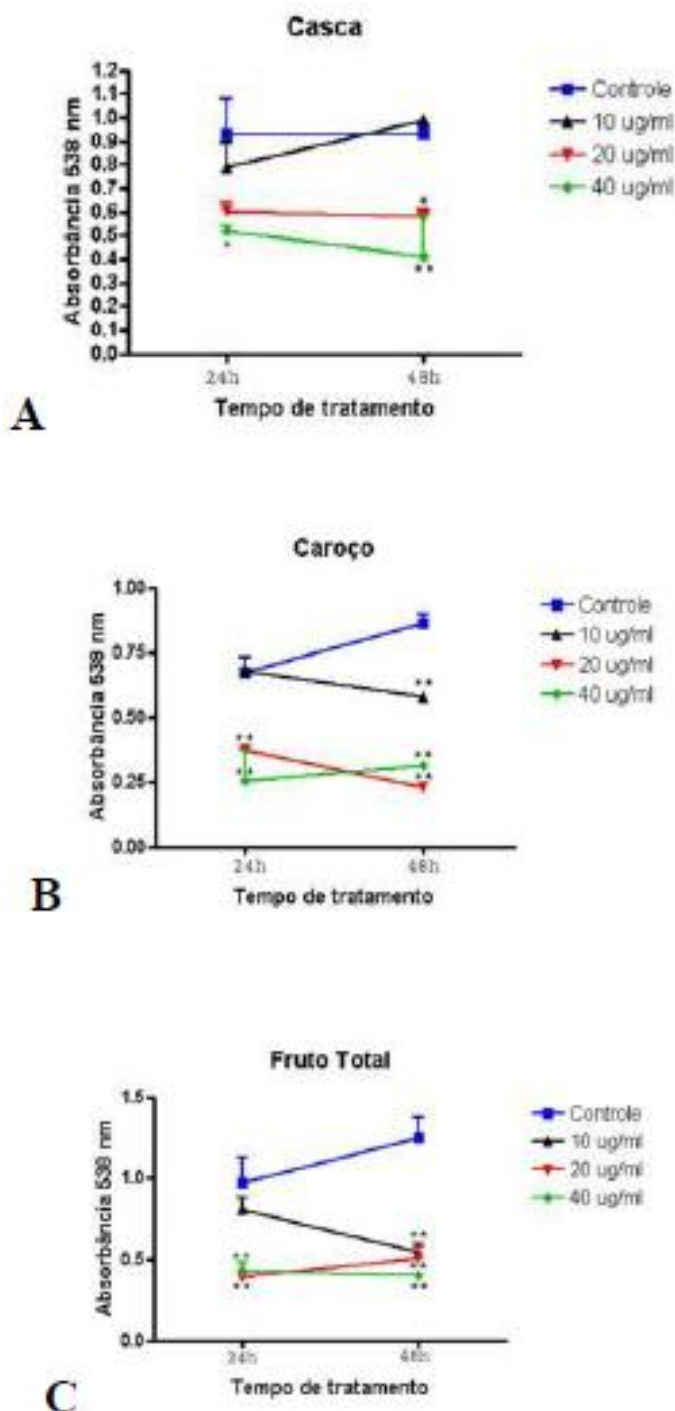


Figura 10 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de juçara em células da linhagem MCF-7 através do ensaio de viabilidade com MTT. A. 20 µg/ml do extrato da casca de juçara inibiu de forma significativa a viabilidade das células MCF-7 após 48h de tratamento. Na concentração de 40 µg/ml, a viabilidade celular foi reduzida significativamente após 24 e 48h de tratamento. B. O extrato do caroço de juçara reduziu a viabilidade das células a partir da concentração de 10 µg/ml após 48h de tratamento. Nas concentrações de 20 e 40 µg/ml, a viabilidade foi reduzida de forma muito significativa. O mesmo resultado foi observado nas células tratadas com o extrato do fruto total de juçara (C). ANOVA, pós-teste Dunnet. \* $p < 0,05$ \*\* $p < 0,01$ .

Comparando o potencial citotóxico dos três extratos hidroalcoólicos de juçara, foi observado que o extrato derivado do caroço foi o mais eficaz, o extrato do fruto total teve efeito intermediário e àquele derivado da casca foi o menos eficaz. A Figura 11A representa a comparação dos tratamentos dos extratos na concentração de 10 µg/ml por 24 e 48 horas. Nesta concentração, após 48 horas de tratamento os extratos do caroço e do fruto de juçara apresentaram uma eficácia muito maior quando comparada ao extrato da casca ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre eles no que se refere ao potencial citotóxico. Na concentração de 20 µg/ml, o extrato do caroço mostrou-se bastante superior aos outros dois extratos. Após 24 horas de tratamento, os extratos do caroço e fruto mostraram-se mais eficazes em reduzir a viabilidade da linhagem MCF-7 ( $p < 0,01$ ) quando comparados ao extrato da casca, porém, após 48 horas o extrato do caroço obteve um efeito citotóxico significativo frente aos extratos do fruto total e casca ( $p < 0,01$ ) (Figura 11B). Na concentração de 40 µg/ml os extratos foram igualmente eficazes em reduzir a viabilidade celular (Figura 11C).

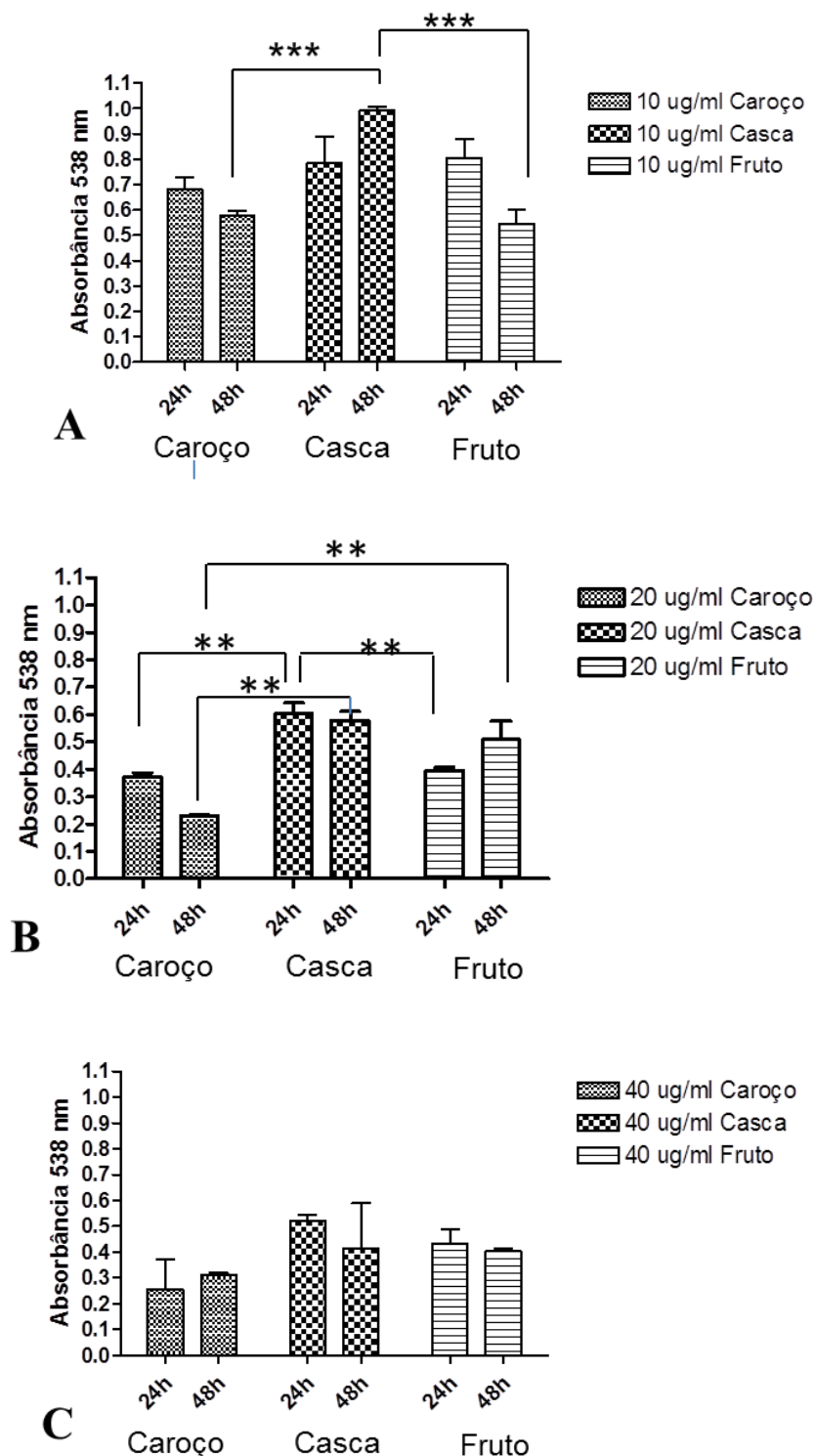


Figura 11 - Comparação de citotoxicidade em MCF-7 entre os extratos de juçara. A. Na concentração de 10 µg/ml, os extratos derivados do caroço e fruto total de juçara, foram significativamente mais eficazes na redução da viabilidade das células MCF-7 após 48h de tratamento quando comparados com a mesma concentração do extrato da casca de juçara. B. O tratamento por 24h com 20µg dos extratos do caroço e fruto total foram mais eficazes do que o mesmo tratamento com o extrato da casca de juçara. Após 48h de tratamento o extrato derivado do caroço mostrou-se mais eficaz do que os extratos da casca e fruto total. C. Não houve diferença estatisticamente significativa na eficácia dos extratos em relação a 40 µg/ml viabilidade celular das células MCF-7. ANOVA, pós-teste Tukey's\*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001.

### **4.3. Análise morfológica das células após tratamento com os extratos de juçara**

As análises morfológicas nas células CACO-2, HT-29 e MCF-7 foram observadas por microscopia de luz pela técnica de contraste de fase em um microscópio invertido Axio Observer Z1 (Carl Zeiss Inc., Alemanha).

O tratamento por 24 e 48 horas com extratos da casca e fruto total de juçara na linhagem celular CACO-2 não causaram nenhuma modificação morfológica evidente (Figura 12A e 12C, respectivamente). Células controle e tratadas apresentavam muitas vesículas em sua superfície o que é normal para esta linhagem uma vez que são células mucíparas. O tratamento por 24 e 48h com 40 µg do extrato do caroço de juçara causou arredondamento das células (Figura 12B). A linhagem MDA-MB 468 no ensaio de viabilidade pelo MTT, nas concentrações de 10, 20 e 40 µg/ml em 24 e 48 horas não apresentaram inibição da viabilidade celular (Figura 9C).

