



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR

LUANA FRANÇA CALANDRINI DE AZEVEDO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
EFEITOS BIOLÓGICOS DE *Annona glabra* E *Euterpe oleracea***

Belém-PA

2022

LUANA FRANÇA CALANDRINI DE AZEVEDO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
EFEITOS BIOLÓGICOS DE *Annona glabra* E *Euterpe oleracea***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFPA como requisito para obtenção do grau de Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka

Belém-PA

2022

LUANA FRANÇA CALANDRINI DE AZEVEDO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
EFEITOS BIOLÓGICOS DE *Annona glabra* E *Euterpe oleracea***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da UFPA como requisito
para obtenção do grau de Doutora em Genética e Biologia
Molecular.

Belém, ____ de _____ de _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Julio Pieczarka (Orientador)
Laboratório de Citogenética, UFPA

Prof^a. Dr^a. Maria Fani Dolabela (UFPA)

Prof^a. Dr^a. Barbarella de Matos Macchi

Prof^a. Dr^a. Adriana Ribeiro Carneiro Folador

Prof^o. Dr. Luís Adriano Santos do Nascimento

“E o mundo, eu vou virá-lo do avesso, sim!
Estou flutuando por aí em êxtase
Então não me pare agora”

Freddie Mercury

Às minhas duas estrelinhas no céu, sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento sempre será a Deus, que me ouve, acalenta e da paz em momentos de desesperos, sabendo exatamente o que eu preciso, mas sempre me deixando agoniada, valeu Deus, Jesus e Nossa senhora!

Agradeço também a família que tenho, passamos tempos tenebrosos e permanecemos unidos, essa união me ajudou a chegar até aqui, obrigada meus amores!

Aos principais responsáveis por tudo e amores maiores da minha vida: minha mãe Patrícia, mãe Lourdes, meu irmão Felipe, meu pai João Vicente (minha estrelinha no céu). Á minha maravilhosa Algelita, meu vovô gotinha Aleixo, meu tio Aleixo Júnior, tia e madrinha única e preferida Xixa (minha outra estrelinha no céu) e primo preferido William essa vitória é nossa! A minha vovó Darci, meu avô José Vicente, meu tio Júnior, sua esposa Vanessa e minhas primas Sophia e Jade que mesmo do ouro lado do país, sempre foram tão presentes na minha vida! E a família na qual eu nasci no coração e eles nasceram no meu, a família da minha mãe Lourdes que também é minha, muito obrigada!

Ao Vinícius que esteve presente comigo desde o TCC e está agora na tese de doutorado, amo você e sua família, obrigada por tanto!

Obrigada aos meus amigos, de longa data, Marcelo, Ícaro, Éricka, Nathallia e Carol e Renato e os de todo dia o dia todo, presentinhos da vida, Roberta, Jéssica, Felipe, Marina, Amanda e Carol sempre com as palavras que eu preciso ouvir e com os abraços que preciso receber, eu não sei o que seria da minha vida sem vocês! Obrigada minhas amigas que são meus pares perfeitos Karina e Tássia, eu não teria palavras suficientes pra agradecer vocês e dizer o quanto são especiais!

Obrigada meus amigos da Biologia 2011, Minhas Lulys, meus Salafrários, meus amigos que eu morro de saudade, Laiza, Luan, Ananda, André, Rafael, meu grupinho! Laís, Josi, Diego, Dri, Pati, Sara, Fabiano, Carlinhos e Eri, eu tive a melhor turma de graduação de todos os tempos!

E muito obrigada meus amigos do LabCito, vocês foram fundamentais pra chegar aqui, nossas festas e a forma como nos apoiamos na copa desde 2012 me moldaram até os dias de hoje, vocês são maravilhosos, na maioria das vezes kkkk

Obrigada seu Jorge por todo ensinamento compartilhado, eu amo o cultivo de células graças ao senhor, obrigada por tudo! Obrigada dona Conci, por todo carinho super necessário no dia a dia, toda atenção e todas as conversas eu nunca vou esquecer!

Obrigada a meu orientador Julio Pieczarka e minha orientadora Cleusa Nagamachi, por sempre acreditarem em mim e no meu trabalho, são muitos anos de orientação e eu aprendi demais com vocês!

Obrigada a Programa de Pós graduação em Genética e Biologia molecular, por toda formação e ensino, à Universidade federal que foi minha casa por tantos anos, pela infraestrutura para realizar minhas pesquisas e ao CNPq por todo auxílio financeiro, a bolsa de pesquisa é fundamental para os alunos de pós graduação.

Espero não ter esquecido ninguém, com o tempo os agradecimentos ficam menores, estamos mais cansados, porém, cada uma das pessoas importantes da minha vida é lembrada do seu valor, sou grata a todos!

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O SER HUMANO E A FLORA: UMA RELAÇÃO ANTIGA.....	1
1.2 – AS PLANTAS E SEUS EFEITOS	2
1.2.1 Efeito de toxicidade	2
1.2.2 Efeito antioxidante.....	3
1.2.3 Efeito antimutagênico.....	4
1.3- Euterpe oleraceae (AÇAÍ).....	6
1.4- <i>Annona glabra</i> (ARATICUM-DO-BREJO).....	9
1.5- O FRACIONAMENTO BIOMONITORADO COMO METODOLOGIA DE ANÁLISE.....	10
1.6- TESTES IN VITRO: UMA IMPORTANTE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÕES PRELIMINARES EM PRODUTOS NATURAIS.....	11
1.7 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO TESTE DO DPPH	13
1.8 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	14
1.8.1 - Ensaio do MTT	14
1.8.2 – Teste de Apoptose e Necrose (La/Be)	15
.....	17
1.9 –AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE PELO TESTE DO MICRONÚCLEO.....	17
1.10 -TESTE DE AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR	20
2 – OBJETIVOS	21
2.1 – OBJETIVO GERAL	21
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
CAPÍTULO I - Extrato e fração obtidos da casca de <i>Annona glabra</i> (araticum) alteram o ciclo celular de células estomacais não neoplásicas (MNP01) e células de adenocarcinoma gástrico (ACP02).....	23
CAPÍTULO II – Extrato etanólico obtido a partir do caroço de açaí branco e preto exibem atividade antioxidante e citoprotetora <i>in vitro</i>	46
3-CONCLUSÃO GERAL	64
4-PESPECTIVAS	64
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Árvore de açaí (*Euterpe oleraceae*), demonstrando caule e folhas e frutos

Fonte: <http://maqmixer.blogspot.com/2016/08/blog-post.html> B) Fruto de açaí preto

Fonte: <https://www.dicionariotupiguarani.com.br/dicionario/yasai/> C) Fruto de açaí

branco Fonte: <https://www.saudedica.com.br/os-15-beneficios-do-acai-branco-para-saude/>

D) Carçoço de açaí Fonte: <http://revistagalileu.globo.com/revista/common/0,,emi317134-18537,00-pesquisadores+usam+carocos+de+acai+para+fazer+proteses+mais+baratas.html>

Figura 2. Árvore de araticum-do-brejo (*Annona glabra*) em região inundada Fonte:

<https://www.flickr.com/people/scottzona/> B) Fruto de cor esverdeada Fonte:

https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/446898?lg=en C) Fruto maduro de cor amarela

Fonte: <https://www.flickr.com/photos/67300849@N02/35471644172>

Figura 3. Imagens em invertoscópio mostrando as diferenças morfológicas entre linhagem gástrica não neoplásica (MNP01) e de adenocarcinoma gástrico (ACP02) (Fonte: Acervo pessoal).

Figura 4. Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidazil) e a sua forma reduzida (difenil-picril-hidrazina). Fonte:

<https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3730368BMRI2013251754.sch.001&req=4> com adaptações.

Figura 5. Demonstração do MTT de cor amarela e sua forma reduzida de cor roxa. Fonte: https://www.researchgate.net/figure/23456470_fig12_Figure-13-Principle-of-cytotoxicity-MTT-assay, com adaptações

Figura 6. Avaliação do tipo de morte celular por coloração diferencial pelo laranja de acridina e brometo de etídio (La/Be). A. célula viável em verde e célula necrótica em vermelho; B. Célula apoptótica em verde, com corpos apoptóticos e célula necrótica em vermelho. Fonte: De Carvalho et al. (2022) com adaptações.

Figura 7. Mecanismos de formação de micronúcleo aneugênico e clastogênico, mediante exposição a agente indutor. Fonte: <https://bioafgj.wordpress.com/projeto/>, com adaptações.

Figura 8. A) Célula mononucleada. B) Célula binucleada. C) Célula trinucleada. D) Célula polinucleada. E) Célula mononucleada com micronúcleo F) Célula binucleada com micronúcleo. G) Célula mononucleada com broto nuclear. H) Célula binucleada com

broto nuclear. I) Célula com ponte nuclear J) C-metáfase com perda cromossômica K) C-metáfase com perda cromossômica. L) Célula em apoptose. Fonte: Acervo pessoal.

Figura 9. Histograma gerado a partir do teste de ciclo celular avaliado por citometria de fluxo, determinando a quantidade de células em cada etapa da divisão. Fonte: <https://www.abcam.com/cell-cycle-analysis-kit-ab287852.html> acesso em 9/11/2022

CAPÍTULO I

Figura 1. Perfil cromatográficos e espectros de UV do extrato etanólico obtido das cascas de *A. glabra*. $\lambda= 280$ a 400 nm. Fonte: Brígido (2016).

Figura 2. Perfil cromatográficos e espectros de UV da fração metanólica obtida do fracionamento do extrato etanólico das cascas de *A. glabra*. $\lambda= 280$ a 400 nm. Fonte: Brígido (2016).

Figura 3. Correlação entre a captura de radicais livre DPPH e as concentrações utilizadas. Teste de regressão linear. A) Extrato etanólico (EE) e seu respectivo EC_{50} . B) Fração metanólica (FM) e seu respectivo EC_{50} . C) Rutina (RUT) e seu respectivo EC_{50}

Figura 4. Porcentagem da média da sobrevivência celular e seus respectivos desvios padrão. Teste: Kruskal-Wallis-Student Newman Keuls, ($p<0.05$). A: Células gástricas normais (MNP01); B: células de adenocarcinoma gástrico (ACP02); * difere de todos os tratamentos

Figura 5. Média e Desvio padrão da porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular após exposição aos extratos de *A. glabra* e seus controles. A) MNP01. B) ACP 02. *Difere em relação a NC e DMSO. Teste paramétrico ANOVA; comparações múltiplas de Tukey-Kramer ($p<0,05$). NC: controle negativo; DMSO: dimetilsulfóxido (veículo de diluição); EE: extrato etanólico; FM: fração metanólica; PC: controle positivo.

Figura 6. Média e Desvio padrão da sobrevivência das células após exposição aos extratos de *A. glabra* e seus controles. A) MNP01. B) ACP02. *Difere em relação aos demais tratamentos. Teste paramétrico ANOVA; Comparações múltiplas de Tukey-Kramer ($p<0,05$). NC: controle negativo; DMSO: dimetilsulfóxido (veículo de diluição); EE: extrato etanólico de *A. glabra*; FM: fração metanólica de *A. glabra*; PC: controle positivo (DOX= 200 $\mu\text{g/mL}$).

CAPÍTULO II

Figura 1. Correlação entre a captura de radicais livre DPPH e as concentrações utilizadas. A) Extrato de açaí preto e seu respectivo EC_{50} ; B) Extrato de açaí branco e seu respectivo EC_{50} . Teste de regressão linear.

Figura 2. Porcentagem da média da sobrevivência celular com seus respectivos e desvios padrão, expostas por 48h aos extratos de caroços de açaí preto e branco, concomitante à exposição com doxorubicina. A) Células gástricas normais (MNP01); B) Células de adenocarcinoma gástrico (ACP02). Teste: Tukey-ANOVA, ($p < 0.05$). CN: controle negativo, CP: controle positivo. ^a difere de cn e DMSO; ^b difere de todos os tratamentos ^c difere de 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/mL}$, CN e DMSO.

Figura 3. Porcentagem da média da sobrevivência celular com seus respectivos e desvios padrão, expostas por 48h aos extratos de caroços de açaí preto e branco, concomitante à exposição com doxorubicina. A) Células gástricas normais (MNP01); B) Células de adenocarcinoma gástrico (ACP02). Teste: Tukey-ANOVA, ($p < 0.05$). CN: controle negativo, CP: controle positivo e DOX: doxorubicina. ^a difere de CN e DMSO; ^b difere de todos os tratamentos; ^c difere de todos os tratamentos, exceto CN e DMSO, ^d difere de CP, 6,25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Média e desvio padrão dos parâmetros analisados pelo teste do MN na linhagem celular ACP02 após 48 horas de exposição a extrato etanólico, fração metanólica e substância isolada (rutina) a partir de *A. glabra* e seus respectivos controles.

Tabela 2. Média e desvio padrão dos parâmetros analisados pelo teste do MN na linhagem celular MNP01 após 48 horas de exposição a extrato etanólico, fração metanólica e substância isolada (rutina) a partir de *A. glabra* e seus respectivos controles

CAPÍTULO II

Tabela 1. Perfil químico dos extratos etanólicos dos caroços de *Euterpe oleracea* em (unidade) obtido por análise cromatográfica. Os valores são expressos a partir da porcentagem (%) da área do pico do cromatograma.

Tabela 2. Frequência de micronúcleos (fMN) e índice de proliferação por bloqueio de citocinese (IPBC) de células gástricas não neoplásicas (MNP01) expostas ao extrato etanólico de açaí preto e açaí branco. Em que CN significa controle negativo; CP significa controle positivo. *Difere de CP.

Tabela 3. Frequência de micronúcleos (fMN) e índice de proliferação por bloqueio de citocinese (IPBC) de células de adenocarcinoma gástrico (ACP02) expostas ao extrato etanólico de açaí preto e açaí branco. Em que CN significa controle negativo; CP significa controle positivo. *Difere de CP.

LISTA DE ABREVIATURAS

AB: açaí branco

AP: açaí preto

BE: brometo de etídio

BNf: frequência de broto nuclear

C1: Concentração 1

C2: Concentração 2

CBMN: ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese

CG: cromatografia gasosa

CLAE-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência

CN: controle negativo

CP: controle positivo

DMEM: dulbecco's modified eagle médium

DMSO: dimetil-sulfóxido

DOX: doxorubicina

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidazil

EC50: coeficiente efetivo de 50%

EE: extrato etanólico

EM: espectrômetro de massa

EROs: espécies reativas de oxigênio

FM: fração metanólica

HIV: vírus da imunodeficiência humana

IC50: coeficiente inibitório de 50%

IPBC: índice de proliferação por bloqueio da citocinese

LA: laranja de acridina

MN: micronúcleo

MNf: frequência de micronúcleo

MTT: (brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2il] 2,5 – difeniltetrazólio)

OAf: frequência de outras anormalidades

RMN: ressonância magnética nuclear

RPA: proteína de replicação A

RUT: rutina

SBF: soro bovino fetal

RESUMO

A formação no nosso saber etnobotânico ocorreu e ainda ocorre de forma lenta, sendo baseado em técnicas de observação e experimentação. Atualmente, sabe-se que preparos vegetais podem exibir além de efeitos de toxicidade, também o antioxidante, de captura de radicais livres e de antimutagênese, quando protege ou reverte danos causados no material genético. Diante disto este trabalho objetiva avaliar os efeitos *in vitro* de duas plantas já utilizadas: a *Euterpe oleraceae*, conhecida como açaí, a partir do extrato etanólico dos caroços de açaí preto (AP) e branco (AB) e a *Annona glabra*, conhecida como araticum-do-brejo, pelo extrato etanólico (EE), fração metanólica (FM) e a rutina (RUT), substância isolada obtida da FM, oriundos da casca do caule desta planta. Após o preparo e caracterização dos extratos e seus derivados, foi realizado o teste de avaliação antioxidante DPPH nas concentrações crescentes de 6,25 µg/mL a 400 µg/mL para todas as substâncias testadas. Para os testes *in vitro*, foram utilizadas duas linhagens celulares estomacais, a gástrica normal (MNP01) e de adenocarcinoma gástrico (ACP02). Com extratos de AP e AB foi realizado o teste do MTT nas concentrações de 6,25 µg/mL a 400 µg/mL, em que para avaliação do potencial citoprotetor, as mesmas concentrações foram testadas concomitante a doxorrubicina (DOX) (200 µg/mL). Para o ensaio do micronúcleo (MN) foram utilizadas apenas as concentrações de 25 a 200 µg/mL Já para EE, FM e RUT o MTT foi testado nas concentrações 6,25 a 200 µg/mL e o micronúcleo nas concentrações de 25 a 200 µg/mL. Os testes de apoptose e necrose e ciclo celular ocorreram apenas com EE e FM nas concentrações de 100 e 200 µg/mL. Como resultados, para o araticum-do-brejo, EE, FM e RUT exibem potencial antioxidante, sendo EE e FM com maior potencial. O teste do MTT e o teste de apoptose e necrose revelam a ausência de atividade citotóxica das substâncias testadas e o ensaio do micronúcleo não exhibe a presença de MN ou outras anomalias, porém demonstra uma redução do índice de divisão nuclear em ACP02 apenas para FM e em MNP01 em EE e FM. Esta alteração na divisão celular também foi observada no teste de ciclo celular, sugerindo que mais avaliações de possíveis danos no DNA nas fases do ciclo e análises moleculares em genes específicos relacionados sistema de reparo possam elucidar melhor os resultados. Para o açaí, DPPH revela que os dois extratos são antioxidantes, sendo o AP 30% mais eficiente quando comparado a AB. Nos testes *in vitro*, o ensaio do micronúcleo exhibe ausência de genotoxicidade e o teste do MTT demonstra ausência de citotoxicidade em ACP02 e uma pequena redução da viabilidade em MNP01 em 400 µg/mL. Neste teste também foi observado que ambos extratos protegem as duas linhagens nas concentrações de 200 e 400 µg/mL, provavelmente pela atividade antioxidante. Acreditamos que uma melhor investigação do potencial citoprotetor seja fundamental, uma vez que antioxidantes exógenos podem contribuir para a prevenção ou minimização de sintomas de diversas enfermidades como o câncer, diabetes e doenças cardiovasculares.

Palavras chave: Antioxidante, Neoplásica, Divisão nuclear, Ciclo celular, Citoprotetora

ABSTRACT

Training in our ethnobotanical knowledge took place and still takes place slowly, being based on observation and experimentation techniques. Currently, it is known that vegetable preparations can exhibit, in addition to toxicity effects, also antioxidant, free radical scavenging and antimutagenesis effects, when they protect or reverse damage caused to genetic material. Therefore, this work aims to evaluate the *in vitro* effects of two plants already used: *Euterpe oleracea*, known as açai, from the ethanolic extract of black (AP) and white (AB) açai seeds and *Annona glabra*, known as araticum -do-brejo, by the ethanolic extract (EE), methanolic fraction (FM) and rutin (RUT), isolated substance obtained from FM, derived from the stem bark of this plant. After preparing and characterizing the extracts and their derivatives, the DPPH antioxidant evaluation test was performed at increasing concentrations from 6.25 µg/mL to 400 µg/mL for all tested substances. For *in vitro* tests, two stomach cell lines were used, normal gastric (MNP01) and gastric adenocarcinoma (ACP02). With AP and AB extracts, the MTT test was performed at concentrations from 6.25 µg/mL to 400 µg/mL, in which, for the evaluation of the cytoprotective potential, the same concentrations were tested concomitantly with doxorubicin (DOX) (200 µg/mL). For the micronucleus assay (MN), only concentrations from 25 to 200 µg/mL were used. For EE, FM and RUT, MTT was tested at concentrations from 6.25 to 200 µg/mL and micronucleus at concentrations from 25 to 200 µg/mL. The apoptosis and necrosis and cell cycle tests occurred only with EE and FM at concentrations of 100 and 200 µg/mL. As a result, for araticum-do-brejo, EE, FM and RUT exhibit antioxidant potential, with EE and FM having the highest potential. The MTT test and the apoptosis and necrosis test reveal the absence of cytotoxic activity of the substances tested and the micronucleus test does not show the presence of MN or other anomalies, but demonstrates a reduction in the nuclear division index in ACP02 only for FM and in MNP01 in EE and FM. This alteration in cell division was also observed in the cell cycle test, suggesting that more evaluations of possible DNA damage in the cycle phases and molecular analyzes in specific genes related to the repair system can better elucidate the results. For açai, DPPH reveals that both extracts are antioxidants, with AP being 30% more efficient when compared to AB. In *in vitro* tests, the micronucleus assay shows no genotoxicity and the MTT test shows no cytotoxicity in ACP02 and a small reduction in viability in MNP01 at 400 µg/mL. In this test, it was also observed that both extracts protect the two strains at concentrations of 200 and 400 µg/mL, probably due to their antioxidant activity. We believe that a better investigation of the cytoprotective potential is essential, since exogenous antioxidants can contribute to the prevention or minimization of symptoms of several diseases such as cancer, diabetes and cardiovascular diseases.

Keywords: Antioxidant, Neoplastic, Nuclear division, Cell cycle, Cytoprotective

1- INTRODUÇÃO

1.1 O SER HUMANO E A FLORA: UMA RELAÇÃO ANTIGA

O advento da agricultura na vida do homem foi fundamental para o surgimento das primeiras organizações sociais, uma vez que a partir do cultivo de plantas foi possível a fixação de moradias e o conseqüente desenvolvimento das sociedades. No entanto, nesta época já havia o receio do uso indiscriminado de vegetais; assim, os humanos antigos começaram a observar os animais a fim de investigar espécies que exibiam potencial tóxico. Este processo de conhecimento sempre foi conduzido a partir de métodos como a observação e a experimentação. A partir deste, foi desenvolvido o estimado saber etnobotânico (MAGALHÃES, 2011; OLIVEIRA, 2014; NASCIMENTO, 2021).

Atualmente, a Etnobotânica tornou-se uma ciência interdisciplinar que estuda o uso de plantas por comunidades ao redor do mundo. Pesquisas oriundas desta buscam aliar o conhecimento empírico tradicional ao acadêmico científico (DAVIS 1995; MELO, 2008) Diante disto, é importante ressaltar que sementes, raízes, caules, folhas e frutos, são estruturas ricas em compostos que podem atuar no organismo de diferentes maneiras tornando-se objeto de interesse econômico para as mais diversas indústrias (ABREU et al., 2001). Um exemplo claro é o crescente aumento de lojas com produtos orgânicos e naturais, uma vez que existe a constante busca pela vida saudável e os chamados alimentos funcionais têm sido cada vez mais consumidos, uma vez que possuem propriedades além da nutricional básica e prometem ajudar na promoção da saúde e no combate de doenças como hipertensão, câncer, alergias, diabetes e osteoporose (HASLER, 2000).

De modo geral, alimentos funcionais apresentam ingredientes fisiologicamente saudáveis, que podem inclusive proteger nosso material genético de danos aos quais estamos expostos cotidianamente, nos fazendo compreender a forte relação dos genes com a dieta a qual praticamos (SOUZA, et al., 2003; CÂNDIDO; CAMPOS, 2005). A avaliação do papel dos nutrientes na expressão gênica é chamada de nutrigenômica e, nesta investigação, é possível perceber como determinados alimentos interagem com a estrutura e funcionamento de genes (VALENTE, 2014). Esta modulação na expressão do genoma pode ocorrer de diversas formas, uma delas é a alteração no padrão de metilação do DNA. Neste processo ocorre a adição de um radical metil (CH₃) em regiões promotoras de genes, podendo anular sua expressão; no entanto, este radical é doado por enzimas chamadas de SAM e a disponibilidade desta enzima é altamente influenciada pela alimentação (MILAGRO; MARTÍNEZ, 2013; VIEIRA et al., 2015). Outra forma é

a partir de nutrientes capazes de realizar a captura de radicais livres produzidos pelo próprio metabolismo celular. Acontece que estes átomos ou moléculas contém elétrons não pareados, com conseqüente reatividade química aumentada e, desta forma, estas podem interagir com regiões específicas do material genético, modulando a expressão dos genes. A este potencial de capturar radicais livres, damos o nome de atividade antioxidante (VIEIRA et al., 2015).

Sendo assim, é crescente o interesse na prospecção da biodiversidade ou bioprospecção, que consiste investigação e elaboração de novas fontes de substâncias candidatas para a obtenção de novos fármacos, os chamados fitoterápicos (MAKHUBU, 1998) Estes são medicamentos que utilizam apenas plantas como matéria prima e tem sua eficácia e segurabilidade comprovada a partir de testes científicos (BRASIL, 2010), ou seja para serem explorados comercialmente a partir do setor produtivo, são necessários resultados de testes provenientes de pesquisas laboratoriais, toxicológicas e farmacológicas (NOVAIS et al. 2003; OMS, 2002; YUNES et al., 2011; BRAGA, 2011)

Levando em conta a ampla biodiversidade da flora brasileira, bem como o amplo interesse econômico das mais variadas indústrias em utilizá-la como matéria prima no preparo de produtos, que se tornam importantes avaliações acerca dos efeitos destas substâncias nos organismos, avaliações estas que são geralmente realizadas a partir do biomonitoramento fracionado, que envolve extrações, fracionamentos e purificações de substâncias isoladas para serem testadas. Esta metodologia permite uma melhor compreensão do mecanismo de ação dos compostos, atuando de forma isolada ou em conjunto (JUNIO et al., 2011; NIEMEYER et al., 2013). Outra relevância destes estudos é a determinação de concentrações a serem utilizadas, uma vez as plantas podem ser altamente efetivas na cura e/ou tratamento de doenças, mas também apresentar uma gama de efeitos adversos que desregulam a homeostase do organismo e tudo isso dependendo da dose utilizada no tratamento.

1.2 – AS PLANTAS E SEUS EFEITOS

1.2.1 Efeito de toxicidade

Existe uma errônea concepção acerca de que tudo que é natural é desprovido de atividade tóxica subjacente (WHO, 2004; SERPELONI et al., 2010). Uma vez que a partir do metabolismo secundário das plantas são produzidas substâncias para se proteger de parasitas e predadores, estes compostos também podem provocar alterações no equilíbrio bioquímico do usuário e, conseqüentemente, serem danosos (DELBONE; LANDO,

2010). Um exemplo são os componentes contendo nitrogênio (alcaloides), os quais apresentam grande atividade biológica e margem reduzida de segurança. Por isso, é importante se conhecer de forma precisa a quantidade de alcaloides presentes em uma planta antes da sua utilização, uma vez que são substâncias com acentuado efeito no sistema nervoso (VIZZOTTO et al., 2010).

São consideradas espécies tóxicas aquelas capazes de produzir constituintes que podem causar alterações metabólicas prejudiciais no organismo dos seres vivos. Sendo assim, o uso de espécies vegetais, tanto no preparo de medicamentos quanto na alimentação, deve ser restrito àquelas conhecidas e/ou corretamente identificadas, evitando distúrbios como a intoxicação e prejuízo de órgãos envolvidos na metabolização de substâncias (COLOMBO et al., 2010; CAMPOS et al., 2016).

Alguns efeitos de plantas tóxicas no organismo são o citotóxico, genotóxico e mutagênico; estes estão relacionados à capacidade de causar danos na célula, no material genético e formação de mutações, respectivamente. Logo, eles devem ser amplamente investigados como triagem inicial para a toxicidade de compostos vegetais. Nesse processo, é importante também delimitar doses que sejam eficazes, mas não prejudiciais, visto que muitas das vezes um composto pode ser altamente benéfico até determinado limite e por isso é importante que este limite seja conhecido (HARVEY et al., 1998). Como o trabalho de Galucio (2014) que avaliou a toxicidade de extratos, frações e subfrações obtidas a partir do bulbo de Marupazinho (*Eleutherine plicata*), planta amplamente utilizada na farmacologia popular, este vegetal exibiu atividade citotóxica e genotóxica dose dependente quando testada em células de tumor hepático (HepG2) e de rim de macaco verde (VERO), sendo nesta segunda linhagem mais citotóxico a partir do fracionamento.

