

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Susane Lopes

ESTUDO *IN VITRO* DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DOS EXTRATOS CAROTENOÍDICO E POLIFENÓLICO
DERIVADOS DAS FOLHAS DE *ZEA MAYS* EM LINHAGENS
CELULARES NEOPLÁSICAS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e do
Desenvolvimento da
Universidade Federal de Santa
Catarina como parte dos
requisitos para a obtenção do
Título de Mestre em Biologia
Celular e do Desenvolvimento
Orientador: Prof. Dr. Paulo
Fernando Dias.
Coorientadora: Prof(a). Dr(a).
Shirley Kuhnen.

Florianópolis

2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

L864e Lopes, Susane

Estudo *in vitro* de atividades biológicas dos extratos carotenóidico e polifenólico derivados das folhas de *Zea mays* em linhagens celulares neoplásicas [dissertação] / Susane Lopes ; orientador, Paulo Fernando Dias. - Florianópolis, SC, 2012.

153 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia celular. 2. Tumores. 3. Melanoma. 4. Carotenóides. 5. Polifenóis. I. Dias, Paulo Fernando. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

CDU 576

Susane Lopes

Estudo *in vitro* de atividades biológicas dos extratos carotenóidico e polifenólico derivados das folhas de *Zea mays* em linhagens celulares neoplásicas.

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e _____ em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Prof. Dr. Paulo Fernando Dias,
Orientador
Universidade Federa de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof.^a, Dr.^a Rozangela Curi Pedrosa
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a Gecioni Loch Neckel,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a Cláudia Beatriz Nedel,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Giordano Wosgrau Calloni,
Universidade Federa de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a Ilíada Rainha de Souza
Coordenadora do Curso

Florianópolis, 28 de fevereiro de 2012.

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação especialmente à minha amada família por todo infinito amor e dedicação. Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Obrigada Senhor por esse momento!

Não poderia iniciar esta página de agradecimentos de forma diferente. Muito obrigada DEUS por todas as oportunidades de crescimento que me destes ao longo desse período e pelas pessoas maravilhosas que colocastes no meu caminho!;

Agradeço infinitamente aos meus pais, pois sem a dedicação de vocês e todo o apoio nada disso seria realizado. Obrigada pelo feijão mãe e pelas vibrações! Oração de mãe é a mais forte do mundo!!! Obrigada pelas ajudas financeiras pai, sei o quanto é difícil!!! Amo vocês!;

Doy gracias a mi hermana Josi, para obtener ayuda con ropa y otras cosas más que nunca llegaron en hora de necesidad. Gracias también porque siempre me está ayudando con las traducciones y leer los textos para identificar los errores. ¡Gracias!;

Agradeço ao Kleber, por toda a paciência (haja paciência!!); por ter abdicado muito do seu lazer para não me deixar sozinha em casa trabalhando; por todo amor, carinho e incentivo nas horas mais difíceis...Sou sempre seu orgulho porque tenho você como exemplo de dedicação e honra! ONRETE OMA ET;

Sou eternamente grata ao professor Paulo pela oportunidade de crescimento profissional e espiritual (muito obrigada pelas longas conversas!). Agradeço-lhe por ter aberto a porta do LEBIMA para que enfim, eu pudesse desbravar esse mundo *in vitro* do qual sempre almejei. Thanks por todas as barras de cereais nas horas mais propícias!;

Ao professor Marcelo Maraschin, por nos oferecer a oportunidade de desenvolver parte do nosso projeto no LMBV. Sou eternamente grata por todas as perguntas retóricas, tanto em aula quanto nos seminários e corredores do laboratório. Certo dia resolvi procurar o significado exato de pergunta retórica, e veja só... “pergunta em que o orador não espera que seus ouvintes respondam, mas sim, estimula o raciocínio dos mesmos”. OK! Não poderia deixar de lhe agradecer também, por sempre estimular-nos a pensar e sermos criativos;

Às minhas amigas de Blumenau, Lilah (agora manezinha), Priscila, Vani, Tati, Ana e Malu. Me perdoem pela ausência durante esses dois anos. Certeza absoluta que vocês fizeram e fazem muito falta!!!;

Às minhas amigas amadas de Floripa, que carregarei eternamente no “core”. Vou citá-las em ordem alfabética para evitar transtornos emotivos futuros (rs): Aline, Fernanda Borba, Simone e Vivi. Minha

vida se tornou muito mais leve durante todo esse período graças a ajuda de vocês. Aline, quero ser cabeçuda igual a você com sua alegria de viver!; Fer, quero ter essa sua tranquilidade da P...rs!!!; Dra. Kobe, sua honestidade, paciência e amizade foram fundamentais!!!; Vivi amada! Me salvando sempre, me ouvindo sempre. Amo vocês!;

À Jaqueline, meu braço direito e esquerdo, minhas pernas, minha memória...! O que seria de mim sem você Jakipédia? Admiro muito sua dedicação. Admiro muito seu trabalho. Sempre estudando, trabalhando e trabalhando e nunca, nunca se queixando. Você vai longe menina e se um dia eu puder, te levo comigo! Muito obrigada pela amizade além de tudo!;

À Geci, minha salvadora! Sem querer querendo te encontrei e jamais te larguei (rs). Sou grata à você por muitos dos conhecimentos adquiridos durante essa fase. Obrigada por me ensinar que quando tudo está dando certo é porque algo está errado!;

A todos do LMBV, LEBIMA, LAMAR e Lab. Morfofuncional, obrigada pela convivência e divertimento: Bia Mandioca, Júuuu, Bia Veleirinho, Fer Ramlow, Amélia, Fer Berti, Thiago “Pereirão”, Maíra, Luana, Ana, Diego, Bruno, Lauana, Carlos, Eduardo (viciiei na água de melissa!), Rodolfo, Virgílio (valeu pelas tabelas e momentos estatísticos), Ricardo (obrigada pelas folhas de milho), Cris, Luiza, Tici (muitos cafés!), Gladis, Rodrigo, Bibi (obrigada pela cia nos trabalhos em dupla) e Denis;

Ao pessoal do Laboratório de Farmacologia, por todo auxílio e sugestões ao longo do desenvolvimento desse estudo: Jarbas, Mariana e professora Rosa;

Ao professor Giordano! Muito obrigada por me permitir assisti-lo durante todo o período de bolsa REUNI do qual pude compartilhar em sua disciplina. Suas aulas foram as melhores!!! Admiro muito sua determinação, com toda certeza, um exemplo a ser seguido!;

À professora Shirley, pelos conhecimentos direcionados a extração das folhas de milho e, principalmente, por ter me apresentado a Jaque, pois sem ela, muito disso tudo teria sido inaplicável;

Aos professores do programa de pós-graduação por todo conhecimento transmitido;

Aos membros da banca, pela disposição em aperfeiçoar esse projeto com os seus conhecimentos;

Às coordenadoras do programa de pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Ilíada e Evelise, por sempre estarem a disposição de todos, procurando fazer o possível para nos orientar da melhor forma;

À secretaria da pós. Gustavo você mudou a cara da nossa secretaria. Valeu! e a secretaria do BEG, obrigada pelos chás Anselmo!;

À Universidade Federal de Santa Catarina;

À Capes, FAPESC e FAPEU, pelo apoio financeiro;

A todas as outras pessoas, que por esquecimento meu, apesar da lista extensa, fizeram parte dessa história e contribuíram de alguma forma.

That's all folks!!

RESUMO

A pesquisa científica sobre o câncer mostra que a tumorigênese é um processo multifatorial, onde cada evento é o resultado de alterações genéticas e epigenéticas que conduzem as células a uma transformação progressiva, convertendo-as de um padrão de linhagem normal em derivados celulares malignizados. Os produtos naturais de origem vegetal têm sido investigados em função de suas propriedades biológicas, nutricionais e farmacológicas. O conhecimento da biologia e das relações existentes entre determinados metabólitos obtidos de espécies vegetais, e a profilaxia ou terapêutica de doenças, refletem em melhorias na qualidade de vida. Estudos prévios sobre as atividades biológicas de carotenóides e polifenóis obtidos de tecidos de milho, espécie *Zea mays*, demonstraram a ocorrência de inibição do crescimento tumoral e estímulo à função imune, além de inibição da proliferação celular e indução de apoptose. O presente estudo *in vitro* avaliou a potencial ação antitumoral de extratos carotenóidico (ECa) e polifenólico (EPf) derivados de folhas de *Z. mays* da variedade crioula Rajado 8 Carreiras. A cromatografia líquida alta de eficiência revelou a presença de luteína e ácido clorogênico como compostos majoritários de EC e EPf, respectivamente. Foram avaliados a citotoxicidade dos extratos foliares ECa e EPf e dos compostos puros β -caroteno (β C), luteína (Lut), ácido gálico (AG), ácido cafeico (AC) e ácido ferúlico (AF) sobre quatro linhagens neoplásicas e uma linhagem não-neoplásica. Além disso foram avaliados os efeitos de ambos os extratos e de compostos puros sobre a morfologia, proliferação e adesão de células da linhagem B16F10. Ambos os extratos e os compostos puros, com exceção do AF, reduziram a viabilidade (método colorimétrico do MTT) de todas as linhagens de células tumorais sob estudo. No entanto, a única linhagem não-neoplásica, de fibroblasto de camundongo (L929), foi a menos susceptível, tendo, inclusive, apresentado um aumento (ao invés de redução) de 10% na viabilidade celular no grupo tratado com Lut (0,5 μ g/mL). Além disso, ambos os extratos e os compostos β C e Lut (principalmente) causaram efeito citotóxico tempo-dependente (12 - 48 h) sobre a linhagem celular B16F10. Os ECa e EPf (5 μ g/mL) também produziram alterações na morfologia (diminuição do espreado) e, após 24 h de exposição, induziram morte apoptótica nas células dessa linhagem. Os resultados do ensaio de BrdU mostraram que ECa e EPf (5 μ g/mL, 24h) não inibiram a proliferação celular. Em um ensaio complementar, confirmou-se que ambos os extratos

bloquearam a proliferação celular em até 99,5%; quantificada com base na capacidade de formar colônias (ensaio de clonogenicidade). Os ensaios de imunocitoquímica para detecção de actina e vinculina mostrou ocorrência de alterações nessas microestruturas evidenciadas pela distribuição dos pontos de adesão das células B16F10 expostas aos extratos (ECa e EPF). Com estes resultados sugere-se que os extratos de carotenóides e de polifenóis sob estudo teriam promovido alterações na estrutura do citoesqueleto (refletidas na morfologia celular), mais do que efeitos específicos nos mecanismos de viabilidade, migração e proliferação celular, os quais seriam uma consequência daquelas alterações.