# CASCA

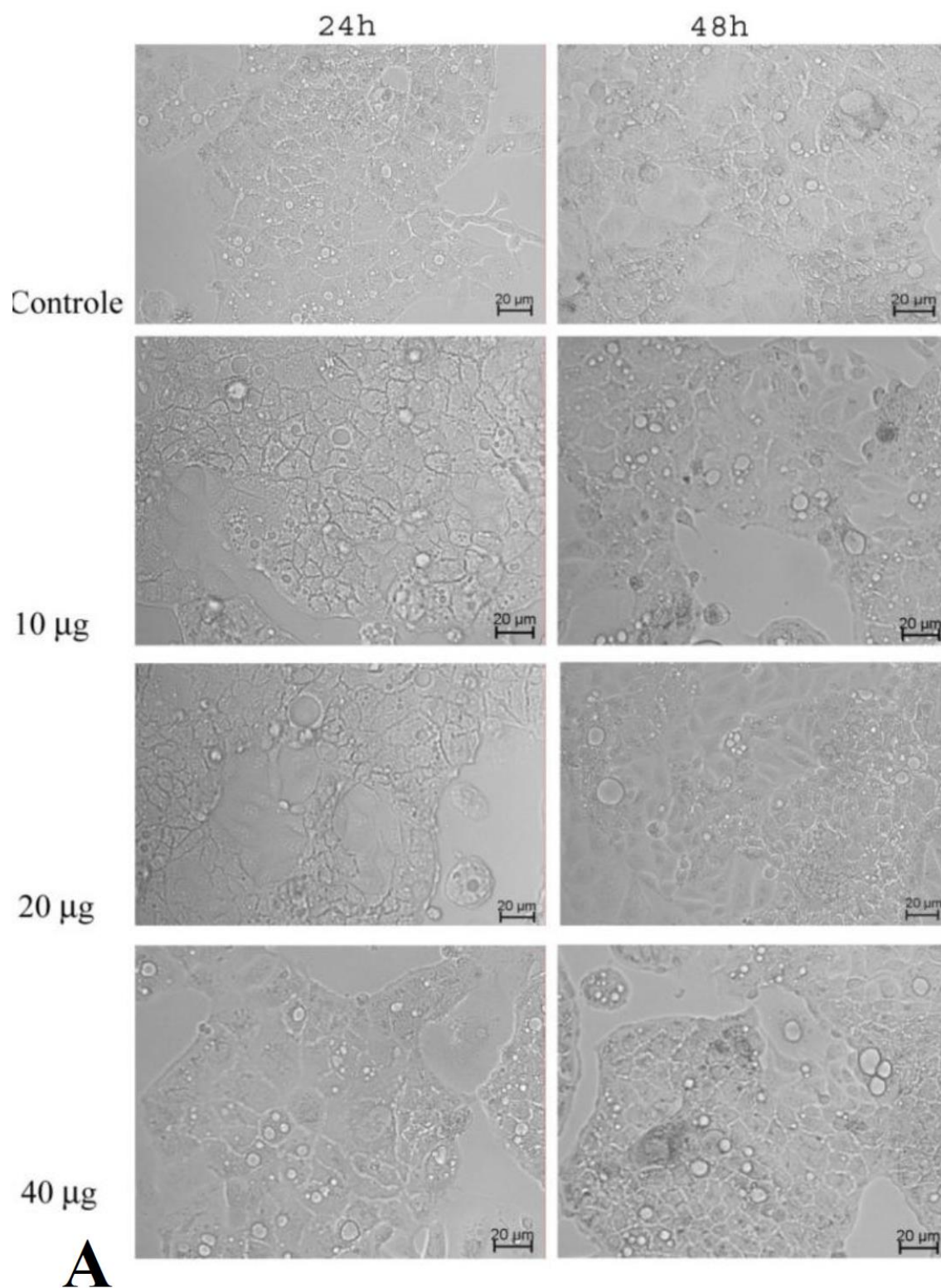
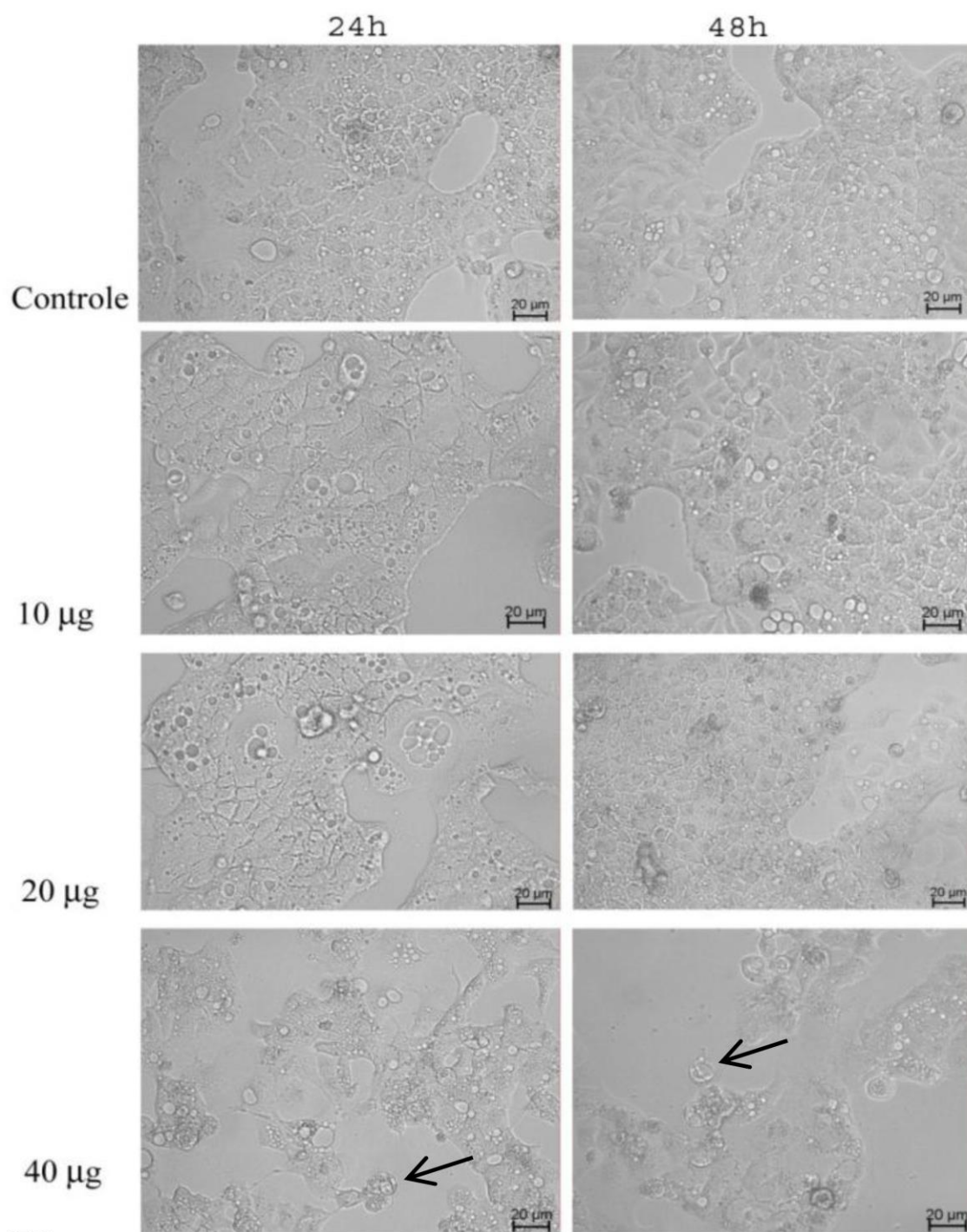


Figura 12 - A - Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos dos extratos de juçara na linhagem celular CACO-2. O extrato derivado da casca de juçara não causou modificações morfológicas evidentes (A)

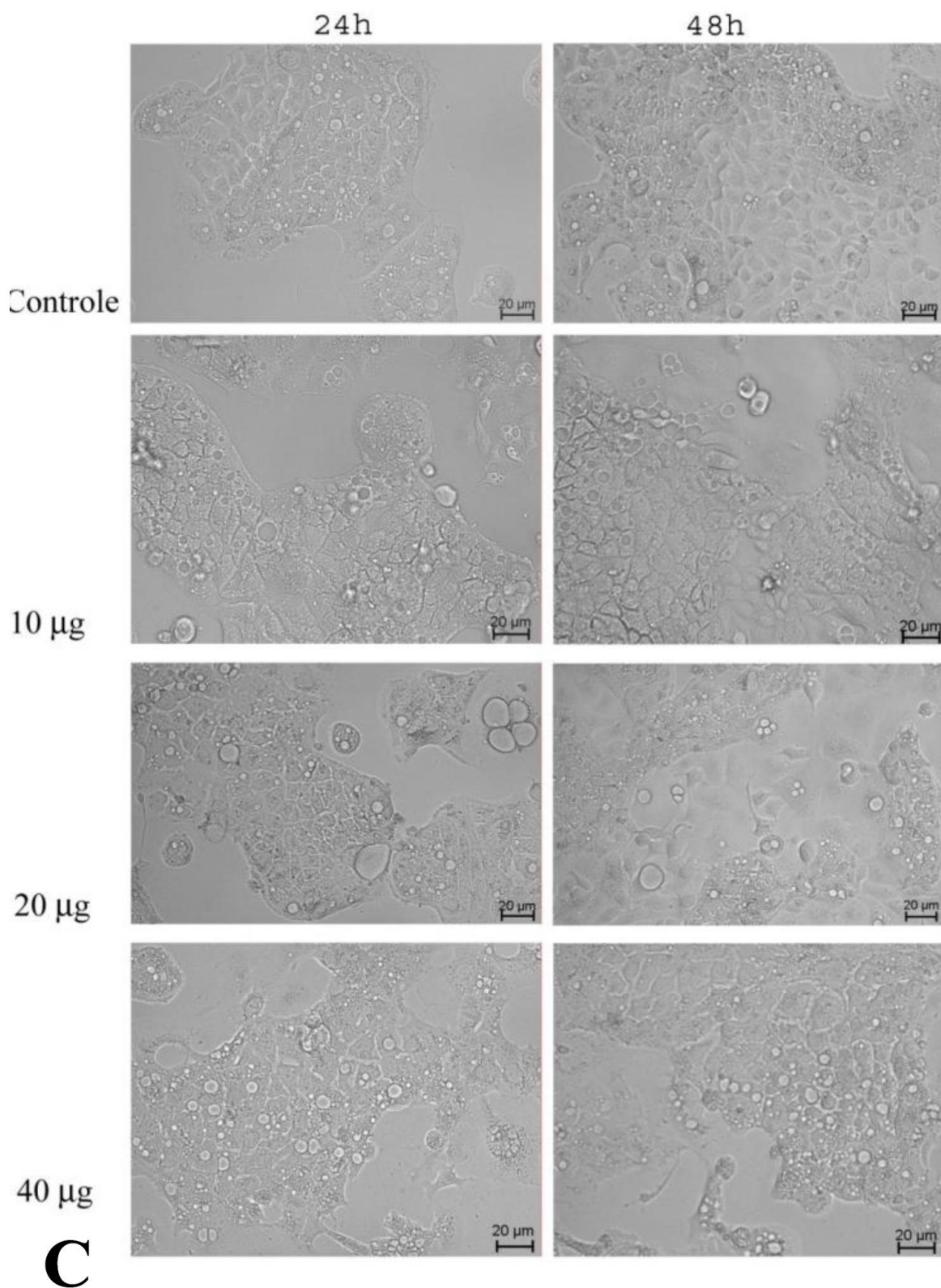
# CAROÇO



**B**

Figura 12 - B - Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos dos extratos de juçara na linhagem celular CACO-2. O extrato derivado do caroço de juçara não causou modificações morfológicas evidentes nas concentrações de 10 e 20 µg/ml. Na concentração de 40 µg/ml o extrato do caroço causou o arredondamento das células (seta) (B).

# FRUTO



**C**  
Figura 12 - C - Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos dos extratos de juçara na linhagem celular CACO-2. O extrato derivado do fruto total de juçara não causou modificações morfológicas evidentes.

O tratamento da linhagem celular HT-29 com os extratos de juçara não causaram modificações morfológicas evidentes em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 13).

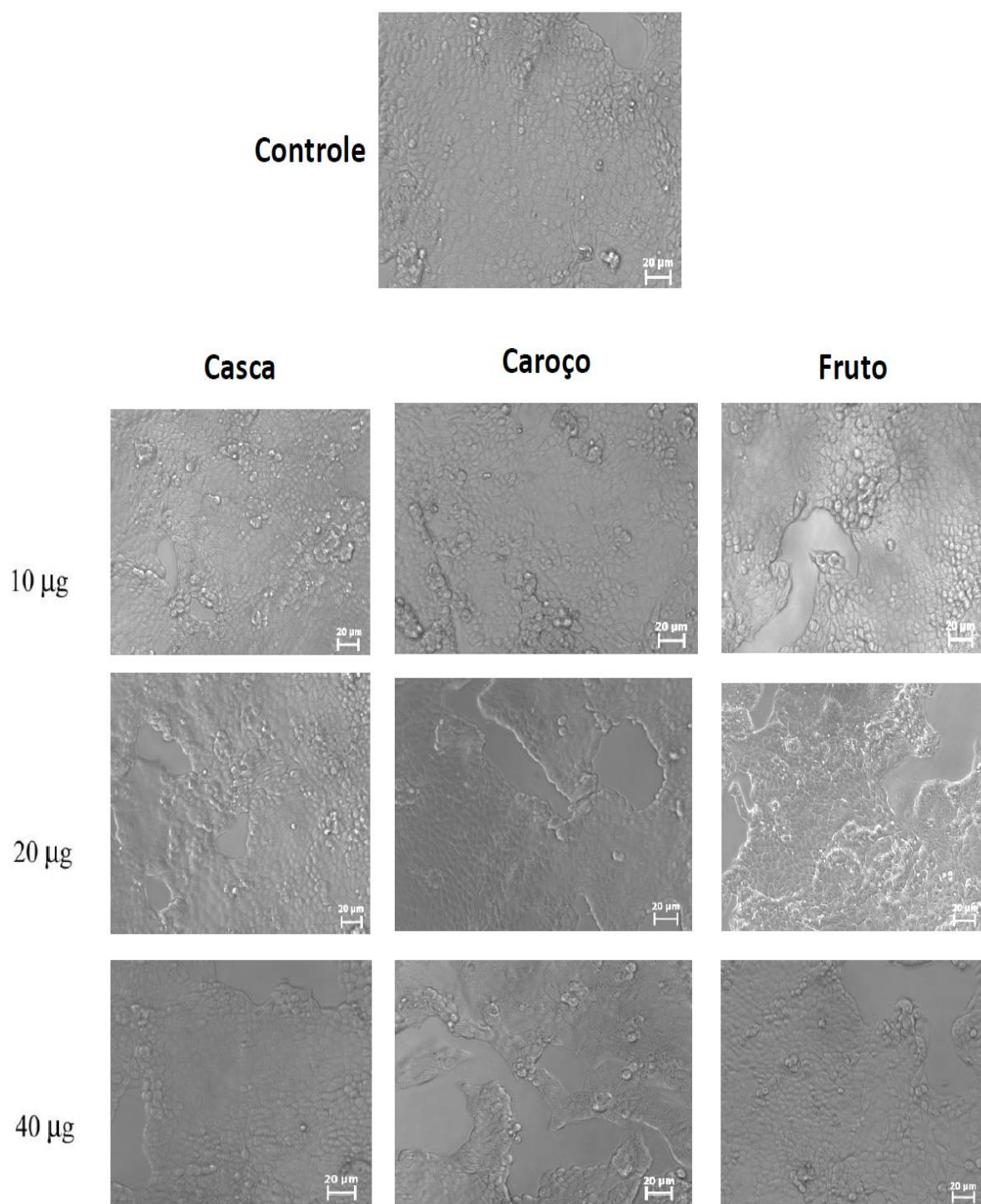


Figura 13 - Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos dos extratos de juçara na linhagem celular HT-29. Os extratos derivados da casca, caroço e fruto total de juçara não causaram modificações morfológicas evidentes após 24 horas de tratamento.

A análise morfológica da linhagem MCF-7 mostrou que células controle apresentavam morfologia epitelial típica com as células em formato cubóide, crescimento em monocamada e aderidas umas as outras (WALSH; DAMJANOVSKI, 2011) (Figura 14).

O extrato da casca de juçara ocasionou discretas alterações morfológicas nas concentrações de 40  $\mu\text{g/ml}$  representado pelo arredondamento de algumas células (Figura 14A).

As modificações morfológicas observadas nas células tratadas com os extratos do caroço e do fruto total de juçara foram mais severas do que àquelas observadas nas células tratadas com o extrato da casca (Figuras 14B e 14C, respectivamente). O tratamento das células com 10  $\mu\text{g/ml}$  do extrato do caroço de juçara por 24 e 48 horas causou o arredondamento das células e surgimento de expansões citoplasmáticas e algumas vesículas na superfície celular. Células tratadas com 20  $\mu\text{g/ml}$  após 24 e 48 horas apresentaram aumento do número de vesículas na superfície da célula além de uma grande diminuição no seu volume. O tratamento com 40  $\mu\text{g/ml}$  modificou drasticamente a morfologia das células MCF-7 causando vacuolizações e aparente lise com perda de conteúdo citoplasmático. Efeitos semelhantes foram observados nas células MCF-7 tratadas com o extrato do fruto total de juçara. O tratamento das células com 10  $\mu\text{g/ml}$  por 24 e 48 horas causou o surgimento de vesículas na superfície celular e forte retração citoplasmática. Estes efeitos foram vistos com maior intensidade nas células tratadas com 20  $\mu\text{g/ml}$ . O tratamento com 40  $\mu\text{g/ml}$  afetou severamente a morfologia das células MCF-7 causando retração citoplasmática, vacuolizações e aparente lise com perda de conteúdo citoplasmático.