Considerando tudo o que foi dito, uma análise detalhada a respeito da toxicidade e possíveis efeitos adversos é um passo importante na pesquisa científica, pois garante usufruir dos efeitos terapêuticos da planta, eliminando os efeitos adversos em potencial.

1.2.2 Efeito antioxidante

Um importante potencial dos vegetais, amplamente citado e discutido na literatura, é o antioxidante. Constituintes bioativos que auxiliam nesta ação são encontrados em diferentes quantidades e porções em frutas, verduras e cereais; destacam-se aqui a vitamina C, vitamina E, β -caroteno, antocianinas, flavonoides, taninos e compostos fenólicos (BYRD, 2001; MALACRIDA; MOTA, 2005; KUSKOLSKI et al.,

2005). Este último é a classe química de compostos naturais que mais se destacam por sua ação antioxidante, estando largamente presente no reino vegetal (MALACRIDA; MOTA, 2005; SILVA, 2014).

É considerada antioxidante toda substância que, em baixas concentrações, apresenta a capacidade de inibir ou reduzir significativamente o processo oxidativo, diminuindo a concentração dos radicais livres no organismo e/ou quelando íons metálicos, prevenindo a peroxidação lipídica (PRIOR; CAO, 1999; BORGUINI, 2006). Os radicais livres apresentam alta capacidade de reatividade química e, devido possuir número ímpar de elétrons, exibem a tendência de adquirir um elétron para se tornarem estáveis (SILVA et al., 2003). Por este motivo interagem com macromoléculas e estruturas celulares, causando danos inclusive em moléculas fundamentais como o DNA e o RNA (SOUZA et al., 2007).

A formação destas espécies reativas de oxigênio (EROs) ocorre naturalmente no organismo devido ao estilo de vida aeróbico e em outros processos do metabolismo celular, como a fagocitose, a regulação do crescimento intracelular, a sinalização intercelular e a síntese de substâncias biológicas importantes (MIRANDA, 2010). Acontece que em níveis normais de produção as defesas antioxidantes naturais do organismo, como o conjunto de enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, fazem a remoção destes, mantendo o balanço entre a sua produção e a sua retirada (HALLIWELL; GUTTRIDGE, 2007). Porém, estamos expostos a diversos agentes externos que levam a excessiva formação destes radicais livres, gerando um desbalanço e levando ao processo conhecido como estresse oxidativo (NUNES, 2010).

Em função da associação entre a maior ingestão de compostos antioxidantes e a redução da incidência de vários tipos de doenças, desenvolveu-se um grande interesse na obtenção e utilização de antioxidantes naturais que sirvam como reforços ao sistema de defesa antioxidante presente no organismo (HRAS et al., 2000; LIGUORI et al., 2018).

1.2.3 Efeito antimutagênico

Um outro efeito altamente relevante relacionado a ingestão de produtos naturais é o de antimutagenicidade. Este resultado está relacionado à capacidade de uma substância em minimizar, inibir ou reverter danos causados no material genético, se utilizada anteriormente, concomitante ou *a posteriori* à exposição a certo agente mutagênico. Por isso, elas são consideradas importantes no combate ao câncer e outras doenças

relacionadas a mutação, sendo uma abordagem promissora na proteção da saúde humana (BHATTACHARYA, 2011; DE FLORA, 1998).

Agentes antimutagênicos são compostos, naturais ou sintéticos, capazes de reduzir a frequência ou taxa de mutação (espontânea ou induzida) (GASIOROWSKI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2009). Estes agentes são subdivididos de acordo com o mecanismo de ação, classificados em dois processos maiores e generalistas, a desmutagênese e a bioantimutagênese (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

Agentes desmutagênicos previnem a ação do agente indutor do dano, inativando mutágenos de forma total ou parcial, antes que estes entrem em contato com o gene. Na bioantimutagênese, os agentes atuam no reparo das lesões causadas, eliminando a mutação após os genes serem mutados (KADA et al., 1978; ANTUNES; ARAÚJO, 2000; OLIVEIRA, 2009). Muitos agentes antimutagênicos possuem mais de um mecanismo de ação podendo atuar por desmutagênese ou bioantimutagênese (FERGUSON, 1994). Sendo assim, compostos antimutagênicos podem impedir um agente de interagir com o DNA por inativação química ou enzimática ou por modulações das alterações induzidas após o dano ao DNA (BUNKOVA et al., 2005).

Nas pesquisas envolvendo a análise do potencial antimutagênico, normalmente um dano é induzido por um mutágeno para depois prever o potencial de uma substância em reverter esse dano. Quimioterápicos são muito utilizados nesse tipo de análise, visto que é comum observar efeitos colaterais a partir do tratamento contra o câncer. Um exemplo é a doxorrubicina (DOX). Estudos sugerem que na ativação metabólica da DOX ocorre a excessiva produção de radicais livres e que isto pode estar relacionado ao seu efeito tóxico (GEETHA et al., 1990; EL-MOSELHY et al., 2014). É possível também que esta droga contribua para a redução da capacidade antioxidante do organismo (RESENDE et al., 2006).

Um exemplo de estudo nessa perspectiva foi feito por Carneiro et al. (2017). Os autores demonstraram que a administração do óleo de Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) após o tratamento com DOX reduz a frequência de micronúcleos para todas as concentrações em tratamentos agudos. Já Barcelos (2007) mostrou que o tratamento simultâneo entre a DOX e o extrato da casca do cajueiro (*Anacardium occidentale*) apresenta efeito antimutagênico na redução de aberrações cromossômicas.

Outras substâncias, com mecanismos de ação diferentes, também podem ser utilizadas para indução do dano. A análise da proteção do DNA contra possíveis quebras e mutações é uma pesquisa promissora frente à exposição do homem a diversos agentes danosos.

Visto os inúmeros efeitos das plantas e sua importância na saúde do homem, acredita-se que a ampla biodiversidade brasileira deve ser analisada, uma vez que diversos órgãos de uma só planta são utilizados e uma mesma espécie apresenta várias finalidades, tendo praticamente todas as suas estruturas exploradas e comercializadas para a elaboração de produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentícios, dentre outros. Dois exemplos que, objetos de estudo do trabalho, são a *Euterpe oleracea* (açai) e a *Anona glabra* (Araticum do brejo).

1.3- *Euterpe oleracea* (AÇAÍ)

Euterpe oleracea é uma palmeira pertencente à família Arecaceae, nativa da América do Sul e típica da região amazônica, popularmente conhecida como açazeiro. Seus frutos (açai) apresentam-se de forma globulosa em cachos, sendo sua maior parte composta pelo endocarpo, comumente denominado de caroço (**Figura 1D**), que contém em seu interior uma semente e tecidos de reserva. Suas folhas são compostas por 40 a 80 pares de folíolos e seu caule tipo estipe é longo e fino com altura de 3m a 20m e diâmetro de 7cm a 18cm (**Figura 1A**) (ROGEZ, 2000; YAMAGUCHI et al., 2015).



Figura 1. A) Árvore de açai (*Euterpe oleraceae*), demonstrando caule e folhas e frutos Fonte: <http://maqmixer.blogspot.com/2016/08/blog-post.html> B) Fruto de açai preto Fonte: <https://www.dicionariotupiguarani.com.br/dicionario/yasai/> C) Fruto de açai branco Fonte: <https://www.saudedica.com.br/os-15-beneficios-do-acai-branco-para-saude/> D) Caroço de açai Fonte: <http://revistagalileu.globo.com/revista/common/0,,emi317134-18537,00-pesquisadores+usam+carocos+de+acai+para+fazer+proteses+mais+baratas.html>

Várias espécies do gênero *Euterpe* são chamadas vulgarmente de açai, porém a única considerada como açai verdadeiro é a *E. oleraceae* (MUÑIZ-MIRETS et al., 1996; CHOI et al., 1998). Esta espécie, apresenta mais de 29 genótipos descritos, exibindo variação fenotípica quanto a coloração do fruto maduro, sendo denominados de açai preto (**Figura 1B**) e açai branco (**Figura 1C**) (SANCHES; OLIVEIRA, 2011). O açai preto é o mais conhecido e comercializado e, após processado, apresenta cor roxa ou violácea. Já o açai branco, também conhecido como “tinga” exibe frutos de cor verde opaca e produzem bebida de coloração creme esverdeada. Devido ao pequeno volume de produção, a bebida do açai branco tem mercado restrito, geralmente local, e possui poucos estudos relacionados aos seus efeitos (OLIVEIRA et al., 2000).

Devido a crescentes estudos exibirem benefícios relacionados ao consumo do açai, esta planta tem ganhado visibilidade fazendo com que países como os Estados

Unidos e Japão importem grande quantidade do seu fruto (BONOMO, 2014; CEDRIM et al., 2018). Tais pesquisas, geralmente relatam a intensa atividade antioxidante da polpa do açaí, sendo reconhecido pelos consumidores como um alimento funcional (PINTO, 2014). O valor nutricional atribuído ao fruto se dá devido a este apresentar-se rico em compostos fenólicos como os ácidos vanílico, cafeico e siríngico (PACHECO-PALENCIA et al., 2008; CARVALHO et al., 2017) e, principalmente, um grupo de flavonoides conhecido como antocianinas, um pigmento que atribui a coloração roxo escuro ao suco (LIMA et al., 2012; LIN et al., 2007).

Além do mais, produtos à base de açaí exibem comprovada propriedade farmacológica e medicinal, que incluem a anticarcinogênica, anti-inflamatória e antimicrobiana, previnem a oxidação de proteínas de baixa densidade, atua no combate a enfermidades cardiovasculares e doenças neurológicas (KUSKOSKI et al., 2002; ALASALVAR et al., 2005). No entanto, a polpa do fruto representa 5 a 15% de seu volume, variando de acordo com tipo e grau de maturidade, o restante do fruto se constitui do caroço, que é um resíduo descartado logo após o processamento para obtenção do suco (PAULA, 1995). Este caroço também tem sido fonte de estudo em diversas áreas devido à preocupação quanto ao descarte adequado e possível reutilização do resíduo, visto que a produção diária de açaí gera toneladas de lixo orgânico (FREITAS, 2010). Tal estrutura é comumente reutilizada no artesanato, na alimentação animal e como adubo orgânico; estudos ainda demonstram seu efeito antioxidante, vaso dilatador, anti-hipertensivo, protetor contra enfisema e antimicrobiano (AGUIAR; MENDONÇA, 2003; RODRIGUES et al., 2006; MOURA et al., 2011; GARBIN, 2011; MELHORANÇA FILHO; PEREIRA, 2012). Assim, devido às pesquisas demonstrarem a importância deste resíduo, torna-se necessário um estudo mais aprofundado sobre as implicações deste no organismo do ser humano.

1.4-*Annona glabra* (ARATICUM-DO-BREJO)

A outra planta avaliada neste estudo é a *Annona glabra* pertencente a família Annonaceae e nativa da América tropical, porém com ampla distribuição geográfica. No Brasil ocorre desde a Amazônia até o estado de Santa Catarina sendo popularmente conhecida como araticum-do-brejo ou araticum-da-lagoa, em inglês é denominada de pond apple (LORENZI et al. 2006; BRAGA, 1976). A denominação popular se dá devido a espécie crescer em regiões costeiras ao longo das margens de lagos, necessitando de solo úmido, ou em regiões periodicamente ou permanentemente inundadas (**Figura 2A**), apresentando assim adaptações como raízes adventícias, com aerênquima, que está presente também na base do caule e sementes que se dispersam na água que germinam e crescem em grupos dando aspecto de moita com vários caules. Seu fruto, de sabor pouco palatável, é esférico e de cor verde (**Figura 2B**), tornando-se amarelado quando maduro (**Figura 2C**) (SIEBRA, 2007)



Figura 2. Árvore de araticum-do-brejo (*Annona glabra*) em região inundada Fonte: <https://www.flickr.com/people/scottzona/> B) Fruto de cor esverdeada Fonte: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/446898?lg=en C) Fruto maduro de cor amarela Fonte: <https://www.flickr.com/photos/67300849@N02/35471644172>

A família Annonaceae é uma das menos estudadas quimicamente, porém investigações fitoquímicas e farmacológicas dentro desta família vem se intensificando nos últimos anos (SIEBRA, 2007). Grande parte disso ocorre devido às espécies pertencentes à família serem largamente empregadas de forma etnofarmacológica por conta de suas propriedades medicinais. O gênero *Annona* destaca-se por apresentar esteroides, peptídeos, diterpenos, alcaloides, acetogeninas e flavonoides. Neste último

grupo de substâncias químicas foram encontradas flavonas (luteonina) e flavonóis (canferol, quercetina, ramnetina, isorramnetina e a rutina) (FAGUNDES et al., 2005)

Dentre todos os compostos, a rutina é um dos mais estudados por apresentar propriedades farmacológicas (PEDRIALI, 2005), provavelmente relacionadas à sua atividade antioxidante, sendo terapêutica em patologias que envolvam radicais livres sem ocasionar toxicidade (AFANAS'EV et al. 1989). Já é descrito na literatura a eficiência da rutina no tratamento da artrite e atuando em infecções por *Candida albicans* (HAN, 2009), supressão da imunidade celular (MIDDLETON et al. 2000), efeito anti-inflamatório (GUARDIA et al. 2001) e atividade anticarcinogênica (MACHADO, 2005).

Com relação a *A. glabra*, análises fitoquímicas demonstram que extratos obtidos da casca, folha e frutos exibem a presença de diterpenóides, alcaloides, flavonoides e acetogeninas (CHEN et al., 2000; CHANG et al., 1998). Sendo assim, visto a quantidade de compostos presentes nas partes das plantas e a escassez de estudos a respeito, diversas metodologias de análise têm sido utilizadas para melhor compreensão dos efeitos destes constituintes amplamente presentes no gênero *Annona*, inclusive na *A. glabra* e, dentre os tipos de análise, destaca-se o fracionamento biomonitorado.

1.5- O FRACIONAMENTO BIOMONITORADO COMO METODOLOGIA DE ANÁLISE

O desenvolvimento de preparações à base de plantas inclui diversas etapas que vão desde a escolha do material vegetal até o produto final. Dentre estas fases de análise o primeiro processo é o de preparo do extrato bruto, constituído de uma mistura complexa de diversas classes de constituintes vegetais, que exibem efeitos variados. Para uma análise mais eficiente dos efeitos biológicos destes compostos são necessários processos como o de fracionamento do extrato e purificação do princípio ativo (NAVARRO, 2005).

O termo extração significa retirar, de forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ou fração ativa contida no material vegetal. Para isto, são utilizados solventes tecnologicamente apropriados que realizam este processo de retirada dos constituintes, a partir da polaridade deste líquido extrator, transferindo de uma solução menos concentrada para uma mais concentrada, dando origem ao extrato bruto que leva o nome do solvente utilizado para extração (SIMÕES et al., 2003; FONSÊCA, 2005; HECK, 2013). Já para o fracionamento destes, é feita uma partição de solventes orgânicos por polaridade crescente, método (líquido/líquido) que resulta na separação dos principais metabólitos secundários; uma vez realizada essa partição, pode se obter o isolamento e

purificação de substâncias, geralmente realizado a partir de métodos cromatográficos (MIYAKE, 2005).

De modo geral, esta partição torna-se relevante visto que constituintes presentes em extratos e frações podem levar a diferentes efeitos no organismo como a indiferença, sinergismo e antagonismo. No primeiro efeito, um composto não vai interferir no mecanismo de ação do outro, ou seja, estes não interagem sob nenhum aspecto e podem estar em extratos brutos ou frações isoladas. No segundo é observado que um constituinte intensifica a ação de outro, ocorrendo assim uma potencialização do efeito. No terceiro ocorre a diminuição ou inibição a ação de um composto quando presente de forma concomitante a outro (SHUNCK, 2011).

Neste contexto, o fracionamento biomonitorado, que consiste na análise dos efeitos biológicos em cada etapa de separação dos compostos, auxilia pesquisadores em um diagnóstico mais eficiente em relação ao verdadeiro constituinte ou constituintes responsáveis por determinado efeito, além de direcionar os estudos que muitas vezes selecionam extratos, frações e moléculas puras de melhor efeito para o objetivo do teste. É neste sentido que existem evidências de que combinações fitoquímicas exibem melhor efeito, inclusive na proteção contra doenças, quando comparadas a compostos isolados. Isso encoraja estudos de extratos vegetais e a escolha dos testes a serem aplicados para investigar seus efeitos. Essa etapa é altamente importante visto que estudos preliminares podem contribuir com informações relevantes que vão auxiliar outros estudos na mesma área de atuação (DE KOK et al., 2008).

1.6- TESTES IN VITRO: UMA IMPORTANTE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÕES PRELIMINARES EM PRODUTOS NATURAIS

A escolha do modelo experimental é uma etapa importante no delineamento da pesquisa científica. Diversos protocolos e diretrizes nacionais e internacionais indicam o uso de modelos para serem utilizados e ainda recomendam metodologias para garantir o bem-estar do animal e também minimizar o uso destes, mas garantindo diagnósticos confiáveis (FERREIRA et al., 2005). É neste contexto que são utilizadas diversas metodologias com culturas de células (pesquisas *in vitro*) almejando um resultado mais próximo do objetivo da pesquisa, porém evitando o sacrifício de animais. Além disso, quando não se conhece nada sobre a substância alvo de estudo, os primeiros testes costumam ser realizados *in vitro* para resultados preliminares, podendo ou não avançar para etapas de testes *in vivo*.

A análise a partir de linhagens celulares tornou-se uma importante ferramenta em avaliações científicas, auxiliando o progresso de pesquisas e oferecendo excelentes resultados. Russel e Burch (1959) desenvolveram a teoria dos 3Rs (*Refine, Reduce, Replace*), buscando alternativas *in vitro* para substituir a experimentação animal (BEDNARCZUK et al., 2010). Nesse cenário de discussões, o uso de cultura de células torna-se relevante, inclusive para a análise da eficácia e toxicidade de produtos naturais. Estes testes são baseados na exposição direta ou indireta de um agente a uma cultura de células, geralmente linhagens celulares, devido estas serem mais resistentes e apresentarem maior facilidade de manutenção (ROGERO et al., 2003).

Por outro lado, existem diversas questões acerca da confiabilidade dos testes *in vitro*. Um exemplo é o processo de metabolização, um evento importante para a determinação do efeito de qualquer substância no organismo. Para reverter esse viés o uso de frações enzimáticas metabolizadoras tem sido recomendado para células que não possuem metabolismo ativo. Isso possibilita que as análises *in vitro* cheguem mais próximo do que aconteceria num organismo como um todo. Por outro lado, algumas linhagens celulares possuem enzimas endógenas que facilitam o processo de metabolização das substâncias testadas, dispensando o uso de frações enzimáticas (RIBEIRO et al. 2003).

Ressaltando o fato de que o câncer gástrico é o quarto tipo mais frequente e a segunda maior causa de mortalidade por câncer no mundo, destacam-se duas linhagens celulares a serem utilizadas em estudos *in vitro*: MNP01, linhagem de mucosa gástrica não neoplásica, e ACP02, linhagem de adenocarcinoma gástrico. A linhagem celular de mucosa gástrica normal 01 (MNP01), foi produzida a partir de 10 pacientes que não apresentavam câncer ou qualquer outra doença gástrica (LEAL et al., 2016). Nesta linhagem foi feita uma análise para a expressão de genes, como o *MYC*, e proteínas relacionadas ao câncer para garantir que não houve modificação no processo de estabelecimento da cultura celular. Já a cultura neoplásica de adenocarcinoma gástrico primário (ACP02) foi obtida a partir de um morador de 66 anos residente do estado do Pará (LIMA et al., 2004). A partir de análise citogenética, foi observado que esta apresenta características correspondentes ao tumor de origem, como a deleção do braço curto do cromossomo 17, onde estaria localizado o gene supressor de tumor *TP53* e a trissomia do cromossomo 8 com amplificação do oncogene *MYC* (LEAL et al., 2011). Este último gene é responsável pelo crescimento excessivo de células de câncer e geralmente regula diversos outros genes envolvidos neste processo, sendo super expresso

em células de câncer gástrico e silenciado em células não neoplásicas (MAUÉS et al., 2018).

As linhagens citadas, mesmo sendo de origem gástrica, exibem diferenças morfológicas e metabólicas. A ACP02 possui bordas irregulares, geralmente seu formato é sextavado, quantidade de nucléolos aumentada, intensa atividade mitótica e perda de adesão, crescendo em camadas. Já a MNP01 exibe bordas regulares, atividade mitótica normal e seu crescimento ocorre apenas em monocamada (**Figura 3**). Ambas podem oferecer importantes resultados a partir de testes *in vitro* e ainda serem utilizadas em pesquisas comparativas que relacionem efeitos de substâncias em células saudáveis e cancerosas (MESQUITA et al., 2018; VIEGAS, 2015).

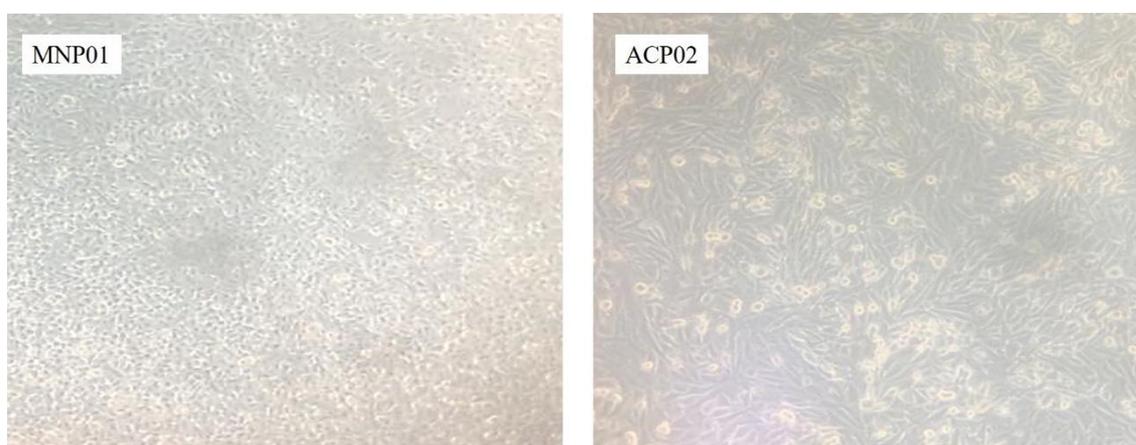


Figura 3. Imagens em invertoscópio mostrando as diferenças morfológicas entre linhagem gástrica não neoplásica (MNP01) e de adenocarcinoma gástrico (ACP02) (Fonte: Acervo pessoal).

1.7 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO TESTE DO DPPH

Como já citado, a atividade antioxidante é fundamental no combate a doenças causadas a partir da formação de radicais livres, estando este potencial altamente presente em compostos do reino vegetal. Medir esse potencial em plantas torna-se cada vez mais essencial na seleção de substâncias candidatas na base da formulação de produtos naturais (RAMALHO; JORGE, 2006). Assim, o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) constitui-se de um teste que avalia o potencial antioxidante de substâncias. Esta técnica, adaptada por Rufino et al. (2007) e Sousa et al. (2007), é baseada na capacidade de um composto em sequestrar o radical livre DPPH. O radical pode ser obtido diretamente por dissolução em meio orgânico, apresentando coloração violeta e, ao entrar em contato com um composto antioxidante, é reduzido a difenil-picril-hidrazina, assumindo coloração amarela (**Figura 4**).

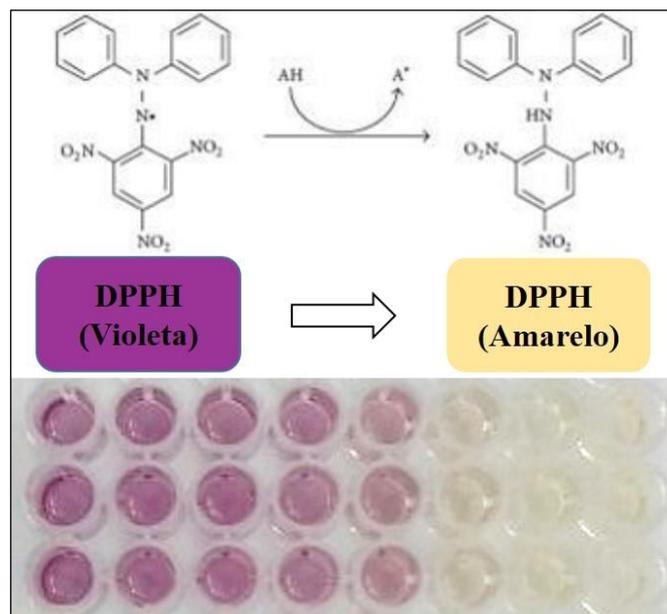


Figura 4. Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidazil) e a sua forma reduzida (difenil-picril-hidrazina).
 Fonte: <https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3730368BMRI2013251754.sch.001&req=4>
 com adaptações.

Quanto mais amarelada for a solução final, mais radicais livres de DPPH foram sequestrados e maior é a atividade antioxidante da substância. O monitoramento da atividade é feito através da quantificação do decréscimo das medidas de absorbância, lida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 510-520nm (BORGES et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2011; DARONCHO et al., 2012). Além do mais, o teste ainda permite calcular a concentração efetiva que captura 50% dos radicais livres (EC50), permitindo ao avaliador comparar a atividade antioxidante de diferentes extratos (RUFINO et al., 2007).

1.8 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

1.8.1 - Ensaio do MTT

O ensaio do MTT (brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio) é um teste, descrito pela primeira vez por Mossman et al. (1983), que utiliza enzimas mitocondriais para avaliar a quantidade de células viáveis mediante exposição prévia a um agente. O MTT é um sal de cor amarela que, ao entrar em contato com a enzima redutase mitocondrial, é reduzido formando cristais de formazan de cor roxa (**Figura 5**). A partir da diluição destes cristais em dimetil-sufóxido (DMSO), é possível a quantificação da absorbância em espectrofotômetro que é posteriormente transformada em viabilidade.

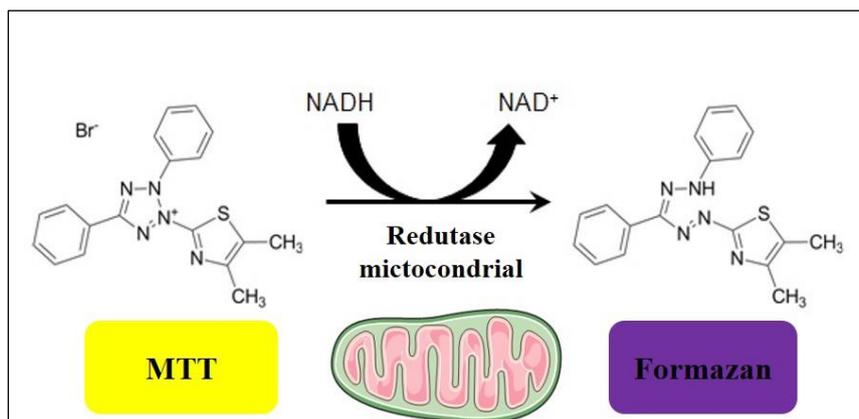


Figura 5. Demonstração do MTT de cor amarela e sua forma reduzida de cor roxa. Fonte: https://www.researchgate.net/figure/23456470_fig12_Figure-13-Principle-of-cytotoxicity-MTT-assay, com adaptações.

A intensidade da cor roxa é diretamente proporcional a quantidade de células viáveis, ou seja, quando mais forte a coloração, mais mitocôndrias ativas em células viáveis reduziram o MTT em formazan e, portanto, maior a viabilidade celular (SILVA, 2009; BELLAN, 2013).