Palavras-chaves: Comportamento celular, Neoplasia, Melanoma, Carotenóides, Polifenóis.

ABSTRACT

The scientific research about cancer shows that the tumorigenesis is a multifactorial process, where each event is the result of genetics and epigenetic alterations that conduct the cells to a progressive transformation, converting them from a pattern of normal line to maligned cell derivatives. The natural products have been investigated because of their biological, nutritional and pharmacological properties. The knowledge of the biology and the existing relations between determined metabolites obtained from vegetal species and the prophylaxy or therapy of diseases, reflect in life quality improvement. Previous studies on the biological activities of carotenoids and polyphenols obtained from maize tissues, species *Zea mays*, demonstrate occurrence of tumor growth inhibition and stimulation of the immune function, beyond the inhibition of cell proliferation and apoptosis induction. This study *in vitro* evaluated the potential antitumoral action of carotenoidic (ECa) and polyphenolic (EPf) extracts derived from leaves of *Z. mays* of the creole mayze variety Brindle 8 Careers. The high performance liquid chromatography revealed that lutein and chlorogenic acid were the major compounds of the ECa and EPf, respectively. It was evaluated the cytotoxicity of the extracts ECa and EPf and the pure compounds β -carotene (β C), lutein (Lut), gallic acid (AG), caffeic acid (AC) and ferulic acid (AF) assaying four neoplastic cell lineages and also a non-neoplastic cell line. Besides, the effects of treatment with the extracts and some pure compounds were evaluated on the morphology, proliferation and adhesion of the B16F10 cell line. Both the extracts and pure compounds, with the exception of AF decreased the viability (MTT colorimetric method) in all the cell lineages under study. However, the only cell line non-neoplastic (mice fibroblasts; L929 cells) was the less susceptible, showing an 10 % increase (instead of increasing) in the viability of the cell group treated by Lut (0.5 μ g/mL). Moreover, both the extracts and the pure compounds β C, AG and Lut (mainly) caused time-dependent cytotoxic effects (12 - 48h) in the B16F10 cell line. Eca and EPf (5 μ g/mL) also afforded morphological alterations (spreading decrease) and, after 24 h of exposure, those extracts induced apoptotic death in the B16F10 cells. The results attained by means of the BrdU assay show that ECa and EPf (5 μ g/mL, 24h) did not inhibit cell proliferation. By means of a complementary assay based in the cell capacity to form colonies (clonogenicity), we demonstrated that both the extracts blocked (until 99.5%) the cell proliferation. With these findings we suggest that the

extracts of carotenoids and polyphenols under study possibly promoted alteration in the cytoskeleton structure (reflected in the cell morphology) rather than the specific effects in the mechanisms of survival, migration and cell proliferation, which would be a consequence from those alterations.

Key-words: Cell behavior, Cancer, Melanoma, Carotenoid, Polyphenol..

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: As duas principais vias de sinalização de apoptose.....	10
Figura 2: Estrutura química de compostos carotenóides derivados do milho.....	17
Figura 3: Estrutura química de fenól simples e ácido fenólico	18
Figura 4: Variedade crioula de milho Rajado 8 Carreiras (<i>Zea mays</i>)...21	
Figura 5: Perfil cromatográfico do extrato hexânico de carotenóides (Ca) derivado da folha da variedade crioula de milho Rajado 8 Carreiras de <i>Zea mays</i>	42
Figura 6: Perfil cromatográfico do extrato metanólico de polifenóis totais (PFT) derivado da folha da variedade crioula de milho Rajado 8 Carreiras de <i>Zea mays</i>	44
Figura 7: Perfil cromatográfico da purificação do composto de luteína	46
Figura 8: Efeito do solvente Tetrahidrofurano (THF) sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do MTT.....	49
Figura 9: Efeito do extrato de carotenóides sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do MTT.....	50
Figura 10: Efeito do extrato de polifenóis sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do do MTT.....	52
Figura 11: Efeito do β -caroteno sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do MTT.....	54
Figura 12: Efeito da luteína sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim	

humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do MTT.....	56
Figura 13: Efeito do ácido gálico sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do MTT.....	58
Figura 14: Efeito do ácido cafeico sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do MTT.....	60
Figura 15: Efeito do ácido ferúlico sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do MTT.....	62
Figura 16: Determinação do efeito do tempo de exposição do extrato de carotenóides (ECa, A), extrato de polifenóis (EPf, B), β -caroteno (β C, C), luteína (Lut, D) e ácido gálico (AG, E) sobre a viabilidade celular da linhagem B16F10 após 12, 24, 36 e 48 horas de exposição.....	67
Figura 17: Análise morfológica por microscopia óptica da linhagem B16F10 após tratamentos com o extrato de carotenóides (0,5 e 5 μ g/mL) pelo período de 12h (A) e 24h (B).....	70
Figura 18: Figura 9. Análise morfológica por microscopia óptica da linhagem B16F10 após tratamento com o extrato de polifenóis (0,5 e 5 μ g/mL) pelo período de 12h (A) e 24h (B).....	71
Figura 19: Avaliação da morte celular da linhagem B16F10 exposta ao ECa (0,5 – 5 μ g/mL) pelo período de exposição de 12 h através da marcação com Anexina – V FITC (AV) e iodeto de propídeo (IP) por citometria de fluxo.....	73
Figura 20: Avaliação da morte celular da linhagem B16F10 exposta ao ECa (0,5 – 5 μ g/mL) pelo período de exposição de 24 h através da marcação com Anexina – V FITC (AV) e iodeto de propídeo (IP) por citometria de fluxo.....	75
Figura 21: Avaliação da morte celular da linhagem B16F10 exposta ao EPf (0,5 – 5 μ g/mL) pelo período de exposição de 12 h através da marcação com Anexina – V FITC (AV) e iodeto de propídeo (IP) por citometria de fluxo.....	77
Figura 22: Avaliação da morte celular da linhagem B16F10 exposta ao EPf (0,5 – 5 μ g/mL) pelo período de exposição de 24 h através da	

marcação com Anexina – V FITC (AV) e iodeto de propídeo (IP) por citometria de fluxo.....	79
Figura 23: Fotografias representativas (40 x) da imunofluorescência por BrdU para avaliação da proliferação celular da linhagem B16F10.....	82
Figura 24: Efeito do ECa na linhagem B16F10 sobre a proliferação celular através da técnica de imunocitoquímica utilizando-se BrdU como marcador.....	83
Figura 25: Efeito do EPf na linhagem B16F10 sobre a proliferação celular através da técnica de imunocitoquímica utilizando-se BrdU como marcador.....	84
Figura 26: Efeito da concentração nos tratamento com ECa (0,5 e 5 µg/mL) em dois períodos de tempo (12 e 24 h), sobre a capacidade de formação de colônias das células B16F10.....	87
Figura 27: Efeito da concentração nos tratamento com EPf (0,5 e 5 µg/mL) em dois períodos de tempo (12 e 24 h), sobre a capacidade de formação de colônias das células B16F10.....	88
Figura 28: Influência dos extratos de carotenóides (ECa) e polifenóis (EPf) (0,5 e 5 µg/mL) sobre o citoesqueleto, núcleo e pontos de adesão focal de células B16F10, avaliada por microscopia de fluorescência (imagens merge).....	91
Figura 29: Influência dos extratos de carotenóides (ECa) e polifenóis (EPf) (0,5 e 5 µg/mL) sobre o citoesqueleto, núcleo e pontos de adesão focal de células B16F10, avaliada por microscopia de fluorescência.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Amostras utilizadas nos tratamentos das linhagens celulares, siglas, concentrações e nome do fabricante.....	35
Tabela 2: Resultados referentes à determinação de compostos carotenóidicos em amostras de extrato hexânico derivado da folha da variedade crioula de milho Rajado 8 Carreira de <i>Zea mays</i> , por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acompanhadas dos respectivos \pm erro padrão da média (EPM) de três injeções consecutivas.....	43
Tabela 3: Resultados referentes à determinação de PFT em amostras de extrato metanólico derivado da folha da variedade crioula de milho Rajado 8 Carreira de <i>Zea mays</i> , por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acompanhadas dos respectivos \pm erro padrão da média (EPM) de três injeções consecutivas.....	45
Tabela 4: Resultados referentes à purificação do composto de luteína por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acompanhadas dos respectivos \pm erro padrão da média de três análises independente.....	46
Tabela 5: Valores de CI50 obtidos nos testes de viabilidade celular após a administração de concentrações crescentes do extrato de carotenóides (0,5 - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, n=12) nas linhagens U87-MG, L929, MCF-7, B16F10 e 786-O, e a respectiva porcentagem da inibição mínima (IMín) e máxima (IMáx) obtida.....	51
Tabela 6: Valores de CI50 obtidos nos testes de viabilidade celular após a administração de concentrações crescentes do extrato de polifenóis (0,5 - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, n=12) nas linhagens 786-O, U87-MG, L929, B16-F10 e MCF-7, e a respectiva porcentagem da inibição mínima (IMín) e máxima (IMáx) obtida.....	53
Tabela 7: Valores de CI50 obtidos nos testes de viabilidade celular após a administração de concentrações crescentes do β -caroteno (0,5 - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, n=12) nas linhagens U87-MG, MCF-7, L929, 786-O e B16-F10 e a respectiva porcentagem da inibição mínima (IMín) e máxima (IMáx) obtida.....	55
Tabela 8: Valores de CI50 obtidos nos testes de viabilidade celular após a administração de concentrações crescentes de luteína (0,05 - 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, n=12) nas linhagens U87-MG, L929, B16-F10, MCF-7 e 786-O e a respectiva porcentagem da inibição mínima (IMín) e máxima (IMax) obtida.....	57
Tabela 9: Valores de CI50 obtidos nos testes de viabilidade celular após a administração de concentrações crescentes do composto puro ácido	

gálico (1 - 100 $\mu\text{g/mL}$, $n=12$) nas linhagens L929, B16-F10, U87-MG, MCF-7 e 786-O, e a respectiva porcentagem da inibição mínima (IMín) e máxima (IMáx) obtida.....59