# CASCA

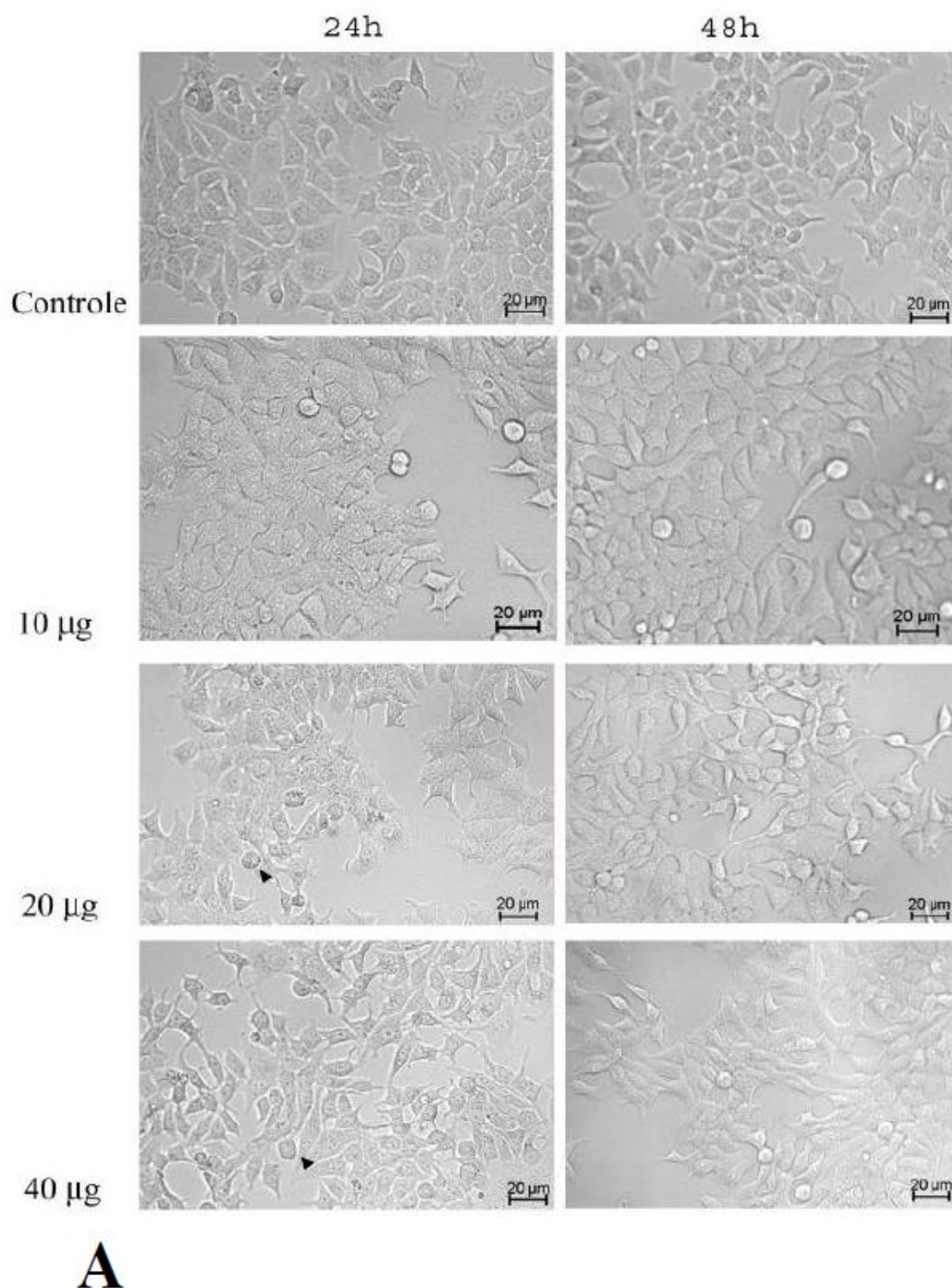
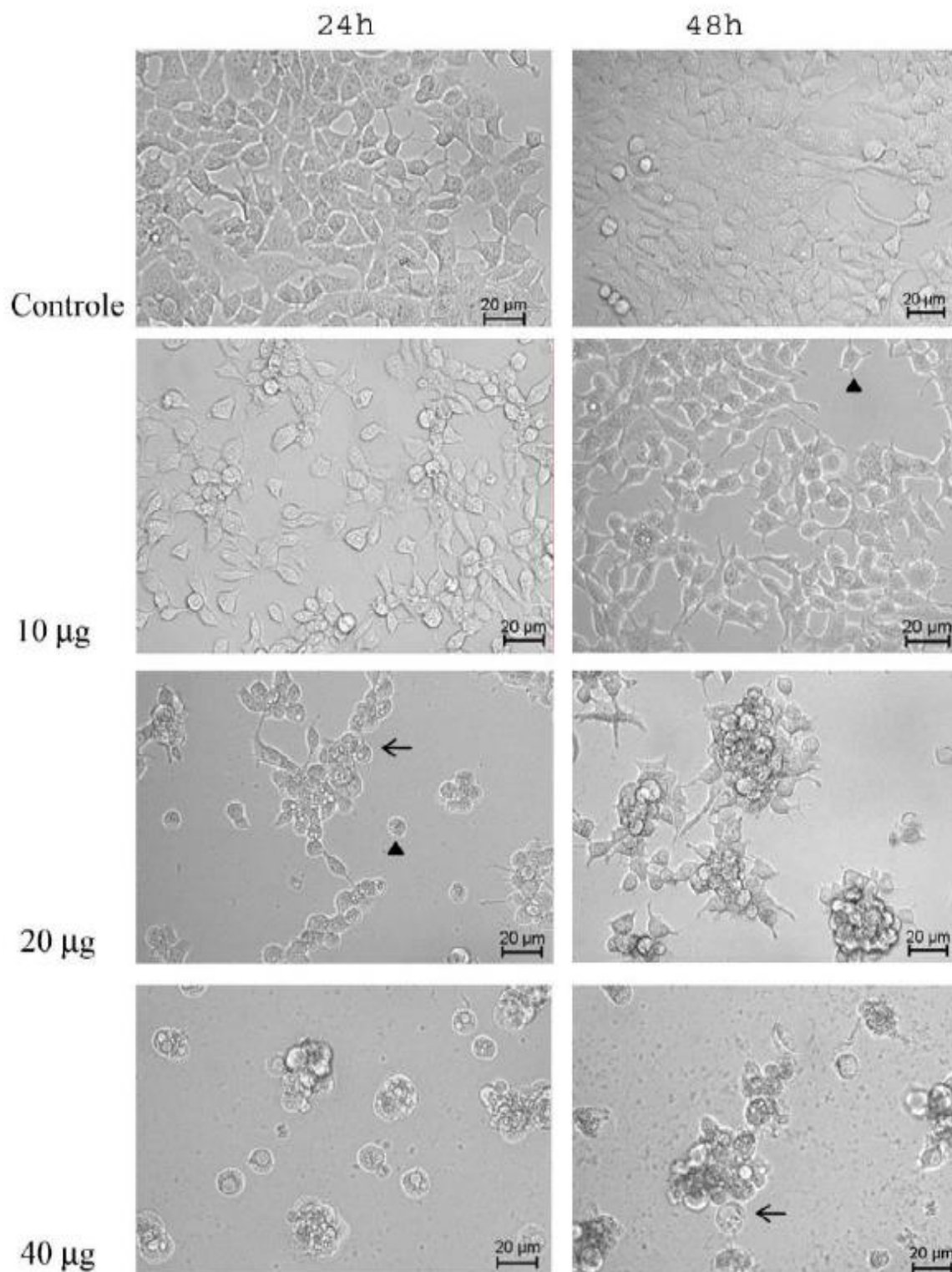


Figura 14 - A- **Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos dos extratos de juçara na linhagem celular MCF-7.** O extrato derivado da casca causou arredondamento celular (cabeça de seta) (A).

# CAROÇO



## B

Figura 14 - B - Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos dos extratos de juçara na linhagem celular MCF-7. O extrato do caroço causou além do arredondamento celular, o aparecimento de vesículas na superfície celular e aparente perda do conteúdo citoplasmático (seta) (B).

# FRUTO

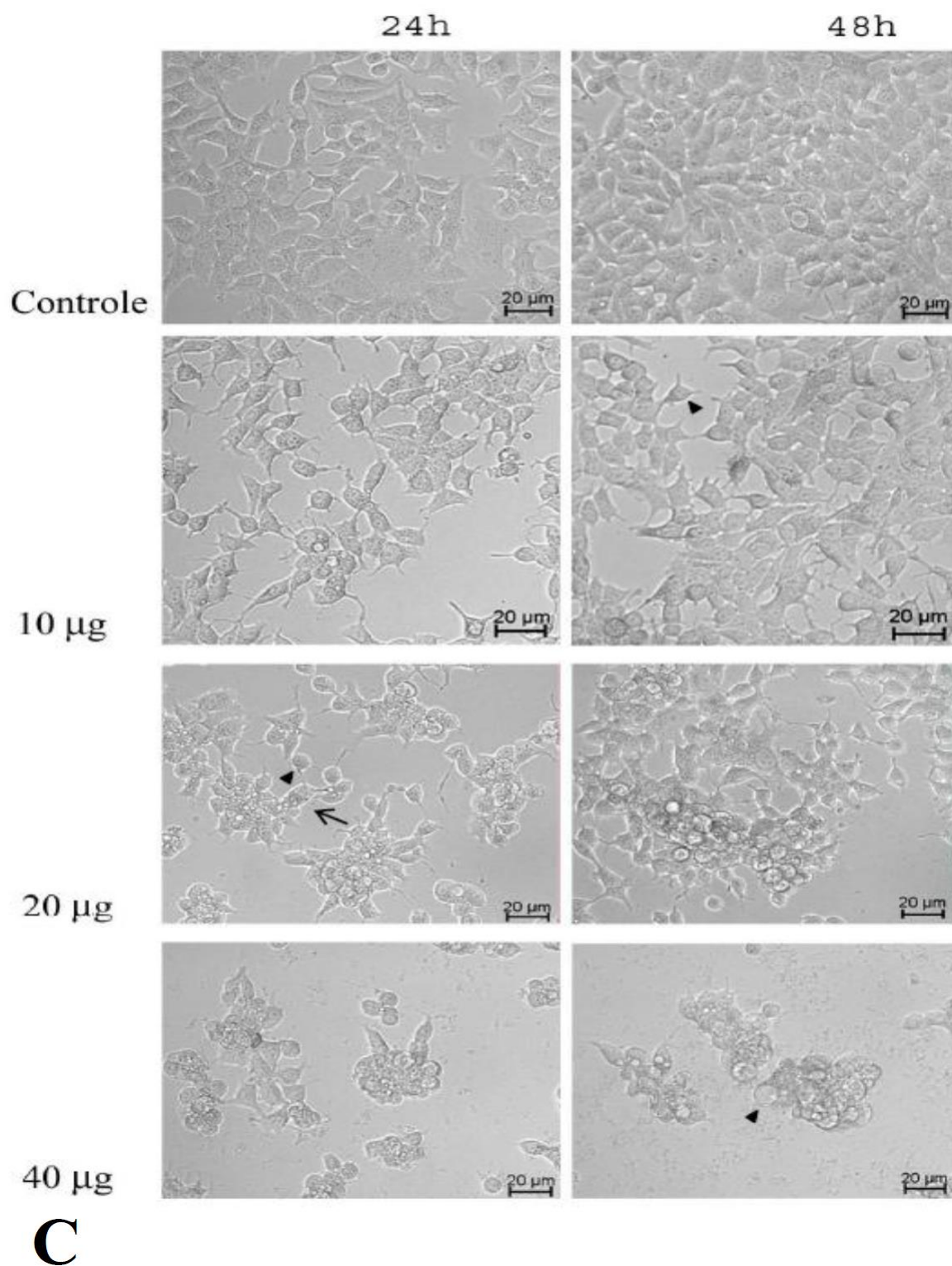


Figura 14 - C- Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos dos extratos de juçara na linhagem celular MCF-7. O extrato do fruto total causou arredondamento celular (cabeça de seta) e vesículas na intracitoplasmática celular (seta) (C).

#### 4.4. Análise do potencial apoptótico do extrato de juçara

Para observação de possíveis alterações morfológicas no núcleo que indicassem apoptose, foi realizada uma análise do núcleo através da coloração por DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Células MCF-7 tratadas com 20 e 40  $\mu\text{g/ml}$  do caroço de juçara apresentaram discretas alterações nucleares como fragmentações e retração (Figura 15A). O mesmo efeito foi observado nas células tratadas com os extratos do caroço e fruto total de juçara em todos os tempos e concentrações examinados a partir do tratamento com 10  $\mu\text{g/ml}$  (Fig.15B e 15C, respectivamente).