Testes de citotoxicidade são geralmente os primeiros a serem realizados, devido à facilidade de execução e a curta duração. Além do mais, eles fornecem importantes informações na toxicologia de substâncias, permitindo ao pesquisador uma análise do coeficiente inibitório de 50% das células (IC₅₀), ou seja, o valor exato em que ocorre a redução da viabilidade em 50%, e ainda auxilia na determinação de concentrações que podem ser utilizadas em ensaios de exposição subletal, geralmente representadas por frações do IC₅₀, permitindo prever a ocorrência de danos em células vivas (OECD, 2010).

1.8.2 – Teste de Apoptose e Necrose (La/Be)

Durante a divisão celular, proteínas específicas atuam no reparo de eventuais erros para a continuidade da divisão de maneira correta visto que, uma vez que o erro persista, a célula pode entrar em um processo de instabilidade e dar início a doenças, como por exemplo o câncer. Caso o sistema de reparo não seja capaz de corrigir as alterações no material genético, a célula é encaminhada para morte celular programada a fim de preservar a integridade do indivíduo. Os dois processos mais conhecidos de morte celular são a apoptose e a necrose (FETT-CONTE et al., 2000; GRIVICICH et al., 2007).

Kerr et al. (1972) descrevem a apoptose como uma deleção controlada de células; este tipo de morte celular pode ser utilizado como marcador de toxicidade, pois em excesso

podem estar relacionadas com a ocorrência de uma série de doenças ou lesões no genoma induzida por agentes externos (GRISOLIA et al., 2009). As alterações indicativas de apoptose são a picnose, cromatina condensada e cariorréxis. Neste processo acontece a condensação citoplasmática e nuclear, em seguida a cromatina transforma-se em picnótica e é empurrada contra a membrana nuclear, originando a forma de “meia-lua” no núcleo celular que sofre cariorréxis ou fragmentação. Simultaneamente a célula emite protuberâncias onde são encontrados fragmentos picnóticos (XAVIER, 2002). Já a necrose consiste de um edema celular agudo que leva a morte do tecido; neste as células sofrem danos que levam ao aumento do seu volume, a agregação da cromatina, desorganização do seu citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e ruptura celular afetando as células vizinhas, danificando o tecido como um todo (GRIVICICH et al., 2007).

Assim, um dos mais importantes objetivos dos testes toxicológicos é descobrir se as substâncias testadas são citotóxicas e ainda por quais mecanismos elas podem provocar morte celular. Neste contexto, o teste de apoptose e necrose utilizando os corantes Laranja de Acridina (La) e Brometo de Etídio (Be) é, portanto, relevante, uma vez que elucida se a morte celular ocorreu por necrose ou por apoptose (ANAZETTI; MELO, 2007).

Este ensaio pode ser considerado padrão devido a sua simplicidade e precisão e é baseado na diferença de permeabilidade da membrana plasmática das células aos corantes (La/Be). O LA é um corante permeável à membrana citoplasmática intacta que interage com o DNA, emitindo fluorescência verde às células. Já o BE é permeável a membrana somente quando rompida, permitindo a entrada do corante e conferindo fluorescência vermelha as células (WYLLIE, 2008; PERONDI, 2018). Na avaliação, células viáveis se apresentam na cor verde e morfologia íntegra da membrana, citoplasma e núcleo (**Figura 6A**), células apoptóticas também se exibem na cor verde porém, por vezes, cor amarelada, sendo possível observar os corpos apoptóticos em seu interior (**Figura 6B**) e a célula necrótica apresenta cor avermelhada (**Figura 6A;B**).

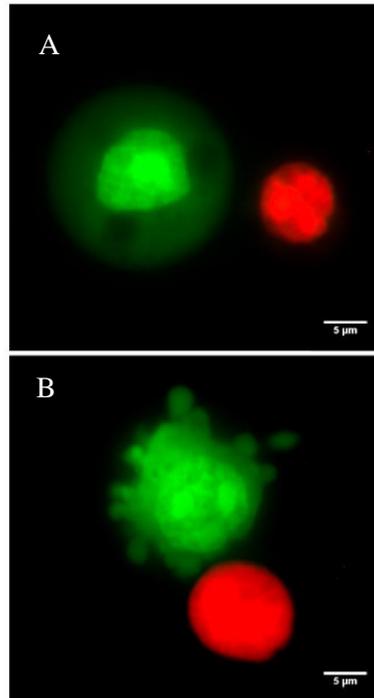


Figura 6. Avaliação do tipo de morte celular por coloração diferencial pelo laranja de acridina e brometo de etídio (La/Be). A. célula viável em verde e célula necrótica em vermelho; B. Célula apoptótica em verde, com corpos apoptóticos e célula necrótica em vermelho. Fonte: De Carvalho et al. (2022) com adaptações.

1.9 –AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE PELO TESTE DO MICRONÚCLEO

O micronúcleo (MN) é caracterizado por um corpúsculo livre, presente no citoplasma da célula, de cor, forma e textura semelhante ao núcleo principal. São formados durante a divisão celular, na última fase do ciclo (telófase), sendo excluídos do núcleo quando a carioteca é reconstituída. Podem ser oriundos de duas formas diferentes: a partir de fragmentos cromossômicos (clastogênese) ou de cromossomos inteiros (aneugênese) (**Figura 7**). No primeiro mecanismo o agente testado interage diretamente com DNA e o fragmenta, e no segundo ocorre uma alteração no aparelho de divisão celular, que impede a correta segregação dos cromossomos durante o ciclo celular (HOGSTEDT, 1984; AGOSTINI, 1993). No momento da análise do teste, os critérios considerados para a classificação do MN são a coloração igual ao núcleo principal, diâmetro inferior a 1/3 em relação ao núcleo principal, bordas íntegras e bem evidenciadas, forma arredondada e localização no interior do citoplasma (ALLEN et al., 1992).

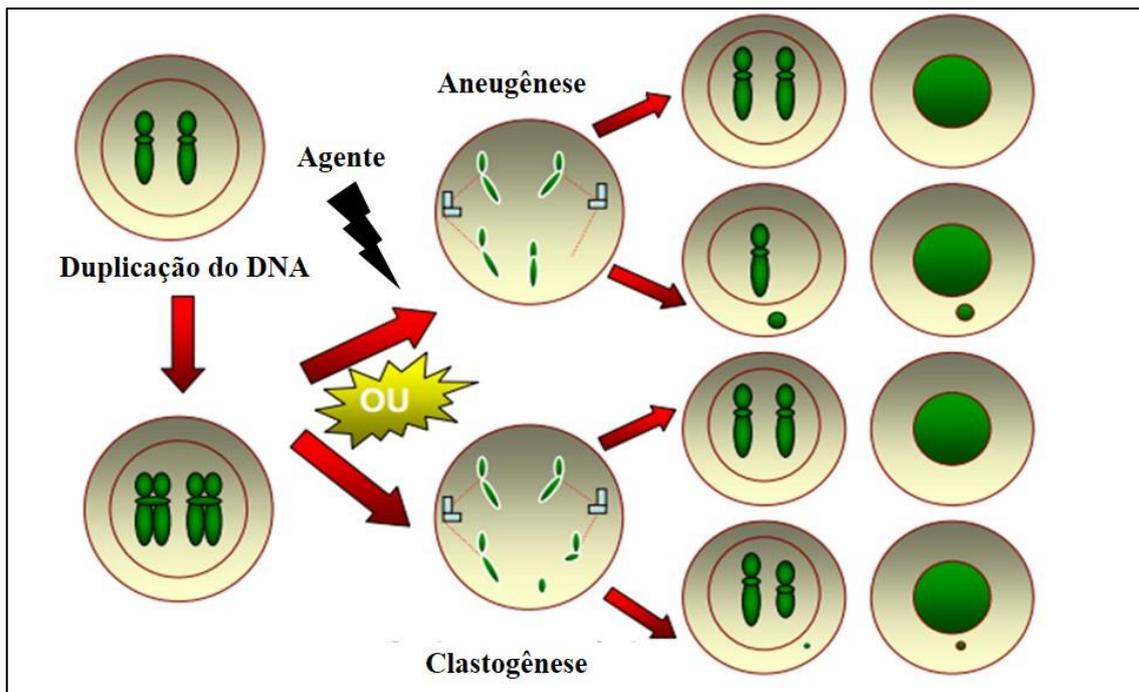


Figura 7. Mecanismos de formação de micronúcleo aneugênico e clastogênico, mediante exposição a agente indutor. Fonte: <https://bioafgj.wordpress.com/projeto/>, com adaptações.

O ensaio do micronúcleo tornou-se um teste citogenético padrão que pode ser realizado tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Quando *in vitro*, a metodologia mais comum inclui o uso de linfócitos, porém também pode ser feito em linhagens celulares, inclusive tumorais (MACGREGOR, 1991; OECD, 2010; OLIVEIRA et al., 2005; VALGÔDE, 2008). O ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN) é uma importante metodologia de estudos *in vitro*, devido a permitir identificar micronúcleos formados em células que sofreram divisão celular recente; estas exibem-se de forma binucleada (**Figura 8B**) depois que ocorre exposição a citocalasina B, substância que impede a divisão do citoplasma. Sendo assim, o teste originalmente proposto para a contagem de MN (**Figura 8E,F**) permite também a detecção de outras alterações, como brotos nucleares (**Figura 8G,H**) e pontes nucleoplasmáticas (**Figura 8I**), C-metáfases, perdas cromossômicas (**Figura 8J,K**) e morte celular (apoptose -**Figura 8L**- e necrose).

Além disso, o teste permite também contabilizar o índice de divisão celular, uma vez que é possível saber a quantidade de vezes em que ocorreu um ciclo celular completo, a partir da quantidade de núcleos presentes no interior da célula e comparar a possibilidade de diferentes tratamentos alterarem essa taxa de divisão (FENECH, 2006).

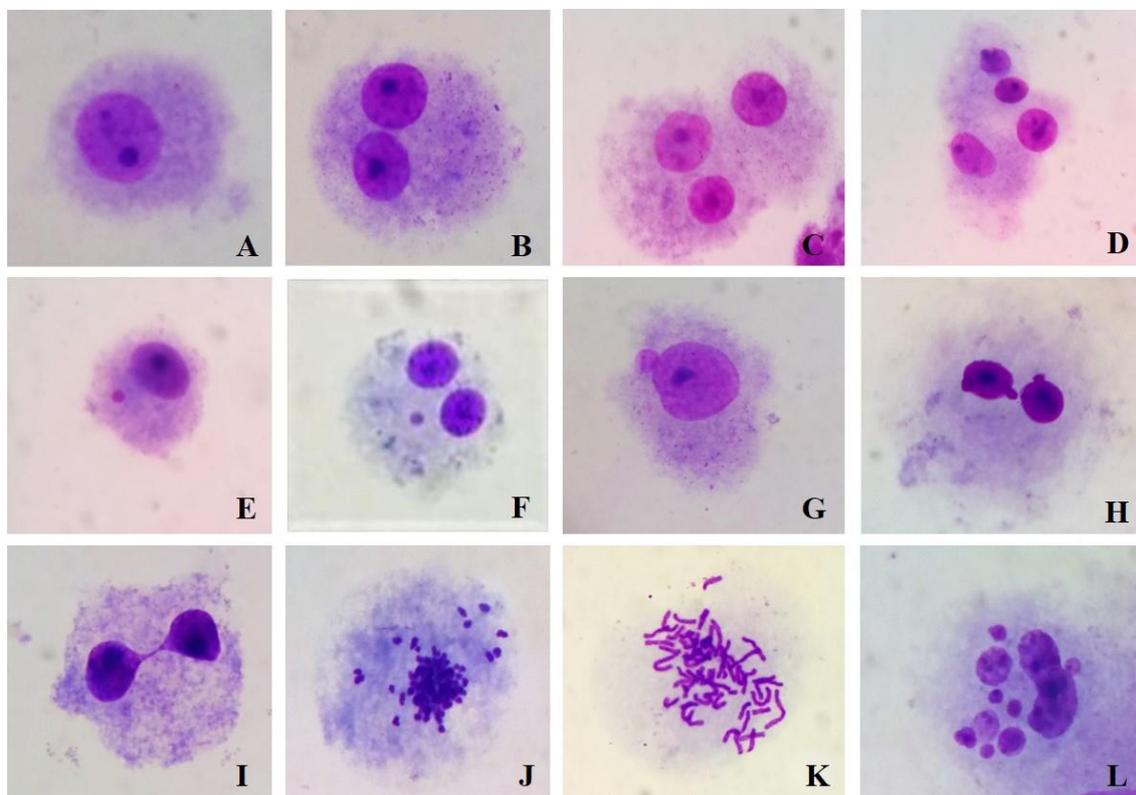


Figura 8. A) Célula mononucleada. B) Célula binucleada. C) Célula trinucleada. D) Célula polinucleada. E) Célula mononucleada com micronúcleo F) Célula binucleada com micronúcleo. G) Célula mononucleada com broto nuclear. H) Célula binucleada com broto nuclear. I) Célula com ponte nuclear J) C-metáfase com perda cromossômica K) C-metáfase com perda cromossômica. L) Célula em apoptose. Fonte: Acervo pessoal.

A formação de MN pode ocorrer de forma espontânea, devido a erros naturais do ciclo celular. No entanto, este processo acontece em níveis baixos, nos quais o próprio sistema de reparo do organismo é capaz de detectar e eliminar (ZÚÑIGA-GONZÁLEZ et al., 2000). Porém, quando o organismo é exposto a um determinado agente mutagênico externo, as taxas de formação de MN podem aumentar de forma significativa e, visto que a ocorrência desta estrutura significa a perda de cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos, torna-se perigoso o aumento deste índice.

Uma vez que estas perdas estão frequentemente associadas a abortos ou defeitos no nascimento, além de possivelmente estarem envolvidas com o processo inicial do desenvolvimento de câncer (SILVA et al., 2003) o teste do micronúcleo é considerado uma importante metodologia de triagem inicial do possível efeito genotóxico e mutagênico de uma substância, sendo um ensaio simples, sensível e robusto (FENECH,

2000; FENECH; CROTT, 2002; BONASSI et al., 2003; SALVADORI et al., 2003; ANDRADE et al., 2005).

1.10 -TESTE DE AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

O ciclo celular consiste nos processos que ocorrem na célula desde o seu surgimento até a etapa de divisão. Para concluir seu ciclo, a célula deve cumprir várias etapas antes de dividir-se fisicamente em duas células filhas, no caso da divisão celular por mitose. No início, ocorre o estágio que chamamos de interfase, este é dividido em G1, S e G2. Em G1 a célula cresce, multiplica organelas e fabrica componentes necessários para as etapas posteriores; em S, ocorre a duplicação de todo material genético, com a célula sintetizando uma cópia completa do seu DNA no núcleo e em G2 a célula produz proteínas, organelas e começa a reorganizar seu conteúdo para iniciar a mitose (SNUSTAD; SIMMONS, 2008).

A mitose é dividida em 4 fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase, que inicia na condensação do DNA, formando os cromossomos e finaliza na divisão deste material genético e de todo conteúdo da célula mãe para as células filhas. Em células humanas normais, este ciclo dura em torno de 24 horas, no entanto em cada uma das etapas ocorrem eventos que são passíveis de erros, porém de extrema importância para que o processo ocorra de forma correta. Desta forma, durante o ciclo celular, a célula passa por uma série de pontos de checagem que são extremamente sensíveis, onde qualquer dano no DNA ou cromossomo não associado ao fuso mitótico pode provocar o bloqueio do ciclo até a maquinaria de reparo celular examinar a viabilidade da continuidade da divisão (PERDIGÃO; TAVARES, 2001). Três pontos de checagem são considerados mais importantes, o ponto em G1, em G2 e em M, sendo que outros podem ser ativados de acordo com a necessidade da célula (DAS-BRADOO; BIELISKY, 2010).

O ponto em G1 determina a continuidade do ciclo, uma vez que ao passar por esta etapa a célula deve obrigatoriamente concluir a divisão; caso não esteja em condições, fica estacionada em G0. Nesta etapa, são avaliados fatores como tamanho da célula, quantidade de nutrientes suficiente para o ciclo e sinais de fatores de crescimento, além da integridade do DNA. Em G2 também ocorre a verificação de danos no DNA, checagem se o mesmo foi totalmente replicado na fase anterior (S) e tentativa de corrigir os erros; caso não seja possível a célula é encaminhada para apoptose. Em M o ponto de checagem ocorre da metáfase para a anáfase, a fim de verificar se todas as cromátides

irmãs estão corretamente ligadas aos microtúbulos; em caso negativo, as fibras do fuso tentam capturar cromossomos retardatários (LI et al., 1998).

O teste de ciclo celular consiste na quantificação de células em cada uma das fases (G0/G1, S e G2/M). Este ensaio baseia-se na mudança do conteúdo de DNA nos diferentes estágios da divisão; para isto, um corante fluorescente é utilizado a fim de emitir determinada intensidade de fluorescência, variável ao longo das fases do ciclo de acordo com a quantidade de material genético. A avaliação ocorre por citometria de fluxo na qual, a partir de programas específicos, gera um histograma que indica a quantidade de células em cada etapa (**Figura 9**) (POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004).

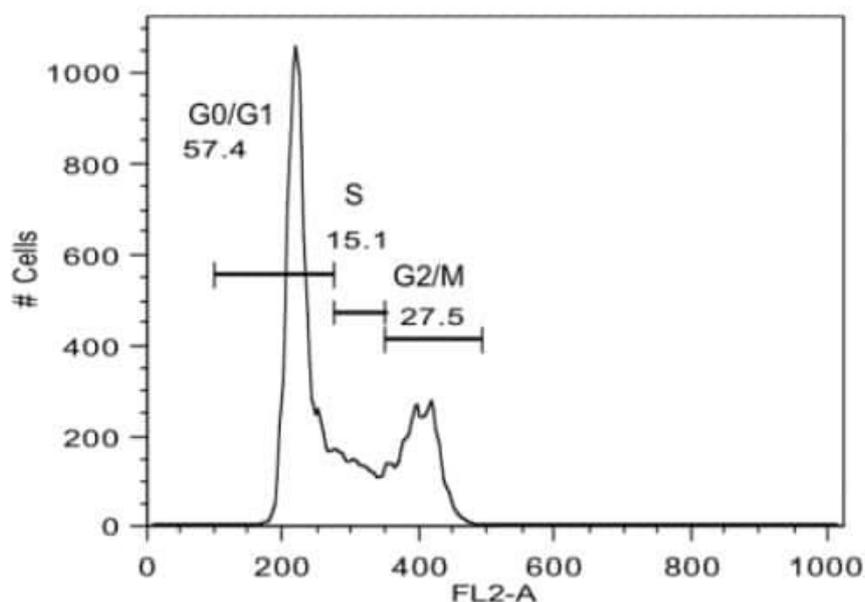


Figura 9. Histograma gerado a partir do teste de ciclo celular avaliado por citometria de fluxo, determinando a quantidade de células em cada etapa da divisão. Fonte: <https://www.abcam.com/cell-cycle-analysis-kit-ab287852.html> acesso em 9/11/2022

2 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antioxidante e a interação de extratos vegetais e seus derivados em testes *in vitro*

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar e comparar o potencial antioxidante do extrato etanólico, fração metanólica e da substância isolada (rutina) da casca de araticum-do-brejo (*Annona glabra*).
- Detectar e comparar o potencial citotóxico e genotóxico do extrato etanólico, fração metanólica e da substância isolada (rutina) da casca de araticum-do-brejo (*Annona glabra*) *in vitro*.

- Definir o mecanismo de morte celular (apoptose ou necrose) *in vitro* a partir da exposição do extrato etanólico e da fração metanólica.
- Determinar possíveis atividades de sinergismo *in vitro* a partir da avaliação por fracionamento biomonitorado do extrato etanólico, fração metanólica e substância isolada (rutina).
- Investigar efeitos no ciclo celular pela da interação do extrato etanólico e fração metanólica com as linhagens celulares estomacais não cancerosa MNP01 e cancerosa ACP02.
- Determinar e comparar o potencial antioxidante dos extratos etanólicos do caroço de açaí branco e açaí preto (*Euterpe oleraceae*).
- Definir e comparar o potencial citotóxico, e genotóxico de extratos etanólicos do caroço de açaí branco e preto (*Euterpe oleraceae*) *in vitro*.
- Avaliar e comparar o potencial citoprotetor *in vitro* de extratos etanólicos do caroço de açaí branco e preto (*Euterpe oleraceae*) frente à exposição concomitante à doxorubicina.

CAPÍTULO I

Submetido à revista *Journal of Applied Toxicology*

Title: Extrato e fração obtidos da casca de *Annona glabra* (araticum) alteram o ciclo celular de células estomacais não neoplásicas (MNP01) e células de adenocarcinoma gástrico (ACP02)

Short title: Avaliação de efeitos do extrato, fração e substância isolada de araticum *in vitro*

Luana França Calandrini de Azevedo¹; Karina Motta Melo^{1,2}; Vinicius Silva de Carvalho¹; Andryo Orfi de Almada Vilhena¹; Jorge das Dores Rissino¹; Heliton Patrick Cordovil Brígido³; Maria Fani Dolabela³; Cleusa Yoshiko Nagamachi^{1,4}; Julio Cesar Pieczarka^{1,4*}.

¹Laboratório de Citogenética, Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

²Universidade Federal Rural da Amazônia, Tomé-Açu, PA, Brasil.

³Laboratório de Farmacologia e Doenças Negligenciadas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

⁴Pesquisador CNPq

*Corresponding author

E-mail: julio@ufpa.br

RESUMO

Por apresentarem riqueza de metabólitos secundários, plantas da família Annonaceae são amplamente utilizadas como fonte de princípios ativos de medicamentos. Alguns metabólitos bioativos nesta família, principalmente no gênero *Annona* são as acetogeninas, os alcaloides e os flavonoides, constituintes com importantes atividades biológicas que tornam estas espécies amplamente estudadas. A *Annona glabra*, objeto de estudo desta pesquisa, exibe-se como uma planta com importantes atividades biológicas descritas na literatura e diversos constituintes com potencial terapêutico. Este trabalho objetiva avaliar a atividade antioxidante e interações de constituintes presentes no extrato etanólico (EE) e fração metanólica (FM), bem como avaliar um flavonóide isolado desta fração, a rutina (RUT), em linhagens estomacais não neoplásicas (MNP01) e neoplásicas (ACP02). Para isto, foram realizados os testes de DPPH para avaliação da atividade antioxidante, MTT e ensaio de apoptose/necrose para avaliação de citotoxicidade, teste do micronúcleo para avaliação de genotoxicidade e ensaio de ciclo celular para avaliação dos efeitos das substâncias sobre a divisão celular das células expostas. Todas as substâncias exibiram atividade antioxidante, sendo EE e FM mais que a RUT. Não foi observada atividade citotóxica e nem a formação de MN e outras anormalidades nucleares para EE e FM, porém o teste do MN revelou uma redução do índice de divisão nuclear para ambas as amostras. Os efeitos das amostras sobre a divisão da célula também foram observados no teste de ciclo celular. Acreditamos que interações sinérgicas no EE e em FM podem estar gerando danos no material genético e, por isso, atrasam o ciclo celular devido à tentativa de correção do sistema de reparo. Sugerimos que mais avaliações

devam ser feitas para melhor esclarecer o mecanismo de ação do composto de modo que garanta o bom uso de seus efeitos benéficos em condições e concentrações adequadas.

Palavras chave: Metabólitos secundários, Antioxidante, Ciclo celular, Interações sinérgicas.

1 - INTRODUÇÃO

A família Annonaceae compreende 2.016 espécies distribuídas em mais de 130 gêneros. Somente na Amazônia estão presentes $\frac{3}{4}$ de todas as espécies, desempenhando um importante papel econômico, uma vez que produzem frutos comestíveis e plantas comumente usadas na medicina popular, com riqueza de metabólitos secundários vegetais atuando na homeostase do organismo (SCOTTI et al., 2012; ARAÚJO, 2013 TAMOKOU ET AL., 2017; LOBÃO et al., 2020).

Compostos produzidos a partir do metabolismo secundário das plantas são responsáveis por conferir vantagem evolutiva ao vegetal, sendo fundamentais na adaptação e sobrevivência da espécie (BERLINCK et al., 2017). Devido à variedade de funções biológicas, os metabólitos secundários são amplamente utilizadas como princípios ativos de medicamentos. Por outro lado, por vezes estes metabólitos podem apresentar baixa estabilidade e solubilidade e oferecer riscos à saúde se consumidas em sua forma natural (MCCREATH; DELGODA, 2017). Diante deste cenário, destacam-se três classes de metabólitos constantemente citados na literatura como bioativos na família Annonaceae, principalmente no gênero *Annona*, as acetogeninas, os alcaloides e os flavonoides.

As acetogeninas são conhecidas pelo seu potencial anticâncer, causando a morte de células tumorais por diferentes mecanismos, como por exemplo, pela modulação da quantidade de quimioterápicos no meio intracelular ou por causar parada do ciclo celular e consequente indução a apoptose (PAES et al., 2016; HOUGHTON et al, 2007). Os alcaloides também exibem atividade antineoplásica, podendo atuar também com função antibacteriana, antifúngica, antiplasmódica e citotóxica, sendo esta última a propriedade mais representativa desta classe (CAVÉ et al., 1982; STÉVYGNI et al., 1998). Já o grupo dos flavonoides apresentam grande potencial antioxidante, atuando no combate a radicais livres. Porém, já foi reportado que em algumas situações o composto pode apresentar ação pró-oxidante, como na exposição a altas concentrações (VRHOVSEK et al., 2004; RODRIGUEZ-GARCIA et al., 2019). Portanto é possível observar que o gênero *Annona* constitui-se como uma fonte de substâncias com potencial terapêutico, o que torna relevante a pesquisa a partir de espécies de plantas com este potencial (ATTIQ et al.,

2017; FRAUSIN et al., 2014). Esta análise geralmente ocorre a partir do biomonitoramento fracionado, que envolve extrações, fracionamentos e purificações de substâncias isoladas para serem testadas (JUNIO et al., 2011; NIEMEYER et al., 2013). No entanto, tem se constatado que neste processo ocorre uma redução ou perda e, em alguns casos, o surgimento ou potencialização da atividade observada (CASANOVA; COSTA, 2017). É comum o relato de que misturas complexas de origem natural apresentam efeitos mais evidentes que doses tradicionais de seus constituintes isolados, e as explicações para estes fatos geralmente estão relacionadas a interações sinérgicas (WILLIAMSON, 2001; MA et al., 2009; CARMOSA et al., 2013; NIEMEYER et al., 2013). Esta sinergia pode ser resultado de dois mecanismos: efeitos farmacocinéticos ou farmacodinâmicos. No primeiro é observado que uma substância aumenta a solubilidade, absorção ou metabolismo de outra, já o segundo efeito está relacionado a ação simultânea destes constituintes a diferentes alvos terapêuticos inter-relacionados. É neste contexto que plantas medicinais são evidenciadas como potenciais agentes terapêuticos, pois geralmente exibem constituintes capazes de interagir com proteínas e modular processos celulares diversos (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009; MA et al., 2009)

Dentre as espécies do gênero *Annona*, destaca-se a *Annona glabra*, popularmente conhecida como araticum-do-brejo ou araticum-da-lagoa (LORENZI et al., 2006). Diversos estudos descrevem as atividades biológicas desta planta, como a inibição da replicação do HIV em linfócitos expostos ao extrato metanólico do fruto (CHANG et al., 1998), o potencial de extratos alcoólicos da folha, fruto e sementes, no combate a linhagens celulares leucêmicas (COCHRANE et al., 2008), o efeito anti-inflamatório do extrato da casca (SIEBRA et al., 2009) e a atividade citotóxica do extrato metanólico dos seus frutos (HIEN et al., 2015). Os dados presentes na literatura levaram esta espécie vegetal a ser objeto de avaliação desta pesquisa.