Tabela 10: Valores de CI50 obtidos nos testes de viabilidade celular após a administração de concentrações crescentes do composto puro ácido cafeico (1 - 50 $\mu\text{g/mL}$, $n=12$) nas linhagens L929, B16-F10, U87-MG, 786-O e MCF-7, e a respectiva porcentagem da inibição mínima (IMín) e máxima (IMáx) obtida.....61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Avaliação entre os tratamentos administratos de ECa, EPf, β C, Lut, AG, AC e AF e as linhagens celulares sob estudo U87-MG, 786-O, MCF-7, B16F10 e L929.....	64
Quadro 2: Determinação do efeito do tempo de exposição do extrato de carotenóides (ECa) e extrato de polifenóis (EPf) e compostos puros, sobre a viabilidade celular da linhagem B16F10 após 12, 24, 36 e 48 horas de exposição. Comparação com o ensaio de MTT de 24 h.....	69
Quadro 3: Avaliação da morte celular da linhagem B16F10 após incubação com meio de cultura (CN) ou com extrato de carotenóides (ECa) e extrato de polifenóis (EPf) (0,5 e 5 μ g/mL), pelo período de exposição de 12 e 24 h. Média das porcentagem e o respectivo erro padrão da média em cada quadrante (Q1, Q2, Q3 e Q4), avaliadas por citometria.....	81
Quadro 4: Efeito na proliferação celular da linhagem B16F10 após incubação com meio de cultura (CN) ou com extrato de carotenóides (ECa) e extrato de polifenóis (EPf) (0,5 e 5 μ g/mL), pelo período de exposição de 12 e 24 h. Média do número total de células marcadas com DAPI e BrdU, seguido pela porcentagem de células com marcação positiva para BrdU e o respectivo erro padrão da média	85
Quadro 5: Efeito na formação de colônias da linhagem B16F10 após incubação com extrato de carotenóides (ECa) e extrato de polifenóis (EPf) (0,5 e 5 μ g/mL), pelo período de exposição de 12 e 24 h. Média da porcentagem de colônias e o respectivo erro padrão da média	89

LISTA DE SÍMBOLOS

% - percentagem
°C - graus Celsius
μg - micrograma
μL - microlitro
μm - micrômetro
μM - micromolar
h - horas
mg – miligrama
min - minutos
mL - mililitro
nm - nanômetro
rpm - rotações por minuto
seg - segundos
x - vezes
α – alfa
β – beta

LISTA DE ABREVIATURAS

- 786-O – linhagem de adenocarcinoma de rim humano
Abs - absorvância
AC – ácido cafeico
Acs 1°- anticorpos primários
Acs 2°- anticorpos secundários
AF – ácido ferúlico
AG – ácido gálico
ATP – adenosina trifosfato
AV – Anexinn V
B16F10 – linhagem neoplásica de melanoma de camundongo
B9 – linhagem de melanoma murino
BrdU - 5-bromo-2- deoxiurina
BSA – soro albumina bovina
C - concentração
CaT – carotenóides totais
CDKs – Quinases dependentes de ciclinas
CI50 - concentração inibitória de 50%
CKI – inibidor quinase
CN – controle negativo
CO₂- gás carbônico
DAPI- 4'-6- diamino – 2- fenilindol
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO - dimetil-sulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucleico
ECa – extrato de carotenóides
EDTA - Etileno-dinitrilo-tetracético
EPf – extrato de polifenóis
G1 – *gap* (intervalo)
G2 – *gap* (intervalo)
HCT 116 – linhagem de carcinoma colorctal humano
HeLa – linhagem de carcinoma de colo de útero
HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico
HepG2 – linhagem de carcinoma hepatocelular
HS578T – linhagem de câncer de mama humano
HT-29 - linhagem neoplásica de cólon humano
IP – iodado de propídeo
K562 – linhagem de leucemina mielóide crônica humano
L929 – linhagem não neoplásica fibroblasto de camundongo

Lut – luteína

M – fase mitótica

M21-HPB - linhagem de melanoma maligno humano

MCF-7 – linhagem de carcinoma de mama humano

MDA MB 231 – linhagem de câncer de mama humano

MEC – matriz extra celular

MTT - brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS - Salina Tamponada Fosfatada

PC-3 – linhagem neoplásica de próstata humano

PFA – paraformaldeído

PfT – polifenóis totais

FS - fosfatidilserina

Q1 – quadrante 1

Q2 – quadrante 2

Q3 – quadrante 3

Q4 – quadrante 4

RPM – rotações por minuto

S – fase de síntese de proteína

SFB - soro fetal bovino

THP-1 - linhagem de leucemia humana aguda monocítica

U87-MG – linhagem de glioblastoma humano

v/v – volume/volume

β C – β -caroteno

HL-60 – linhagem de células leucêmicas humanas

WiDr – linhagem de adenocarcinoma de cólon humano

SK-MEL-2 – linhagem de melanoma humano

SV-40 – linhagem de células mamárias transformadas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA SOBRE A TUMORIGÊNESE...1	
1.1.1. Epidemiologia do câncer.....1	1
1.1.2. Aspectos da tumorigênese.....2	2
1.1.3. Melanoma.....5	5
1.1.4. Câncer de mama, adenocarcinoma de rim e glioma.....6	6
1.2.MECANISMOS CELULARES RELEVANTES NA TUMORIGÊNESE.....8	8
1.2.1. Apoptose.....8	8
1.2.2. Proliferação celular.....11	11
1.2.3. Adesão celular.....12	12
1.3.ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PRINCÍPIOS ATIVOS VEGETAIS – ÊNFASE EM CONSTITUINTES DE <i>ZEA MAYS</i>14	14
1.3.1. Importância dos compostos naturais para a saúde humana.....14	14
1.3.2. Bioatividade de carotenóides.....16	16
1.3.3. Bioatividade de compostos fenólicos.....17	17
1.3.4. Bioatividade de constituintes químicos do milho.....19	19
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. OBJETIVO GERAL.....24	24
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....24	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. COLETA DO TECIDO FOLIAR.....26	26
4.2. ANÁLISES FITOQUÍMICAS.....26	26
4.2.1. Obtenção e detecção de carotenóides.....26	26
4.2.2. Obtenção e detecção de polifenóis totais27	27
4.2.3. Purificação e detecção da luteína.....28	28
4.2.4. Diluição e preparo dos extratos e compostos puros para os tratamentos <i>in vitro</i>29	29
4.3. ESTUDO <i>IN VITRO</i> DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....33	33
4.3.1. Cultura de células.....33	33
4.3.2. Determinação da atividade citotóxica do solvente tetrahidrofurano (THF) pelo métodos colorimétrico MTT.....33	33
4.3.3. Determinação da atividade citotóxica dos extratos e compostos puros pelo métodos colorimétrico MTT.....34	34
4.3.4. Determinação do efeito do tempo de exposição na viabilidade celular.....36	36
4.3.5. Análise da morfologia celular por meio de microscopia óptica...37	37

4.3.6. Avaliação da ocorrência de morte celular por apoptose pela incorporação de Anexina – V FITC e iodeto de propídeo utilizando citometria de fluxo.....	37
4.3.7. Avaliação da proliferação celular por imunocitoquímica por BrdU	38
4.3.8. Avaliação da capacidade de formação de colônias.....	39
4.3.9. Avaliação do citoesqueleto e pontos de adesão por imunofluorescência.....	40
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5. RESULTADOS.....	42
5.1. ANÁLISES FITOQUÍMICAS.....	42
5.1.1. Obtenção e detecção de compostos carotenóides.....	42
5.1.2. Obtenção e detecção de polifenóis totais.....	43
5.1.3. Purificação e e detecção da luteína.....	45
5.2. ESTUDO <i>IN VITRO</i> DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	47
5.2.1. Determinação da atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT.....	47
5.2.1.1. Efeito do solvente tetrahidrofurano (THF) na viabilidade celular.....	47
5.2.1.2. Efeito do extrato de carotenóides na viabilidade celular.....	49
5.2.1.3. Efeito do extrato de polifenóis na de viabilidade celular.....	51
5.2.1.4. Efeito do β -caroteno na viabilidade celular.....	53
5.2.1.5. Efeito da luteína na viabilidade celular.....	55
5.2.1.6. Efeito do ácido gálico na viabilidade celular.....	57
5.2.1.7. Efeito do ácido cafeico na viabilidade celular.....	59
5.2.1.8. Efeito do ácido ferúlico na viabilidade celular.....	61
5.2.2. Determinação do efeito do tempo de exposição na viabilidade celular.....	65
5.2.3. Análise da morfologia celular por meio de microscopia óptica...69	69
5.2.3.1. Efeito do extrato de carotenóides.....	69
5.2.3.2. Efeito do extrato de polifenóis.....	70
5.2.4. Avaliação da ocorrência de morte celular por apoptose pela incorporação de Anexina – V FITC e iodeto de propídeo utilizando citometria de fluxo.....	72
5.2.4.1. Efeito do extrato de carotenóides.....	72
5.2.4.2. Efeito do extrato de polifenóis.....	76
5.2.5. Avaliação da proliferação celular por imunocitoquímica por BrdU.....	82
5.2.5.1. Efeito do extrato de carotenóides.....	82

5.2.5.2. Efeito do extrato de polifenóis.....	83
5.2.6. Avaliação da capacidade de formação de colônias.....	85
5.2.6.1. Efeito do extrato de carotenóides.....	86
5.2.6.2. Efeito do extrato de polifenóis.....	87
5.2.7. Avaliação do citoesqueleto e pontos de adesão por imunofluorescência	89
6. DISCUSSÃO.....	93
6.1. ANÁLISES FITOQUÍMICAS.....	94
6.2. ESTUDO <i>IN VITRO</i> DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	96
7. CONCLUSÃO.....	106
REFERÊNCIAS.....	107

1. INTRODUÇÃO

As estratégias voltadas ao controle e tratamento do câncer - a segunda maior causa de morte por doença, em todo o mundo - têm apontado para a busca de novas diretrizes voltadas ao aprimoramento e melhoria de terapias não convencionais (Reddy et al., 2003). Nesse contexto, a cada dia se descobre um número maior de vegetais que, reconhecidamente, possuem em sua composição substâncias que conferem certa proteção química ao organismo humano (Hashimoto, 2003).