## CASCA

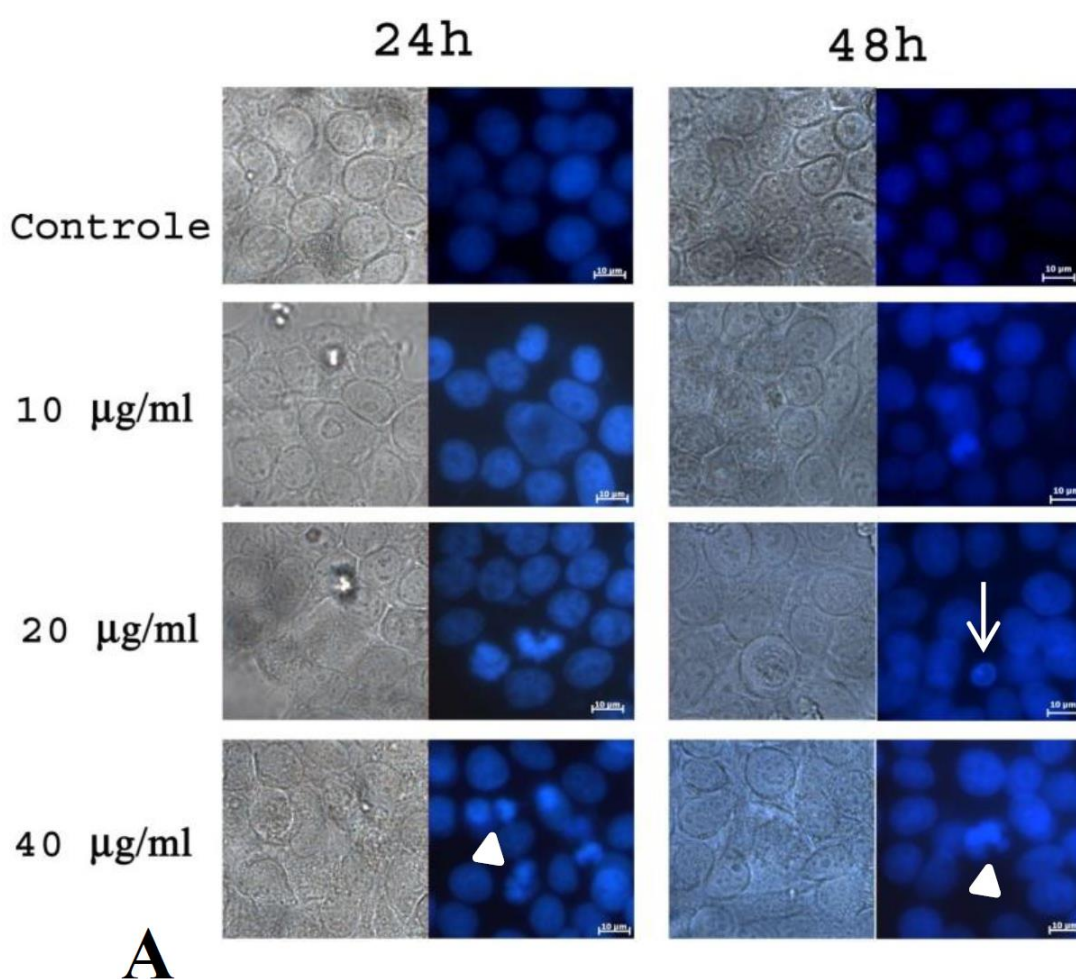


Figura 15 - A - Análise morfológica do núcleo das células MCF-7 corados com DAPI após tratamento com os extratos de juçara. Células MCF-7 tratadas com 20 e 40  $\mu\text{g/ml}$  do extrato da casca de juçara apresentaram discretas alterações nucleares como fragmentações (cabeça de seta) e retração (seta) (A).

# CAROÇO

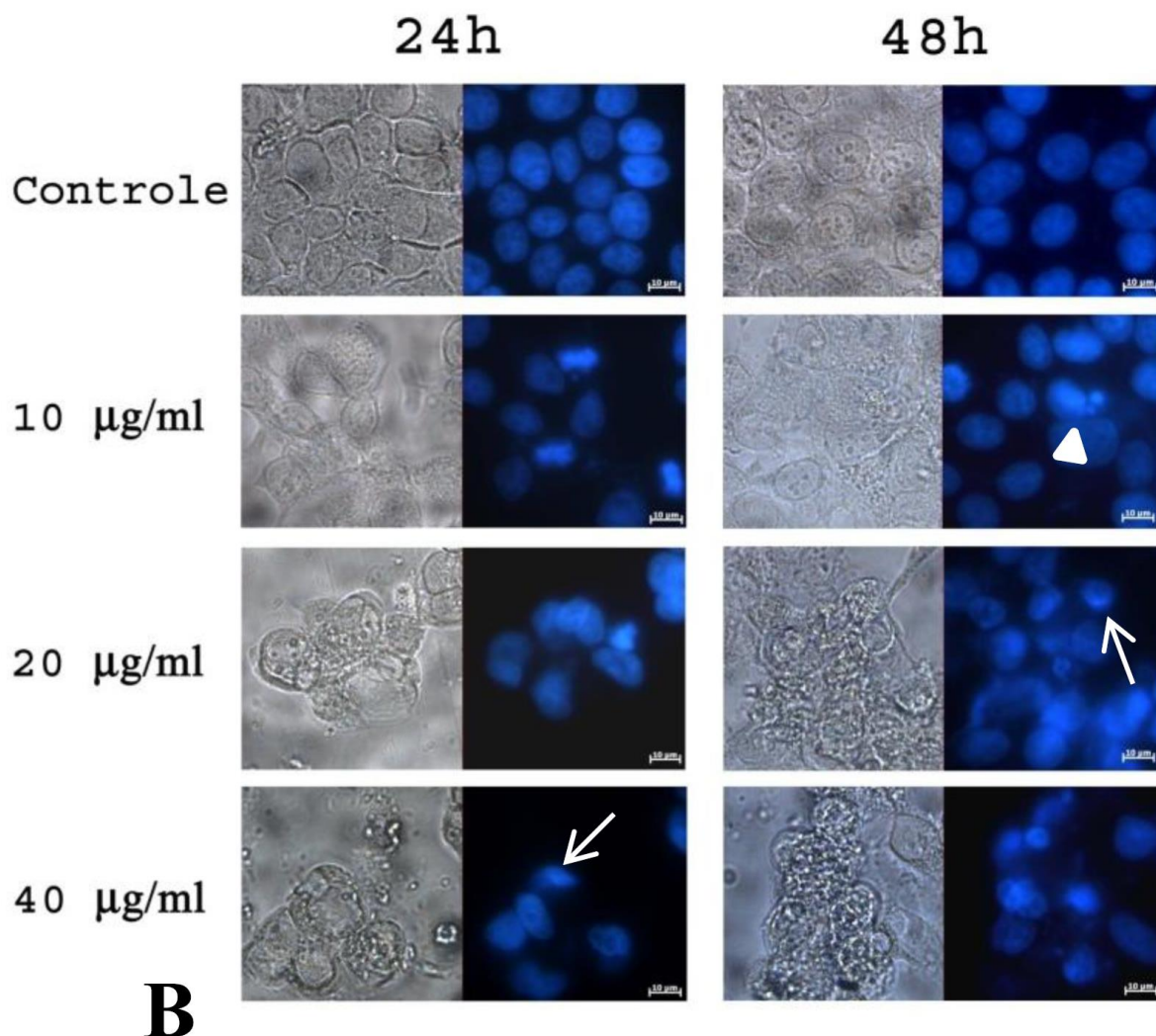
**B**

Figura 15 - B - Análise morfológica do núcleo das células MCF-7 corados com DAPI após tratamento com os extratos de juçara. Células MCF-7 tratadas com 10, 20 e 40 µg/ml do extrato do caroço de juçara apresentaram discretas alterações nucleares como fragmentações (cabeça de seta) e retração (seta) (B).

# FRUTO

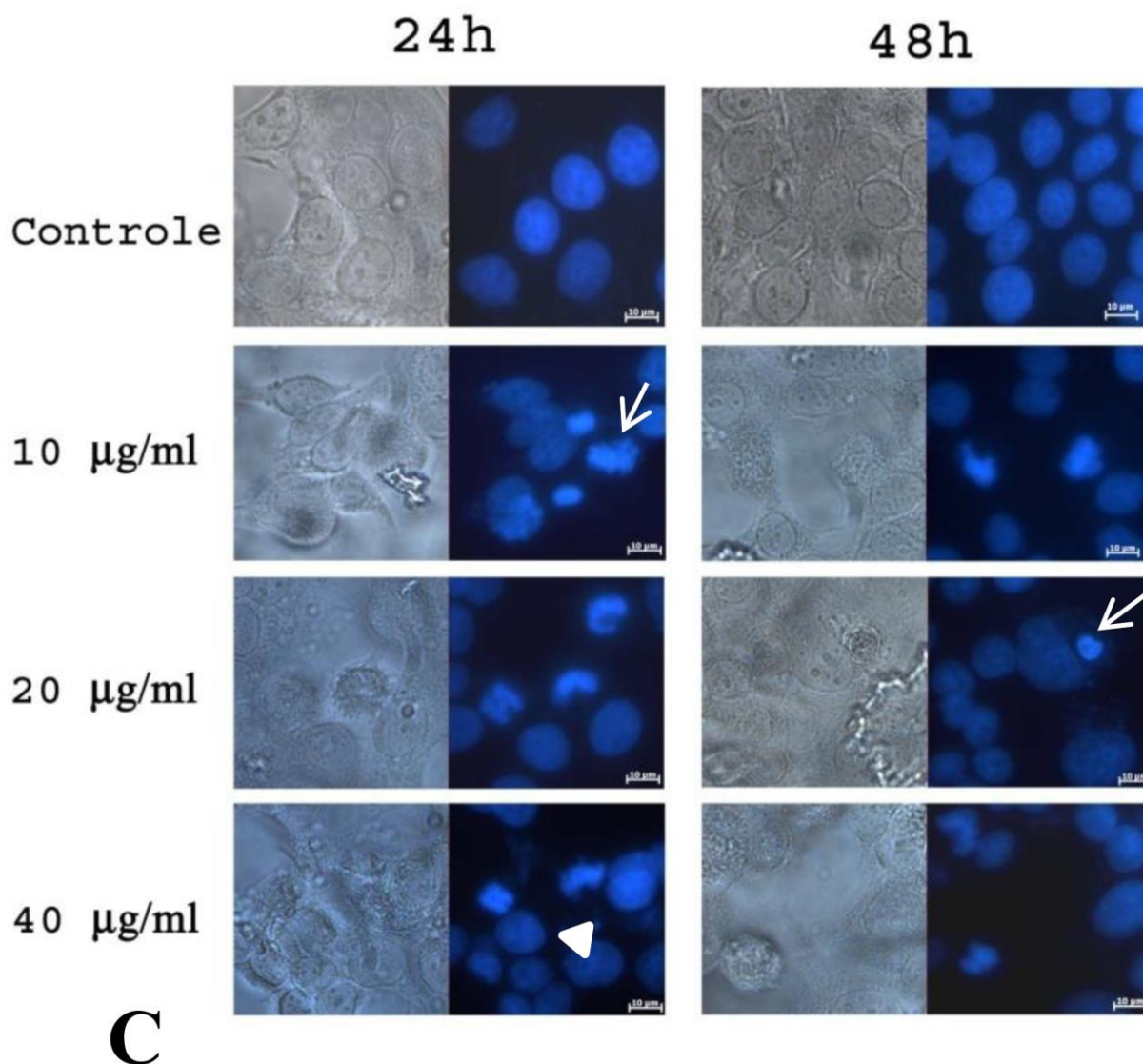


Figura 15 - C - Análise morfológica do núcleo das células MCF-7 corados com DAPI após tratamento com os extratos de juçara. Células MCF-7 tratadas com 10, 20 e 40 µg/ml do extrato do fruto total de juçara apresentaram discretas alterações nucleares como fragmentações (cabeça de seta) e retração (seta) (C).

Complementando o ensaio luminescente com o corante DAPI, foi realizado um ensaio para verificar a atividade da caspase 7. Não houve aumento da atividade da caspase 7 em células MCF-7 tratadas com os diferentes extratos de juçara após 6 horas de tratamento (Figura 16).