O presente estudo objetiva avaliar efeitos a nível celular do extrato etanólico, fração metanólica e uma substância isolada desta fração (rutina), obtidos a partir da casca do caule de *Annona glabra*, quando expostos a linhagens celulares gástricas não neoplásica (MNP01) e neoplásica (ACP02).

2.1- MATERIAL VEGETAL

A casca do caule de *A. glabra* foi coletada no estado do Pará (latitude 01°43'05"S, longitude 48°52'57"W). A identificação foi realizada pela Dra. Márlia R. F. Coelho

(Museu Paraense Emílio Goeldi), com exsicata (MG176948) depositada no referido museu.

2.2 – OBTENÇÃO, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

A obtenção e análise do extrato etanólico (EE) e da fração metanólica (FM) obtidos de *A. glabra*, bem como o isolamento da substância isolada (Rutina), foi realizado no estudo de Brígido, (2016) ou Brígido et al., (2020) e gentilmente cedido a nossa pesquisa.

O extrato etanólico (EE) foi obtido através da maceração exaustiva do pó da casca com etanol (1:10). A solução etanólica foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, até obtenção do resíduo. A fração metanólica (FM) foi obtida a partir de uma partição com hexano e metanol: água (9:1). Esta fração, FM, foi então submetida a subfracionamentos e de uma subfração de interesse foi isolado o flavonoide rutina (RUT), através de escala preparativa por cromatografia em camada fina. O EE, a FM e a RUT foram analisados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD). O Isolado também foi analisado em espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) a fim de ser identificado como o flavonoide Rutina (BRÍGIDO et al., 2020).

2.3- TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDAZIL)

Para determinação da atividade antioxidante de EE, FM e RUT, o DPPH foi previamente diluído em metanol (0,04 mg/mL). Em seguida 900 µL da solução de DPPH foi misturada a 100 µL dos extratos diluídos em metanol, em concentrações de 6,25 a 400 µg/mL. A mistura reagiu durante 20 minutos em local protegido da luz e, após a reação, as absorbâncias das amostras foram medidas em espectrofotômetro (Epoch, Biotek), utilizando o programa Gen5 (2003) versão 2.03.01. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH (% inibição), utilizando-se a fórmula $\% \text{Inibição} = \{[A1 - (A2 + A3)] / A1\} / 100$, onde A1: absorbância do DPPH, A2: absorbância do DPPH + extrato testado e diluídos e A3: absorbância do metanol + extrato testado e diluído. Após isso foi calculada a concentração de extrato necessária para capturar 50% do radical livre (EC50), utilizando análise de regressão linear, com auxílio do programa Graphpad Prism versão 6.01 (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

2.4 - LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTURA

Para todos os testes foram utilizadas duas linhagens celulares gástricas, uma não neoplásica MNP01 e outra de adenocarcinoma gástrico ACP02, ambas gentilmente cedidas pelo laboratório de Citogenética Humana e Genética Toxicológica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Estas foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF).

2.5 – ENSAIOS *IN VITRO*

2.5.1- Teste de citotoxicidade do MTT

O teste do MTT foi realizado em placas de 96 poços. Para exposição, por 48 horas, foram utilizadas concentrações de 6,25 µg/mL até 200 µg/mL de EE, FM e RUT de acordo com proposto por Sperotto (2014). Como controle negativo foi utilizado meio de cultura DMEM e como controle positivo (CP) a doxorrubicina (DOX) (200 µg/mL). Como o DMSO foi utilizado como veículo de diluição (0,1%), este também foi testado, sendo diluído em meio de cultura na mesma concentração. Após o semeio e a exposição, as células nos poços foram submetidas a 100 µL de MTT (5mg/mL) por 3 horas. Após a retirada do MTT, foi adicionado 100 µL de DMSO em cada poço por 1 hora. Então foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Epoch Biotek) pelo programa Gen5 (2003) versão 2.03.1. A absorbância foi convertida em sobrevivência (%S) através da fórmula: $\%S = 100 \times [(A_{\text{testado}} - A_{\text{branco}}) / (A_{\text{controle}} - A_{\text{branco}})]$, sendo “A” a absorbância de cada poço; considerou-se como branco o poço sem meio e células (MOSMANN, 1983).

2.5.2 – Teste do Micronúcleo *in vitro*

O teste do micronúcleo foi realizado em placas de 12 poços. Após 24 horas do semeio, foi realizada a exposição, por 48 horas, de EE, FM e RUT utilizando concentrações de 25 µg/mL a 200 µg/mL de acordo com proposto por Sperotto (2014). O CN foi realizado com DMEM, o DMSO (0,1%) também foi testado e o CP foi feito com colchicina (0,02 µg/mL), de acordo com Machado Santelle e Lofti (1996). Vinte e quatro horas antes da retirada das células, foi adicionado Citocalasina B (6µg/ml) em cada poço.

Após isto, as linhagens foram tripsinizadas e transferidas para um tubo Falcon no qual foi acrescentado solução hipotônica (KCl) e em seguida foi adicionado fixador Carnoy com metanol e ácido acético (3:1). Após centrifugado e retirado o sobrenadante, foi adicionado 1ml de fixador Carnoy e o tubo foi armazenado para posterior análise. A

avaliação foi feita em teste cego, sendo analisadas e quantificadas 500 células totais para determinação do Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) utilizando a fórmula: $CBPI = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/N$; sendo de M1 a M4 o número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente, e N o número total de células viáveis. A contagem das células binucleadas permaneceu até serem contabilizadas 1000 células para a observação de micronúcleo e determinação de sua frequência através da seguinte fórmula: $fMN = n^{\circ}MN/1000$ (FENECH, 2007).

2.5.3- Teste do Ciclo Celular

Para o ensaio de ciclo celular foram utilizadas placas de 6 poços. 24 horas após o semeio, foi realizada a exposição ao EE e a FM por 48h nas concentrações de 200 $\mu\text{g/mL}$ (C1) e 100 $\mu\text{g/mL}$ (C2), determinadas por resultados obtidos em testes anteriores, em que nestas concentrações os efeitos biológicos observados se mostraram mais evidentes. Como CN foi utilizado DMEM e como CP foi utilizado DOX (200 $\mu\text{g/mL}$), o DMSO também foi testado na concentração de 0,1%.

Ao fim da etapa de exposição, os poços com células foram lavados com tampão Hank's e as células aderidas foram tripsinizadas e transferidas a um eppendorf de 2ml contendo de 500 μl de meio DMEM. Em seguida, o eppendorf com as células foi centrifugado a 200g e o sobrenadante foi descartado, o pellet restante este foi lavado com 500 μl de PBS 1x e centrifugado novamente a 200g. Após esta etapa de lavagem, as células foram fixadas em álcool 70% gelado, por 1 h a 4°C; esta etapa foi realizada com auxílio do vórtex a fim de evitar doublets na leitura. Em seguida, realizou-se novamente a centrifugação a 200g e lavagem com 500 μl de PBS 1x. O sobrenadante foi então descartado e foi então adicionado 5 μl de RNase (20 mg/ml) e 495 μl de PBS, de modo que a concentração de RNase ficou com uma concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$, sendo deixado por 1h na estufa. Por último, foi adicionado 500 μl de iodeto de propídeo (50 $\mu\text{g/ml}$) e os eppendorfs foram levados ao citômetro de fluxo (BD FACSCanto II) para análise do ciclo celular a partir do Software FACSDiva. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra e a quantificação de células nas fases do ciclo (G0/G1, S e G2/M) foi realizada com auxílio do programa Flowing Software 2.5.1 (POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2014).

2.5.4 – Teste de Apoptose e Necrose (LA/BE)

Para o teste de morte celular por apoptose e necrose (LA/BE) foram utilizadas placas de 12 poços. 24 horas após o semeio, foi realizada a exposição ao EE e

a FM por 48h nas concentrações de 200 µg/mL (C1) e 100µg/mL (C2), determinadas por resultados obtidos em testes anteriores, em que nestas concentrações os efeitos biológicos observados se mostraram mais evidentes. Como CN foi utilizado DMEM e como CP foi utilizado DOX (200 µg/mL) e DMSO testado na concentração de 0,1%.

Após semeio e exposição, as células foram tripsinizadas e transferidas para um tubo Falcon, que em seguida foi centrifugado e retirado o sobrenadante. Uma mistura de Laranja de acridina (LA) (100 µg/mL) e Brometo de Etídio (BE) (100 µg/mL) foi preparada na proporção de 1:1 e 2 µl dessa mistura foi adicionado a 20 µl da solução celular em uma lâmina limpa, que em seguida foi coberta por uma lamínula e imediatamente analisada em microscópio de fluorescência Nikon (H550S). A análise aconteceu em quadruplicata na qual 300 células por amostra foram avaliadas. A porcentagem de células viáveis, em necrose ou apoptose foi calculada a partir da fórmula: %Células = (número de células de interesse/total de células analisadas) *100 (MCGAHON et al., 1995).

2.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Bioestat 5.0, sendo o valor de $p \leq 0,05$ considerado estatisticamente significativo. A normalidade dos dados foi avaliada a partir do teste Kolmogorov– Smirnov e então foram realizados os testes de comparações múltiplas Tukey- ANOVA ou Kruskal-Wallis (Student-Newman-Keuls) (AYRES, 2007).

3- RESULTADOS

3.1 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO E DA FRAÇÃO

A partir da análise cromatográfica de EE e FM realizada por Brígido (2016) e Brígido et al., (2020), dois picos principais são observados e se repetem nas duas amostras (**Figura1;2**). A avaliação dos espectros de UV, sugerem que essas substâncias são flavonoides, sendo esta a classe de compostos majoritária tanto em EE quanto em FM.

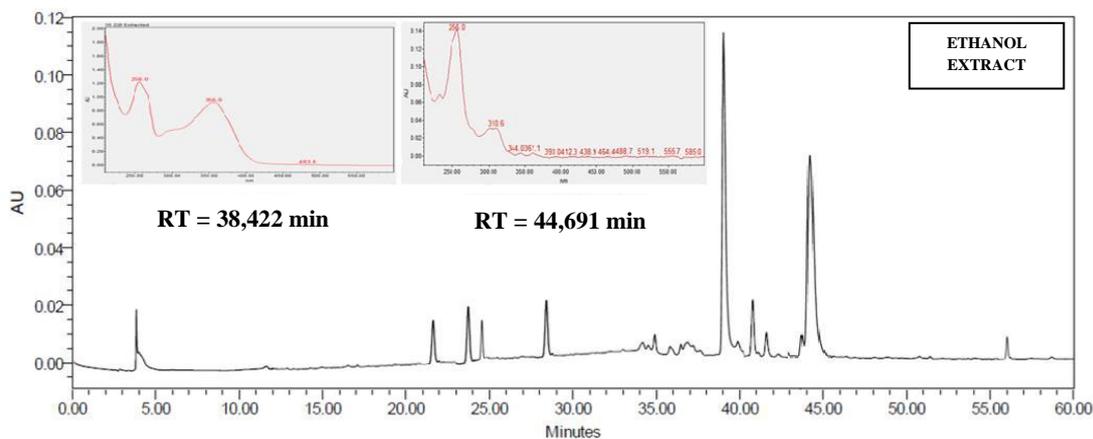


Figura 1. Perfil cromatográficos e espectros de UV do extrato etanólico obtido das cascas de *A. glabra*. $\lambda = 280$ a 400 nm. Fonte: Brígido (2016).

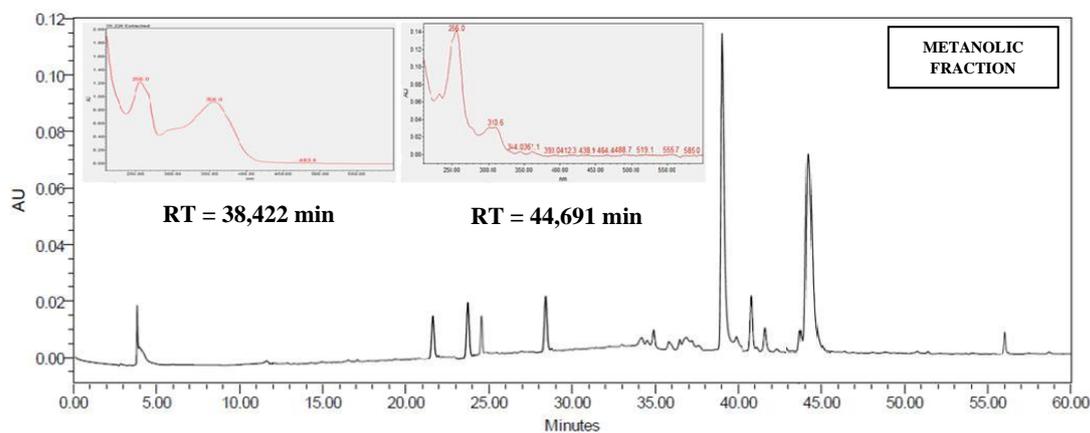


Figura 2. Perfil cromatográficos e espectros de UV da fração metanólica obtida do fracionamento do extrato etanólico das cascas de *A. glabra*. $\lambda = 280$ a 400 nm. Fonte: Brígido (2016).

3.2 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A partir da análise de captura de radicais livre DPPH pode se observar que tanto o EE quanto a FM e a RUT exibem potencial antioxidante, sendo o EE e a FM mais antioxidantes e com igual EC₅₀ de 16,7 μ g/mL enquanto o da RUT é de 19,5 μ g/mL (**Figura 3**).

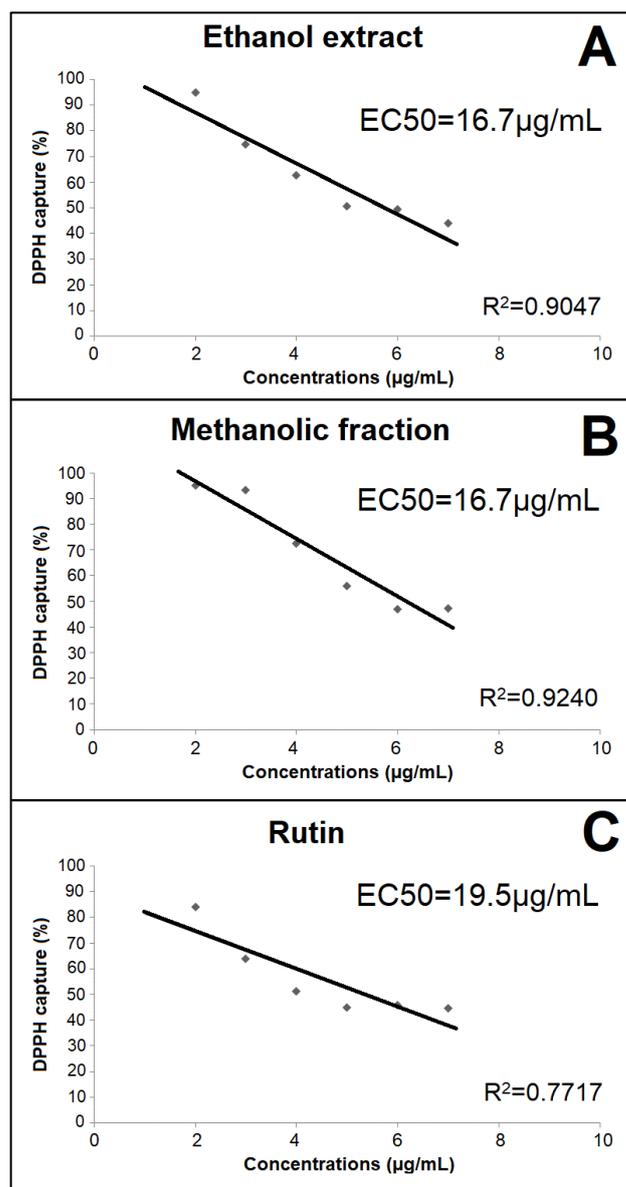


Figura 3. Correlação entre a captura de radicais livre DPPH e as concentrações utilizadas. Teste de regressão linear. A) Extrato etanólico (EE) e seu respectivo EC₅₀. B) Fração metanólica (FM) e seu respectivo EC₅₀. C) Rutina (RUT) e seu respectivo EC₅₀

3. 3 - ENSAIO MTT

O ensaio do MTT demonstra que o EE, a FM e a RUT foram atóxicos no tempo de 48 horas até a maior concentração testada, tanto para a linhagem ACP02 quanto para a MNP01 (**Figura 4**).

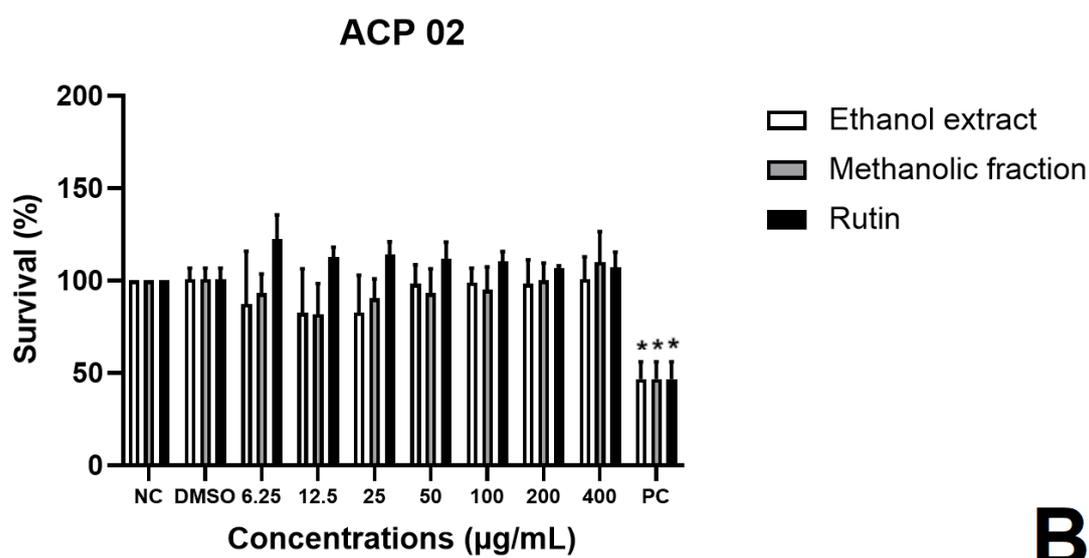
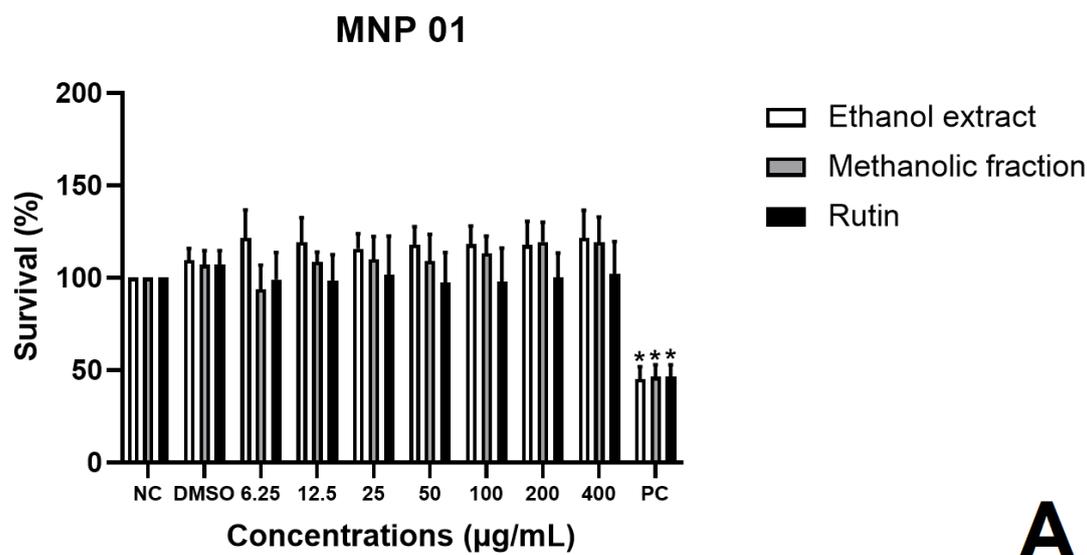


Figura 4. Porcentagem da média da sobrevivência celular e seus respectivos desvios padrão. Teste: Kruskal-Wallis-Student Newman Keuls, ($p < 0.05$). A: Células gástricas normais (MNP01); B: células de adenocarcinoma gástrico (ACP02); * difere de todos os tratamentos

3.4 – TESTE DO MICRONÚCLEO

O teste do micronúcleo mostrou que o EE, a FM e a RUT não exibem atividade mutagênica, visto que não ocorreu aumento na frequência de micronúcleos e nem de nenhuma outra alteração nuclear analisada. Estes resultados foram observados tanto na linhagem ACP02 (**Tabela 1**) quanto na MNP01 (**Tabela 2**)

Já o teste do índice de proliferação por bloqueio de citocinese (IPBC) demonstrou que, na linhagem cancerosa ACP02 apenas a FM diminui o índice de divisão nuclear (Tabela 1). O resultado do IPBC para a linhagem gástrica normal MNP01 demonstra redução no índice de divisão nuclear tanto nos tratamentos com o EE quanto com a FM em 48 horas de tratamento (Tabela 2).

Tabela 1. Média e desvio padrão dos parâmetros analisados pelo teste do MN na linhagem celular ACP02 após 48 horas de exposição a extrato etanólico, fração metanólica e substância isolada (rutina) a partir de *A. glabra* e seus respectivos controles.

Cell ACP02				
Ethanol extract				
Treatments	MNf	BNf	Oaf	CBPI
NC	0,25 (± 0,07)	0,20 (± 0)	0,38 (± 0,26)	1,49 (± 0,02)
DMSO	0,25 (± 0,07)	0,20 (± 0,14)	0,30 (± 0,36)	1,35 (± 0,04)
25 µg/mL	0,60 (± 0,07)	0,35 (± 0,07)	0,05 (± 0,06)	1,42 (± 0,08)
50 µg/mL	0,05 (± 0)	0,20 (± 0,28)	0,12 (± 0,09)	1,38 (± 0,12)
100 µg/mL	0,30 (± 0,07)	0,55 (± 0,50)	0,12 (± 0,10)	1,40(±0,03)
200 µg/mL	0,30 (± 0)	0,30 (± 0)	0,21 (± 0,05)	1,39 (± 0,05)
PC	4,36 (± 0,05)*	1,65 (± 0,21)*	0,10 (± 0,20)*	1,33 (± 0,03)
Methanolic fraction				
Treatments	MNf	BNf	Oaf	CBPI
NC	0,25 (± 0,07)	0,2 (± 0)	0,38 (± 0, 26)	1,49 (± 0,02)
DMSO	0,25 (± 0,07)	0,2 (± 0,14)	0,30 (± 0,36)	1,35 (± 0,04)
25 µg/mL	0,39 (± 0,14)	0,04 (± 0,04)	0,06 (± 0,06)	1,30 (± 0)*
50 µg/mL	0,23 (± 0,18)	0,11 (± 0,11)	0,11 (± 0,11)	1,30 (± 0,09)*
100 µg/mL	0,69 (± 0,27)	0,2 (± 0)	0,15 (± 0,15)	1,31 (± 0,03)*
200 µg/mL	0,27 (± 0,09)	0,22 (± 0,31)	0,14 (± 0,14)	1,30 (± 0,01)*
PC	4,36 (± 0,50)*	1,65 (± 0,21)*	0,10 (± 0,20)*	1,33 (± 0,03)*
Rutin				
Treatments	MNf	BNf	Oaf	CBPI
NC	0,25 (± 0,07)	0,2 (± 0)	0,38 (± 0, 26)	1,49 (± 0,02) **
DMSO	0,25 (± 0,07)	0,2 (± 0,14)	0,30 (± 0,36)	1,35 (± 0,04)
25 µg/mL	0,39 (± 0,14)	0,04 (± 0,04)	0,06 (± 0,06)	1,43 (± 0,04)
50 µg/mL	0,23 (± 0,18)	0,11 (± 0,11)	0,11 (± 0,11)	1,48 (± 0,04)
100 µg/mL	0,69 (± 0,27)	0,2 (± 0)	0,15 (± 0,15)	1,47 (± 0,01)
200 µg/mL	0,27 (± 0,09)	0,22 (± 0,31)	0,14 (± 0,14)	1,33 (± 0,06)
PC	4,36 (± 0,50)*	1,65 (± 0,21)*	0,10 (± 0,20)*	1,33 (± 0,03)

MNf: frequência de micronúcleos; BNf: frequência de brotos nucleares; Oaf: frequência de outras anormalidades; CBPI: índice de proliferação com bloqueio de citocinese; NC: controle negativo; PC: controle positivo. Teste paramétrico ANOVA; múltiplas comparações Tukey-Kramer ($p < 0.05$); *Difere de NC; **difere de 200 e PC.

Tabela 2. Média e desvio padrão dos parâmetros analisados pelo teste do MN na linhagem celular MNP01 após 48 horas de exposição a extrato etanólico, fração metanólica e substância isolada (rutina) a partir de *A. glabra* e seus respectivos controles

Cell MNP01				
Ethanol extract				
Treatments	MNf	BNf	Oaf	CBPI
NC	0,45 (± 0,07)	0,05 (± 0,07)	0 (± 0)	1,56(±007)
DMSO	0,50 (± 0,001)	0,25 (± 0,07)	0 (± 0)	1,43 (± 0,05)
25 µg/mL	0,65 (± 0,07)	0,35 (± 0,21)	0,05 (± 0,04)	1,24 (± 0,02)*
50 µg/mL	0,19 (± 0,13)	0,20 (± 0,14)	0,05 (± 0,05)	1,27 (± 0,02)*
100 µg/mL	0,25 (± 0,06)	0,20 (± 0,28)	0,03 (± 0,05)	1,24 (± 0, 001)*

200 µg/mL	0,55 (± 0,49)	0,30 (± 0,14)	0,03 (± 0,05)	1,26 (± 0,03)*
PC	2,28 (± 0,21)*	1,80 (± 0,67)*	0,19 (± 0,14)*	1,42 (± 0,07)*
Methanolic fraction				
Treatments	MNf	BNf	Oaf	CBPI
NC	0,45(± 0,07)	0,05 (± 0,07)	0 (± 0)	1,56 (± 0,07)
DMSO	0,50 (± 0,001)	0,25 (± 0,07)	0 (± 0)	1,43 (± 0,05)
25 µg/mL	0,65 (± 0,07)	0,16 (± 0,03)	0,02 (± 0,04)	1,24 (± 0,05)*
50 µg/mL	0,19 (± 0,13)	0,25 (± 0)	0 (± 0)	1,36 (± 0)*
100 µg/mL	0,25 (± 0,06)	0,53 (± 0,36)	0 (± 0)	1,27 (± 0,01)*
200 µg/mL	0,55 (± 0,49)	0,12 (± 0,16)	0 (± 0)	1,35 (± 0,05)*
PC	2,28 (± 0,21)*	1,80 (± 0,67)*	0,19 (± 0,14)*	1,42 (± 0,07)*
Rutin				
Treatments	MNf	BNf	Oaf	CBPI
NC	0,45 (± 0,07)	0,05 (± 0,07)	0 (± 0)	1,56 (± 0,07)
DMSO	0,50 (± 0,001)	0,25 (± 0,07)	0 (± 0)	1,43 (± 0,05)
25 µg/mL	0,50 (± 0,70)	0,27 (± 0,03)	0 (± 0)	1,63 (± 0,03)
50 µg/mL	0,25 (± 0,35)	0,15 (± 0,07)	0,05 (± 0,05)	1,61 (± 0,09)
100 µg/mL	0,23 (± 0,18)	0,36 (± 0,36)	0,03 (± 0,06)	1,51 (± 0,04)
200 µg/mL	0,30 (± 0,28)	0,1 (± 0,14)	0 (± 0)	1,43 (± 0,07)
PC	2,28 (± 0,21)*	1,80 (± 0,67)*	0,19 (± 0,14)*	1,42 (± 0,07)

fMN: frequência de micronúcleos; fBN: frequência de brotos nucleares; fOA: frequência de outras anormalidades; CBPI: índice de proliferação com bloqueio de citocinese; CN: controle negativo; CP: controle positivo. Teste paramétrico ANOVA; múltiplas comparações Tukey-Kramer ($p < 0.05$); *Diferença dos demais tratamentos.