No tocante aos constituintes químicos do milho da espécie *Zea mays*, a sua introdução como eficazes princípios adjuvantes ou suplementos na dieta, ou mesmo como agentes terapêuticos poderiam por hipótese contribuir para uma melhora no atual quadro relativo a doenças incapacitantes, algumas delas de etiologia complexa e prognóstico ruim, como o câncer (German et al., 2005).

1.1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA SOBRE A TUMORIGÊNESE.

1.1.1. Epidemiologia do câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (INCA, 2011).

Conhecido há muitos séculos, o câncer foi considerado como uma doença dos países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. Há aproximadamente quatro décadas, a situação vem mudando, e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos (INCA, 2012). Dos dez milhões anuais de novos casos de câncer, cinco milhões e meio são diagnosticados nos países em desenvolvimento, que representam 12% de todas as causas de morte no mundo (Guerra et al., 2005).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os cânceres de pele de tipo não-melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Excetuando-se os casos de câncer de pele não-melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. Os tipos mais incidentes serão cânceres de pele não-melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide, para o sexo feminino (INCA, 2012).

1.1.2. Aspectos da tumorigênese

Há mais de 200 anos, os pesquisadores que estudavam células tumorais humanas notaram que estas células frequentemente continham um número excessivo de cromossomos. Foi demonstrado que essas células poderiam conter de 60 até 90 cromossomos, comparado com células normais (46 cromossomos). Além disso, esses cromossomos demonstravam aberrações estruturais: inversões, deleções, duplicações e translocações. Estas anormalidades numéricas e estruturais foram definidas como aneuploidias. A maioria dos fenótipos de câncer são instáveis e esse fenômeno ficou conhecido como "instabilidade genética" de células tumorais. A aneuploidia altera a expressão de milhares de genes estruturais e de regulação, como resultado, ocorre a imensa variabilidade de fenótipos existentes de câncer (Nobili et al., 2009).

A pesquisa científica sobre o câncer demonstrou que a tumorigênese é um processo multifatorial, onde cada evento é o resultado de alterações genéticas e epigenéticas que conduzem as células a uma transformação progressiva, convertendo-as de um padrão de linhagem normal em derivados celulares malignizados (Riley e Desai, 2009). Evidências indicam que o câncer constitui um conjunto de patologias caracterizadas, primordialmente, pelo surgimento de extensas alterações na dinâmica do genoma da célula, tais como as mutações, as quais repercutem em oncogenes capazes de anular a função de genes supressores de tumor, passando a controlar de forma autônoma, diversos mecanismos celulares (Hanahan e Weinberg, 2000).

As células tumorais são metabolicamente adaptadas para o rápido crescimento e proliferação celular em condições de baixo pH e oxigênio no qual as células não-transformadas crescem muito pouco ou mesmo,

cessam o processo proliferativo (Rossignol et al., 2004). Além disso, as células tumorais diferem das células normais em relação a muitas outras propriedades importantes, desenvolvendo diferentes padrões de alteração na fisiologia celular, por exemplo, indiferenciação, capacidade de invasão e sensibilidade reduzida a medicamentos, auto-suficiência em sinais de crescimento, susceptibilidade reduzida aos fatores que inibem o crescimento celular ou que promovem morte celular apoptótica. Estes eventos culminam em potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, metástase e uma diversidade de genótipos de células neoplásicas (Hartwell e Kastan, 1994; Wu et al., 2004; Martinez et al., 2006).

As etapas da carcinogênese, delineado ao longo dos últimos 50 anos, abrangem eventos crônicos, como iniciação, promoção e progressão. A iniciação tumoral começa quando o DNA, em uma célula ou população de células, é danificado por exposição a agentes carcinogênicos. Se esta lesão persiste, repará-lá pode levar a mutações genéticas. A fase de promoção tumoral é caracterizada pela expansão clonal seletiva das células, como resultado da expressão alterada de genes cujos produtos estão associadas à hiperproliferação, remodelação do tecido e inflamação. Durante a progressão tumoral, o desenvolvimento de células pré-neoplásicas em tumores se dá através de um processo de expansão clonal, facilitada pela instabilidade genômica progressiva e alteração da expressão do gene (Fresco et al., 2006).

No geral, há pelo menos três mecanismos que permitem que mudanças genéticas e epigenéticas sejam transferidas para a prole de uma célula a desencadear uma transformação maligna: uma mutação herdada, uma mutação somática e metilação do DNA. Os eventos genéticos normalmente afetam pelo menos quatro vias, no entanto, a ordem na qual os genes são afetados não seguem uma regra. Por exemplo, uma mutação em um gene supressor de tumor pode ocorrer antes de uma mutação em qualquer oncogene ou um gene envolvido no reparo do DNA. O comportamento biológico das células, pode variar drasticamente, sendo que várias alterações adicionais que envolvem interações entre células malignas e os elementos em torno do estroma são necessários para a transição de uma célula diferenciada, para pouco diferenciada, até alcançar um fenótipo agressivo na forma metastática (Riley e Desai, 2009).

Outro mecanismo que regula a função genética da progênie celular, mas não envolve uma mutação na célula somática, é a metilação do DNA. A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA

na qual um grupamento metil (CH_3) é transferido da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina (5-Mec) que geralmente precede a uma guanina (dinucleotídeo CpG). A transcrição gênica pode ser fortemente inibida pela adição do radical metil. A presença de um “capuz” metil sobre uma citosina que precede a uma guanina pode inibir a ligação de fatores de transcrição a essas regiões como, por exemplo, em genes supressores tumorais (Weber et al., 2005; Oliveira et al., 2010). Uma variedade de genes supressores tumorais silenciados tem sido encontrados em cânceres humanos e em quase todos os casos esse silenciamento é causado por hipermetilação do DNA dos promotores desses genes (Bachman et al., 2003). A não ligação de fatores de transcrição aos seus sítios específicos resulta na ausência de transcrição gênica. Ao contrário, a desmetilação leva ao aumento da transcrição gênica, como em casos relacionados a proliferação celular descontrolada (Oliveira et al., 2010).

Os distúrbios responsáveis por alterações de células normais em células neoplásicas podem ser desencadeados também por inúmeros fatores ambientais, referidos como carcinógenos (cigarro, efluentes industriais, vapores de combustíveis, etc), ou ainda, por agentes pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF) e os promotores de tumor a exemplo dos ésteres de forbol, entre outros (Hanahan e Weinberg, 2000).

Sinais mitogênicos são necessários para que as células, de um modo geral, possam dar início à transição do estado de repouso para o proliferativo (Rak et al., 1995), evento que envolve também a participação de receptores de superfície celular, componentes da matriz extracelular e moléculas de adesão, que por sua vez atuam nos mecanismos que fazem a transdução do sinal para o interior da célula (Kessenbrock et al., 2010). Os danos no DNA induzem a várias respostas celulares que permitem a célula a lidar com o dano ou ativar o processo de morte celular programada, presumivelmente, para eliminar células com mutações potencialmente catastróficas. Estas respostas a danos no DNA incluem: remoção de danos e de restauração da continuidade do DNA, ativação de “ponto de checagem” com parada do ciclo celular de modo a permitir a reparação e prevenção da transmissão do DNA danificado ou do cromossomo incompletamente replicado, resposta transcricional, ou apoptose que elimina as células danificadas ou muito seriamente desreguladas (Sancar et al., 2004).

A capacidade das populações de células tumorais de se expandirem em número é determinada não somente pela taxa diferenciada de proliferação celular, mas também, pela redução na taxa

de atrito entre células, pois normalmente os eventos apoptóticos são determinantes desse atrito. Isso evidencia que a resistência à apoptose é uma característica de muitos, e talvez de todos, os tipos de câncer, o que torna esse processo um alvo relevante na pesquisa da terapêutica do câncer (Hanahan e Weinberg, 2000).

1.1.3. Melanoma

O principal alvo biológico do presente projeto é o melanoma, um tumor bastante refratário às terapias atualmente utilizadas e de ocorrência significativa embora representando apenas 5% dos cânceres de pele, é considerado o mais grave por apresentar acentuada invasibilidade e capacidade metastática, responsável por cerca de 75% de todas as mortes causadas pelo câncer de pele (Souza et al., 2009).