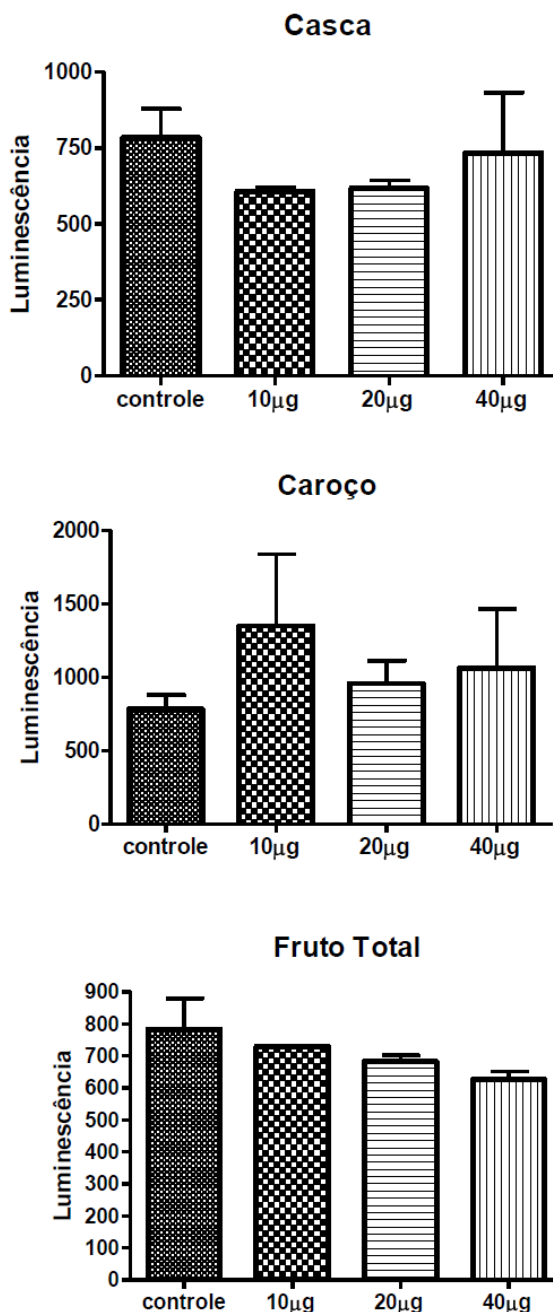
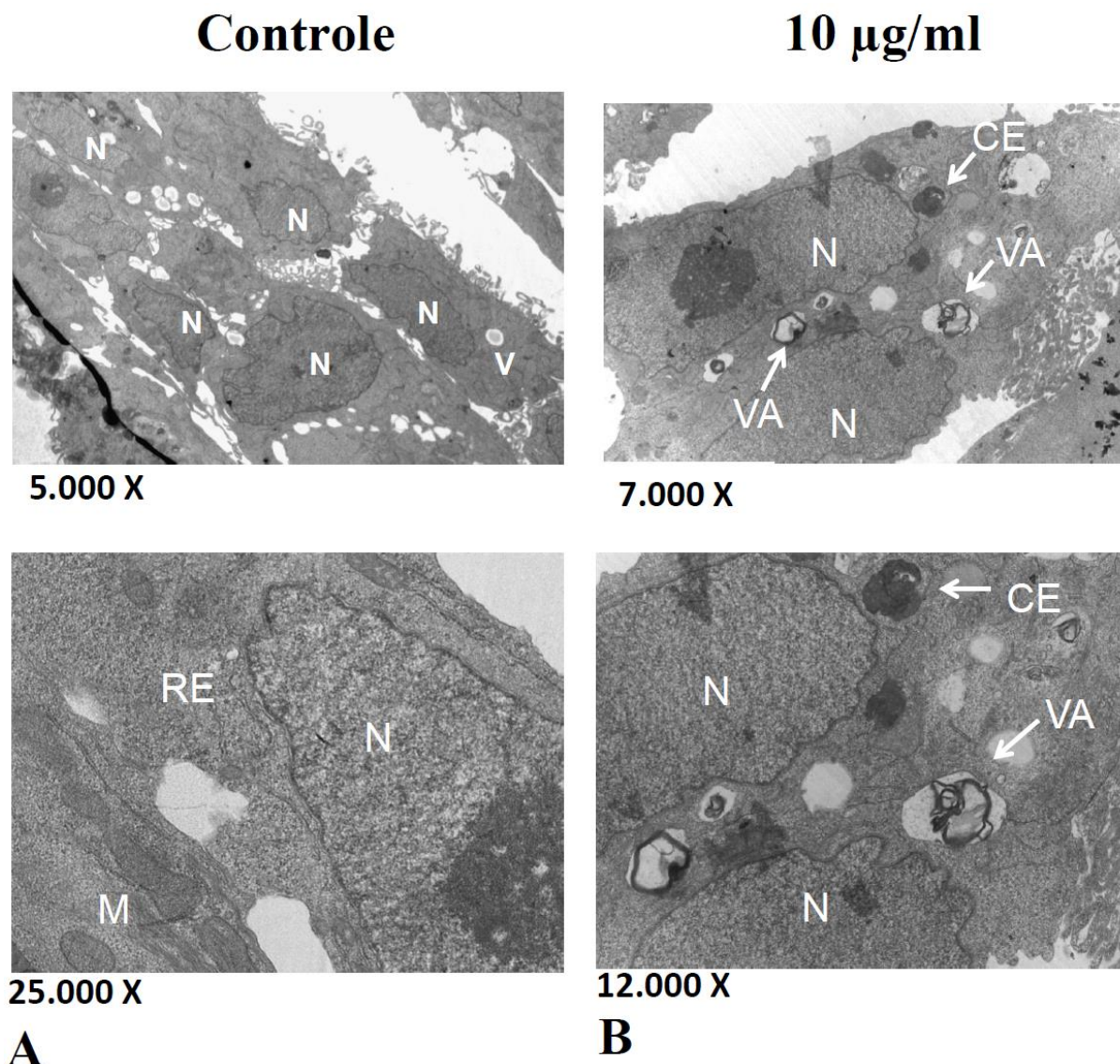


Figura 16 - Avaliação da atividade da caspase 7 nas células MCF-7 após tratamento com os extratos de juçara. Não houve aumento significativo na atividade da caspase 7 nas células MCF-7 tratadas por 6h com os extratos de juçara.

#### **4.5. Indução de autofagia na linhagem MCF-7 após tratamentos com o extrato hidroalcoólico do caroço de juçara**

Para análise detalhada da morfologia nuclear e outras organelas das células MCF-7 tratadas com o extrato do caroço de juçara, foi realizada análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Figura 17).

Células controle apresentavam membrana plasmática e núcleo íntegros assim como a presença de vesículas secretórias no citoplasma (Figura 17A). Em maior aumento (25.000X) foi possível observar com mais detalhes a dupla membrana nuclear, mitocôndrias e o retículo endoplasmático. Após tratamento com 10 µg/mL do extrato do caroço por 24 horas, observou-se o surgimento de corpos eletrondensos no citoplasma assim como a presença de vesículas autofágicas. O núcleo por sua vez estava íntegro, não apresentando características de núcleo apoptótico (Figura 17B).



**Figura 17 - Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão das células MCF-7 após tratamento com o extrato do caroço de juçara.** Células controle apresentavam membrana plasmática e núcleo íntegros assim como a presença de vesículas secretórias no citoplasma (A). Em maior aumento (25.000X) foi possível observar com mais detalhes a dupla membrana nuclear, mitocôndrias e o retículo endoplasmático. Após tratamento com 10  $\mu$ g/ml do extrato do caroço por 24 horas, observou-se o surgimento de corpos eletrondensos no citoplasma assim como a presença de vesículas autofágicas. O núcleo por sua vez estava íntegro, não apresentando características de núcleo apoptótico (B). N= núcleo, M= mitocôndria, V= vesícula, VA= vesícula autofágica, CE= corpos eletrondensos, RE= retículo endoplasmático.

Para fins de confirmação da ocorrência de autofagia, foi analisada a expressão da proteína LC3-B II através da técnica de Western Blotting. Durante a autofagia, a proteína LC3B-I é convertida em LC3B-II, sendo, portanto, a quantidade de LC3B-II relacionada ao número de autofagossomas (BARTH; GLICK, MACLEOD,

2010). Foi observado aumento da expressão da proteína LC3-B após 6 e 48 horas de tratamento das células MCF-7 com o extrato do caroço de juçara, corroborando com os achados da microscopia eletrônica e confirmando a ocorrência de autofagia (Figura 18).

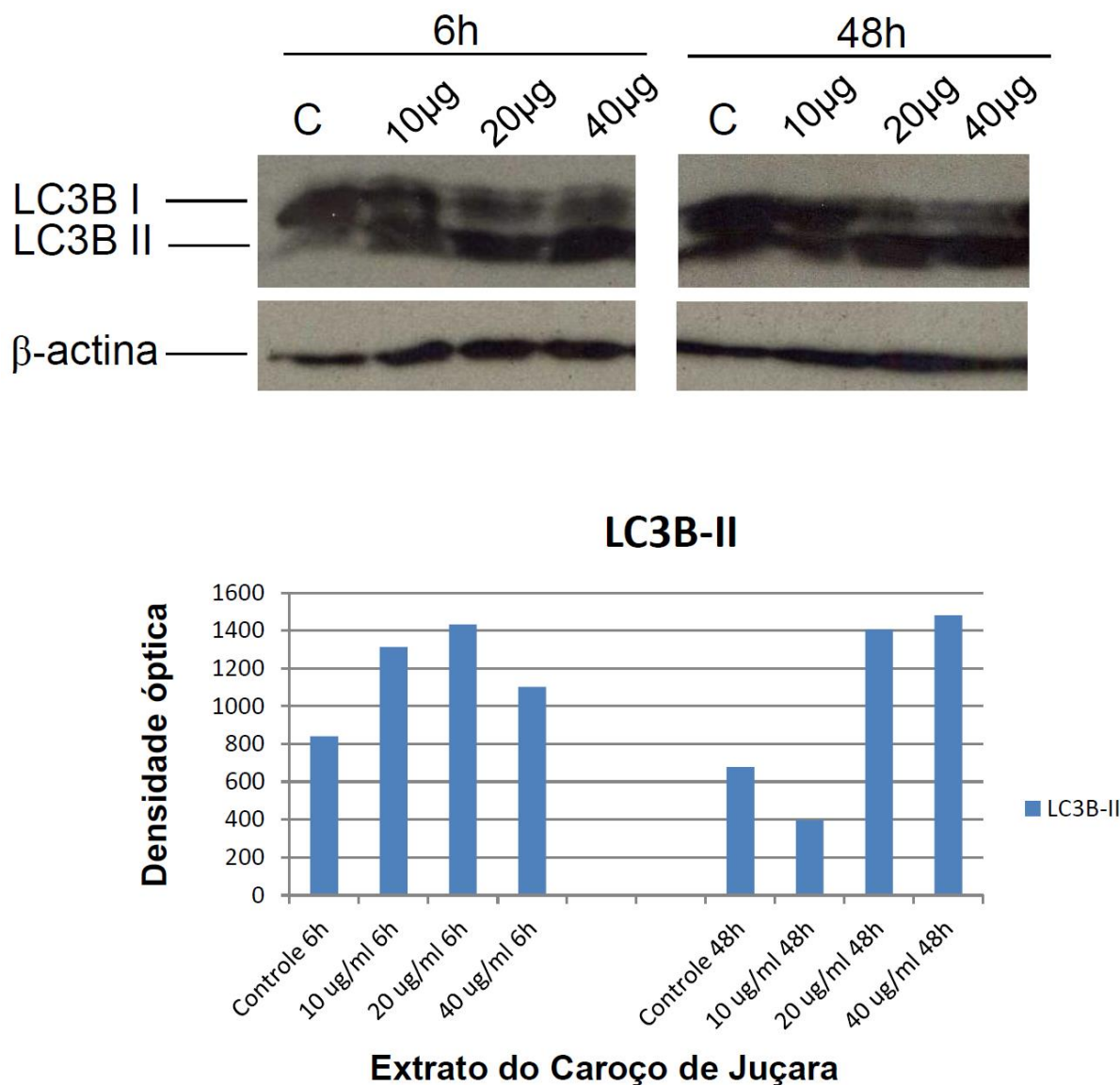


Figura 18 - **Análise da expressão da proteína LC3-B II através da técnica de Western Blotting.** Foi observado aumento da expressão da proteína LC3-B após 6 e 48 horas de tratamento das células MCF-7 com o extrato do caroço de juçara. A proteína  $\beta$ -actina foi utilizada como controle de concentração protéica.

## 5. DISCUSSÃO

Apesar dos grandes esforços na pesquisa e do avanço dos tratamentos na área da oncologia, o câncer ainda é uma das principais causas de morte em todo o mundo, calculando-se cerca de 7.6 milhões de mortes (13% de todas as mortes) em 2008 (WHO, 2008). No Brasil, o câncer foi responsável por 178.990 mortes (15% de todas as mortes) no ano de 2010 (INCA, 2011).

Entre mulheres, o câncer de mama é responsável pelo maior número de mortes por câncer no mundo seguido do câncer colon-retal, cérvix uterina, pulmão e estômago (WHO, 2008). No Brasil, o câncer de mama também é a neoplasia que mais mata mulheres, seguida dos tumores de pulmão, cólon e reto, cérvix uterina e estômago (INCA, 2011).

Não menos importante do que as pesquisas e os novos tratamentos para o câncer está a quimioprevenção. A Organização Mundial de Saúde (OMS) (2008), corroborada por Bode; Dong (2009) e Lee *et al.*, (2011), advertem que um terço das mortes por câncer poderiam ter sido evitadas e que a dieta está intimamente relacionada à prevenção da enfermidade.

A suplementação de fitoquímicos em dietas humanas é indicada para proporcionar numerosos benefícios à saúde. Esta suplementação dar-se-á principalmente através do consumo de frutas e vegetais (PAN *et al.*, 2009; BIHAN *et al.*, 2010).

Compostos bioativos naturais em produtos vegetais alimentares, incluindo frutas, vegetais, grãos, legumes, chá e vinho são indicados para ajudar a prevenir diversas enfermidades como o câncer, doenças degenerativas, inflamação crônica e aguda (PAN *et al.* 2009).

Estudos avaliam a ingestão de determinados alimentos com a redução da incidência de doenças. Torre-Sanchez *et al.* (2008) observaram que a ingestão de alimentos ricos em flavonoides e lignanas como tomate, cebola, banana e melão reduzia o risco de desenvolvimento de câncer de mama entre mulheres mexicanas.

O fruto da *Euterpe oleracea* Mart., conhecido como açaí ou juçara, é rico em flavonoides, tendo sido demonstrado por ter potenciais benefícios à saúde em modelos experimentais. Apresenta propriedades antitumorigênicas (DEL POZO-INSFRAN; PERCIVAL; TALCOTT, 2006), antioxidante *in vitro*, e possui potencial

anti-inflamatório como potente inibidor de COX-2 (SCHAUSS *et al.*, 2006; SUN *et al.* 2010).

Feio *et al.* (2012), observaram que a ingestão de extratos de *Euterpe oleracea* Mart. melhoraram o perfil lipídico e atenuaram a aterosclerose em coelhos.

A juçara é composta por algumas importantes substâncias fitoquímicas de reconhecida atividade antineoplásica como as antocianinas. A cianidina é um composto orgânico da categoria das antocianinas de coloração vermelha presente em vegetais como cereja, jamelão, uva, morango, amora, figo, cacau e açaí (GALVANO *et al.*, 2004; SCHAUSS *et al.*, 2006; MULABAGAL; KELLER; CALDERÓN, 2012).

A cianidina é reconhecidamente um potente agente quimiopreventivo (LAZZÈ *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2010). Lazzè *et al.* (2004) demonstraram que a cianidina induziu parada no ciclo celular em linhagens de tumores de útero e adenocarcinoma colon-retal. Kim *et al.* (2010) observaram que a cianidina inibiu a expressão de COX-2 e a secreção de prostaglandina E<sub>2</sub> em uma linhagem celular de epiderme. Este composto também reduziu fortemente a fosforilação de proteínas da via MAPK como JNK1/2, ERK1/2, e MEK1/2.

Outras antocianinas como a malvidina, peonidina, petunidina e delphinidina também tem sido relatadas como compostos com atividade antitumorigênica (KAUSAR *et al.*, 2012).