3.5 – TESTE DE CICLO CELULAR

Este ensaio mostrou que para a linhagem MNP01 (**Figura 5A**), o número de células na fase G0/G1 após a exposição ao EE na concentração de 200µg/mL aumentou em relação aos demais tratamentos, assim como seu controle positivo. Na fase S, houve um aumento de células expostas ao EE na concentração de 200µg/mL e uma diminuição do número de células expostas a FM na concentração 200µg/mL. O número de células em G2/M permaneceu constante em todos os tratamentos.

Com relação as células ACP02 (**Figura 5B**), em G0/G1 houve uma diminuição do número de células expostas ao EE na concentração 100µg/mL e um aumento do número de células estagnadas em S para todos os tratamentos com *A. glabra* e seu controle positivo.

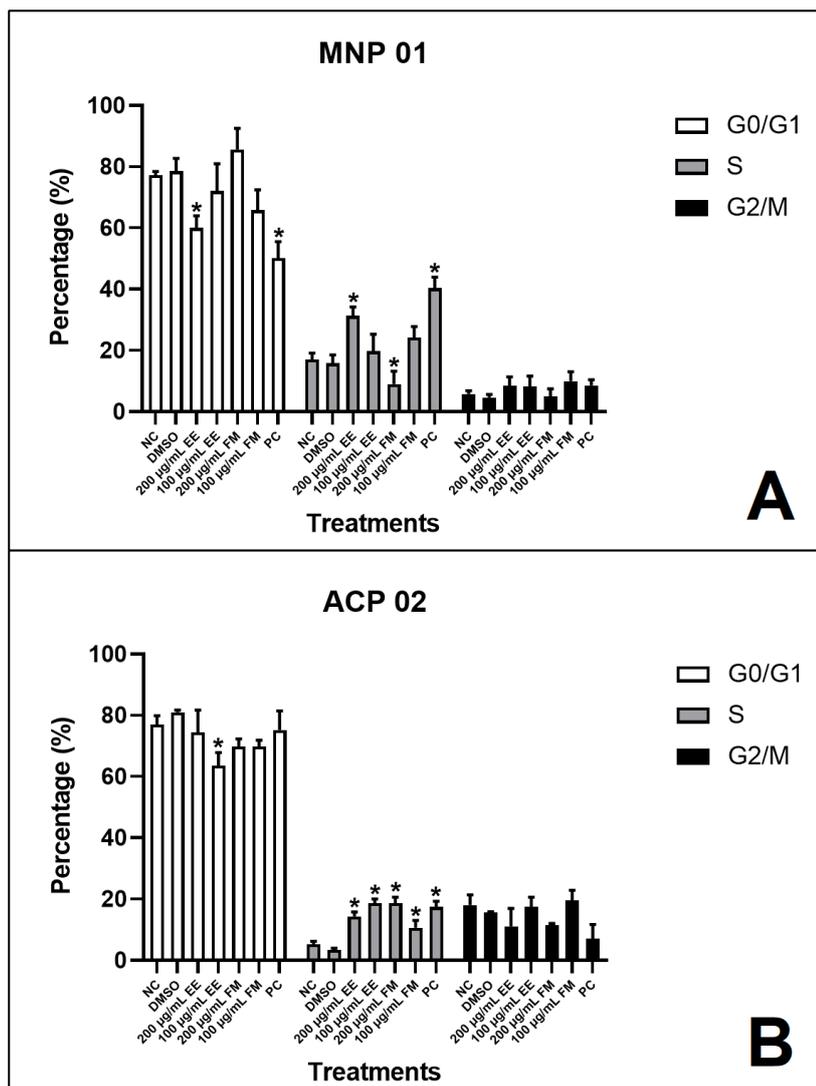


Figura 5. Média e Desvio padrão da porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular após exposição aos extratos de *A. glabra* e seus controles. **A)** MNP01. **B)** ACP 02. *Difere em relação a NC e DMSO. Teste paramétrico ANOVA; comparações múltiplas de Tukey-Kramer ($p < 0,05$). NC: controle negativo; DMSO: dimetilsulfóxido (veículo de diluição); EE: extrato etanólico; FM: fração metanólica; PC: controle positivo.

3.6 - TESTE DE APOPTOSE E NECROSE (LA/BE)

O ensaio de apoptose/necrose investigado pela coloração diferencial de laranja de acridina e brometo de etídio mostrou morte celular por necrose da linhagem MNP01 após exposição da FM de *A. glabra* na concentração de 100 µg/mL. Nenhuma das outras concentrações mostrou diferença estatística, à exceção do CP (**Figura 6**).

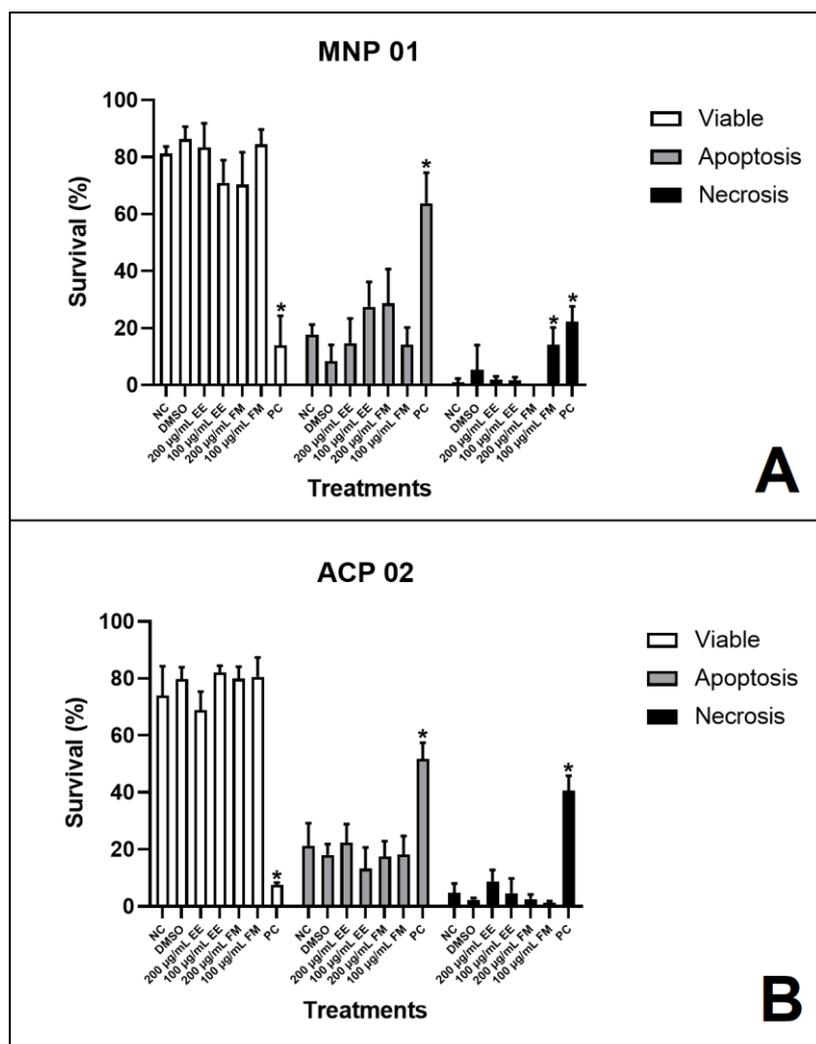


Figura 6. Média e Desvio padrão da sobrevivência das células após exposição aos extratos de *A. glabra* e seus controles. **A)** MNP01. **B)** ACP02. *Difere em relação aos demais tratamentos. Teste paramétrico ANOVA; Comparações múltiplas de Tukey-Kramer ($p < 0,05$). NC: controle negativo; DMSO: dimetilsulfóxido (veículo de diluição); EE: extrato etanólico de *A. glabra*; FM: fração metanólica de *A. glabra*; PC: controle positivo (DOX= 200 µg/mL).

4- DISCUSSÃO

Constituintes fitoquímicos diversificados presentes na família Annonaceae fazem com que investigações acerca de suas propriedades em células, tecidos e até organismos, venham se intensificando ao longo dos anos (SIEBRA, 2007). A espécie *Annona glabra*, objeto de estudo desta pesquisa, tem ampla utilização na medicina tradicional, onde compostos de diferentes partes da planta exibem importantes atividades biológicas já descritas anteriormente por outros autores, como efeitos anti-helmíntico, antimalárico, antimicrobiano, antiprotozoário, pesticida e até anticâncer (ALALI et al., 1999; COCHRANE et al., 2008).

A atividade antioxidante observada tanto em EE quanto em FM pode ser explicada pela sugestão da presença de flavonoides na caracterização química de ambos, visto que esta propriedade é amplamente descrita nesta classe de compostos (NUNES et al., 2012). Já a sutil redução da capacidade do flavonoide majoritário (RUT) em capturar radicais livres, acredita-se estar relacionada a diminuição do seu tempo de atuação, ou seja, sua biodisponibilidade, quando atua de forma isolada. Este fato já foi descrito na avaliação da cinética de absorção *in vitro* de frações de *Annona muricata* enriquecidas de flavonoides, que concluiu que a rutina se apresentava mais biodisponível ao atuar em conjunto com outros compostos (YANG et al., 2015).

Os resultados do ensaio do MTT e teste de apoptose e necrose, mostram que as substâncias utilizadas não induziram citotoxicidade para nenhuma das linhagens celulares, nas condições e concentrações testadas. Trabalhos anteriores, ao caracterizarem quimicamente extratos de *A. glabra*, descreveram os alcalóides e as acetogeninas como os principais grupos de compostos fitoquímicos presentes nesta planta (CHANG et al., 1998; CHEN et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002; CHEN et al., 2004; HIEN et al., 20015), ambos exibem conhecido potencial citotóxico. Na metodologia utilizada para caracterização do EE e da FM testados no presente trabalho, acetogeninas e alcaloides também foram identificados, porém em concentrações muito reduzidas, o que também explicaria a ausência da atividade citotóxica.

Nossos resultados indicam que o EE e a FM induzem o mesmo efeito biológico: redução do índice de divisão nuclear e alteração na duração das fases do ciclo. Como os demais ensaios não dão evidências de citotoxicidade, talvez a resposta possa estar ligada a paradas nas fases do ciclo em pontos de checagem, visto que a célula eucarionte sempre examina sinais internos e externos para decidir se deve continuar ou parar o ciclo (TYLER, 1996). Diante disso, a ausência de micronúcleos em nossas análises nos leva a levantar duas hipóteses: 1) os danos gerados são reparados, não sendo capazes, portanto, de gerar micronúcleos ou 2) os danos gerados pelos compostos presentes em *A. glabra* em altas concentrações, impedem o progresso do ciclo celular e os micronúcleos não são visualizados uma vez que a célula não consegue completar sua divisão. Nossa 2ª hipótese é reforçada por Cochrane (2008) que na avaliação de extratos de *A. glabra*, observou o aumento da expressão de um inibidor do complexo regulador do ciclo (WAF1/p21) e sugeriu que esta modulação contribuía para parada das células na interfase, em G0/G1, interrompendo o processo de divisão celular.

Paradas nas fases do ciclo também foram observadas no teste de ciclo celular. A grande quantidade de células não neoplásicas (MNP01) paradas em G1/G0 na maior concentração do EE, demonstra que conhecidamente células não neoplásicas tendem a avaliar de forma mais criteriosa as condições para iniciar o processo de divisão (PINHO, 2008), dado que o ponto de checagem em G1 é crucial para determinar se a célula que vai iniciar o ciclo. Se isso acontecer, a célula torna-se comprometida irreversivelmente com a divisão celular, caso contrário, fica estacionada em G0 (LI et al., 1998). Já os resultados observados na fase S tanto na linhagem MNP01 quanto em ACP02 confirmam a tentativa da maquinaria de reparo em corrigir danos causados no DNA dado que, durante esta etapa, qualquer problema na replicação do DNA aciona um ponto de checagem que estagna as células enquanto não for reparado (WILLIS; RHIND et al., 2009).

Na fase S do ciclo celular, ocorre um importante evento para a divisão celular: a replicação do material genético. Uma vez que este processo é finalizado, proteínas de reparo, avaliam se existem pontos em que o DNA não está duplicado. Em caso positivo, proteínas de replicação A (RPA) atuam como sinalizadoras e bloqueiam o ciclo até a correção do erro (DAS-BRADOO; BIELINSKY, 2010).

Artigos na literatura descrevem que, dependendo da concentração de exposição, compostos presentes tanto no EE quanto FM de *A. glabra* podem exibir a capacidade genotóxica. As acetogeninas, por exemplo, são conhecidas por bloquear o ciclo de divisão em G1 e induzir a autofagia das células (PAES et al., 2016), já os alcaloides apresentam a capacidade de inibir a Topoisomerase, proteína fundamental no processo de replicação (DA SILVA et al., 2007; ALVES et al., 2007). No entanto, acreditamos que os resultados observados em nossa pesquisa nos tratamentos com o EE e a FM possam resultar da combinação destes compostos. Sugerimos ainda que estes constituintes possam trabalhar em sinergia a partir de efeitos farmacocinéticos, no qual que uma substância modula a ação da outra gerando efeitos superiores ao que se era esperado (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009). Resultados semelhantes foram descritos por Paula (2019), concluindo que alcaloides presentes no extrato de *Annona rugulosa* apresentavam maior efeito antiproliferativo *in vitro*, em células de câncer cervical Hela, ao atuar em sinergia com outros metabólitos secundários.

Outro exemplo de sinergia no gênero *Annona* é o resultado observado no trabalho de Yang et al. (2015) que, ao avaliar extratos de graviola (*Annona muricata*) concluiu que combinações de acetogeninas e flavonoides demonstram um aumento da eficácia *in vitro* frente ao combate de células de câncer de próstata (PC-3). Porém, ao administrar esta

mistura a camundongos com xenoinxertos de PC-3 implantados subcutaneamente, todos os animais apresentaram sintomas como perda de apetite, perda drástica de peso, diminuição do movimento, seguida do encurvamento da postura, sendo eutanasiados após três semanas de exposição, e confirmando a toxicidade desta combinação.

Nossos resultados demonstram que o extrato, a fração e a rutina obtidos da casca de *Annona glabra*, nas condições testadas, não apresentam potencial citotóxico tanto para células gástricas não neoplásicas (MNP01) quanto para células de adenocarcinoma gástrico (ACP02). Porém, nas concentrações testadas, foi possível observar que substâncias presentes no extrato e fração alteram a dinâmica do ciclo celular das duas linhagens. É possível que estes constituintes fitoquímicos exibam efeitos genotóxicos ao atuar de forma sinérgica e, conseqüentemente, estas alterações no material genético causariam a parada da divisão celular em pontos de checagem.

Diante disto, nossa pesquisa demonstra que o uso terapêutico de extratos e frações obtidos de *Annona glabra* devem ser realizados de forma atenta às concentrações do preparo, devido a efeitos de compostos produzidos a partir do seu metabolismo secundário e a interação sinérgica destes. Ressaltamos a necessidade de investigações mais detalhadas para uma melhor compreensão da forma como estes constituintes interagem entre si e interferem na dinâmica do ciclo celular.

5 - CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram a importância da avaliação da toxicidade em preparos a base de vegetais, pois, a partir do seu metabolismo secundário, plantas produzem substâncias para se proteger de parasitas e predadores e estes também podem provocar alterações no equilíbrio bioquímico do organismo humano e serem danosos, interagindo inclusive com o nosso material genético, podendo causar alterações em genes importantes e levar ao desenvolvimento de doenças genéticas como, por exemplo, o câncer.

Por outro lado, também é importante ressaltar a avaliação para determinação de concentrações a serem utilizadas nestas misturas complexas, uma vez que a *A. glabra* apresenta importantes atividades biológicas, sendo amplamente utilizada na medicina tradicional. Nossos dados sugerem seu uso de forma cautelosa, atentando sempre para a concentração utilizada, a fim de usufruir dos benefícios farmacológicos deste vegetal e, ao mesmo tempo evitar efeitos de toxicidade.

Assim, atentamos para que mais estudos sejam feitos, avaliando possíveis interações destes compostos de modo a auxiliar na elucidação do mecanismo de ação destes constituintes.

6- AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES; Edital Pro-Amazônia Biodiversidade e Sustentabilidade 047/2012) e Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social – BNDES (Operation 2.318.697.0001) em projeto coordenado por Julio Cesar Pieczarka. Este estudo é parte da tese de doutorado de Luana França Calandrini de Azevedo no Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará (bolsista CNPq)

7- REFERÊNCIAS

ALALI, F.Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recente progress. *J. Nat. Prod.* 1999, Mar;62(3):504-40. DOI: [10.1021/np980406d](https://doi.org/10.1021/np980406d)

ALONSO-SALCES, R. M.; BARRANEO, A.; ABAD, B. BERMUTE, L. A.; GALLO, B.; VIATE, F. Polyphenolic profiles of Basque cider apple cultivars and their technological properties. *J. Agric. Food Chem.* 2004, n. 52, p. 2938-2552. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf035416l>

ALVES, E.P.; DA SILVA, H.R.M.; ANDRADE, M.R.M.A.; WANDERLEY, R. Antineoplásicos – alcalóides da vinca: um estudo das interações medicamentosas dos produtos padronizados no hospital Napoleão Laureano. Extensão e pesquisa, Departamento de Ciências Farmacêuticas. 2007. Avaliable in: <https://www.saudedireta.com.br/docsupload/13398932746CCSDCFOUT01.pdf>

ARAÚJO, C.S. Estudo fitoquímico e atividade biológica *in vitro* de *Annona vepretorum* MART. (Annonaceae). [Mastership dissertation]. Petrolina: Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, UNIVASF, 2013.

ATTIQ, A.; JALIL, J.; HUSAIN, K. Annonaceae: Breaking the Wall of Inflammation. *Front. Pharmacol.* 2017. DOI: [10.3389/fphar.2017.00752](https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00752)

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; DOS SANTOS, A.S. Bio Estat 5.0 Aplicações Estatísticas das Ciências Biológicas e Médicas, 5ª edição, Pará: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSM/ MCT/ CNPq, 2007

BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. *Quim. Nova.* 2017, v. 40, n. 6, p. 706–710. DOI.org/10.21577/0100-4042.20170070.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food. Sci. Technol.* 1995, (28): 25-30. DOI 0.1016/s0023-6438(95)80008-5

BRÍGIDO, H. P. C. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos e biológicos de *Annona glabra* L. (Annonaceae). [Mastership dissertation]. Pará: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPA, 2016.

BRÍGIDO, H. P. C.; SILVA E SILVA, J. V.; BASTOS, M. L. C.; CORREA-BARBOSA, J.; SARMENTO, R. M.; COSTA, E. V. S.; MARINHO, A. M. R.; COELHO-FERREIRA, M. R.; SILVEIRA, F. T.; DOLABELA, M. F. Atividade antileishmania de *Annona glabra* L. (Annonaceae). *Revista Eletrônica Acervo Saúde.* 2020 (57), e3701. DOI: <https://doi.org/10.25248/reas.e3701.2020>

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. *Rev. Virtual Quim.*, 2017. 9 (2). ISSN: 1984-6835. Available in: <http://rvq.s bq.org.br>

CAVÉ, A.; LEBOEUF, M.; WATERMAN, P. G. in *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*; Pelletier. S. W., ed.; John Wiley & Sons: Nova Iorque, 1987, vol. 5; Leboeuf, M.; Cavé, A.; Bhaumik, P. K.; Mukherjee, B.; Mukherjee, R.; *Phytochemistry*, 21, 2783, 1982.

CHANG, F. R.; YANG, P.Y.; LIN, J. Y.; LEE, K. H.; WU, Y. C. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. *J. Nat. Prod.* 1998, Apr;61(4):437-9. DOI: 10.1021/np970497z.

CHEN, C.H.; HSIEH, T.J.; LIU, T.Z.; CHERN, C.L.; HSIEH, P.Y.; CHEN, C.Y. Annoglabayin, a novel dimeric kaurane diterpenoid, and apoptosis in Hep G2 cells of annomontacin from the fruits of *Annona glabra*. *J. Nat. Prod.* 2004, 67:1942-6. DOI: <https://doi.org/10.1021/np040078j>

CHEN, C.Y.; CHANG, F.R.; CHO, C.P.; WU, Y.C. ent-Kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. *J. Nat. Prod.* 2000, 63:1000-3. DOI: <https://doi.org/10.1021/np0000320>

COCHRANE, C.B.; RAVEENDRAN NAIR, P.K.; STEVEN, J; MELNICK, S.J.; RESEK, A.P.; RAMACHANDRAN, C. Anticancer Effects of *Annona glabra* Plant Extracts in Human Leukemia Cell Lines. *Anticancer Res.* 2008, Mar-Apr;28(2A):965-71. PMID: 18507043.

DA SILVA, D.B.; MATOS, M.F.C.; NAKASHITA, S.T.; MISU, C.K.; YOSHIDA, N.C.; CAROLLO, C.A.; FABRI, J.R.; MIGLIO, H.S.; SIQUEIRA, J.M. Isolation and cytotoxicity evaluation of some oxoaporphine alkaloids from Annonaceae. *Quim. Nova.* 2007, 30 (8), 1809-1812. ISSN: 0100-4042. Available in: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n8/a04v30n8.pdf>

DAS-BRADOO, S.; BIELINSKY, A. DNA Replication and Checkpoint Control in S Phase. *Nat. Sci. Educ.* 2010. 3 (9): 50. Available in: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-replication-and-checkpoint-control-in-s-14202419/>

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2007, 2, 1084–1104. DOI: [10.1038/nprot.2007.7](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.7)

FRAUSIN, G.; LIMA, R.B.S.; HIDALGO, A.F.; MAAS, P.; POHLIT, A.M. Plants of the Annonaceae traditionally used as antimalarials: a review. *Rev. Bras. Frutic.* 2014, 36 (spe1). DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500038>

HIEN, N.T.T.; NHIEMI, N.X.; YEND.T.Y.; HANG, D.T.T.; TAI, B.H.; QUANG, T.H.; ANH, H.L.T.; KIEM, P.V.K.; MINH, C.V.; KIM, E.J.; KIM, S.H.; KANG, H.K.; KIM, Y.H. Chemical constituents of the *Annona glabra* fruit and their cytotoxic activity. *Pharm. Biol.* 2015. DOI: [10.3109/13880209.2014.993042](https://doi.org/10.3109/13880209.2014.993042)

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods.* 2007, Aug;42(4):377-87. DOI: [10.1016/j.ymeth.2007.01.003](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.003)

JUNIO, H. A.; SY-CORDERO, A. A.; ETTEFAGH, K. A.; BURNS, J. T.; MICKO, K. T.; GRAF, T. N.; RICHTER, S. J.; CANNON, R. E.; OBERLIES, N. H.; CECH, N. B. Synergy-directed fractionation of botanical medicines: a case study with goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *J. Nat. Prod.* 2011, Jul 22;74(7):1621-9. DOI: [10.1021/np200336g](https://doi.org/10.1021/np200336g).

LI CM, TAN NH, ZHENG HL, ET AL. Cyclopeptides from the seeds of *Annona glabra*. *Phytochemistry.* 50:1047–52, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00752-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00752-8)

LI, F., AMBROSINI, G., CHU, E. Y., PLESCIA, J., TOGNIN, S., MARCHISIO, P. C.; ALTIERI, D. C. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 1998. DOI [10.1038/25141](https://doi.org/10.1038/25141).

LIKHITWITAYAWUID K.; ANGERHOFER, C. K.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M.; RUANGRUNGSI, N. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinolme alkaloids from *Stephania erecta*. *J. Nat. Prod.* 1993, 56:30–8. DOI: <https://doi.org/10.1021/np50091a005>

LOBÃO, A.Q.; LOPES, J.C.; ERKENS, R.H.J.; MENDES-SILVA, I.; PONTES PIRES, A.F.; SILVA, L.V.; OLIVEIRA, M.L.B.; JOHNSON, D.; MELLO-SILVA, R. Annonaceae in Flora do Brasil. 2020. Available in: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110760>

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*). São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006, 1ª edição, Brasil.

MA, X. H.; ZHENG, C. J.; HAN, L. Y.; XIE, B.; JIA, J.; CAO, Z. W.; LI, Y. X.; CHEN, Y. Z. Synergistic therapeutic actions of herbal ingredients and their mechanisms from

molecular interaction and network perspectives. *Drug Discovery Today*. Jun;14(11-12):579-88. DOI: 10.1016/j.drudis.2009.03.012

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The systematic identification of flavonoids. *Springer Sci. Rev.* 1970, 354p. ISBN: 978-3-642-88458-0

MACHADO-SANTELLI, G.M.; LOTFI, C.F.P. Comparative analysis of colchicine induced micronuclei in different cell types in vitro. *Mutat. Res* 1996; 349: 77-83. DOI 10.1016/0027-5107(95)00160-3

MCCREATH, S. B.; DELGODA, R. Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies. Chapter 7 – Evolutionary perspectives on the role of plant secondary metabolites. Academic Press. 2017, p. 93-100. ISBN: 9780128021040

MCGAHON, A.J.; MARTIN, S.M.; BISSONNETE, R.P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R.J., ET AL. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. *Methods Cell. Biol* 1995; 46: 153-185. DOI 10.1016/s0091-679x(08)61929-9

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 1983; 65: 55-63. DOI 10.1016/0022-1759(83)90303-4

NIEMEYER, K.; BELL, I. R.; KOITHAN, M. Traditional knowledge of western herbal medicine and complex systems science. *J. Herb. Med.* 2013, Sep;3(3):112-119. DOI: 10.1016/j.hermed.2013.03.001

NUGRAHA, A.S.; DAMAYANTI, Y.; WANGCHUK, P; KELLERP.A. Anti-infective and anti-cancer properties of the *Annona* species: Their ethnomedicinal uses, alkaloid diversity, and pharmacological activities. *Molecules*. 2019, Dec 3;24(23):4419. DOI: 10.3390/molecules24234419

NUNES, C.R.; BERNARDES, N.R.; GLÓRIAL.L.; OLIVEIRA, D.B. Flavonoids in Annonaceae: occurrence and biological properties. *Vértices*. v.14, n. 1, p. 39-57, 2012. DOI: <https://doi.org/10.19180/1809-2667.v14n12012p39-57>

OLIVEIRA, B.H.; SANT'ANA, A. E.; BASTOS, E. D. Z. Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. *Phytochem. Anal.* 2002, 13:368-71. DOI: <https://doi.org/10.1002/pca.670>

PAES, M. M.; VEGA, M. R. G.; CORTES, D.; KANASHIRO, M. M. Cytotoxic Potencial Acetogenins of *Annona* Genus. *Rev. Virtual Quim.* 2016. ISSN:1984-6835
PAULA, P. Análise quantitativa e sazonal de alcaloides por LC-MS/MS e determinação da atividade antiproliferativa em linhagem de carcinoma cervical do extrato hidroalcoólico de folhas de *Annona rugulosa* (SCHLTDL.) H. Rainer [Mastership dissertation]. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPR, 2019.