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele) e tem predominância em adultos brancos (INCA, 2012). Embora o tratamento cirúrgico do melanoma precoce leve a taxas de cura de aproximadamente 90%, o melanoma avançado é caracterizado por sua resistência intrínseca à quimioterapia, pelo comportamento clínico agressivo e tendência para o rápido desenvolvimento de metástase. As taxas de sobrevivência de cinco anos para pacientes com a doença metastática permanecem abaixo de 20% dessas incidências (Altekruse et al., 2010). Além disso, a incidência de melanoma continua a aumentar em todo o mundo (Jemal et al., 2001). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que em todo o mundo ocorra 66 mil mortes por ano devido ao câncer de pele sendo que, aproximadamente 80%, são relacionados a casos de melanoma (Hodi et al., 2010). Este quadro clínico sombrio e epidemiológico reforçam a necessidade de novas estratégias terapêuticas efetivas para atingir esta neoplasia agressiva (Villanueva et al., 2010)

Como resultado da transformação de melanócitos e do desenvolvimento do processo tumoral, as células de melanoma da epiderme atravessam a membrana basal, invadem a derme e formam pequenos agregados celulares. Quando esses micro-nódulos de células tumorais crescem em espessura, o melanoma pode invadir vasos linfáticos e sanguíneos, originando metástases em diversas regiões, primariamente localizados em linfonodos e em seguida, mais frequentemente, nos pulmões e no cérebro (Ferrier et al., 1998).

A metástase de células de melanoma pode ocorrer por via linfática, hematogênica, ou em ambas as vias. No entanto, ainda há

controvérsias sobre o comportamento dessas células quando atingem os linfonodos regionais. A primeira hipótese seria de que as primeiras células metastizadas viajariam pelo linfonodo sentinela (gânglio linfático) e seriam incubadas por um período indeterminado antes de se espalharem para outros nódulos, à corrente sanguínea, e subsequentemente, para outros locais distantes. Outra hipótese seria que, a presença de células em um linfonodo sentinela seria meramente um marcador para a capacidade metastática de determinado tumor, indicando que ocorreu uma disseminação sistêmica de células de melanoma. Os nódulos linfáticos, não seriam armadilhas ou barreiras, mas atuariam como filtros, permitindo ainda a passagem de fluido, ar, eritrócitos, linfócitos, bactérias e células neoplásicas intactas para eferentes de vasos linfáticos e para sistema vascular. Além disso, a disseminação sistêmica já teria ocorrido uma vez que há células metastáticas suficientes a serem histologicamente detectáveis em um nódulo linfático. Se essa disseminação sistêmica vier a se tornar, clinicamente significativa ou evidente, dependeria da biologia tumoral de cada indivíduo e da capacidade de cada paciente de exercer uma resposta imune antitumoral eficaz (Stebbins et al., 2010).

Os resultados do tratamento dependem essencialmente do estágio inicial da doença, pois a maioria dos tratamentos sistêmicos (incluindo quimio, radio e imunoterapia) apresenta pouco impacto na sobrevida, com exceção do tratamento com altas doses de interferon-alfa, modalidade que vem apresentando resultados animadores. Os principais fatores prognósticos do melanoma cutâneo são a espessura do tumor, a presença de ulceração e a detecção de metástases ganglionares. A sobrevida de cinco anos também está relacionada ao número de linfonodos acometidos e à presença de acometimento micro ou macroscópico (Sapienza et al., 2004).

1.1.4. Câncer de mama, adenocarcinoma de rim e glioma

Além do melanoma maligno, outros tipos de neoplasias foram alvos neste estudo, como os cânceres de mama, renal e glioma.

O câncer de mama apresenta elevada incidência e mortalidade em todo o mundo, representando um grave problema de saúde pública (Guerra et al., 2005). A incidência dessa neoplasia vem aumentando nas últimas décadas, mesmo em áreas de tradicional baixa incidência, em grande parte devido às mudanças nos hábitos de vida e no perfil epidemiológico da população. Vários países desenvolvidos têm conseguido, apesar desse aumento na incidência, reduzir a sua

mortalidade, através de um diagnóstico mais precoce e de um tratamento mais eficaz (Paulinelli et al., 2003). Este é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Cerca de 1,4 milhões de casos novos dessa neoplasia foram esperados para o ano de 2008 em todo o mundo, o que representa 23% de todos os tipos de câncer. Em 2012, esperam-se, para o Brasil, 52.680 casos novos de câncer da mama, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2012).

O carcinoma de células renais, que representa a terceira neoplasia genito-urinária mais frequente, vem apresentando aumento da incidência anual nos últimos 20 anos, determinando um risco de ocorrência do carcinoma renal a partir dos 40 anos de 1,34% e risco de morte superior a 0,5%. A sobrevida destes pacientes depende da extensão da doença no momento do diagnóstico, existindo outros fatores prognósticos bem definidos na evolução do carcinoma renal, como arquitetura sarcomatóide, grau histológico nuclear, o tamanho do tumor e a presença de invasão microvascular intratumoral. Há 20 anos os casos de carcinoma renal não ultrapassavam 5% do total. Atualmente, graças ao uso rotineiro de técnicas radiológicas não-invasivas, como a ultrassonografia e a tomografia computadorizada, houve um aumento acima de 30% no diagnóstico precoce. Estes tumores frequentemente são pequenos e encontrados após exames de rotina e avaliação de outras doenças (Dall'Oglio et al., 2004).

Os gliomas são os mais frequentes tumores cerebrais primários em adultos, são malignidades debilitantes que são derivados de células neuroepiteliais que surgem a partir da transformação de astrócitos e precursores gliais (Kim et al., 2002; Dhandapani et al., 2007). Apesar de excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, a sobrevivência é modestamente prolongada e pacientes com glioblastoma têm uma sobrevida média aproximada de 12 meses (Dhandapani et al., 2007) com uma taxa de sobrevivência menor que 6% após 24 meses, apesar dos avanços em neurocirurgia e tratamento agressivo com fármacos e radiação (Lu et al., 2004). Para glioblastomas, nem a cirurgia nem radioterapia, mesmo combinado com a quimioterapia são capazes de atingir a longo prazo o controle dessas células tumorais (Nusser et al., 2002). A barreira hemato-encefálica restringe e regula a entrega de agentes quimioterápicos. Portanto, é necessário desenvolver agentes altamente permeáveis que cruzem a barreira para o tratamento quimioterápico de pacientes com glioma maligno (Ku et al., 2011).

1.2. MECANISMOS CELULARES RELEVANTES NA TUMORIGÊNESE

Em condições fisiológicas normais o corpo humano mantém a homeostase através da eliminação de estruturas celulares danificadas, materiais indesejados, remoção de células velhas e células em locais indesejados. A homeostase é realizada de uma maneira geneticamente programada pela apoptose. Células cancerosas são capazes de evitar a apoptose e crescer de uma forma rápida e descontrolada, somada a proliferação desregulada, que é uma das principais características de tumorigênese (Gupta et al., 2010).

1.2.1. Apoptose

A morte celular apoptótica, um evento programado durante o desenvolvimento ou consequência final de eventual contaminação tóxica ou patológica parece envolver um número relativamente limitado de vias de execução. Isso reflete a evolução de uma sequência ordenada de eventos, talvez convergentes em vias finais comuns, que são usados para eliminar células indesejáveis ou danificadas. Em muitos casos, a execução ordenada desse programa de morte leva a alterações morfológicas e bioquímicas típicas que têm sido denominadas de apoptose. A apoptose, também conhecida como morte celular programa, opõe-se a outra modalidade de morte celular ocasionada por lise celular acidental (necrose). No entanto, evidências sugerem que as duas formas distintas de morte celular possuem características semelhantes, no que diz respeito à sinalização e à fase de progressão inicial (Leist e Nicoretta, 1997).

Quando a intensidade do dano é muito elevado e/ou quando a geração de ATP é deficitária, as células falham ao executar as mudanças ordenadas que se seguiriam no processo apoptótico. Em seguida, a lise das células por necrose ocorre, antes dos processos que a conduziriam à condensação nuclear e exposição de moléculas na superfície da membrana pudessem ser concluídos (Leist e Nicoretta, 1997).

Na apoptose, ou morte celular programada, ocorre a condensação do núcleo, a célula retrai, formam-se corpos apoptóticos, os quais são fagocitados e digeridos por células especializadas, os macrófagos, de forma rápida e controlada (Alberts et al., 2010). Somada à sua importância no processo de desenvolvimento embrionário, a apoptose contribui para o controle de tumores, na regulação de populações de

células do sistema imunológico e na homeostase dos tecidos (Muzitano e Costa, 2006).

O processo apoptótico pode ser deflagrado por duas vias distintas: uma é mediada por receptores de morte celular na superfície da célula, denominado via extrínseca; a outra é mediada pela mitocôndria, denominada como via intrínseca. Em ambas as vias, as cisteínas aspartil proteases (caspases) são ativadas e clivam os substratos celulares de morte, levando a alterações bioquímicas e morfológicas que são características da apoptose (Fig. 1) (Igney e Krammer, 2002). A via extrínseca é iniciada obrigatoriamente por estímulos extracelulares, por meio da ativação de receptores específicos presentes na superfície celular. Por outro lado, a via intrínseca é desencadeada por uma ampla série de estímulos de morte que são gerados a partir do interior da célula, em resposta à auto-deteção de anormalidades, incluindo danos ao DNA, desequilíbrios na transdução de sinais, ação de oncogenes, insuficiência em fatores de sobrevivência ou aumento de fatores de hipóxia, sendo que a inativação desta via geralmente é considerada como indicação de câncer. (Evan e Littlewood; Thornberry e Lazebnik, 1998; Riedl e Shi, 2004).

A apoptose é um programa de suicídio celular, que foi conservado através da evolução. Indução de apoptose, portanto, é uma propriedade altamente desejável para um quimioterápico, bem como para uma nova estratégia de quimioprevenção para o controle do câncer. Recentemente, o interesse concentrou-se na manipulação de agentes com características vinculadas aos processos apoptóticos no tratamento e prevenção de câncer. Assim, muitos esforços tem sido direcionados na busca de compostos puros ou de extratos de plantas que sejam capazes de induzir ou modular positivamente o seu mecanismo de ação (Ghobrial et al., 2005).