Kausar *et al.* (2012), demonstraram inibição da proliferação de linhagens celulares de câncer de pulmão não-pequenas células após tratamento com diferentes antocianinas. Foi observada parada no ciclo celular, apoptose e supressão da migração e do potencial invasivo nestas linhagens. Os autores relatam que estes efeitos se deram pela interação dos compostos fitoquímicos nas vias de sinalização celular Notch e Wnt através das suas proteínas  $\beta$ -catenina, c-myc, ciclina D1, ciclina B1, pERK, MMP9 e VEGF.

Nesta pesquisa analisaram-se os efeitos dos extratos de juçara (*Euterpe oleracea* Mart.) nativa do Estado do Maranhão em diferentes linhagens de células malignas humanas. Os polifenóis extraídos da *Euterpe oleracea* Mart. nesta pesquisa, mostraram-se mais concentradas do que aqueles do Estado do Pará (casca 8,7%; caroço 21,9% e futo total 18,9%). Após ter sido obtido o extrato hidroalcoólico da casca, caroço e fruto total da juçara analisou-se inicialmente a viabilidade celular nas linhagens MCF-7, CACO-2, HT-29 e MDA-MB-468.

A análise da concentração dos polifenóis pelo método de Folin-Ciocalteu revelou maior concentração destes compostos nos extratos do caroço e fruto total da juçara do Maranhão diferindo da concentração do açaí do Estado do Pará que se mostrou inferior. Os polifenóis compreendem o maior grupo dentre os compostos bioativos nos vegetais, sendo subdivididos em classes, de acordo com a estrutura química de cada substância. Os principais grupos de polifenóis são os ácidos fenólicos, tendo como exemplos: o ácido clorogênico, presente no café; os estilbenos, como o resveratrol presente nas uvas e vinho; as cumarinas, como as furanocumarinas do aipo; as ligninas, como as lignanas da linhaça; e os flavonoides (FALLER; FIALHO, 2009).

Soares de Moura et al. (2011) descreve acerca de *Euterpe oleracea* Mart. as propriedades antioxidantes e antiinflamatórias do fruto.

Os efeitos do tratamento com os extratos de juçara na viabilidade das células foram distintos dependendo do tipo celular. O efeito citotóxico foi específico para a linhagem de adenocarcinoma mamário MCF-7.

O grande diferencial observado na linhagem MCF-7 em relação às outras trabalhadas neste estudo foi a positividade para os receptores hormonais. A juçara, assim como outros alimentos, é rica em isoflavonas e lignanas, que são compostos análogos ao estrogênio, denominados fitoestrógenos (Chiang & Pan, 2013). Os fitoestrógenos possuem a capacidade de se ligar ao receptor de estrogênio e exercer diversos efeitos estrogênicos e antiestrogênicos (Branca, 2003; Usui, 2006). Uma hipótese seria de que na juçara exista um composto ou compostos que atuem na via do estrogênio interferindo na proliferação e viabilidade celular. Porém, esta hipótese precisa ser testada.

Os extratos derivados do caroço e do fruto foram os mais eficazes na redução da viabilidade celular. Sugerimos que este resultado pode ser explicado pela maior concentração de polifenóis encontrados nestas duas frações quando comparadas com a fração da casca.

A literatura descreve uma atividade antitumorigênica de polifenóis. Singh et al (2013) observaram um aumento da quimiosensibilidade à cisplatina em linhagens de câncer cervical tratadas com polifenóis derivados do chá verde. Apostolou et al (2013) viram uma diminuição na viabilidade de linhagens de câncer cervical tratadas com polifenóis derivados de *Vitis vinifera* (Apostolou et al., 2013).

Ainda deve ser comprovado o agente fitoquímico de juçara responsável pelos efeitos antitumorigênicos na linhagem MCF-7.

Pesquisadores já demonstraram efeitos citotóxicos de extratos de plantas na linhagem MCF-7. Sun e Liu (2008) observaram que o extrato de maçã inibiu a proliferação da MCF-7 e da linhagem MDA-MB-231 (receptor estrogênio negativo) sugerindo que a atividade antiproliferativa ocorreu pela interferência no ciclo celular devido à redução da expressão de ciclina D1 e Cdk4.

Bouallaqui et al. (2011) estudando o extrato rico em hidroxitirosol derivado de folhas de oliveira (*Olea europea* L), observaram a inibição da progressão do ciclo celular em células MCF-7. Os efeitos citotóxicos foram examinados utilizando teste MTT em concordância com os experimentos desta pesquisa com o extrato da juçara, cujos ensaios resultaram em uma inibição do crescimento dependente da dose. O efeito citotóxico das folhas de oliveira se deu pelo impedimento da progressão do ciclo celular observado pelo acúmulo de células na fase G0/G1. Estes pesquisadores consideraram o elevado teor de polifenóis identificados como fitoquímicos valiosos por apresentar propriedades antioxidantes e anti-cancer com atividades preventivas.

O resveratrol, um polifenol isolado da uva, também apresenta atividade antiproliferativa na linhagem MCF-7, inibindo a expressão do NF- $\kappa$ B (BANERJEE; BUESO-RAMOS; AGGARWAL, 2002).

Muslim *et al.*, (2012) demonstraram *in vitro* a inibição da angiogênese por ensaios com extrato de *Pithecellobium jiringa*, da família Leguminosae nativa do Sudoeste da Ásia. A inibição do crescimento celular foi avaliada pelo teste de MTT. As células foram tratadas com o extrato durante 48 h. Foi testado além da linhagem MCF-7, a linhagem Hep G2 (linhagem de células de câncer de fígado) CCD-18Co (fibroblastos normais do cólon) e HUVEC (células endoteliais). No entanto, o extrato apresentou maior inibição de crescimento na linhagem HUVEC bloqueando fator de crescimento vascular (VEGF).

Manoj *et al.*, (2012) avaliaram os efeitos do extrato aquoso e metanólico de *Leucobryum bowringii* Mitt na viabilidade da linhagem MCF-7. Através de observações da célula tratada por microscopia eletrônica e por coloração do núcleo pelo corante Hoechst 33342, os autores caracterizaram a morte das células por apoptose. Pesquisadores japoneses observaram que o tratamento de células MCF-7 com o extrato etanólico do própolis vermelho brasileiro causava apoptose. Diferentemente do

que foi observado por estes pesquisadores, o presente trabalho com o fruto juçara demonstrou que a morte das células MCF-7 se deu pelo processo de autofagia também confirmada pela detecção da proteína do autofagossoma LC3B-II.

A autofagia é uma via lisossomal de degradação essencial na proteção do organismo contra várias patologias como infecções, câncer, neurodegeneração, envelhecimento e doenças coronárias (LEVINE; KROEMER, 2008; ALBUQUERQUE-XAVIER *et al.*, 2012).

No presente trabalho, os ensaios com o corante DAPI e a microscopia eletrônica de transmissão não mostraram morfologia indicativa de apoptose. O ensaio com o kit Caspase 3/7 corroborou com este resultado. A morte celular ocorrida na linhagem MCF-7 foi a autofagia comprovada pelas observações morfológicas e pelo aumento da expressão da proteína LC3B-II.

Tsuyuki *et al* (2012) observaram que antocianidinas induziam autofagia na linhagem HeLa e não induziam apoptose. O extrato de *Solanum nigrum* Linn, uma erva utilizada na medicina popular asiática, rico em polifenóis e antocianidinas, causou autofagia na linhagem de câncer de mama AU565 (Huang *et al.*, 2010).

A autofagia é ativada em resposta a diferentes formas de estresse metabólico como privação de nutrientes, depleção de fatores de crescimento, estresse oxidativo e hipóxia. Neste processo, cargas citosólicas são presas em vesículas de dupla membrana, chamado autofagossomas e orientadas para a degradação pelo lisossoma. Esta "autodigestão" serve tanto para sustentar a produção de energia na falta de nutrientes como para eliminar proteínas danificadas ou organelas defeituosas após o estresse. Durante o stress oxidativo, a autofagia é particularmente importante para a remoção de mitocôndrias danificadas (LEVINE; KROEMER, 2008).

O papel da autofagia na tumorigênese é controverso. Estudos têm demonstrado que a autofagia é um mecanismo de sobrevivência que sustenta a produção de energia e de proteína (LU *et al.*, 2010; CHEN; KARANTZA, 2011; KIMMELMAN, 2011). No entanto, outros estudos têm demonstrado que a autofagia tem efeitos supressores no tumor (CRIGHTON *et al.*, 2006; GONZALEZ-MALERVA *et al.*, 2011). A perda do gene da autofagia, Beclin 1 e de outros genes importantes é observada em câncer humanos e promove a formação de tumores em ratos (OH *et al.*, 2011).

O papel da autofagia mostra-se dinâmico no cancer, tanto como um supressor de tumor no início da progressão e mais tarde como um processo pró-tumorigênico, crítico para a manutenção de tumores e resistência terapêutica (CHEN; KARANTZA, 2011; KIMMELMAN, 2011). O papel da autofagia no câncer humano e sua regulação ainda não foram elucidados e terá de ser explorada para um entendimento completo do processo.

Segundo Gonzalez-Malerva et al. (2011), os moduladores selectivos de receptor de estrogénio como o tamoxifeno fazem parte do tratamento padrão para muitos cancer da mama ER-positivo demonstrado por reduzir a mortalidade. Infelizmente, muitos pacientes se tornam resistentes por mecanismos que foram apenas parcialmente caracterizados.

Aoki *et al.*, (2008), em estudos para identificar eventos moleculares associados à autofagia, foi realizada a análise de microarranjo de cDNA em linhagens celulares de glioblastoma. Com base na análise, foi levantado um anticorpo policlonal contra isoforma B humana associada a microtúbulos 1 proteína de cadeia leve de 3 (LC3B). Aplicação do anticorpo anti-LC3B revelou a presença de células autofágicas tanto *in vitro* e em contexto *in vivo*. Elevada expressão de LC3B foi associada com um melhor resultado para os pacientes com pior desempenho, Anti-LC3B anticorpo proporciona uma ferramenta útil para monitorizar a indução de autofagia em células cancerosas e em outros tecidos.

Substâncias orgânicas originárias de fontes naturais há muito tempo são utilizadas no tratamento de inúmeras enfermidades humanas. Grande parte dos medicamentos encontrados no mercado é derivada diretamente ou indiretamente de vegetais, microorganismos e invertebrados terrestres (BRANDÃO *et al.*, 2010). Dessa forma, a pesquisa básica envolvendo estudos acerca do potencial terapêutico de produtos naturais deve ser incentivada, pois compreende uma fonte muito importante no desenvolvimento de novos medicamentos.

O extrato hidroalcoólico do caroço de juçara utilizado nesta pesquisa foi extrato bruto, que necessita de purificação para que seja possível a identificação do(s) princípio(s) ativo(s). Além disso, mais testes necessitam ser realizados para identificação do alvo molecular na célula neoplásica.

## 6. CONCLUSÕES

Os extratos hidroalcoólicos da casca, caroço e fruto de juçara foram obtidos e analisados tendo sido demonstrado a predominância de polifenóis no caroço, fruto total e em menor quantidade na casca.

Os extratos de juçara reduziram a viabilidade na linhagem de adenocarcinoma mamário estrogênio-dependente (MCF-7), não tendo efeito citotóxico nas demais linhagens.

A morfologia das células MCF-7 apresentou-se alterada com a redução do volume celular e aparecimento de vesículas na membrana da célula.

A morte celular foi investigada e concluiu-se que esta não ocorreu por apoptose nos ensaios realizados. A análise por Western Blotting das proteínas extraídas das células tratadas demonstrou um aumento da expressão da proteína LC3-B que corroborado com observações de vesículas autofágicas na microscopia eletrônica de transmissão confirmaram a ocorrência de autofagia.

Os efeitos citotóxicos do extrato de juçara sugerem que na *Euterpe oleracea* Mart. existe um potente agente quimiopreventivo útil no tratamento do câncer de mama estrogênio-dependente.

Os extratos hidroalcoólicos de juçara não foram capazes de reduzir a viabilidade das células CACO-2, HT-29 e MDA-MB-468, comprovando a não ocorrência de efeito citotóxico.

## REFERÊNCIAS

Agra MF, Freitas PF, Barbosa Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17(1), 2007.

Aiyer HS, Gupta RC. Berries and ellagic acid prevent estrogen-induced mammary tumorigenesis by modulating enzymes of estrogen metabolism. *Cancer Prev Res (Phila)*. 3(6):727-37. 2010.

Albuquerque-Xavier AC, Bastos LG, de Freitas JC Jr, Leve F, de Souza WF, de Araujo WM, Wanderley JL, Tanaka MN, de Souza W, Morgado-Díaz JA. Blockade of irradiation-induced autophagosome formation impairs proliferation but does not enhance cell death in HCT-116 human colorectal carcinoma cells. **Int J Oncol**. 40(4):1267-76. 2012.

Alink G, Barlow S, Cockburn A, Flachowsky G, Knudsen I, Kuiper H, Massin DP, Pascal G, Peijnenburg A, Phipps R, Pötting A, Poulsen M, Seinen W, Spielmann H, Loveren VH, Wal JM, Williams A, Andersson HC, Arpaia S, Bartsch D, Casacuberta J, Davies H, Loose M de, Hendriksen N, Kärenlampi HL, Kiss SJ, Sørensen H-KI, Kuiper NI, Panopoulos N, Perry J, Pötting A, Schiemann W, Seinen J, Sweet JM, Wal J. EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials. **Food Chem Toxicol**. 46 Suppl 1:S2-70. 2008.

Aoki H, Kondo Y, Aldape K, Yamamoto A, Iwado E, Yokoyama T, Hollingsworth EF, Kobayashi R, Hess K, Shinojima N, Shingu T, Tamada Y, Zhang L, Conrad C, Bogler O, Mills G, Sawaya R, Kondo S. Monitoring autophagy in glioblastoma with antibody against isoform B of human microtubule-associated protein 1 light chain 3. **Autophagy**. 4(4):467-75.2008.

Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, Trizoglou I, Wallace Hayes A, Kouretas D. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. **Food Chem Toxicol**. 2013 Feb 1.

Banerjee S, Bueso-Ramos C, Aggarwal BB. Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor- $\kappa$ B, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9. **Cancer Res**. 62, 4945–4954. 2002.