PINHO, M.S.L. Biologia Molecular do Câncer Colorretal: Uma Revolução Silenciosa em Andamento. *Rev Bras Coloproct.* 2008, V. 28(3): 353-368. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-98802008000300017>

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. *Methods Mol. Biol.* 2014. DOI: 10.1385/1-59259-811-0:301

RODRIGUEZ-GARCIA, C.; SANCHEZ-QUESADA, C. Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: Na Updated Review of Human Studies. *Antioxidants (Basel)*. 2019, May 18;8(5):137. DOI: 10.3390/antiox8050137

SCOTTI, L.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; FALCÃO, E. V.; SILVA, L. M.; SOARES, G. C. S. S.; SCOTTI, M. T. Chemotaxonomy of three genera of the Annonaceae family using self-organizing maps and ¹³C NMR data of diterpenes. *Quim. Nov.* 2012, Vol. 35, No. 11, 2146-2152. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100008>

SIEBRA, C.A. Atividades biológicas de *Annona glabra* Linn., Annonaceae. [Mastership dissertation]. Curitiba: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPR, 2007.

SIEBRA, C.A.; NARDIN, J.M.; FLORÃO, A.; ROCHA, F.H.; BASTOS, D.Z.; OLIVEIRA, B.H.; WEFFORT-SANTOSA.M. Potencial antiinflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2009, 19(1A): 82-88 DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000100017>

SPEROTTO, R.A. Protocolos e métodos de Análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana, 1ª edição, Lajeado: Editora Univates, 2014. Avaliable in: https://www.univates.br/editora-univates/media/publicacoes/74/pdf_74.pdf

STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUENTIN-LECLERCQ, Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* 2005, Mar;5(2):173-82. DOI: 10.2174/1568011053174864

TAMOKOU, J.D.D.; MBAVENG, A.T.; KUETE, V. Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands. 2017, 207-237. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00008-X>

TSAI, S.F.; LEE, S.S. Characterization of acetylcholinesterase inhibitory constituents from *Annona glabra* assisted by HPLC microfractionation. *J. Nat. Prod.* 2010, Oct 22;73(10):1632-5. DOI: 10.1021/np100247r

TYLER, J. The mammalian cell cycle is controlled by systems that monitor the cell's health and act through the tumour-suppressor p53 and its effector, p21. Therapeutic intervention can restore order to tumour cells lacking p53. *Nature*, V. 381, Issue 6584, pp. 643-644. 1996. DOI: [10.1038/381643a0](https://doi.org/10.1038/381643a0)

VRHOVSEK, U.; RIGO, A.; TONON, D.; MATTIVI, F. Quantitation of polyphenols in diferent apple varieties. *J. Agric. Food Chem.* 2004, Oct 20;52(21):6532-8. DOI: 10.1021/jf049317z

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 2009, Mar;16(2-3):97-110. DOI: 10.1016/j.phymed.2008.12.018.

WILLIAMSON, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*. 2001, Sep;8(5):401-9. DOI: 10.1078/0944-7113-00060

WILLIS, N.; RHIND, N. Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell Div*. 2009. DOI:10.1186/1747-1028-4-13

YANG, C.; GUNDALA, S.R.; VANGALA, R.M.S.; REID, M.D.; ANEJA, R. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in Graviola (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. *J. Carcinog*. 2015. DOI:10.1093/carcin/bgv046

CAPÍTULO II

Artigo a ser submetido à revista *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*

Extrato etanólico obtido a partir do caroço de açaí branco e açaí preto exibem atividade antioxidante e citoprotetora *in vitro*

Luana França Calandrini de Azevedo¹; Gustavo Henrique da Silva Lopes¹; Karina Motta Melo¹; Vinicius Silva de Carvalho¹; Andryo Orfi de Almada Vilhena¹; Jorge das Dores Rissino¹; Karen Albuquerque dias da costa²; Alberdan da Silva Santos²; Cleusa Yoshiko Nagamachi¹; Julio Cesar Pieczarka^{1*}.

¹Laboratório de Citogenética, Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

²Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

*Corresponding author - E-mail: julio@ufpa.br

RESUMO

A *Euterpe oleracea* exibe um fruto conhecido como açaí, no qual seu caroço é considerado um resíduo, descartado logo após processamento para retirada do suco. Porém, este também exibe importantes atividades biológicas. O açaí vem ganhando destaque devido apresentar atividades além na nutricional básica, sendo utilizado em estudos de nutrigenômica, avaliando nutrientes de alimentos capazes de modular a expressão de genes, por exemplo, a partir da captura de radicais livres, pela ação antioxidante. Sendo assim, este trabalho objetiva avaliar a ação antioxidante, atividade citotóxica, citoprotetora e genotóxica *in vitro* de duas variedades: o açaí preto (AP) e o açaí branco (AB), a partir de extratos etanólicos obtidos do caroço deste fruto. Para isto, foi realizado o teste avaliação antioxidante DPPH nas concentrações de 6,25 a 400 µg/mL e os testes do MTT em concentrações de 6,25 a 200 µg/mL e do micronúcleo (MN) em concentrações de 25 µg/mL a 200 µg/mL utilizando duas linhagens celulares estomacais normais MNP01 e de adenocarcinoma gástrico ACP02. Foi observada a atividade antioxidante dos dois extratos, sendo o AP 30% mais eficiente que AB em capturar 50% dos radicais livres. Na avaliação dos efeitos biológicos, não foi observada citotoxicidade e nem genotoxicidade; no entanto, foi constatado uma atividade citoprotetora de ambos os extratos nas duas linhagens celulares. Acreditamos que este potencial possa estar relacionado a intensa capacidade dos extratos em capturar radicais livres, provavelmente devido a apresentarem compostos fenólicos em sua constituição. Sugerimos que mais estudos para avaliar o mecanismo de citoproteção, a determinação da melhor metodologia de administração do agente protetor e do causador de danos e análises quanto as concentrações utilizadas nestas combinações possam contribuir com informações, inclusive para a elaboração de fármacos para serem administrados combinados a tratamentos que induzam a produção de radicais livre, uma vez que o uso de antioxidantes exógenos contribui na prevenção ou minimização de sintomas de diversas enfermidades.

Palavras chave: Caroço, Antioxidante, Nutrigenômica, Citoprotetora, Linhagem celular.

1- INTRODUÇÃO

A *Euterpe oleracea* (açazeiro) é considerada a palmeira mais produtiva da região Amazônica, uma vez que sua árvore inteira apresenta interesse econômico. Esta planta tem sido explorada ao longo dos anos, inclusive por populações ribeirinhas da região amazônica, que utilizam as fibras da folha do açazeiro para tecer chapéus, esteiras, sacolas e cestas; além disso, do seu caule é extraído o palmito de açaí amplamente apreciado e comercializado no mercado nacional e internacional (SOUTO, 2001; SILVA, 2002). No entanto, o grande destaque é proveniente do seu fruto, chamado de açaí, que ganhou visibilidade devido aos crescentes estudos que demonstram seus benefícios em relação a saúde do homem, estando presente em produtos como sorvetes, iogurtes, cremes e licores, na forma de polpa congelada, em pó ou *in natura* (MONTEIRO, 2006; BONOMO, 2014; CEDRIM et al., 2018).

Esta espécie exibe variação fenotípica quanto à coloração do fruto maduro, sendo denominados de açaí preto, o mais conhecido, que pós processado apresenta cor roxa ou violácea e açaí branco com frutos de cor verde opaca e produzem bebida de coloração creme esverdeada (SANCHES; OLIVEIRA, 2011). Contudo, a polpa do fruto representa 5 a 15% de seu volume, variando de acordo com tipo e grau de maturidade e o restante do fruto constitui-se do caroço, que é considerado um resíduo descartado logo após o processamento para obtenção do suco (PAULA, 1995). O caroço também tem sido fonte de estudo em diversas áreas devido à preocupação quanto ao descarte adequado e possível reutilização do resíduo, visto que a produção diária de açaí gera toneladas de lixo orgânico, além disso diversas pesquisas também demonstram seu efeito antioxidante, vaso dilatador, anti-hipertensivo, protetor contra enfisema e antimicrobiano (AGUIAR; MENDONÇA, 2003; RODRIGUES et al., 2006; MOURA et al., 2011; GARBIN, 2011; MELHORANÇA FILHO; PEREIRA, 2012; FREITAS, 2010).

A presença de constituintes como compostos fenólicos, os ácidos vanílico, cafeico e sirínico e, principalmente, um grupo de flavonoides conhecido como antocianinas, pigmento que atribui a coloração roxo escuro ao suco do açaí preto (PACHECO-PALENCIA et al., 2008; CARVALHO et al., 2017), explicam sua intensa atividade antioxidante, inibindo ou diminuindo os efeitos causados pelos radicais livres no organismo. O açaí vem ganhando reconhecida importância pelos consumidores como um alimento funcional, aquele que exibe propriedades além da nutricional básica, sendo alvo de estudos da nutrigenômica (LIMA et al., 2012; LIN et al., 2007).

A nutrigenômica avalia interações dos nutrientes, oriundos da alimentação, com o material genético das células, observando a forma como os compostos são capazes de modular a expressão de genes, e dentre as formas de acontecer esta modulação destaca-se a atividade antioxidante, atuando no combate de diversas doenças, inclusive as neoplasias (VALENTE et al., 2014). Estima-se que em 2030 haverá 21,4 milhões de novos casos de câncer, no entanto, acredita-se que esta estatística pode ser alterada caso ocorram mudanças em hábitos alimentares com maior consumo de alimentos antioxidantes exógenos ou o consumo diário de fármacos com compostos oriundos de plantas com a capacidade de capturar radicais livres (TESSARIN; SILVA, 2013; MS/INCA, 2014; VIEIRA et al., 2015).

Os radicais livres possuem alta capacidade de reatividade química pois, devido possuírem número ímpar de elétrons, apresentam a tendência de adquirir mais um para se tornar estável (SILVA et al., 2003). A formação destes ocorre naturalmente no organismo, pois a oxidação é fundamental para a vida aeróbica e, quando presentes em níveis normais, podem ser removidos por defesas antioxidantes naturais do organismo (HALLIWELL; GUTTRIGDE, 2007). No entanto, somos expostos a diversos fatores externos que podem gerar um desbalanço entre a produção e a retirada desses radicais livres pelo sistema de defesa antioxidante, levando ao processo chamado de estresse oxidativo. É neste contexto que se torna importante inserir antioxidantes exógenos na dieta, como o açaí, garantindo a manutenção do balanço oxidativo e da saúde do organismo (NUNES, 2010).

Sendo assim, o presente trabalho objetiva avaliar a atividade antioxidante de extratos etanólicos obtidos do caroço de açaí branco e preto e analisar sua capacidade em proteger linhagens celulares frente a exposição prévia a doxorrubicina, bem como investigar possíveis concentrações com efeitos de citotoxicidade e genotoxicidade, a fim de determinar nas condições testadas uma concentração, antioxidante, citoprotetora e segura.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Os extratos etanólicos de açaí foram produzidos no Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Química Fina (LabISisBio). Para o processo, caroços de açaí preto e branco foram coletados, como resíduo agroindustrial, no município de Santa Barbara, no Pará (latitude 1°15,5'13"S, longitude 48°16'35", 96W) e, em seguida, o

material foi secado, por 3 dias, em estufas de circulação de ar a 60°C, para então ser moído em moinho de martelos com peneira de 1 mm. Após isto, os metabólitos presentes em 1 Kg de caroços de *E. oleracea* (preto e branco) foram extraídos à uma temperatura de 35°C, com 1,5 L, e de 45°C com 3,0 L de etanol. Cada extração ocorreu por 30 minutos sob agitação assistida em ultrassom (banho ultrassônico modelo UNIQUE – USC – 1800, 40KHz de frequência, potência 155 Watts), dando origem aos extratos etanólicos de açaí preto (AP) e o de açaí branco (AB).

2.2 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS

2.2.1 - Identificação de taninos por via úmida

Em um tubo de ensaio de 10 mL, foi adicionado 50 mg de AP e AB, 2,0 mL de água destilada e agitado até a completa dissolução. Em seguida foram adicionadas 3 gotas de Cloreto Férrico (FeCl_3) a 10,0 % e se observou a mudança de coloração, onde a presença de coloração verde indicava a presença de taninos condensados e a coloração azul a presença de taninos hidrolisáveis.

2.2.2 - Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os extratos (AP e AB) foram aplicados em placas de sílica gel (3 cm de largura, 5 cm de comprimento e 4 cm de percurso cromatográfico). A eluição foi realizada empregando o sistema Acetato de Etila: Ácido Acético: Ácido fórmico: H_2O (10:1:1:2,6). Os metabólitos investigados e seus respectivos agentes reveladores foram os taninos condensados (vanilina 1,0% e ácido sulfúrico à 10,0% ambos em etanol) ($\text{VAS}+\text{H}_2\text{SO}_4$), ácidos graxos (ácido fosfomolibidico) (PMA), compostos fenólicos (Cloreto Férrico 10,0% em etanol) (FeCl_3), antraquinonas, antronas, antronois, cumarinas (Hidróxido de Potássio 1,0% em etanol e radiação ultravioleta em comprimento de onda de 365 nm) ($\text{KOH}+\text{UV}$), alcalóide (Dragendoff), flavonóides (difetilboriloxietilamina 1,0% em metanol e polietilenoglicol 5,0%) (NP+PEG).

2.2.3 – Análise Cromatográfica (CG/EM)

A análise por Cromatografia Gasosa foi realizada empregando um cromatógrafo (CG) Thermo Scientific Trace 1300 acoplado a um espectrômetro de massa (EM) Thermo Scientific MS-ISQ Single Quadrupolo com auto-amostrador AI 1310, equipado com coluna capilar ZB-5HT INFERNO (30m x 0,25mm x 0,10 μm); foi usado gás Hélio como carreador a um fluxo de 1mL / min. A injeção de amostra de 1,0 μL ocorreu no modo

Splitless. O injetor operou a 250 °C e a programação de temperatura do forno foi iniciada a 200 °C, mantendo-se por 2 min., elevando-se até 300 °C (20 °C/min.), se mantendo por 10 min. O MS-ISQ operou com interface a 275 °C, fonte de ionização a 230 °C, usando um atraso do solvente de 5 minutos, com faixa de massa (50-1000 Da). A ionização eletrônica ocorreu a 70 eV. As identificações das substâncias foram realizadas através da comparação dos espectros de massas com os das bibliotecas comerciais NIST2011-WILEY2009-FAMES2011.

2.3 TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDAZIL)

A determinação da atividade antioxidante foi realizada em triplicata, por método espectrofotométrico. O DPPH foi diluído em metanol na concentração de 0,04 mg/mL. Para a reação, foi utilizado 900 µL da solução de DPPH e 100 µL dos extratos diluídos em metanol nas concentrações de 6,25 µg/mL a 400 µg/mL. A mistura reagiu por 20 minutos em local protegido da luz e, após isto, as absorbâncias das amostras em diferentes concentrações foram medidas em espectrofotômetro (Epoch Biotek), utilizando o programa Gen5 (2003) versão 2.03.01.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH (% inibição), utilizando-se as absorbâncias para o cálculo através da fórmula: %Inibição = $\{[A1 - \{(A2 + A3) / A1\}] / 100$, sendo A1: absorbância do DPPH, A2: absorbância do DPPH + extrato testado e diluídos e A3: absorbância do metanol + extrato testado e diluído. Após isso também foi calculada a concentração de extrato necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (EC50) com auxílio do programa Graphpad Prism versão 6.01 (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

2.4- LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTURA

Para todos os testes foram utilizadas duas linhagens celulares gástricas, uma não neoplásica MNP01 e outra de adenocarcinoma gástrico ACP02, ambas gentilmente cedidas pelo laboratório de Citogenética Humana e Genética Toxicológica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Estas foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF).

2.5 – DESENHO EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS *IN VITRO*

Nesta pesquisa foram realizados dois ensaios biológicos: O ensaio do MTT (brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio), com semeio das células em placas de 96 poços, e o teste do micronúcleo, no qual esta etapa foi realizada em placas de 12 poços.

Nos dois testes, para exposição por 48 horas, foram utilizadas concentrações de 6,25 µg/mL até 400 µg/mL de AP e AB de acordo com proposto por Sperotto (2014). Como controle negativo (CN) foi utilizado meio de cultura DMEM e, devido DMSO ser utilizado como veículo de diluição (0,1%), este também foi testado, diluído em meio de cultura, na mesma concentração. O controle positivo (CP) para o MTT foi realizado utilizando a doxorrubicina (DOX) (200 µg/mL) e para o micronúcleo utilizou colchicina (0,02 µg/mL), de acordo com Machado Santelle; Lofti (1996). Neste último ensaio, 24 horas antes da retirada das células, foi adicionado Citocalasina B (6µg/ml) em cada poço.

2.5.1 – Avaliação da citotoxicidade e citoproteção do MTT

Para avaliação da citoproteção, a partir do teste do MTT, foi realizada a exposição como descrito no item anterior, porém concomitantemente com a DOX diluída em meio de cultura DMEM (200 µg/mL) em todos os tratamentos.

Em seguida as etapas de semeio e exposição, as células nos poços foram submetidas a 100 µL de MTT (5mg/mL) por 3 horas. Após a retirada do MTT, foi adicionado 100 µL de DMSO em cada poço por 1 hora. Após isto, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Epoch Biotek) pelo programa Gen5 (2003) versão 2.03.1. A absorbância foi convertida em sobrevivência (%S) através da fórmula: $\%S = 100 \times [(A_{\text{testado}} - A_{\text{branco}}) / (A_{\text{controle}} - A_{\text{branco}})]$, sendo “A” a absorbância de cada poço; considerou-se como branco o poço sem meio e células (MOSMANN, 1983).

2.5.2 – Teste do Micronúcleo *in vitro*

Após as etapas já descritas, as linhagens foram tripsinizadas e transferidas para um tubo Falcon no qual foi acrescentado solução hipotônica (KCl) e em seguida foi adicionado fixador Carnoy com metanol e ácido acético (3:1). Após centrifugado e retirado o sobrenadante foi adicionado 1ml de fixador Carnoy e o tubo foi armazenado para posterior análise. A avaliação foi feita em teste cego, sendo analisadas e quantificadas 500 células totais para determinação do Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) utilizando a fórmula: $CBPI = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N$; sendo de M1 a M4 o número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente, e N o número

total de células viáveis. A contagem das células binucleadas permaneceu até que serem contabilizadas 1000 células para a observação de micronúcleo e determinação de sua frequência através da fórmula $fMN = n^{\circ}MN/1000$ (FENECH, 2007).

2.6 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Bioestat 5.0, sendo o valor de $p \leq 0,05$ considerado estatisticamente significativo. A normalidade dos dados foi avaliada a partir do teste Kolmogorov– Smirnov e então foram realizados os testes de comparações múltiplas Tukey- ANOVA ou Kruskal-Wallis (Student-Newman-Keuls) (AYRES, 2007).

3- RESULTADOS

3.1 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS

Foi observada a presença de ácidos graxos, fenóis e taninos condensados em ambos os extratos analisados. Os compostos descritos até o momento e suas respectivas quantidades são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Perfil químico dos extratos etanólicos dos caroços de *Euterpe oleracea* em (unidade) obtido por análise cromatográfica. Os valores são expressos a partir da porcentagem (%) da área do pico do cromatograma.

COMPOSTOS	AP	AB
Ácido benzoico	2,47	0,00
Piragalol	0,00	0,35
Ácido para-hidroxibenzóico	0,00	1,57
Floroglucionol	24,71	24,78
Ácido para-hidroximandelico	0,84	0,99
Ácido vanílico	0,00	0,00
Ácido azelaico	0,00	0,00
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	15,12	15,26
Ácido mirístico	9,35	7,49
Ácido 4-hidroxifenilático	1,49	1,21
Ácido 3,4-dihidroximandelico	0,26	1,62
Ácido palmítico	12,11	12,06
Catecolactato	18,79	18,32
Ácido 2,6-dihidroxibenzóico	0,00	0,31

Ácido trans-9-octadecenoico	8,39	9,54
Ácido esteárico	6,42	6,31
(Epi) Catequina	0,05	0,19

AP :açáí preto e AB: açáí branco

3.2 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante observada a partir da captura de radicais livres DPPH, demonstra alto potencial, de forma dose-dependente para ambos os extratos, porém o açáí preto demonstrou maior atividade antioxidante sendo o EC₅₀ deste de apenas 9,8µg/mL, enquanto o do açáí branco é de 14,47µg/mL (**Figura 1**).

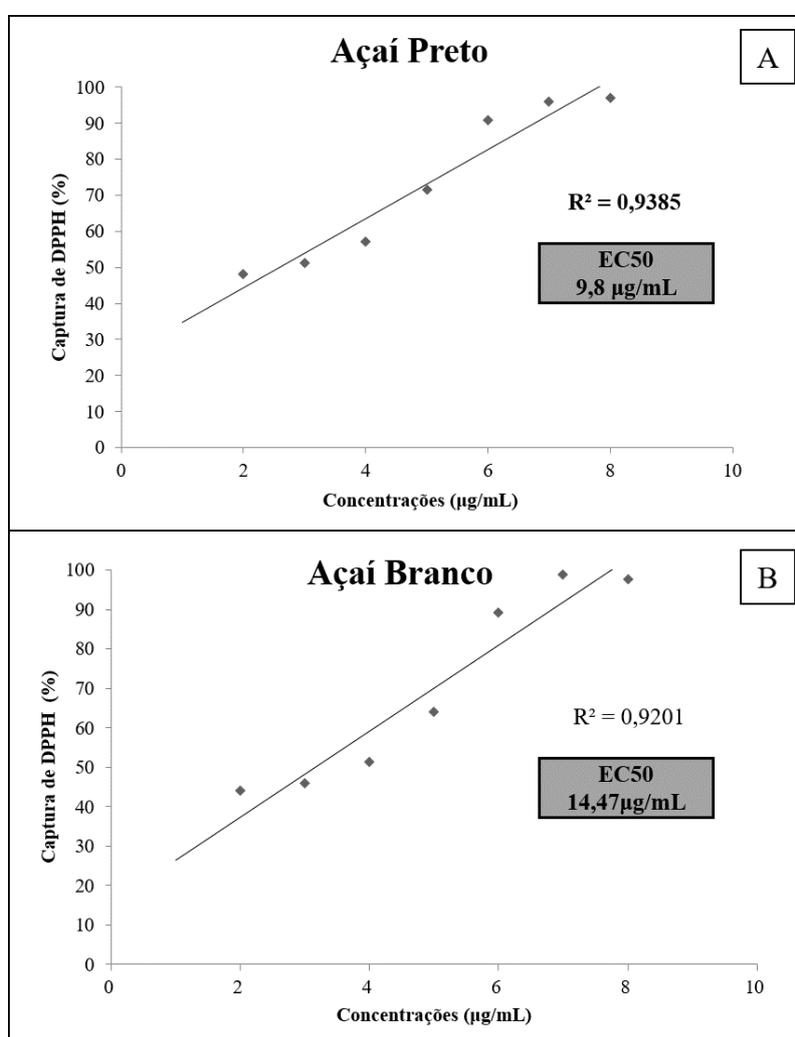


Figura 1. Correlação entre a captura de radicais livre DPPH e as concentrações utilizadas. A) Extrato de açáí preto e seu respectivo EC₅₀; B) Extrato de açáí branco e seu respectivo EC₅₀. Teste de regressão linear.

3.3 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

A partir do teste do MTT em 48h de exposição, pode-se observar que na linhagem de adenocarcinoma gástrico (ACP02) não houve toxicidade para os extratos de açaí preto e branco. Já na linhagem gástrica normal (MNP01), ocorre uma redução da viabilidade na maior concentração (400 $\mu\text{g/mL}$) para ambos os extratos (**Figura 2**).

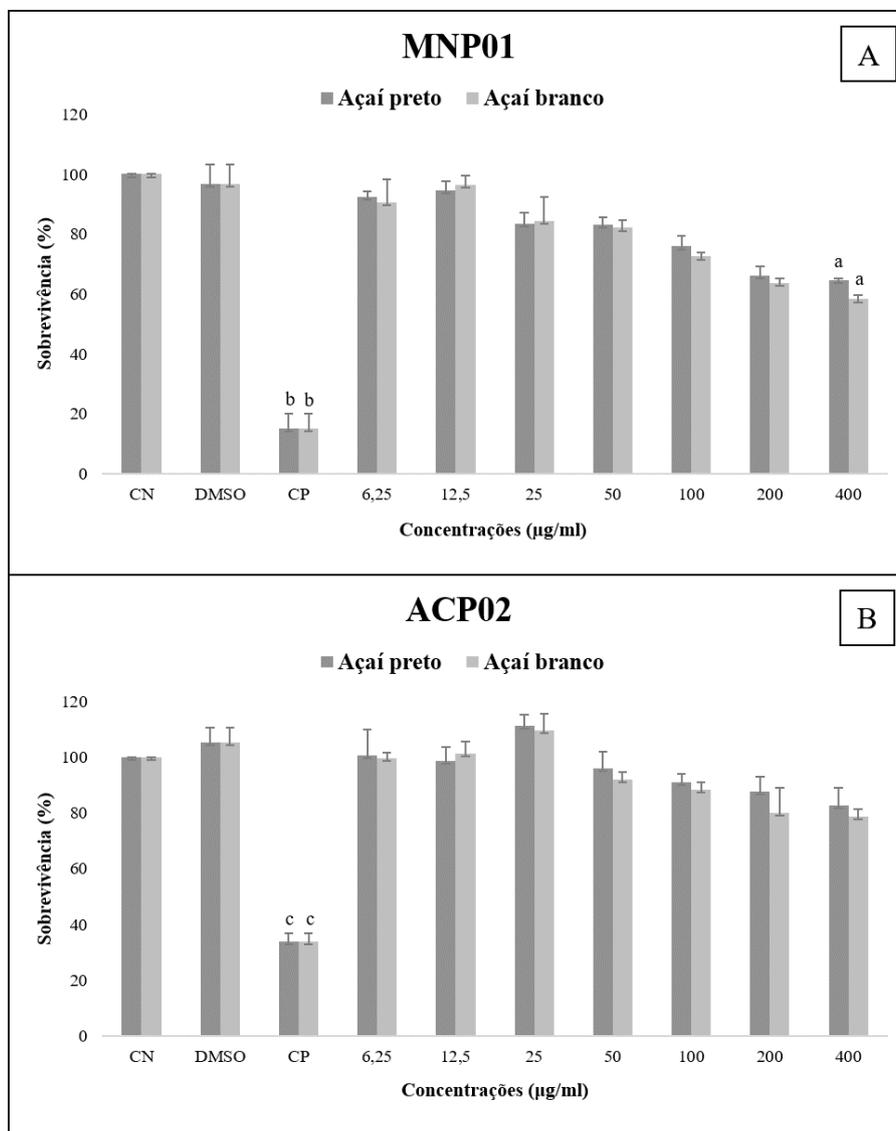


Figura 2. Porcentagem da média da sobrevivência celular com seus respectivos e desvios padrão, expostas por 48h aos extratos de caroços de açaí preto e branco, concomitante à exposição com doxorubicina. A) Células gástricas normais (MNP01); B) Células de adenocarcinoma gástrico (ACP02). Teste: Tukey-ANOVA, ($p < 0.05$). CN: controle negativo, CP: controle positivo. ^a difere de cn e DMSO; ^b difere de todos os tratamentos ^c difere de 50, 25, 12,5, 6,25 $\mu\text{g/mL}$, CN e DMSO.

3.4 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOPROTETORA

Na avaliação da atividade citoprotetora, foi observada proteção frente aos danos causados pela doxorubicina nas duas linhagens celulares (ACP02 e MNP01) nas maiores

concentrações (200 e 400 µg/mL) para os extratos de caroços de açaí branco e preto em 48h de tratamento (**Figura 3**).