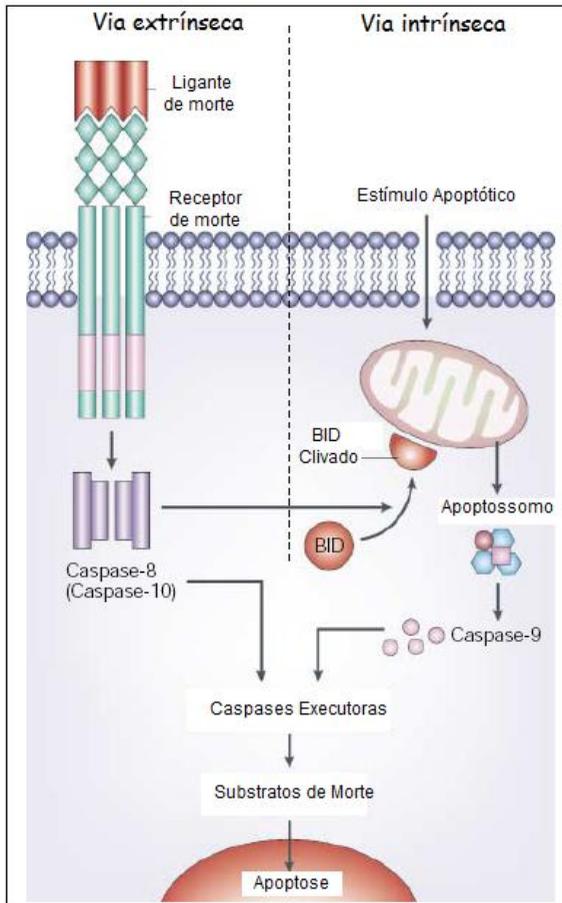


Figura 1. As duas principais vias de sinalização de apoptose. A apoptose pode ser iniciada por duas vias alternativas: ou através de receptores de morte na superfície da célula (via extrínseca) ou através de mitocôndrias (via intrínseca). Em ambas as vias, a indução da apoptose conduz à ativação de uma caspase iniciadora: caspase-8 e, possivelmente, caspase-10 para a via extrínseca; e caspase-9, o qual é ativado o apoptossomo, para o via intrínseca. As caspases iniciadoras, em seguida, ativam caspases executoras. Estas caspases ativadas clivam os substratos celulares de morte, resultando em apoptose. Existe um *cross-talk* entre esses dois caminhos. Por exemplo, a clivagem de BID, membro da família Bcl-2, por caspase-8, ativa a via mitocondrial após a indução de apoptose através de receptores de morte e pode ser usado para amplificar o sinal apoptótico (adaptado de Igney e Krammer, 2002).

Devido a utilização constante de muitos fármacos antitumorais convencionais usados em tratamentos quimioterápicos, as células desenvolvem resistência, além desses provocarem muitos efeitos colaterais. Como alternativa, os compostos de origem natural vem sendo adotados como eficazes para o tratamento do câncer como, por exemplo, os compostos fenólicos, que exercem importante ação antioxidante e pró-apoptóticas (Kilani-Jaziri et al., 2009).

1.2.2. Proliferação celular

A proliferação excessiva de células epiteliais e angiogênese são as principais características da iniciação e crescimento inicial de cânceres epiteliais primários (Kalluri e Weinber, 2009).

Em células normais, a proliferação é regulada por um equilíbrio delicado entre os sinais de crescimento e sinais anticrescimento. As células tumorais, porém, adquirem uma capacidade de gerar seus próprios sinais de crescimento e tornarem-se insensíveis aos sinais anticrescimento. O seu crescimento é controlado por reguladores do ciclo celular na fase G1 / S, na fase S, e durante as fases G2 / M do ciclo celular. Um conjunto preciso de proteínas chamadas ciclinas e quinases dependentes de ciclina (CDKs) controlam a progressão de eventos do ciclo celular. Algumas ciclinas são necessárias para ativar CDKs, entretanto, outras são necessárias para inibição (CKIs) tais como, p21, p27 e p57, evitando a progressão do ciclo celular (Gupta et al., 2010).

Cada uma das vias que restringe a resposta proliferativa em células normais é perturbada na maioria dos cânceres, onde uma classe de mutações são necessárias para o desenvolvimento do tumor, sendo que os requisitos obrigatórios iniciais para ativar esse mecanismo são os sinais mitogênicos. Tais mutações podem envolver a produção autócrina de um mitógeno normalmente limitante, como mutações em receptores tirosina quinases (RTKs) ou transdutores de sinais da proteína-G, como Ras, ou mutações que afetam uma das muitas moléculas de sinais intermediários de transdução que transmitem informações mitogênicas para o alvo intracelular. A segunda classe de mutações de desregulação no crescimento compreende aqueles onde o principal alvo do fim de *checkpoint* G1 do ciclo celular é regulado pela proteína retinoplastoma (pRb) (Weinberg, 1995). Defeitos nesta via, que podem ocorrer em todos os tipos de cânceres humanos, incluem a supressão do gene Rb e desregulação das CDKs que fosforilam e, funcionalmente, inativam a pRB, através da ativação direta de CDKs ou através da perda genética dos seus inibidores (Evan e Vousdent, 2001).

Outra frequente lesão proliferativa que tem o efeito de desregulação do ciclo celular é a expressão descontrolada de Myc. Em células normais, c-Myc é induzida após o estímulo do fator de crescimento, que é constitutivamente elevada em células transformadas. Cerca de 70% dos tumores possuem uma superexpressão desta proteína (Nilsson e Cleveland, 2003). Além disso, a c-Myc atua tanto como um ativador transcricional quanto repressor (Gordan et al., 2007).

Os esteróides também interferem na proliferação celular onde atuam através da interação dos seus receptores com sequências de DNA específicas que regulam a expressão de genes necessários para a multiplicação de células e a produção de fatores de crescimento pelas células alvo (Migliaccio et al., 2000).

Além disso, a proteína p53 também modula vários processos biológicos importantes como o crescimento e a morte celular, sendo regulada pela fosforilação, acetilação e ubiquitinação. Mutações do gene p53 podem levar tanto à alterações quanto a perda da atividade da p53, permitindo a proliferação celular aberrante com a consequente transformação celular maligna. Devido a sua importância em processos tumorais, cientistas vêm desenvolvendo várias estratégias eficazes para o tratamento do câncer através da melhora da função da p53 e da sua estabilidade (Bai e Zhu, 2006).

Tanto as células cancerosas quanto as células-tronco compartilham a capacidade de se dividirem continuamente sem sofrer senescência. Além disso, evidências suportam a existência de 'células tronco-cancerosas' que podem ser importantes na gênese de certos tipos de cânceres, incluindo leucemia e tumores sólidos. Devido à importância destas células em estados normais e fisiopatológicas, existe um interesse crescente em elucidar os mecanismos que conferem as propriedades únicas destas células (Hwang e Mendell, 2006).

1.2.3. Adesão celular

Além de sua principal função de aderência, as moléculas de adesões celulares modulam as vias de transdução de sinal, interagindo com moléculas, tais como, receptores tirosina quinase e vias de sinalização de componentes Wnt e família Rho de GTPases. As vias de sinalização podem modular a função de moléculas de adesão, alterando as interações entre as células e o seu ambiente. Evidências recentes indicam que tais processos têm um papel crucial na progressão tumoral, em particular durante a invasão e metástase (Cavallaro e Christofori, 2004). Para que ocorra a indução de uma adesão focal são

necessários o desencadeamento de processos de sinalização. Isso envolve o agrupamento de integrinas, que por si só pode provocar uma resposta de sinalização, mas não uma adesão. Para que ocorra a adesão é necessário que o citoesqueleto, entre outras moléculas sinalizadoras, se liguem também à integrina (Geiger et al., 2001).

As adesões celulares entre elementos da matriz extracelular (MEC) são formadas em todos os tipos celulares aderentes, entretanto, a sua morfologia, tamanho e distribuição podem ser heterogêneas. Essas adesões possuem duas peças fundamentais: as integrinas, que interagem com o citoesqueleto de actina no interior da célula; e ligantes extracelulares, que ancoram essas adesões, incluindo, fibronectina, vitronectina e diferentes tipos de colágenos. O tipo de adesão clássica são as adesões focais e suas variantes incluem, adesão fibrilar, complexo focal e podossomos (Geiger et al. 2001).

Actina é uma das proteínas mais abundantes do citoesqueleto e é amplamente expressa em quase todos os tipos de células eucarióticas. Mudanças na organização do citoesqueleto de actina são essenciais em vários processos celulares, tais como, reorganização da morfologia, motilidade, cicatrização e morfogênese tecidual. Muitos destes processos requerem um comportamento dinâmico do citoesqueleto de actina, que envolve a polimerização e despolimerização de filamentos de actina os quais mantêm sua capacidade para reorganizar rapidamente o citoesqueleto quando submetido a sinais externos. Estes incluem estímulos quimiotáticos, fatores de crescimento, adesão à MEC e agentes que afetam as vias de transdução de sinais (Kouloukoussa et al., 2004).

Em processos de metástase, é essencial que ocorra uma dinâmica reestruturação do citoesqueleto de actina. Além disso, em um processo de transição epitélio-mesenquimal, ocorre a alteração dos pontos de adesão das células do tumor primário para que ele possa adquirir capacidade migratória invasiva em outros tecidos ou órgãos (Yilmaz E Christofori, 2009). As transições epitélio-mesenquimal são essenciais para o desenvolvimento embrionário normal e para a progressão de células tumorais não invasivas em fenótipos malignos metastizados, sendo que muitos genes e proteínas que reconhecidamente desempenham um papel essencial durante o desenvolvimento embrionário, apresentam-se mutados em células tumorais (Vernon e Labonn, 2004).