Barth S, Glick D, Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts. **J Pathol**. 221(2): 117–124. 2010.

Baumann L, Woolery-Lloyd H, Friedman A. "Natural" ingredients in cosmetic dermatology. **Journal of Drugs and Dermatology**, v. 8, n. 6, S:5-9, 2009.

Bemis DL, Capodice JL, Desai M, Buttyan R, Katz, AE. A concentrated aglycone isoflavone preparation (GCP) that demonstrates potent anti-prostate cancer activity in vitro and in vivo. **Clin Cancer Res.** 1;10(15):5282-92. 2004.

Bihan H, Castetbon K, Mejean C, Peneau S, Pelabon L, Jellouli F, Le Clesiau H, Hercberg S. Sociodemographic factors and attitudes toward food affordability and health are associated with fruit and vegetable consumption in a low-income French population. **J Nutr.** 140(4):823-30. 2010.

Bode AM, Dong, Z. Cancer prevention research - then and now. **Nat Rev Cancer.** 9(7):508-16. 2009.

Bouallagui Z, Han J, Isoda H, Sayadi S. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, 49. 179–184. 2011.

Boyle L, Levin B. World Cancer Report 2008. **IARC Library Cataloguing in Publication Data**

Branca F. Dietary phyto-oestrogens and bone health. **Proc Nutr Soc.** 62(4):877-87. 2003.

Brandão HN, David JP, Couto RD, Nascimento JAP, David JM. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 6, 1359-1369, 2010.

Bray F, Moller B. Predicting the future burden of cancer. **Nat Rev Cancer.** 6(1):63-74. 2006.

Broeders M, Moss S, Nyström L, Njor S, Jonsson H, Paap E, Massat N, Duffy S, Lynge E, Paci E, EUROSCREEN Working Group. The impact of mammographic screening on breast cancer mortality in Europe: a review of observational studies. **J Med Screen.** 19 Suppl 1:14-25. 2012.

Brown EM, Gill CI, Mcdougall GJ, Stewart D. Mechanisms Underlying the Anti-Proliferative Effects of Berry Components in In Vitro Models of Colon Cancer. **Curr Pharm Biotechnol.** 2011.

Buhrke T, Lengler I, Lampen A. Analysis of proteomic changes induced upon cellular differentiation of the human intestinal cell line Caco-2. *Dev Growth Differ.* 53(3):411-26. 2011.

Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem.* 11(4):298-344. 2011.

Calzavara BBG. **As possibilidades do açazeiro no estuário amazônico.** (Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 5). Belém: FCAP. 103p. 1972.

Cavalli F. Cancer in the developing world: can we avoid the disaster? *Nat Clin Pract Oncol.* 11, 582-3. 2006.

Cavallini DCU, Rossi EA. Equol: Efeitos Biológicos e Importância Clínica de um Metabólito das Isoflavonas. *Alim. Nutr.*, Araraquara v.20, n.4, p. 677-684, 2009.

Chen N, Karantza V. Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biol Ther.* 15;11(2):157-68. 2011.

Cheung KL, Kong AN. Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention. *AAPS J*, v. 12, n. 1, p. 87-97, 2010.

Chiang , Shen-Shih; Tzu-Ming Pan. Beneficial effects of phytoestrogens and their metabolites produced by intestinal microflora on bone health. **Applied Microbiology and Biotechnology** February 2013, Volume 97, Issue 4, pp 1489-1500

Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW, Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys.* 1;501(1):79-90. 2010.

Cock IE, Mohanty S. Evaluation of the antibacterial activity and toxicity of Terminalia ferdinandia fruit extracts. **Pharmacogn Mag Forthcoming.** 2011.

Cohen E, Ophir I, Shaul YB. Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 16):2657-66. 1999.

Coisson JD Travaglia F, Piana G, Capasso M, Arlorio M. *Euterpe oleracea* juice as functional pigment for yogurt. *Food res Int.* v. 38, p. 847-853, 2005.

Colavitti R, Finkel T. Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence. **IUBMB Life**. 57(4-5):277-81. 2005.

Colditz GA, Sellers TA, Trapido E. Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer? **Nat Rev Cancer**. 6(1):75-83. 2006.

Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, Alves APNN, Madeira SVF, Pessoa C, Moraes MEA, Moraes MO. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, Rev. **Virtual Quim.**, 2 (1), 47-58. 2010.

Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, 60:52-60. 1997.

Crichton D, Wilkinson S, O'prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. **Cell**. 14;126(1):121-34. 2006.

Cronquist A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press - Nature - 1262 pages. 1981.

Dampier K, Hudson EA, Howells LM, Manson MM, Walker RA, Gescher A. Differences between human breast cell lines in susceptibility towards growth inhibition by genistein. **British Journal of Cancer**, 85(4), 618–624. 2001.

Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*. 19;366(9499):1784-93. 2005.

Del Pozo-Insfran D, Percival SS, Talcott S. T. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1222-1229, 2006.

Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J. Natl Cancer Inst**. 66, 1191–1308.1981.

dos Santos GM, Maia GA, Sousa PHM, Costa JMC, Figueiredo RW, Prado GM. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açai (*Euterpe oleracea* Mart) *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, v. 58, n. 2, 2008.

Duthie SJ. Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. **Mol Nutr Food Res.** 51(6):665-74. 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Sistema de Produção do Açaí. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai\\_2ed/index.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/index.htm)> Acesso em: 09 fev. 2013.

Faller ALK, Fialho E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. *Rev. Saúde Pública* vol.43 no.2 São Paulo Apr. 2009.

Feio CA, Izar MC, Ihara SS, Kasma SH, Martins CM, Feio MN, Maués LA, Borges NC, Moreno RA, Póvoa RM, Fonseca FA. *Euterpe oleracea* (açai) modifies sterol metabolism and attenuates experimentally-induced atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb.** 19(3):237-45. 2012.

Feitosa AC, Trovão JR. Atlas escolar do Maranhão: Espaço Geo-Historico e Cultural, João Pessoa: Grafset, 2006.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008, v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase, Nº. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed. 07.12.2011.

Galvano F, La Fauci L, Lazzarino G, Fogliano V, Ritieni A, Ciappellano S, Battistini, NC, Tavazzi B, Galvano G. Cyanidins: metabolism and biological properties. **J Nutr Biochem.** 15(1):2-11. 2004.

Gama JS, Monte DM de O, Alves EU, Bruno R de LA, Braga Júnior, J.M. Temperatures and substrates for germination and vigor of *Euterpe oleracea* Mart. Seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 4, p. 664-670. 2010.

Gey KF. Cardiovascular disease and vitamins: concurrent correction of 'suboptimal' plasma antioxidant levels may, as an important part of the 'optimal' nutrition, help to prevent early stages of cardiovascular disease and cancer, respectively. *Bibl Nutr Dieta.* (52):75-91. 1995.

Gonzalez-Malerva L, Park J, Zou L, Hu Y, Moradpour Z, Pearlberg J, Sawyer J, Stevens H, Harlow E, Labaer J. High-throughput ectopic expression screen for tamoxifen resistance identifies an atypical kinase that blocks autophagy. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1;108(5):2058-63. 2011.

Hanausek M, Walaszek Z, Slaga TJ. Detoxifying cancer causing agents to prevent cancer. *Integr Cancer Ther.* 2:139. 81. 2003.

Henderson A, Galeano G. **Euterpe, Prestoea, and Neonicholsonia (Palmae: Euterpeinae)**. New York: New York Botanical Garden, 1996. 90p. (Flora Neotropica, 72).

Hisham An, Yip CH. Spectrum of breast cancer in Malaysian women: overview. *World J Surg.* 27(8):921-3. 2003.

Holderness J, Schepetkin IA, Freedman B, Kirpotina LN, Quinn MT, Hedges J.F, Jutila MA. Polysaccharides isolated from Açai fruit induce innate immune responses. *PLoS One.* 28;6(2):e17301. 2011.

Huang HC, Syu KY, Lin JK. Chemical composition of *Solanum nigrum* linn extract and induction of autophagy by leaf water extract and its major flavonoids in AU565 breast cancer cells. **J Agric Food Chem.** 2010 Aug 11;58(15):8699-708.

Hwang Mk, Kang Nj, Heo Ys, Lee Kw, Lee HJ. Fyn kinase is a direct molecular target of delphinidin for the inhibition of cyclooxygenase-2 expression induced by tumor necrosis factor-alpha. **Biochem Pharmacol.** 1;77(7):1213-22. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE - Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura Vol. 25, 2010. 50p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE - Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. v. 25, Rio de Janeiro: 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. [Acesso em 2013 jan 20] Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidades>, 2013

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: Inca, 2011. 118 p.

Jensen GS, Wu X, Patterson KM, Barnes J. Carter SG, Scherwitz L, Beaman R, Endres JR, Schauss AG. In vitro and in vivo antioxidant and anti-inflammatory

capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8326-8333, 2008.

Jeong WS, Kong AN. Chemopreventive functions of isothiocyanates. **Drug News Perspect.** 18:445–51. 2005.

Johnson JL, Rupasinghe, SG, Stefani F, Schuler MA, Mejia EG. Citrus Flavonoids Luteolin, Apigenin, and Quercetin Inhibit Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Enzymatic Activity by Lowering the Interaction Energy Within the Binding Cavity. **Journal of Medicinal Food.** 14(4): 325-333. 2011.

Jones DL. **Palms**: throughout the world. Washington: Smithsonian Institution. 1995. 410p.

Kahn F. **Les palmiers de l'eldorado**. Paris: Éditions de l'Oprstom. 1997. 252p.

Kang NJ, Lee K.W, Rogozin EA, Cho YY, Heo YS, Bode AM, Lee HJ, Dong Z. Equol, a metabolite of the soybean isoflavone daidzein, inhibits neoplastic cell transformation by targeting the MEK/ERK/p90RSK/activator protein-1 pathway. **J Biol Chem.** 9;282(45):32856-66. 2007.

Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J Cell Biol**, v. 27, p. 137a, 1965.

Katikireddi V. 100 000 children die needlessly from cancer every year. **BMJ.** 21; 328 (7437): 422. 2004.

Kausar H, Jeyabalan J, Aqil F, Chabba D, Sidana J, Singh Ip, Gupta RC. Berry anthocyanidins synergistically suppress growth and invasive potential of human non-small-cell lung cancer cells. **Cancer Lett.** 1;325(1):54-62. 2012.

Khan SI, Zhao J, Khan IA, Walker L.A, Dasmahapatra AK. Potential utility of natural products as regulators of breast cancer-associated aromatase promoters. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 9:91. 2011.

Kim JE, Kwon J.Y, Seo SK, Son JE, Jung SK, Min SY, Hwang MK, Heo Y.S, Lee KW, Lee HJ. Cyanidin suppresses ultraviolet B-induced COX-2 expression in epidermal cells by targeting MKK4, MEK1, and Raf-1. **Biochem Pharmacol.** 15;79(10):1473-82. 2010.

Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer. **Genes Dev.** 1;25(19):1999-2010. 2011.

Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 44:239–67. 2004.

Kwon JY, Lee KW, Kim JE, Jung SK, Kang NJ, Hwang MK, Heo YS, Bode AM, Dong Z, Lee HJ. Delphinidin suppresses ultraviolet B-induced cyclooxygenases-2 expression through inhibition of MAPKK4 and PI-3 kinase. **Carcinogenesis.** 30(11):1932-40. 2009.

Kwon KH, Barve A, Yu S, Huang MT, Kong An. Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models. **Acta Pharmacol Sin.** 28(9):1409-21. 2007.

Laslo M, Sun X, Hsiao CT, Wu WW, Shen R.F, Zou S. A botanical containing freeze dried açai pulp promotes healthy aging and reduces oxidative damage in sod1 knockdown flies. **Age (Dordr).** 2012. 26.

Lazzè MC, Savio M, Pizzala R, Cazzalini O, Perucca P, Scovassi AI, Stivala LA, Bianchi L. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. **Carcinogenesis.** 25(8):1427-33. 2004.

Lee KM, Lee KW, Byun S, Jung SK, Seo SK, Heo YS, Bode AM, Lee HJ, Dong Z. 5-deoxykaempferol plays a potential therapeutic role by targeting multiple signaling pathways in skin cancer. **Cancer Prev Res (Phila).** 3(4):454-65. 2010a.

Lee KM, Lee KW, Jung SK, Lee EJ, Hez YS, Bode AM, Lubet RA, Lee HJ, Dong Z. Kaempferol inhibits UVB-induced COX-2 expression by suppressing Src kinase activity. **Biochem Pharmacol.** 15;80(12):2042-9. 2010b.

Lee KW, Bode AM, Dong Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. **Nature Reviews. CanCer.** Volume 11, 2011.

Lee KW, Kang N.J, Rogozin EA, Oh SM, Heo YS, Pugliese A, Bode AM, Lee H.J, Dong Z. The resveratrol analogue 3,5,3',4',5'-pentahydroxy-trans-stilbene inhibits cell transformation via MEK. **Int J Cancer.** 1;123 (11):2487-96. 2008.

Lee Seon-Jin, Smith A, Guo L, Alastalo Tero-Pekka, Li M, Sawada H, Liu X, Chen Zhi-Hua, Ifedigbo E, Jin Y, Feghali-Bostwick C, Ryter S. W.; Kim, H. P.; Rabinovitch,

M.; Choi, A. M. K. Autophagic protein LC3B confers resistance against hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 183, n. 5, p. 649-58, 1. 2011.

Levêque D, Jehl F. Clinical pharmacokinetics of vinorelbine. **Clin Pharmacokinet.** 31(3):184-97. 1996.

Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell.** 11;132(1):27-42. 2008.

Lichtenthäler R, Rodrigues R.B, Maia J.G, Papagiannopoulos M, Fabricius H, Marx F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits. **Int J Food Sci Nutr.** 56(1):53-64. 2005.

Liedo P, Carey J.R, Ingram DK, Zou S. The interplay among dietary fat, sugar, protein and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp in modulating lifespan and reproduction in a Tephritid fruit fly. **Exp Gerontol.** 47(7):536-9. 2012.