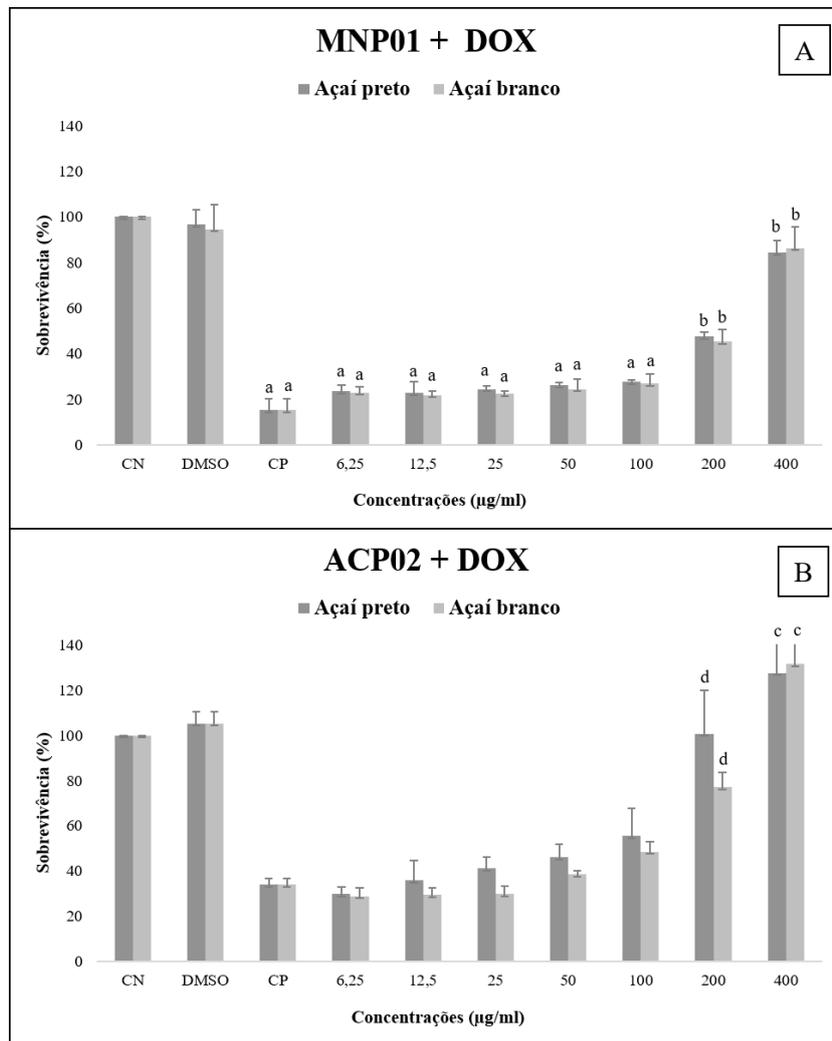


Figura 3. Porcentagem da média da sobrevivência celular com seus respectivos e desvios padrão, expostas por 48h aos extratos de caroços de açaí preto e branco, concomitante à exposição com doxorrubicina. A) Células gástricas normais (MNP01); B) Células de adenocarcinoma gástrico (ACP02). Teste: Tukey-ANOVA, ($p < 0.05$). CN: controle negativo, CP: controle positivo e DOX: doxorrubicina. ^a difere de CN e DMSO; ^b difere de todos os tratamentos; ^c difere de todos os tratamentos, exceto CN e DMSO, ^d difere de CP, 6,25 e 12,5 µg/mL.

3.5 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA

Na avaliação de genotoxicidade feita partir do teste do micronúcleo foi possível observar que em MNP01 não ocorreu a formação de micronúcleos e nem a alteração do IPBC (**Tabela 2**)

LINHAGEM CELULAR MNP01		
AÇAÍ PRETO		
TRATAMENTO	fMN	IPBC
CN	0,009(±0,006)*	1,47(±0,03)
DMSO (0.1%)	0,003(±0,001)*	1,42(±0,001)
25 µg/ml	0,006(±0,001)*	1,39(±0,03)
50 µg/ml	0,007(±0,001)*	1,45(±0,005)
100 µg/ml	0,005(±0,002)*	1,2(±0,16)
200 µg/ml	0,068(±0,06)*	1,43(±0,01)
CP	0,04(±0,009)	1,37(±0,02)
AÇAÍ BRANCO		
TRATAMENTO	fMN	IPBC
CN	0,009(±0,006)*	1,47(±0,03)
DMSO (0.1%)	0,003(±0,001)*	1,42(±0,09)
25 µg/ml	0,005(±0,001)*	1,42(±0,03)
50 µg/ml	0,006(±0,002)*	1,39(±0,009)
100 µg/ml	0,005(±0,002)*	1,46(±0,03)
200 µg/ml	0,005(±0,00)*	1,39(±0,01)
CP	0,07(±0,001)	1,37(±0,01)

Tabela 2. Frequência de micronúcleos (fMN) e índice de proliferação por bloqueio de citocinese (IPBC) de células gástricas não neoplásicas (MNP01) expostas ao extrato etanólico de açaí preto e açaí branco. Em que CN significa controle negativo; CP significa controle positivo. *Difere de CP.

Já na linhagem de adenocarcinoma gástrico (ACP02) apenas as duas maiores concentrações (100 e 200 µg/ml) no tratamento com AP não diferiram do CP. Também não ocorreu alteração do IPBC (**Tabela 3**).

LINHAGEM CELULAR ACP02		
AÇAÍ PRETO		
TRATAMENTO	fMN	CBPI
CN	0,01 (±0,006)*	1,33 (± 0,12)
DMSO (0.1%)	0,00 (±0,001)*	1,46 (±0,04)
25 µg/ml	0,01 (±0,001)*	1,36 (±0,01)
50 µg/ml	0,01 (±0,001)*	1,40 (±0,04)
100 µg/ml	0,01 (±0,004)	1,38 (±0,03)
200 µg/ml	0,02 (±0,009)	1,47 (±0,03)

CP	0,025 (\pm 0,007)	1,34 (\pm 0,09)
AÇAÍ BRANCO		
TRATAMENTO	fMN	CBPI
CN	0.011(\pm 0.006)*	1,33(\pm 0,12)
DMSO (0.1%)	0.005(\pm 0.002)*	1,46(\pm 0,04)
25 μ g/ml	0,011(\pm 0,002)*	1,41(\pm 0,03)
50 μ g/ml	0,006(\pm 0,001)*	1,45(\pm 0,46)
100 μ g/ml	0,001(\pm 0,001)*	1.39(\pm 0,06)
200 μ g/ml	0,008(\pm 0.001)*	1,33(\pm 0,08)
CP	0,025(\pm 0,007)	1,34(\pm 0,09)

Tabela 3. Frequência de micronúcleos (fMN) e índice de proliferação por bloqueio de citocinese (IPBC) de células de adenocarcinoma gástrico (ACP02) expostas ao extrato etanólico de açaí preto e açaí branco. Em que CN significa controle negativo; CP significa controle positivo. *Difere de CP.

4 – DISCUSSÃO

Ao observar a composição química dos extratos de AP e AB, é notória a semelhança dos compostos presentes de forma qualitativa, o que ocorre devido serem a mesma espécie, apenas com variação fenotípica. Porém, a pequena variação quantitativa de alguns constituintes pode explicar a diferença dos resultados encontrados na ação antioxidante, visto que o AP é 30% mais efetivo em capturar 50% de radicais livre DPPH quando comparado ao AB. Talvez a explicação para esta sutil diferença seja a presença do ácido benzoico no AP ausente em AB, pois uma vez que este atua como um conservante natural (OLIVEIRA; REIS, 2017), pode ser a presença dele no extrato tenha mantido a atividade dos demais compostos de forma mais intensa, garantindo assim um melhor potencial antioxidante.

Na avaliação da atividade citotóxica pelo MTT a viabilidade celular, nas concentrações testadas, é reduzida em no máximo em 20%, inviabilizando inclusive o cálculo do IC₅₀. Além disso também não foi observada atividade genotóxica a partir do teste do micronúcleo. Esse é um dado interessante, visto que nos extratos de AP e AB foi observada, a partir da análise por via úmida, a presença de taninos condensados, também conhecidos por proantocianidinas ou procianidinas, como constituinte fitoquímico e estes exibem potencial tóxico já descrito, inclusive em análises *in vitro* em linhagens celulares de câncer (YE et al., 1999; MANTENA et al., 2006). Esta classe de compostos deve estar presente em pequenas quantidades ou atuar de forma antagônica a outros compostos que

inibem seu potencial tóxico. Este tipo de interação, na qual a combinação de substâncias diminui a toxidez e outras reações adversas, aumentam a eficácia terapêutica de plantas medicinais visto que este efeito é frequentemente descrito em preparos vegetais (VAN VUUREN; VILJOEN, 2011).

Com relação à atividade citoprotetora dos extratos, acreditamos estar relacionada ao elevado potencial antioxidante destes, devido aos compostos fenólicos estarem presentes nos extratos dos caroços, segundo nossa avaliação. Constituintes como catecolactato, catequina e ácido 3,4-dihidroxibenzóico, são exemplos de fenóis presentes nos extratos de AP e AB, que podem atuar na captura do excesso de radicais livre produzidos pela DOX. Estudos demonstram que a DOX, possui atividade pró-oxidante durante sua ativação metabólica e possivelmente também contribui para a redução da capacidade antioxidante do organismo, gerando efeitos colaterais tóxicos diversos quando utilizado no tratamento do câncer (GEETHA et al., 1990; EL-MOSELHY et al., 2014; RESENDE et al., 2006).

Diante disto, talvez a terapia a partir da combinação deste quimioterápico a fármacos com intensa atividade antioxidante, inclusive a base de açaí, possa atenuar os efeitos gerados pelo tratamento. Esta é uma importante descoberta para a pesquisa, visto que os caroços de açaí são considerados resíduos agroindustriais que podem vir ser reaproveitados para a elaboração e suplementação de diversos produtos. Outros estudos já observaram a importância de caroços de frutos, com alto potencial antioxidante e muitas vezes descartados (SATO et al., 2001; TEBIB et al., 1997; JORGE; MALACRIDA 2008; PIENIZ et al., 2009).

Assim, sugerimos que as próximas etapas desta pesquisa sejam a partir da avaliação da atividade citoprotetora destes extratos frente a outros tipos de toxicidade, como a genotóxica e mutagênica. Desta forma poderemos compreender melhor a forma como ocorre esta proteção, como por exemplo por desmutagênese, prevenindo a ação do agente indutor do dano, inativando-o de forma total ou parcial, antes do contato com o gene ou por bioantimutagênese atuando no reparo das lesões causadas, eliminando a mutação, porém após os genes serem mutados (KADA et al., 1978; OLIVEIRA, 2009), ou se esta interação ocorre por ambos os mecanismos de ação.

Além disso, também devem ser realizadas análises para determinar a melhor forma de administração do agente protetor se anteriormente, concomitante ou *a posteriori* à exposição ao agente danoso e, ainda concentrações destas misturas que atuem de forma efetiva no combate ao câncer e na proteção de células saudáveis, visto que células

cancerosas são consideradas mais resistentes e apresentam características únicas como a fuga a morte celular e alterações do seu metabolismo a partir da modificação da quantidade de mitocôndrias que levam a rearranjos nas vias metabólicas, que fazem com que esta avaliação seja mais dificultosa para encontrar o método de exposição e a concentração mais eficiente e com menor viés de toxicidade (PRIESNITZ, 2012; PINHO, 2008).

5- CONCLUSÃO

Desta forma, concluímos que os extratos obtidos a partir de caroços de açaí branco e preto possuem intensa atividade antioxidante, sendo o resíduo de açaí preto um pouco mais eficaz que o do açaí branco; porém sugerimos que ambos podem ser reaproveitados para mais estudos relacionados a sua atividade biológica, inclusive de proteger danos causados no organismos, devido estarmos diariamente expostos a agentes externos que levam a excessiva formação de radicais livres, sendo a atividade de capturar estas moléculas associada a prevenção ou minimização de sintomas de diversas enfermidades como o câncer, diabetes e doenças cardiovasculares.

Observamos ainda ausência de citotoxicidade e genotoxicidade nas condições e concentrações testadas, sendo a atividade citoprotetora observada de extrema relevância para o trabalho, permeando os próximos passos do estudo por nosso grupo de pesquisa e contribuindo com importantes informações para que outros pesquisadores avaliem extratos obtidos não só da polpa do açaí, mas também do seu caroço.

6- REFERÊNCIAS

AGUIAR, M. O.; MENDONÇA, M. S. (2003). Morfo-anatomia da semente de *Euterpe precatória* Mart. (Palmae). Revista Brasileira de Sementes, V. 25 (1): 37-42

ALEGRE, P; MATHIAS, L.; LOURENÇO, M.A.; SANTOS, P.P.; GONÇALVEZ, A.; FERNANDES, A.A.; GAIOLLA, P.S.A.; MINICUCCI, M.F.; ZANOFF, L.; PAIVA, S.A.R.; POLEGATO, B.F. (2019). Euterpe Oleracea Mart. (Açaí) Reduz o Estresse Oxidativo e Melhora o Metabolismo Energético da Lesão de Isquemia-Reperfusão Miocárdica Em Ratos. Arq. Bras. Cardiol. DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20180140>

AYRES, M.; JR AYRES, M.; AYRES, D.L.; DOS SANTOS, A.S. (2007). Bio Estat 5.0 Aplicações Estatísticas das Ciências Biológicas e Médicas, 5ª edição, Pará: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSM/ MCT/ CNPq.

BONOMO, L.F. (2014). O extrato aquoso de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) modula a resistência ao estresse oxidativo no organismo modelo *Caenorhabditis elegans* através de

mecanismos diretos e indiretos. Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Ouro preto, Brasil.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food. Sci. Technol.* (28): 25-30. DOI 0.1016/s0023-6438(95)80008-5

CARVALHO, A. V.; SILVEIRA, T. F. F.; MATTIETTO, R. A.; OLIVEIRA, M. S. P.; GODOY, H. T. (2017). Chemical composition and antioxidant capacity of açai (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, V. 97: 1467–1474.

CEDRIM, P.C.A.S.; BARROS, E.M.A.; NASCIMENTO, T.G. (2018). Antioxidant properties of acai (*Euterpe oleracea*) in the metabolic syndrome. *Braz. J. Food Technol.*, V. 21.

EL-MOSELHY, M.A.; EL-SHEIKH, A.A.K. (2014). Protective mechanisms of atorvastatin against doxorubicin-induced hepato-renal toxicity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, V. 68: 01-110.

FENECH, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, V.2:1084–1104

FERREIRA, M.C.; OLIVEIRA, M.M.B.; SILVA, A.P.G.; MEL, T.S.; SANTANA, D.L.; NEVES, A.C.S.; MENINO, R.K.S. (2021). Pesquisa de sujidades, avaliação físico-química e de rotulagem das polpas de açai (*Euterpe Oleracea*) comercializadas no Recife-PE. *Brazilian Journal of Development*. DOI:10.34117/bjdv7n7-572

FREITAS, D.M. (2010). Extração de polissacarídeos do caroço de açai (*Euterpe oleracea*). Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, São Carlos, Brasil.

GARBIN, V. P. (2011). Análise da atividade antimicrobiana dos extratos dos frutos, óleos das sementes e fungos isolados da palmeira juçara (*Euterpe edulis MARTIUS*). Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba

GEETHA, A.; SANKAR, R.; MARAR, T.; DEVI, C.S.S. (1990). α - tocopherol reduces doxorubicin-induced toxicity in rats - histological and biochemical evidences. *Journal PphysioL Phannac*, V. 34 (2):94-100.

HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, J.M. (2007). *Free Radicals in biology and medicine*. 4° ed Londres: Oxford University Press.

JORGE, N.; MALACRIDA, C.R. (2008). Extratos de ementes de mamão (*Carica papaya* L.) como fonte de antioxidantes naturais. *Alim. Nutr.* V .19(3): 337-340.

KADA, T.; MORITA, K.; INOUE, T. (1978). Antimutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutat. Res.* V.53:351-355.

LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; MIYAZAKI, C. M. S.; MIGUEL, O. G.; CÔCCO, L. C.; YAMAMOTO, C. I.; MIGUEL, M. D. (2012). Conteúdo polifenólico e atividade

antioxidante dos frutos da palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, V. 14 (2): 321-326.

LIN, J.; REXRODE, K. M.; HU, F.; ALBERT, C. M.; CHAE, C. U.; RIMM, E. B.; STAMPFER, M. J.; MANSON, J. E. (2007). Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. American Journal of Epidemiology, V. 165 (11): 1305-1313.

MACHADO-SANTELLI, G.M.; LOTFI, C.F.P. (1996). Comparative analysis of colchicine induced micronuclei in different cell types in vitro. Elsevier B.V. Vol. 349

MANTENA, S.K.; BALIGA, M.S.; KATIYAR, S.K. (2006). Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. Carcinogenesis, V. 27: 1682-1691.

MELHORANÇA FILHO, A.L.; PEREIRA, M.R.R. (2012). Antimicrobial activity of açai and pupunha oils on the development of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Biosci. J. V. 28 (4): 598-603.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer – INCA. Estimativa. (2014). Incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro – RJ, p.124.

MONTEIRO, S. (2006.) Esperança das goiabas. Rev. Frutas Derivados, (03):27–30.

MOSMANN, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. Journal of Immunological Methods, 65, USA.

MOURA, R. S. de; PIRES, K. M. P.; FERREIRA, T. S.; LOPES, A. A.; NESI, R. T.; RESENDE, A. C.; SOUSA, P. J. C.; SILVA, A. J. R.; PORTO, L. C.; VALENÇA, S. S. (2011). Addition of açai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. Food and Chemical Toxicology, V. 49 (4): 855-863.

NUNES, J.M. (2010). Avaliação *in vitro* do Potencial antioxidante de extratos de *Hypericum polyanthemum* Klotzsh ex Reichardt aclimatizado. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, Brasil.

OLIVEIRA, P. H. R.; REIS, R. R. (2017). Ácido Benzóico (CAS 65-85-0). Rev. Virtual Quim., 9 (6), 2673-2687. DOI: 10.21577/1984-6835.20160156

OLIVEIRA, R.J.; BAISE, E.; MAURO, M.O.; PESARINI, J.R.; MATUO, R.; SILVA, A.F.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S. (2009). Evaluation of chemopreventive activity of glutamine by the comet and micronucleus assay in mice's peripheral blood. Environ. Toxicol. Pharmacol. V. 28 (1): 120-124.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; MERTES-TALCOTT.S.; TALCOTE, S. T. (2008). Chemical composition, properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil Acai (*Euterpe oleracea* Mart). J Agric Food Chem, V. 56(12):4631-6.

- PAULA, J. E. (1995). Anatomia de *Euterpe oleracea* Mart. (*Palmae* da Amazônia). Acta Amazônica, V. 3: 265-278.
- PIENIZ, S.; COLPO, E.; OLIVEIRA, V.R.; ESTEFANEL, V.; ANDREZZA, R. (2009). *In vitro* assessment of the antioxidant potential of fruits and vegetables. Ciênc. agrotec. v. 33(2): 552-559.
- PINHO, M.S.L. (2008). Biologia Molecular do Câncer Colorretal: Uma Revolução Silenciosa em Andamento. Rev bras Coloproct, V. 28(3): 353-368.
- PRIENITZ, C.; NICLAS, J.; ROSE, T.; SANDING, V. (2012). Metabolic flux rearrangement in the aminoacid metabolismo reduces ammonia stress in the a1-antitrypsin producing human AGE1.HN cell line. Metabolic Engineering. V. 14: 128–137
- RESENDE, F.A.; BARCALA, C.A.M.A.; FARIA, M.C.S.; KATO, F.H.; CUNHA, W.R.; TAVARES, D.C. (2006). Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. Life Sciences, V. 79: 1268-1273.
- RODRIGUES, R. B.; LICHTENTHALER, R.; ZIMMERMAN, B. F.; PAPGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. (2006). Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) seeds and identification of their polyphenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, V. 54 (12): 4162-4167.
- SANCHES, E.N.M.; OLIVEIRA, M.S.P. (2011). Caracterização de genótipos de açaí branco por marcadores RAPD. Seminário de iniciação científica da EMBRAPA, Pará, Brasil.
- SATO, R.; DANG, K.M.; MCPHERSON, B.G.; BROWN, A.C. (2001). Anticancer activity of guava (*Psidium guajava*) extracts. J. Complement. Integr. Med., V.7(1).
- SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (2003). Genética Toxicológica, 1ª Edição, Brasil.
- SILVA, P.R. (2002). Novidades na Fruticultura Paraense. *Fruticultura em Revista*. Belém, Pará: 27-31.
- SOUTO, R.N.M. (2001). Uso da radiação γ , combinada à refrigeração, na conservação de polpa de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.). Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 95pp.
- SPEROTTO, R.A. (2014). Protocolos e métodos de Análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana. Editora da Univates.
- TEBIB, K.; ROUANET, J.M.; BESANCON, P. (1997). Antioxidant effects of dietary polymeric grape seed tannins in tissues of rats fed a high cholesterol-vitamin E-deficient diet. Food Chemistry, Kidlington, V.59(1):135–141.
- TESSARIN, M.C.F.; SILVA, M.A.M. (2013). Nutrigenômica e câncer: uma revisão. Cadernos UniFOA, edição especial, p.79-96.

VALENTE, M.A.S.; BARBOSA, M.C.A.; RODRIGUES, C.V.; VIEIRA, P.A.F.; BARBOSA, M.O. (2014). Nutrigenômica/nutrigenética na elucidação das doenças crônicas. HU Revista, Juiz de Fora, v. 40, n. 3 e 4, p. 239-248. Brasil.

VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. (2011). Plant-based antimicrobial studies – methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Medica*, 77, 1168.

VIEIRA, J.A.T.; MARCHIORI, J.M.G.; MOREIRA, W.M.Q.M. (2015). A nutrigenômica na prevenção e combate às células neoplásicas. *Revista Fafibe On-line, Bebedouro, São Paulo-SP*, ed.8, n.1, p.140-153.

YE, X.; KROHN R.L.; LIU, W.; JOSHI, S.S.; KUSZYNSKI, C.A.; MCGINN, T.R.; BAGCHI, M.; PREUSS, H.G.; STOHS, S.J.; BAGCHI, D. (1999). The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.*, V. 196: 99-108.

3-CONCLUSÃO GERAL

As principais conclusões do presente trabalho são:

- 1) Nas concentrações testadas, tanto o EE quanto a FM e a RUT exibiram atividade antioxidante, sendo EE e FM mais antioxidante quando comparado a RUT com valor igual de EC50 de 16,7 μ g/mL enquanto o da RUT é de 19,5 μ g/mL.
- 2) Nas condições e concentrações testadas, o EE, a FM e o flavonoide isolado RUT, não exibem atividade citotóxica, ou seja, não causam morte celular por nenhum dos mecanismos (apoptose ou necrose).
- 3) Não descartamos a possibilidade de haver atividade genotóxica frente a exposição das linhagens celulares MNP01 e ACP02 ao EE e FM. Uma vez que o interrompimento da progressão do ciclo celular, pode impedir a visualização de danos no material genético.
- 4) Acredita-se que os compostos presentes no EE e na FM atuam de forma sinérgica para levar aos resultados observados.
- 5) As linhagens celulares MNP01 e ACP02, quando expostas ao EE e a FM nas concentrações de 100 e 200 μ g/mL interferem na dinâmica do ciclo celular.
- 6) Os extratos de AP e AB exibem atividade antioxidante, sendo o AP 30% mais eficiente em capturar 50% dos radicais livre DPPH.
- 7) Foi observada uma pequena redução da viabilidade celular na linhagem gástrica normal (MNP01) quando exposta a concentração de 400 μ g/mL do AP e nenhum dos extratos exibiu genotoxicidade nas concentrações nas condições testadas.
- 8) Os extratos de AP e AB protegem as duas linhagens celulares testadas dos danos causados pela doxorrubicina, nas concentrações de 200 e 400 μ g/mL, tendo, portanto, atividade citoprotetora.

4-PESPECTIVAS

O presente trabalho desperta o interesse na avaliação tóxica de extratos obtidos a partir de plantas já utilizadas pela população, bem como a determinação de concentrações adequadas para seu bom aproveitamento pelo organismo. Contribuímos com informações relevantes que podem influenciar em outras pesquisas a partir destes vegetais e auxiliar inclusive no desenvolvimento de produtos a partir da bioprospecção destes.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E.S.; VIANA I.C.; MORENO, R.B.; TORRE, E.A.F.S. (2001). Alimentação mundial-uma reflexão sobre a história. *Saúde e Sociedade* 10(2):3-14.

AFANAS'EV, J. B.; DOROZHKO, A. J.; BRODSKILL, A. V.; KOSTYUK, V. A.; PATAPOVITCH, A. I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, Amsterdam, v. 38, p. 1763-1769.

AGOSTINI, J. M. S. (1993). O Teste do Micronúcleo: Seu Uso no Homem. Biotemas, Santa Catarina, Brasil.

AGUIAR, M. O.; MENDONÇA, M. S. (2003). Morfo-anatomia da semente de *Euterpe precatória* Mart. (Palmae). *Revista Brasileira de Sementes*, V. 25 (1): 37-42.

ALASALVAR, C.; AL-FARSI, M.; QUANTICK, P. C.; SHAHIDI, F.; WIKTOROWICZ, R. (2005). Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. *Food Chemistry*, V. 89: 69–76.

ALLEN, M.L.; METZ, A.M.; TIMMER, R.T.; RHOADS, R.E.; BROWNING, K.S. (1992). Isolation and sequence of the cDNAs encoding the subunits of the isozyme form of wheat protein synthesis initiation factor 4F. *J Biol Chem* 267(32):23232-6

ANAZETTI, M. C.; MELO, P.S. ((2007). Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa*, v. 1, n. 1, p. 37-58, Brasil. animals and in humans. *Free Rad. Biol. Med.*, n. 26, p. 202-226.

ANDRADE, M.G.S.; REIS, S.R.A.; ROBINSOM, W.N.; BORGES-OSÓRIO, M.R. (2005). Micronúcleo: Um Importante Marcador Biológico Intermediário na Prevenção Do Câncer Bucal. *Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS*, v. 20, n. 48, abr./jun, Rio Grande do Sul, Brasil.

ANTUNES, L.M.G.; ARAUJO, M.C.P. (2000). Mutagenicity and antimutagenicity of the mais food colorings . *Ver. de Nutr*, v. 13, n. 2, p. 81-88.

Árvore de araticum-do-brejo (*Annona glabra*) em região inundada Fonte: <https://www.flickr.com/people/scottzona/>

BACELOS, G.R.M. (2007). Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e dos efeitos protetores do extrato de *Anacardium occidentale* L. in vitro. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Londrina, Brasil.

BEDNARCZUK, V.O.; VERDAM, M.C.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. (2010). Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem de produtos naturais. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v.11, n.2. DOI: <http://dx.doi.org/10,5380/acd.v11i2.21366>.

BELLAN, D. L. (2013). Avaliação “In Vitro” Da Atividade Antitumoral De Polissacarídeo Obtido Da Espécie *Lentinus edodes*. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Paraná, Brasil.

BHATTACHARYA, S. (2011) Natural antimutagens: A review. Res. J. Med. Plant. V. 5 (2): 116-126.

BONASSI, S.; NERI, M.; LANDO, C.; CEPPI, M.; LIN, Y.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGEL, E.; FENECH, M. (2003). Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus Project. Mutat. Res. 2003 Mar;543(2):155-66. DOI: 10.1016/s1383-5742(03)00013-9.