Células tumorais em estágios iniciais mantem-se aderidas ao epitélio normal através da proteína E-caderina, e através de uma superexpressão de reguladores da transição epitélio-mesenquimal, como

TWIS, Snail e SIP1 a E-caderina é bloqueada, ativando a capacidade de invasão dessas células (Kang e Massagué, 2004). Em vários tipos de carcinomas humanos, a expressão da E-caderina é perdida numa fase precoce do desenvolvimento do tumor, fazendo com que os tumores resultantes apresentem um fenótipo mesenquimal essencialmente permanente, isto é, o fenótipo de células que tenham passado através uma transição epitélio-mesenquimal irreversível (Yang e Weinberg, 2008).

Os processos moleculares subjacentes a essas alterações celulares não estão muito bem elucidados e estruturas envolvendo adesões focais, como, por exemplo, lamelipódios e podossomos, requerem mais estudos para uma melhor caracterização funcional e molecular dessa microestrutura (Yilmaz E Christofori, 2009).

1.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PRINCÍPIOS ATIVOS VEGETAIS – ÊNFASE EM CONSTITUINTES DO MILHO (*ZEA MAYS*)

1.3.1. Importância dos compostos naturais para a saúde

Uma análise do número de agentes quimioterápicos e suas fontes indicam que mais de 60% dos medicamentos aprovados são derivados de compostos naturais (Rocha et al., 2001). Alguns exemplos são significativos, como o alcalóide da vinca (vincristina) extraído de *Catharanthus roseus* (cuja administração foi responsável por um aumento na taxa de recuperação de pacientes portadores de leucemia); ou, tendo como alvo terapêutico o sistema reprodutor, alil-cisteína e etoposídeos, derivados de *Podophyllum peltatum* (compostos eficazes no tratamento de câncer de testículo, quando utilizado em combinação com bleomicina e cisplatina), bem como o paclitaxel, taxano derivado de *Taxus brevifolia* (eficaz no tratamento do câncer de mama e de ovário) (Gurib-Fakin, 2005).

Em uma condição normal, os radicais livres e espécies reativas de oxigênio encontram-se em concentrações baixas, porém, mensuráveis. As respectivas concentrações são determinadas pelo equilíbrio entre a taxa de produção e a respectiva taxa de redução por vários compostos antioxidantes e enzimas (Pariahr et al., 2008). Os radicais livres promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA. Se a cadeia do DNA é quebrada, pode ser reconectada em outra posição alterando, assim, a

ordem de suas bases. Esse é um dos processos básicos da mutação e o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogenese (Barreiros et al., 2006). Devido as suas propriedades antioxidantes, os compostos carotenóidicos podem neutralizar espécies reativas de oxigênio, reduzir dano oxidativo ao DNA e mutações genéticas, bem como, melhorar as funções do sistema imunológico (Zhang et al., 1999).

Os compostos fenólicos, como o tocoferol, vêm demonstrando, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, um rico efeito antioxidante e inibição da proliferação celular em linhagens B16 somado a ação de indução à apoptose (Malafa et al., 2002; Prasad et al., 2003). Gysin e colaboradores (2002) também sugerem potencial antitumoral deste polifenol para linhagens neoplásicas de câncer de próstata e gástrico.

No que concerne às atividades biológicas dos compostos fenólicos, a sua proeminente capacidade antioxidante é bem pontuada por Seo e colaboradores (2003), onde estes compostos poderiam prevenir ou encerrar reações de oxidação pela eliminação de radicais, que em excesso, podem desencadear patologias como o câncer e doenças cardiovasculares. Uma segunda propriedade biológica atribuída aos compostos fenólicos é a de quelar íons metálicos (Grune et al., 2005).

Os compostos fenólicos, incluindo em sua categoria, flavonóides, estão presentes em todas as plantas e tem sido amplamente estudados em cereais, leguminosas, nozes, azeite, legumes, frutas, chá e vinho tinto. Muitos compostos fenólicos (como o ácido gálico, cafeico e ferúlico) com propriedades antioxidantes, têm demonstrado efeitos positivos na terapêutica da tumorigênese (Kris-Etherton et al., 2002; Reddivari et al., 2007). Pesquisas têm mostrado que dietas ricas nesses compostos podem estar associadas à diminuição do risco de diversas doenças crônicas, incluindo câncer (Yi et al., 2005). Devido a sua influência na qualidade dos alimentos, estes compostos apresentam um elevado potencial antioxidante no sistema biológico através da neutralização dos radicais livres gerados no organismo, que estão associados a diversas doenças como câncer e doenças cardiovasculares (Bianchi e Antunes, 1999; Soares, 2002). Segundo Muzitano e Costa (2006) os flavonóides representam uma classe de substâncias com capacidade de ativar caspases. A flavona luteolina, isolada de *Lonicera japonica*, foi capaz de induzir apoptose em células de carcinoma de pulmões, linhagens CH27.

1.3.2. Bioatividade de carotenóides

Os carotenóides, que são tetraterpenos (40 átomos de carbono), constituem um grupo de pigmentos lipossolúveis, encontrados em todos os tipos de plantas. Os seres humanos são incapazes de sintetizá-los e sua ingestão diária deve acontecer a partir de fontes alimentares, como frutas e legumes (Kuhnen et al., 2009). Sua função no organismo humano está relacionada à eliminação de radicais livres, atividade antioxidante e anticarcinogênica, e regulação da proliferação celular (Dulinska et al., 2005).

Os carotenóides estão amplamente distribuídos no reino vegetal, onde desempenham importante papel, a exemplo de seu envolvimento no processo de fotossíntese, atuando na absorção da luz e protegendo, concomitantemente, o aparato celular contra danos causados pela radiação solar (Walton e Brown, 1999).

Estes pigmentos são responsáveis pelas cores, amarela, alaranjada e vermelha dos tecidos de vegetais. Quimicamente, os carotenóides correspondem a uma estrutura tetraterpênica (apresentando 40 átomos de carbono) que pode ser modificada para originar mais de 600 compostos, caracterizados por um comportamento altamente hidrofóbico (Bartley e Scolnik, 1995; Grune et al., 2005; Howitt e Pogson, 2006).

Aproximadamente 50 tipos de carotenóides são reconhecidos como relevantes na nutrição humana. Desse total, pelo menos 40 deles atuam como precursores na via da biossíntese de retinóides, que são formas bioativas da vitamina A (Grune et al., 2005). De acordo com estes autores, as xantofilas (oxicarotenóides), luteína e zeaxantina, são os principais carotenóides encontrados em grãos de milho, contudo, não fazem parte da classe de compostos precursores da vitamina A (sendo não pró-vitamina A).

Os carotenóides constituem um grupo importante de antioxidantes relativamente abundantes em espécies de milho. Os carotenos são hidrocarbonetos, tais como β -caroteno e licopeno, enquanto xantofilas são derivados oxigenados dos carotenos e incluem os compostos luteína, β -criptoxantina e zeaxantina. Alguns carotenóides também são precursores da vitamina A. Eles têm sido relacionados à inibição da transformação neoplásica e imunoproteção. O composto β -caroteno (Fig. 2 - A) tem sido associado a uma melhor resposta imune através do aumento do percentual de leucócitos encontrados no sangue periférico e supressão de bloqueio de linfócitos e linfócitos T *helper* causados por exposição aos raios UV. Luteína e

zeaxantina (Fig. 3 B e C) são armazenados nos olhos quando absorvidos por dietas e têm sido associados com risco reduzido de desenvolvimento de catarata relacionada à idade e degeneração macular. Certos carotenóides, incluindo β -caroteno, podem ativar expressão de genes para proteínas que são necessárias para comunicação celular. A atividade da vitamina A é importante para a pele saudável, ossos, e sistemas gastrointestinal e respiratório. Eles também desempenham um papel na visão clara e previnem a cegueira noturna (Bendich, 1989; Kurilich e Juvik, 1999).

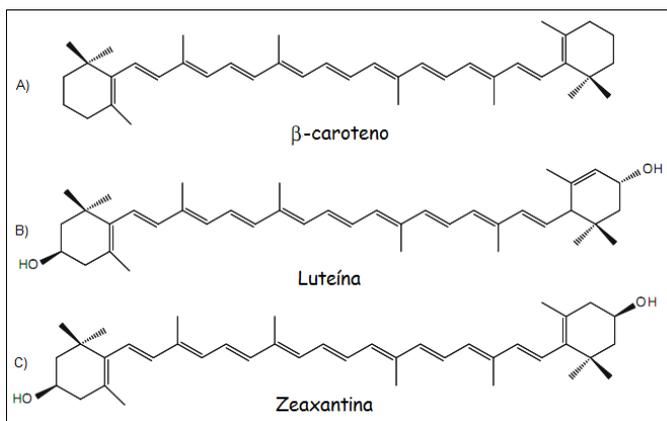


Figura 2. Estrutura química de compostos carotenóides derivados do milho (adaptado de Kuhnen e colaboradores, 2009)

Apesar dessas evidências, os mecanismos de ação dos carotenóides ainda não estão claros. Entre os 620 carotenóides que já foram identificadas na natureza, cerca de 10% são nutricionalmente ativos como precursores de vitamina A, entretanto, sabe-se que os carotenóides também possuem outras propriedades biológicas, não relacionadas à esses níveis. Uma grande proporção de compostos possui atividade antioxidante e essas moléculas também podem ser importantes para melhora da resposta imune, comunicação via junções *gap* (Zhang et al., 1991) e regulação do crescimento celular (Palozza et al., 2004).

1.3.3. Bioatividade de compostos fenólicos

Diferentemente dos compostos carotenóidicos, que possuem propriedades lipossolúveis (Kuhnen et al., 2009), grande parte dos

compostos fenólicos (Fig. 3) são apolares. Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também se ligar entre si ou com outros compostos devido a sua flexibilidade conformacional Karna et al., 2011). Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo. A capacidade desses compostos de liberação de um átomo de hidrogênio é um dos processos fundamentais responsáveis pela limpeza de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças (Soares, 2002).