Lu HH, Kao SY, Liu TY, Liu ST, Huang WP, Chang KW, Lin SC. Areca nut extract induced oxidative stress and upregulated hypoxia inducing factor leading to autophagy in oral cancer cells. **Autophagy.** 6(6):725-37. 2010.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesey C, Jime'Nez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr** 79, 727–747. 2004.

Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nat Rev Cancer.** 2(2):143-8. 2002.

Manoj GS, Kumar TR, Varghese S, Murugan K. Effect of methanolic and water extract of *Leucobryum bowringii* Mitt. on growth, migration and invasion of MCF 7 human breast cancer cells in vitro. **Indian J Exp Biol.** 50(9):602-11. 2012.

Mantovani ISB, Fernandes SBO, Menezes FS. Constituintes apolares do fruto do açai (*Euterpe oleracea* M. - *Arecaceae*). Departamento de Produtos Naturais e Alimentos, Faculdade de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2003.

Marcason W. What is the açai berry and are there health benefits? **J Am Diet Assoc.** 109(11):1968. 2009.

Mazza GJ. Anthocyanins and heart health. **Ann Ist Super Sanita**. 43(4):369-74. 2007.

Menezes EMS, Torres AT, Srur AUS. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart) liofilizada. **Acta Amazônica**. vol. 38 (2): 311 - 316, 2008.

Messina M. Soyfoods and soybean phyto-oestrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). **Eur J Cancer**. 36 Suppl 4:S71-2. 2000.

Mohanty S, Cock IE. The chemotherapeutic potential of *Terminalia ferdinandiana*: Phytochemistry and bioactivity. **Pharmacogn Rev**. 6(11):29-36. 2012.

Moore KL, Agur AMR. Fundamentos de Anatomia Clínica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Mulabagal V, Calderón AI. Liquid chromatography/mass spectrometry based fingerprinting analysis and mass profiling of *Euterpe oleracea* (açaí) dietary supplement raw materials. **Food Chem**. 15;134(2):1156-64. 2012.

Mulabagal V, Keller WJ, Calderón AI. Quantitative analysis of anthocyanins in *Euterpe oleracea* (açaí) dietary supplement raw materials and capsules by Q-TOF liquid chromatography/mass spectrometry. **Pharm Biol**. 50(10):1289-96. 2012.

Muslim NS, Nassar Z.D, Aisha AF, Shafaei A, Idris N, Majid A, Ismail Z. Antiangiogenesis and antioxidant activity of ethanol extracts of *Pithecellobium jiringa*. **BMC Complement Altern Med**. 5;12:210. 2012.

Nakata R, Takahashi S, Inoue H. Recent advances in the study on resveratrol. **Biol Pharm Bull**. 35(3):273-9. 2012.

Nascimento WMO do, Silva WR da. Comportamento fisiológico de sementes de Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) submetidas à desidratação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 349-551, 2005.

Neida S, Elba S. Characterization of the acai or manaca (*Euterpe oleracea* Mart.): a fruit of the Amazon. **Arch Latinoam Nutr**. 57(1):94-8. 2007.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. **J. Nat. Prod.** 66, 1022-1037. 2003.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod.** 461–477. 2007.

Oh S, Xiaofei E, Ni D, Pirooz SD, Lee J-Y, Lee D, Zhao Z, Lee S, Lee H, Ku B, Kowalik T, Martin SE, Oh B-H, Jung J.U, Liang C. Downregulation of autophagy by Bcl-2 promotes MCF7 breast cancer cell growth independent of its inhibition of apoptosis. **Cell Death Differ.** 18(3): 452–464. 2011.

Oliveira I, Coelho V, Baltasar R, Pereira JA, Baptista P. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. **Food Chem Toxicol.** 47(7):1507-11. 2009.

Oliveira M do SP de, Carvalho JEU. De; Nascimento, W.M.O. do. **AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.)**. [Acesso em 2013 fev 02] Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Oliveiraetal\\_2000\\_000](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Oliveiraetal_2000_000)

Oshima M, Dinchuk J.E, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **Cell.** 29;87(5):803-9. 1996.

Pacheco-Palencia L A, Talcott ST, Safe S, Mertens-Talcott S. Absorption and Biological Activity of Phytochemical-Rich Extracts from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Pulp and Oil in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 56, p. 3593–3600, 2008.

Pacheco-Palencia LA. Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and oil in vitro. **J Agric Food Chem.** 28;56(10):3593-600. 2008.

Pan MH, Lai CS, Dushenkov S, Ho CT. Modulation of inflammatory genes by natural dietary bioactive compounds. **J Agric Food Chem.** 10;57(11):4467-77. 2009.

Parkin DM, Fernandez LM. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. **Breast Journal**, Estados Unidos, v. 12, Supplement 1, p.70-80, 2006.

Perez VI, Bokov A, Remmen HV, Mele J, Ran Q, Ikeno Y, Richardson A. Is the oxidative stress theory of aging dead. **Biochim Biophys Acta**. 2009.

Pessoa JDC, Arduin M, Martins MA, Carvalho JEU. De. Characterization of Açaí (*E. oleracea*) Fruits. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.53 n. 6: pp. 1451-1460, 2010.

Plotkin MJ, Balick MJ. Medicinal uses of South **American palms**. **J Ethnopharmacol.** 10(2):157-79. 1984.

Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. **Science**. 330: 1344–1348. 2010.

Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. **Eur Respir J.** 28(1):219-42. 2006.

Rios L. **Estudos de Geografia do Maranhão**. 1. ed. São Luís: Graphis, 2001. p. 93 - 123.

Rocha APM, Carvalho LCRM, Sousa MAV, Madeira SVF, Sousa PJC, Tano T, Schini-Kerth VB, Resende AC, Soares de Moura R. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 97-104, 2007.

Rodrigo R, Gil D, Miranda-Merchak A, Kalantzidis G. Antihypertensive role of polyphenols. **Adv Clin Chem.** 58:225-54. 2012.

Rogez H. **Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação**. Belém, PA: EDUFPA, 2000. 313p.

Sabbe S, Verbeke W, Deliza R, Matta V, Van Damme P. Effect of a health claim and personal characteristics on consumer acceptance of fruit juices with different concentrations of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Appetite**, v. 53, n. 1, p. 84-92, 2009.

Sanabria N, Sangronis E. Caracterización del açaí o manaca (*Euterpe oleracea* Mart.): um fruto del Amazonas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Vol. 57 N° 1, 1–6. 2007.

Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J Nutr.** 130(8S Suppl):2073S-85S. 2000.

Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, Agarwal A, Jensen G.S, Hart AN, Shanbrom E. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai), **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8604, 8610, 2006. CLAE/HPLC

Seeram NP. Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. **Agric Food Chem.** 13; 56(3):630-5. 2008a.

Seeram NP. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 627-629, 2008b.

Seeram NP. Recent trends and advances in berry health benefits research. **J Agric Food Chem.** 14;58(7):3869-70. 2010.

Setchell KD. Assessing risks and benefits of genistein and soy. **Environ Health Perspect.** 114(6):A332-3. 2006.

Shahid F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. **Food Science and Nutrition**, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

Shoeb M. Anticancer agents from medicinal plants. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 1, p. 35 - 41, 2006.

Silva PR. Novidades na Fruticultura Paraense. **Fruticultura em Revista.** Belém, Pará. 27-31. 2002.

Singh M, Bhui K, Singh R, Shukla Y. Tea polyphenols enhance cisplatin chemosensitivity in cervical cancer cells via induction of apoptosis. **Life Sci.** 2013 Feb 8.

Soares de Moura R, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP, Rubenich LM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmão Correia ML. Antihypertensive, vasodilator, and antioxidant effects of vinifera grape skin extract. **J.Pharm. Pharmacol.** 54: 1515-1520. 2002.

Soares de Moura R, da Costa GF, Moreira AS, Queiroz EF, Moreira DD, Garcia-Souza EP, Resende AC, Moura AS, Teixeira MT. *Vitis vinifera* L. grape skin extract activates the insulin-signalling cascade and reduces hyperglycaemia in alloxan-induced diabetic mice. **J Pharm Pharmacol.** 2012 Feb;64(2):268-76.

Soares de Moura R, Pires KM, Santos Ferreira T, Lopes AA, Nesi RT, Resende AC, Sousa PJ, da Silva AJ, Porto LC, Valenca SS. Addition of acai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. **Food Chem Toxicol.** 49(4):855-63. 2011.

Soobrattee MA, Neergheen V.S, Luximon-Ramma A, Aruoma, OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutat Res.** 11;579(1-2):200-13. 2005.

Souto RNM. **Uso da radiação  $\gamma$ , combinada à refrigeração, na conservação de polpa de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.).** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 95pp., 2001.

Souza FS. **Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do suco de juçara (*Euterpe oleracea* Mart.), obtido por métodos manuais e mecânicos, comercializado na cidade de São Luís-Ma.** Monografia Universidade Federal do Maranhão, São Luís-MA, 2003. 64p.

Stoner GD. Foodstuffs for preventing cancer: the preclinical and clinical development of berries. **Cancer Prev Res (Phila).** 2(3):187-94. 2009.

Subbaramaiah K, Chung W.J, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang M, Pezzuto J.M, Dannenberg AJ. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **J Biol Chem.** 273(34):21875-82. 1998.

Sun C, Hu Y, Liu X, Wu T, Wang Y, He W, Wei W. Resveratrol downregulates the constitutive activation of nuclear factor-kappaB in multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and invasion, arrest of cell cycle, and induction of apoptosis. **Cancer Genet Cytogenet.** 165(1):9-19. 2006.

Sun J, Liu RH. Apple phytochemical extracts inhibit proliferation of estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer cells through cell cycle modulation. **J Agric Food Chem.** 24;56(24):11661-7. 2008.

Sun X, Seeberger J, Alberico T, Wang C, Wheeler CT, Schauss AG, Zou S. Açaí palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. **Exp Gerontol.** 45(3):243-51. 2010.

Surh Y-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews Cancer.** vol. 3, 768-780, 2003.

Tirelli U, de Castro G Jr, Awada A. Keynote comment: reimbursement for molecularly targeted anticancer agents. **Lancet Oncol.** 7(1):2-3. 2006.

Torres-Sanchez L, Galvan-Portillo M, Wolff MS, Lopez-Carrillo L. Dietary consumption of phytochemicals and breast cancer risk. In: Mexican women. **Public Health Nutrition** 12(6), 825–831, 2008.

Traustadóttir T, Davies SS, Stock AA, Su Y, Heward CB, Roberts LJ, Harman SM. Tart cherry juice decreases oxidative stress in healthy older men and women. **J Nutr.** 139(10):1896-900. 2009.

Tsuyuki S, Fukui S, Watanabe A, Akune S, Tanabe M, Yoshida K. Delphinidin induces autolysosome as well as autophagosome formation and delphinidin-induced autophagy exerts a cell protective role. **J Biochem Mol Toxicol.** 2012 Nov;26(11):445-53. Nov 5.

Uhl NW, Dransfield J. Genera Palmarum. A new classification of palms and its implications. In: BALICK, M.J., ed. The palm- tree of life: biology, utilization and conservation. **Advances in Economical Botany**, New York, v.6, p.1-19, 1986.  
Usui T. Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. **Endocr J.** 2006 Feb;53(1):7-20.

Vargas PN, Hoelzel SC, Rosa CS da. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. **Alim. Nutr., Araraquara**, v.19, n.1, p. 11-15. 2008.

Vasanthi HR, Parameswari RP, Deleiris J, Das DK. Health benefits of wine and alcohol from neuroprotection to heart health. **Front Biosci (Elite Ed).** 1;4:1505-12. 2012.

Vigneron M, Deparis X, Deharo E, Bourdy G. Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study. **J Ethnopharmacol.** 26;98(3):351-60. 2005.

Villachica H, Carvalho JEU. De; Müller, C.H.; Diaz, S.C.; Almanza, M. **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia.** Lima: Tratado de Cooperación Amazonica, 1996. 367p. (TCA-SPT,44).

Voon PJ, Kong HL. Tumour Genetics and Genomics to Personalise Cancer Treatment. **Tumour Genetics and Genomics.** 40 (8), 362 - 368. 2011.

Walsh LA, Damjanovski S. IGF-1 increases invasive potential of MCF 7 breast cancer cells and induces activation of latent TGF- $\beta$ 1 resulting in epithelial to mesenchymal transition. **Cell Communication and Signaling** 9:10. 2011.

Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. **Cancer Res.** 45, 1–8. 1985.

Webb A, Mccullough M. Dietary lignans potential role in cancer prevention. **Nutr Cancer** 51, 117–131. 2005.

Willcox DC, Willcox B.J, Todoriki H, Suzuki M. The Okinawan diet: health implications of a low-calorie, nutrient-dense, antioxidant-rich dietary pattern low in glycemic load. **J Am Coll Nutr.** 28 Suppl:500S-516S. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. International agency for research on Cancer. IARC. World Cancer Report 2008. Edited by Boyle and Bernard Levin. Geneva. **Lyon.** 2008. 267.p

## ANEXO - O laudo do fruto da Exsicata



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

Núcleo de Estudos Biológicos

Herbário Rosa Mochel

FAM: Arecaceae

Nº 30

N.C: Euterpe oleracea Mart.

N.V: Açaí, Juçara

Proc: Alegria que integra o Parque Ecológico do Maracanã, São Luís - Maranhão.

Habitat: A região da coleta apresenta características rurais, onde a arborização é exuberante existindo várzeas que possibilitam o desenvolvimento de plantas ornamentais, frutíferas e medicinais, entre elas a fruta-pão, jambo, jaca, cupuaçu, manga de várias espécies. Além da forte presença de açalzeiros.

Descrição: A palmeira do açaí (juçara) selecionada para a exsicata apresentou 15 metros de altura com caule cuja base mediu 45 cm, sendo que a parte mediana foi de 39 cm e o ápice de 38 cm. Do segmento superior da palmeira retiraram-se duas palmas e um cacho com frutos maduros. Os frutos apresentavam formato uniforme.

Col/Det: ZAC; SILVA, D.F.; SANTOS, D.S.      Data: 02/03/2011