BONOMO, L.F. (2014). O extrato aquoso de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) modula a resistência ao estresse oxidativo no organismo modelo *Caenorhabditis elegans* através de mecanismos diretos e indiretos. Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Ouro preto, Brasil.

BORGES L.L.; LUCIO, T.C.; GIL, E.S.; BARBOSA, E.F. (2011). Uma Abordagem Sobre Metodos Analiticos Para Determinacao Da Atividade Antioxidante Em Produtos Naturais. Enciclopédia Biosfera, Goiás, Brasil.

BORGUINI, R.G. (2006) Avaliação do potencial antioxidante de algumas características físico químicas do Tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional. Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Brasil.

BORGUINI, R.G. (2006) Avaliação do potencial antioxidante de algumas características físico químicas do Tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional. Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Brasil

BRAGA, C.M. (2011). Histórico da utilização de plantas medicinais. Licenciatura em Biologia, Brasília, Brasil.

BRAGA, R. (1976). Plantas do nordeste, especialmente do Ceará. Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 540p.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). (2010). Farmacopeia Brasileira. 5 ed. v. 1. Brasília: ANVISA.

BUNKOVA, R.; MAROVA, M.; NEMECK, A. (2005). Antimutagenic proprieties of green tea. Plant. Food. Hum. Nut. V. 60: 25-29.

BYRD, S.J. (2001). Using antioxidants to increase shelf-life of food products. Cereal Food World, V. 46: 48-53.

CAMPOS, S.C.; SILVA, C.G.; CAMPANA, P.R.V.; ALMEIDA, V.L. (2006). Toxicidade de espécies vegetais. Rev. Bras. Pl. Med., v.18 (1) supl. I, p.373-382, Campinas, Brasil.

CANDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. (2005). Alimentos funcionais. Uma revisão. *Boletim da SBCTA*. v. 29, n. 2, p. 193-203.

CARNEIRO, A.B.A.; PINTO, E.J.S.; RIBEIRO, I.F.; MAGALHÃES, M.R.G.; NETO, M.A.B.M. (2017). Efeito da *Astrocaryum aculeatum* (Tucumã) na toxicidade da Doxorubicina: modelo experimental *in vivo*. Acta. Paul. Enferm. 30(3):233-9. 233.

Caroço de açaí Fonte: <http://revistagalileu.globo.com/revista/common/0,,emi317134-18537,00-pesquisadores+usam+carocos+de+acai+para+fazer+proteses+mais+baratas.html>

CARVALHO, A. V.; SILVEIRA, T. F. F.; MATTIETTO, R. A.; OLIVEIRA, M. S. P.; GODOY, H. T. (2017) Chemical composition and antioxidant capacity of açaí (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps. Journal of the Science of Food and Agriculture, V. 97: 1467–1474.

CARVALHO, V.S.; LIMA, K.M.M.; AZEVEDO, F.F.C.; DAS NEVES, P.A.P.F.G.; BORGES, R.S.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C. (2022). New derivative of *trans*-dehydrocrotonin isolated from *Croton cajucara* shows reduced cytotoxic and genotoxic effects in hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. Toxicon. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.106940>

CEDRIM, P.C.A.S.; BARROS, E.M.A.; NASCIMENTO, T.G. (2018). Antioxidant properties of acai (*Euterpe oleracea*) in the metabolic syndrome. Braz. J. Food Technol., V. 21.

CHANG, F. R.; YANG, P. Y.; LIN, J. Y.; LEE, K. H.; WU, Y. C. (1998). Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. Journal of Natural Products. V. 61: 437-439.

CHEN, C. Y.; CHANG, F. R.; CHO, C. P.; WU, Y. C. (2000). Ent-kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. Journal of Natural Products. V. 63(7): 1000-1003.

CHOI, W.S.; LEE, S.E.; LEE, H.S.; LEE, Y.H.; PARK, B.S. (1998). Antioxidative activities of methanol extracts of tropical and oriental medicinal plants. Hanguk Nonghwahag Hoeji, V.41: 556-559.

COLOMBO, M.L. et al. (2010). Most commonly plant exposures and intoxications from outdoor toxic plants. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, v.2, (7): 417-25

DARONCHO, M.; SOLDERA, C.; MARQUES, J.; FIORAVANTE J.B; FOGAÇA, A.O. (2012). Quantificação Da Atividade Antioxidante Através De Análises Pelos Métodos DPPH e ABTS. VI Seminário de Nutrição da UNIFRA, Santa Maria, Brasil.

DAS-BRADOO, S.; BIELINSKY, A. DNA Replication and Checkpoint Control in S Phase. Nat. Sci. Educ. 2010. (9):50

DAVIS, E. W. (1995). Ethnobotany: an old practice, a new discipline. In: Schultes, R. E. & Reis, S. von (eds.). Ethnobotany evolution of a discipline. Discorides Press. Pp. 40-51.

DE FORA, F. (1998). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mutat. Res. V. 402: 151-158.

DE KOK, T.M.; VAN BREDA, S.G.; MANSON, M.M.(2008) Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. Eur. J. Nutr. V.47(2):51-9.

DELBONE, C.A.C.; LANDO, L.R. (2010) Importância Ecológica e Evolutiva dos Principais Grupos de Metabólitos Secundários nas Espécies Vegetais. X Congresso de Educação do Norte Pioneiro, Brasil.

Demonstração do MTT de cor amarela e sua forma reduzida de cor roxa. Fonte: https://www.researchgate.net/figure/23456470_fig12_Figure-13-Principle-of-cytotoxicity-MTT-assay.

EL-MOSELHY, M.A.; EL-SHEIKH, A.A.K. (2014). Protective mechanisms of atorvastatin against doxorubicin-induced hepato-renal toxicity. Biomedicine and Pharmacotherapy, V. 68: 01-110.

FAGUNDES, F.A.; OLIVEIRA, L.B.; CUNHA, L.C.; VALADARES, M.C. (2005). *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. Rev. Eletrônica de Farm. V. 2 (1): 24-29.

FENECH, M. CROTT, J.W. (2002) Micronuclei, nucleoplasmatic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficiente human lymphocytes- evidence for breakage fusion-bridge cycles in cytokinesis-block micronucleus assay. Mutat Res. Jul 25;504 (1-2): 131-6.

FENECH, M. CROTT, J.W. (2002) Micronuclei, nucleoplasmatic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficiente human lymphocytes- evidence for breakage fusion-bridge cycles in cytokinesis-block micronucleus assay. Mutat Res. Jul 25;504 (1-2): 131-6.

FENECH, M. F. (2000). The in vitro Micronucleus Technique. Mutation Research 455 (2000) 81–95, South Australia, Australia.

FENECH, M.F. (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay involves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. Mutation Research 600 58-66, Adelaide, Austrália.

FERGUSON, L.R. (1994). Antimutagens as cancer chemopreventive agentes in the diet. Mutat. Res. V. 307 (1): 395-410.

FERREIRA, L.M.; HOCHMAN, B.; VINÍCIUS, M.; BARBOSA, J. (2005). Experimental models in research. Acta Cirúrgica Brasileira , V. 20

FETT-CONTE, A.C; VENDRAME-GOLONI, C.B.; HOMSI C.M.; BORIM, L.N.B.; ZOLA P.A.; RICCI, O. (2000). Estudo cromossômico no sangue periférico de pacientes com diferentes tipos de leucemia do Hospital de Base, São José do Rio Preto – SP. Rev.bras.hematol.hemoter .São Paulo, Brasil.

FONSÊCA, S.G.C. (2005). Farmacoterapia de Fitoterápicos, Brasil.

FREITAS, D.M. (2010). Extração de polissacarídeos do caroço de açaí (*Euterpe oleracea*). Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, São Carlos, Brasil.

Fruto de açaí branco Fonte: <https://www.saudedica.com.br/os-15-beneficios-do-acai-branco-para-saude/>

Fruto de açaí preto Fonte: <https://www.dicionariotupiguarani.com.br/dicionario/yasai/>

Fruto de cor esverdeada Fonte: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/446898?lg=en C

Fruto maduro de cor amarela Fonte: <https://www.flickr.com/photos/67300849@N02/35471644172>

GALÚCIO, N.C.R. (2014). Estudos de citotoxicidade e genotoxicidade de *Eleutherine plicata* Herb. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Pará, Brasil.

GARBIN, V. P. (2011). Análise da atividade antimicrobiana dos extratos dos frutos, óleos das sementes e fungos isolados da palmeira juçara (*Euterpe edulis* MARTIUS). Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GASIOROWSKI, K; BROKOS, B.; LESZEK, J. (2001). Antimutagenic activity of fluphenazine in short-term test. *Mutagenesis*. V. 16 (1): 31-38.

GEETHA, A.; SANKAR, R.; MARAR, T.; DEVI, C.S.S. (1990). α -tocopherol reduces doxorubicin-induced toxicity in rats - histological and biochemical evidences. *Journal Physiol Phannac*, V. 34 (2):94-100.

GRISOLIA, C.K.; OLIVEIRA-FILHO, E.C.; RAMOS, F.R.; LOPES, M.C.; MUNIZ, D.H.; MONNERA, T. R.G. (2009). Acute toxicity and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* strains on fish and mouse bone marrow. *Ecotoxicology*, Brasília, Brasil.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A.B. (2007). Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*. Brasil.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. Q.; PELZER, L. E. (2001). Anti-inflammatory properties os plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hiperidin on adjuvant arthritis in rat. *II Pharmacology*, v. 56, p. 683-687.

HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, J.M. (2007). *Free Radicals in biology and medicine*. 4° ed Londres: Oxford University Press.

HAN, Y. (2009). Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *International Immunopharmacology*, v. 9, p. 207-211.

HARVEY, A.L.; BRADLEY, K.N.; COCHRAN, S.A.; ROWAN, E.G.; PRATT, J.A.; QUILLFELDT, J.A.; JERUSALINSKY, D.A. (1998). What can toxins tells us for drug Discovery. *Toxicon* Vol. 36, No. 11, pp. 1635±1640.

HASLER, C. M. (1998). Functional foods: their role in disease in: developing new food products for a changing preventionand health promotion. *Food Technology*. v. 52, n. 2. p. 57-62.

HECK, N.C. (2013). Extração por Solvente. Metalurgia extrativa dos metais não ferrosos, Brasi.

Histograma gerado a partir do teste de ciclo celular avaliado por citometria de fluxo, determinando a quantidade de células em cada etapa da divisão. Fonte: <https://www.abcam.com/cell-cycle-analysis-kit-ab287852.html> acesso em 9/11/2022

HOGSTEDT, B.; HOMEM, A.; KARLSSON, A.; RAIHLE, G.; NILLIUS, K.; VESTLUND, L. (1991). Gasoline pump mechanisms had increased frequencies and sizes of micronuclei in lymphocytes stimulated by pokeweed mitogen. *Mutation Res.*

HRAS, A.R.; HADOLIN, M; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. (2000). Coparision of antioxidante and sinergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl plamitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, V. 71: 229-233

JUNIO, H. A.; SY-CORDERO, A. A.; ETTEFAGH, K. A.; BURNS, J. T.; MICKO, K. T.; GRAF, T. N.; RICHTER, S. J.; CANNON, R. E.; OBERLIES, N. H.; CECH, N. B. (2011). Synergy-directed fractionation of botanical medicines: a case study with goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *J. Nat. Prod.* 74, 1621.

KADA, T.; MORITA, K.; INOUE, T. (1978). Antimutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutat. Res.* V.53:351-355.

KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*;26:239–57.

KUSKOLSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos, *Ciênc. Tec. De Alim.* V. 24 (4): 726-32

KUSKOSKI, E. M.; FETT, P.; ASUERO, A.G. (2002). Antocianos: un grupo de pigmentos naturales. Aislamiento, identificación y propiedades. *Alimentaria*, V. 2 (61): 61-74.

LEAL, M.F.; CALCAGNO, D.Q.; COSTA, J.F.F.B.; SILVA, T.C.R.; A.S. KHAYAT, CHEN, E.S.; ASSUMPCÃO, P.P.; SMITH, M.A.C.; BURBANO R.R. (2011). *MYC*, *TP53*, and Chromosome 17 Copy-Number Alterations in Multiple Gastric Cancer Cell Lines and in Their Parental Primary Tumors. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

LEAL, M.F.; RIBEIRO, H.F.; REY, J.A.; PINTO, G.R.; SMITH, M.C.; MOREIRA-NUNES, C.A.; ASSUMPCÃO, P.P.; LAMARÃO, L.M.; CALCAGNO, D.Q.; MONTENEGRO, R.C.; BURBANO, R.R. (2016). YWHAE silencing induces cell proliferation, invasion and migration through the up-regulation of CDC25B and MYC in gastric cancer cells: new insights about YWHAE role in the tumor development and metastasis process. *Oncotarget*. V. 7(51): 85393-85410.

LI, F., AMBROSINI, G., CHU, E. Y., PLESCIA, J., TOGNIN, S., MARCHISIO, P. C.; ALTIERI, D. C. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 1998. DOI 10.1038/25141.

LIGUORI, I.; RUSSO, G. CURCIO, F.; BULLI, G.; ARAN, L.; DELLA-MORTE, D.; GARGIULO, G.; TESTA, G.; CACIATTORE, F.; BONADUCE, D.; ABETE, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, V. 13: 757–772.

LIMA, E.M.; RISSINO, J.D.; HARADA, M.L.; ASSUMPÇÃO, P.P.; DEMACHKI, S.; GUIMARAES, A.C.; CASSARTELLI, C.; SMITH, M.A.C.; BURBANO, R.R. (2004). Conventional cytogenetic characterization of a new cell line, ACP01, established from a primary human gastric tumor, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37 1831-1838.9.

LIMA, E.M.; RISSINO, J.D.; HARADA, M.L.; ASSUMPÇÃO, P.P.; DEMACHKI, S.; GUIMARAES, A.C.; CASSARTELLI, C.; SMITH, M.A.C.; BURBANO, R.R. (2004). Conventional cytogenetic characterization of a new cell line, ACP01, established from a primary human gastric tumor, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37 1831-1838.9.

LIN, J.; REXRODE, K. M.; HU, F.; ALBERT, C. M.; CHAE, C. U.; RIMM, E. B.; STAMPFER, M. J.; MANSON, J. E. (2007). Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. *American Journal of Epidemiology*, V. 165 (11): 1305-1313.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. (2006). Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura): Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, 640p.

MACGREGOR, J.T.; HEDDLE, J.A.; HITE, M.; MARGOLIN, B.H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M.F.; TICE, R.R.; WILD, D. (1991). Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mut Res.*

MAGALHÃES, M. P. (2011). A construção de territórios culturais pelas antigas sociedades amazônicas. *Amazônia: Ciência & Desenvolvimento*, v. 6, n. 12, p. 69-88.

MAKHUBU, L. (1998). Bioprospecting in an African context. *Science*, v. 282, n. 5386, p. 41-42.

MALACRIDA, C.R.; MOTA, S. (2005). Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. *Ciênc. Tec. De Alim.* V. 25(4): 659-64.

MAUÉS, J.H.S.; RIBEIRO, H.F.; PINTO, G.R.; LOPES, L.O.; LAMARÃO, L.M.; PESSOA, C.M.F.; MOREIRA-NUNES, M.C.; CARVALHO, R.M.; ASSUMPÇÃO, P.P.; REY, J.A, BURBANO, R.R. (2018). Gastric Cancer Cell Lines Have Different *MYC*-Regulated Expression Patterns but Share a Common Core of Altered Genes. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. V 2018: 14 pp.

Mecanismos de formação de micronúcleo aneugênico e clastogênico, mediante exposição a agente indutor. Fonte: <https://bioafgj.wordpress.com/projeto/>, com adaptações

MELHORANÇA FILHO, A.L.; PEREIRA, M.R.R. (2012). Antimicrobial activity of açai and pupunha oils on the development of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* *Biosci. J.* V. 28 (4): 598-603.

MELO, S.; LACERDA, V.D.; HANAZAKI, N. (2008). Espécies de restinga conhecidas pela comunidade do pântano do sul, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Rodriguésia* 59 (4): 799-812. Brasil.

MESQUITA, F.P.; PINTO, L.C.; SOARES, B.M.; DE SOUSA PORTILHO, A.J.; DA SILVA, E.L.; DE FARIAS RAMOS, I.N.; KHAYAT, A.S.; MOREIRA-NUNES, C.A.; BEZERRA, M.M.; DE LUCAS CHAZIN, E., T.R.A. VASCONCELOS, BURBANO, R.R.; DE MORAES, E.A.; MONTENEGRO, R.C. (2018). Small benzothiazole molecule induces apoptosis and prevents metastasis through DNA interaction and *c-MYC* gene suppression in diffuse-type gastric adenocarcinoma cell line, *Chemico-Biological Interactions*doi, v. 10.1016/j.cbi.2018.08.006.

MILAGRO, F.I.; MARTÍNEZ, J.A. (2013). Epigenética en obesidad y diabetes tipo 2: papel de la nutrición, limitaciones y futuras aplicaciones. *Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes*, v.6, n.3, p.108-114.

MIRANDA, C.A.S.F. (2010). Atividade antioxidante de óleos essenciais de folhas de diversas plantas. Programa de Pós – Graduação em agroquímica, Minas Gerais, Brasil.
MIYAKE, T. (2005). Métodos de extração e fracionamento de extratos vegetais. Florianópolis, Brasil.

MOSMANN, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, USA.

MOURA, R. S. de; PIRES, K. M. P.; FERREIRA, T. S.; LOPES, A. A.; NESI, R. T.; RESENDE, A. C.; SOUSA, P. J. C.; SILVA, A. J. R.; PORTO, L. C.; VALENÇA, S. S. (2011). Addition of açai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. *Food and Chemical Toxicology*, V. 49 (4): 855-863.

MUÑIS-MIRET, N.; VAMOS, R.; HIRAOKA, M.; MONTAGNINI, F.; ENDENSOHN, R. O. (1996). The economic value of managing the acai palm (*Euterpe oleracea* mart) in the floodplains of the Amazon estuary, Para, Brazil. *For Ecol Manage*, V. 87: 163-173.

NASCIMENTO, E. (2021). Floresta é o mundo: pensamento vegetal. *Ensaio Flip: plantas e literatura*, p. 83-102, Rio de Janeiro, Brasil.
NASCIMENTO, J.C.; LAGE, L.F.O.; CAMARGOS, C.R.D.; AMARAL, J.C.; COSTA L.M.; SOUSA A.N.; OLIVEIRA, F.Q. (2011). Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. *Rev. Bras. Farm.* 92(4): 327-332, Brasil.

NAVARRO, D. (2005). Estudo Químico, Biológico e Farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* na obtenção de moléculas bioativas de potencial terapêutico. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

NIEMEYER, K.; BELL, I. R.; KOITHAN, M. (2013). Traditional knowledge of western herbal medicine and complex systems science. *J. Herb. Med.* 3, 112.
NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. L. P.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. (2003). Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, V. 14: 05- 08.

NUNES, J.M. (2010). Avaliação *in vitro* do Potencial antioxidante de extratos de *Hypericum polyanthemum* Klotzsh ex Reichardt aclimatizado. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, Brasil.

OECD Guideline for the testing of chemicals. In vitro mammalian cell micronucleus test. (2010). Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9748701e.pdf?expires=1364237346&id=id&accname=guest&checksum=EC70302F3AA1D65D5F64C4DBE389BBA0>. Acessado em: 25.03.2013.

OLIVEIRA, M.S. P; CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O. (2000). Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). Série frutas nativas. Jaboticabal: FUNEP. 52p.

OLIVEIRA, R.J. (2009). Evaluation of chemopreventive activity of glutamine by the comet and micronucleus assay in mice's peripheral blood. *Eviron. Toxicol. Pharmacol.*, v. 28, n. 1, p. 120, 124.

OLIVEIRA, R.J.; BAISE, E.; MAURO, M.O.; PESARINI, J.R.; MATUO, R.; SILVA, A.F.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S. (2009). Evaluation of chemopreventive activity of glutamine by the comet and micronucleus assay in mice's peripheral blood. *Eviron. Toxicol. Pharmacol.* V. 28 (1): 120-124.

OLIVEIRA, R.J.; GOULART-FILHO, L.R.; BASTOS, L.M.; ALVES, D.D.; SANTOS E SILVA, S.V.; MORELLI, S. (2014). Contribuições da citogenética em pesquisas sobre o câncer. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 245-259.

OLIVEIRA, R.J.; SILVA, A.F.; MATUO, R.; BELLINI, M.F.; MANTOVANI, M.S. (2005). Determinação do mecanismo de ação da molécula β -glucana em teste de antimutagênese através do ensaio do micronúcleo nas linhagens celulares não metabolizadora (CHO-k1) e metabolizadora (HTC). Resumos do 51º Congresso Brasileiro de Genética, Brasil.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). (2002). A crescente ameaça da resistência antimicrobiana, opções de ação. Núcleo de Inovação, Informação, Evidência e Pesquisa.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; MERTES-TALCOTT.S.; TALCOTE, S. T. (2008). Chemical composition, properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil Acai (*Euterpe oleracea* Mart). *J Agric Food Chem*, V. 56(12):4631-6.

PAULA, J. E. (1995). Anatomia de *Euterpe oleracea* Mart. (*Palmae* da Amazônia). *Acta Amazônica*, V. 3: 265-278.

PEDRIALI, C.A. (2005). Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. Programa de pós graduação em ciências Farmacêuticas, São Paulo, Brasil.

PERDIGÃO, J.; TAVARES, A. (2001). Ciclo Celular e novas terapias contra o cancro (o ano do Nobel). *Boletim de Biotecnologia*. Lisboa, Portugal.

PERONDI, D.M. (2018). Investigação do mecanismo de morte celular induzido por tiossemicarbazonas em linhagens de células de leucemias agudas humanas. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia. Santa Catarina, Brasil.

PINTO, G.B. (2014). Prospecção Tecnológica das atividades industriais do açaí em bases de patentes gratuitas. IFRJ – Instituto Federal do Rio de Janeiro. Campus de Realengo, Rio de Janeiro.

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. *Methods Mol. Biol.* 2014. DOI: 10.1385/1-59259-811-0:301

PRIOR R.L.; CAO, G. (1999). *In vitro* total antioxidante capacity: comparison of diferente analytical methods. *Free radical Biology and medicine*, V. 23: 1173-1181

Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidazil) e a sua forma reduzida (difenil-picrilhidrazina). Fonte: <https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3730368BMRI2013251754.sch.001&req=4> com adaptações.

RESENDE, F.A.; BARCALA, C.A.M.A.; FARIA, M.C.S.; KATO, F.H.; CUNHA, W.R.; TAVARES, D.C. (2006) Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. *Life Sciences*, V. 79: 1268-1273.

RODRIGUES, R. B.; LICHTENTHALER, R.; ZIMMERMAN, B. F.; PAPGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. (2006). Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) seeds and identification of their polyphenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 54 (12): 4162-4167.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. (2003). Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research*, Vol. 6, Nº3, 317-320, São Paulo, Brasil.

ROGEZ, H. (2000) **Açaí**: preparo composição e melhoramento da conservação. EDFPA, Belém, Brasil.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. (2007). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Embrapa: Comunicado técnico, v. 127: 1-4.

RUSSELL, W. M. S; BURCH, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen & Co. Special edition published by Universities Federation for Animal Welfare (UFAW).

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. (2003). Teste do micronúcleo em células humanas. Em: Ribeiro L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. *Mutagênese Ambiental*. Canoas:Ulbra, p 221-223

- SANCHES, E.N.M.; OLIVEIRA, M.S.P. (2011). Caracterização de genótipos de açaí branco por marcadores RAPD. Seminário de iniciação científica da EMBRAPA, Pará, Brasil.
- SERPELONI, J.M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A.; CÓLUS, I.M.S. (2008). Avaliação *in vivo* da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero *Miconia* através do teste do micronúcleo. *Semina Cienc. Biol. Saúde*, V. 29 (1): 47-56.
- SHUNCK, E.G. (2011). Interação medicamentosa: Parte II. Caderno de farmácia, V. 2 (2): 97-110.
- SIEBRA, C.A. (2007). Atividades Biológicas de *Annona glabra* Linn., Annonaceae. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) 96 f., Curitiba.
- SILVA, F.A. (2014). Simbiose Micorrízica Arbuscular Em Pau-Ferro (*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea*) Visando Maximização Da Produção De Fitoquímicos Foliares Com Potencial Medicinal. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Recife, Brasil
- SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (2003). Genética Toxicológica, 1ª Edição, Brasil.
- SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (2003). Genética Toxicológica, 1ª Edição, Brasil.
- SILVA, U.C. (2009). História da indumentária. Apostila de projeto de coleção: 2ªed, Santa cataria, Brasil.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (2003). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Universidade federal de Santa Catarina, Porto Alegre, p677-614.
- SNUSTAD, P.D.; SIMMONS, M.J. (2008). Fundamentos de Genética, 4ª edição, Brasil.
- SOUSA, T.M.; SEVERI, J.A.; SILVA, V.Y.A.; SANTOS, E.; PIETRO, L.C.L.R. (2007) Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Strtrphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* V. 28(2): 221-6.
- SOUSA, T.M.; SEVERI, J.A.; SILVA, V.Y.A.; SANTOS, E.; PIETRO, L.C.L.R. (2007) Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Strtrphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* V. 28(2): 221-6.
- SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. (2003). Componentes funcionais nos alimentos. *Boletim da SBCTA*. v. 37, n. 2, p. 127-135.
- VALENTE, M.A.S.; BARBOSA, M.C.A.; RODRIGUES, C.V.; VIEIRA, P.A.F.; BARBOSA, M.O. (2014). Nutrigenômica/nutrigenética na elucidação das doenças crônicas. *HU Revista, Juiz de Fora*, v. 40, n. 3 e 4, p. 239-248.

VALGÔDE, F.G.S (2008). Avaliação do Dano radioinduzido, capacidade de reparo e morte celular em células humanas tumorais (T-47D e MCF-7) e não tumorais (MCF-10) de mama. Dissertação de Mestrado. IPEN, São Paulo, Brasil.

VIEGAS, G.S. (2015). Avaliação da morte celular e da indução autofágica em linhagem de adenocarcinoma gástrico por meio do tratamento combinado *in vitro* com 5-fluoracila e SMER28. Trabalho de Conclusão de Curso, 30pp, Porto Alegre, Brasil.

VIEIRA, J.A.T.; MARCHIORI, J.M.G.; MOREIRA, W.M.Q.M. (2015). A nutrigenômica na prevenção e combate às células neoplásicas. Revista Fafibe On-line, Bebedouro, São Paulo-SP, ed.8, n.1, p.140-153.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. (2010). Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua importância. Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316, Pelotas, Brasil.

WHO (WORD HEALTH ORGANIZATION). (2002). The leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infections.

WYLLIE, A.H. (2008). Apoptosis, Cell death and cell proliferation. 3 ed. Applied Science manual.

XAVIER P.A.F. (2002). Apoptose e Reprodução Humana. Acta médica Portuguesa. Porto, Portugal.

YAMAGUCHI, K. K. L.; PEREIRA, L. F. R.; LAMARÃO, C. V.; LIMA, E. S.; VEIGA-JUNIOR, V. F. (2015) Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. Food Chemistry. V. 179: 137–151, 2015.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. (2011). Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. Quím. Nova, V. 24 (1): 47-152.

ZÚÑIGA-GONZÁLEZ, G., TORRES-BUGARÍN, O.; LUNA-AGUIRRE, J.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A.; ZMORA-PEREZ, A.; GOMEZ-MEDA, B.C.; VENTURA-AGUILAR, A.J.; RAMOS-IBARRA, M.L.; RAMO-MORA, A.; ORTÍZ, G.G; GALLEGOS-ARREOLA, M.P. (2000). Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. Mutation Research, V. 467: 99–103.