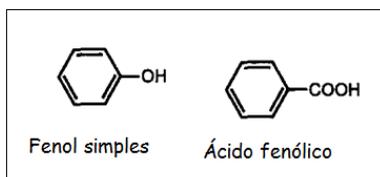


Figura 3. Estrutura química de fenol simples e ácido fenólico (adaptado de Bravo, 1998).

Os polifenóis estão presentes em quase todos os alimentos de origem vegetal (cereais, legumes, frutas, nozes, etc) e derivados (vinho, sidra, cerveja, chá, cacau, etc.), sendo desta forma, uma parte integrante na dieta humana (Bravo, 1998). Por décadas, os polifenóis têm se tornado alvo de interesse dos cientistas porque eles são essenciais para a fisiologia vegetal, participam nas relações ecológicas do vegetal com o meio ambiente e estão relacionados à função alelopática, proteção da planta contra radiação UV e na proteção contra insetos, herbívoros e patógenos. Internamente influenciam diversos processos metabólicos essenciais à planta, como o crescimento vegetal, germinação de sementes, e nos mecanismos de transdução dos sinais luminosos na resposta fototrópica das plantas (Donaduzzi et al., 2003).

Estes compostos têm sido estudados para fins taxonômicos ou para se verificar a adulteração de produtos alimentares, através da quantificação de compostos. Eles têm diversas aplicações industriais, tais como na produção de tinta, papel, e cosméticos e na indústria de alimentos como aditivos (como corantes naturais e conservantes) (Pansera et al., 2003). Além disso, alguns compostos fenólicos, os

flavonóides, têm aplicações como antibióticos, anti-úlceras e como agentes anti-inflamatórios, bem como no tratamento de doenças tais como hipertensão, distrofia muscular, alergias e hipercolesterolemia. A maioria dos interesses nutricionais em compostos polifenólicos esteve ligado aos efeitos deletérios causados pela capacidade de certos polifenóis se vincularem a macromoléculas precipitadas, como proteínas, enzimas e carboidratos, aumentando a digestibilidade dos alimentos. O interesse mais recente em relação aos compostos fenólicos está intimamente ligado a sua ação antioxidante com potenciais efeitos sobre a saúde humana (Bravo, 1998).

Segundo Kampa e colaboradores (2004), ácidos fenólicos (Fig. 4.) e seus compostos puros apresentaram atividade antioxidante na linhagem T47D (câncer de mama humano). Doses dependentes destes compostos isolados inibiram crescimento celular e a produção de óxido nítrico. Somado a este cenário, a indução da apoptose também foi observada, através da via extrínseca Fas/FasL (Yang et al., 1998)..

Extratos ricos em ácidos fenólicos e compostos puros de uva, inibiram crescimento de carcinomas como MCF-7, A-437, CRL-1739, sendo que o composto isolado de ácido gálico promoveu importante nível de indução de apoptose em células tumorais de próstata da linhagem DU-145 e inibição no crescimento celular (Veluri et al., 2006). Locatelli e colaboradores (2009), demonstraram que o ácido gálico também apresentou inibição no crescimento celular e indução de apoptose na linhagem B16F10 e, particularmente, que a adesão celular, nessa mesma linhagem, também foi interrompida.

1.3.4. Bioatividade de constituintes químicos do milho

O milho (*Zea mays* L.) é provavelmente uma das espécies cultivadas com maior diversidade genética. Já foram identificadas cerca de 300 raças e milhares de variedades que são cultivadas em diferentes condições ambientais (Coimbra et al., 2010). Os países em desenvolvimento, como o Brasil, ainda mantém em algumas regiões uma diversidade interessante de genótipos de milho, ou seja, variedades crioulas, que são adaptadas às condições locais (Kuhnen et al., 2011).

O germoplasma de milho é constituído por raças crioulas (locais), populações adaptadas e materiais exóticos introduzidos, sendo caracterizado por uma ampla variabilidade genética (Araujo e Nass, 2002). Em um número significativo de casos, a cultura do milho é o modo de subsistência para muitos pequenos agricultores no sul do Brasil. No entanto, em todo o mundo as populações de milho

crioulo, ainda pouco conhecidas, têm sido ameaçadas de extinção devido ao baixo valor agregado de matérias-primas do milho e do baixo retorno econômico obtido por agricultores (Kuhnen et al., 2011).

De maneira geral, as populações crioulas são menos produtivas que os cultivares comerciais. Entretanto, essas populações são importantes por constituírem fonte de variabilidade genética que podem ser exploradas na busca por genes tolerantes e/ou resistentes aos fatores bióticos e abióticos (Souza et al, 2009). Para compensar tais fragilidades e manter a produtividade em níveis aceitáveis, os agricultores utilizam doses crescentes de agrotóxicos, adubos químicos, irrigação e mecanização; aumentando os custos de produção e os danos ao ambiente (Lemos, 2010).

O sistema de agricultura familiar valoriza a variabilidade genética das espécies, mantendo em cultivo diversas variedades, como resposta às variações nas condições ambientais em uma mesma área e também pela possibilidade de diminuição de perdas relacionadas à instabilidade do clima, ou ainda às demandas de mercado (Lemos, 2010). O resgate das variedades e sua conservação são de fundamental importância para a manutenção da variabilidade da espécie e para conservar esses genótipos em local protegido contra a possibilidade de cruzamento (introgressão) com cultivares comerciais tradicionais ou transgênicos, o que ocorre com frequência nas pequenas propriedades ou comunidades indígenas, devido à introdução de genótipos melhorados com maior potencial produtivo (Coimbra et al., 2010). Atualmente, é crescente o uso de variedades tradicionais como fonte de alelos para a restauração da diversidade genética de espécies agrícolas, principalmente em função de sua maior resistência a agentes estressores bióticos e abióticos. Tal aspecto subsidia a avaliação de seu potencial como fonte de compostos de interesse nutricional e com efeitos benéficos à saúde humana. A utilização de partes do milho de menor aproveitamento, como as folhas, pode gerar novas alternativas de renda, primeiramente, porque elas são produzidas em grande quantidade, em paralelo a produção de grãos especificamente. Em segundo lugar, porque ainda não possuem uma finalidade comercialmente rentável, sendo considerado ainda somente um resíduo agrícola, usualmente utilizado tão somente em cobertura do solo e na preparação de forragem para os ruminantes (Lemos, 2010)



Figura 4. Variedade crioula de milho Rajado 8 Carreiras (*Zea mays*) (adaptado de Lemos, 2010).

Com relação aos tecidos do milho (Fig. 4.), vêm sendo relatadas diversas propriedades farmacológicas de interesse, relacionadas aos polifenóis. Além do mencionado efeito antioxidante, foram descritas outras atividades, tais como: antitumoral (Zielinski, 2003; Jeong et al., 2004), antiproliferativa, antiangiogênica (Rao et al., 1993; Rodrigues-caso et al., 2003; Seeram et al., 2005), antimutagênica e anticarcinogênica (Yang et al., 2001; Orsolich et al., 2003).

Estudos efetuados para avaliação da atividade farmacológica das antocianinas demonstram que, além da ação antioxidante (Tsuda et al., 1996; Gabrielska et al., 1999), são reportadas as atividades antimutagênica (Yoshimoto et al., 1999) e antitumoral (Pedreschi e Cisneros-Zevallos, 2005). Foi também relatado que pigmentos extraídos de grãos de milho de coloração roxa estão associados a um decréscimo na carcinogênese de cólon retal induzida em ratos (Hagiwara et al., 2001). Segundo Yi e colaboradores (2005) a antocianina diminui a proliferação de linhagens tumorais de cólon humano (HT-29) em aproximadamente 50%. Foi observado um aumento na fragmentação do DNA, notadamente uma característica fisiológica da apoptose.

Resultados obtidos por Reddivari e colaboradores (2007) sugerem que, linhagens celulares tumorais de próstata humana (LNCaP e PC-3) submetidos a tratamentos com compostos antociânicos apresentaram efeitos citotóxicos envolvendo a indução de apoptose em vez de necrose através de vias dependentes e independentes de caspases.

Estudos clínicos desenvolvidos com administração de retinóides presentes no milho (no caso, formas ativas da vitamina A não sintetizadas pelo organismo humano) indicam que essas substâncias se mostram eficazes como parte da terapêutica antitumoral, pois embora esses compostos não tenham sido caracterizados diretamente como

fármacos citotóxicos, sabe-se que podem exercer potente efeito modulador nas células (Agadir et al., 1997). Esses autores sugerem ainda que os retinóides atuem reprogramando, por meio da regulação da transcrição gênica, os eventos de diferenciação celular tipicamente descontrolados nas células tumorais.

O importante trabalho conduzido por Hashimoto (2003) relata a remissão completa de quadros de leucemia (induzida por ativação experimental da diferenciação celular) após o tratamento com retinóides. Adicionalmente, foram registradas outras ações protetoras ou terapêuticas exercidas por carotenos (compostos precursores de retinóides) e por xantofilas (oxicarotenos) a exemplo da luteína e zeaxantina (Wrona et al., 2001; Hosocawa et al., 2004; Sharoni et al., 2004; Bertram e Vine, 2005). Sendo os carotenóides mais abundantes no milho, a luteína e a zeaxantina (Aman et al., 2005) promoveram inibição do crescimento tumoral e concomitante estímulo à função imune (Chew e Park, 2004). Faz-se também digno de nota, que a presença de luteína na dieta de ratos inibiu o crescimento de tumores nesses animais, ao modular seletivamente a apoptose e inibir a angiogênese (Chew et al., 2003).

2. JUSTIFICATIVA

Até o momento, muitos fármacos antitumorais convencionais usados em tratamentos quimioterápicos produziram resistência e efeitos colaterais, e os compostos de origem natural vem sendo adotados como uma alternativa eficaz para o tratamento do câncer (Kilani-Jaziri et al., 2009) como, por exemplo, os extratos derivados de milho crioulo.

O milho crioulo, ainda pouco conhecido, tem sido ameaçado de extinção devido ao baixo valor agregado de matérias-primas e do baixo retorno econômico obtido por agricultores (Kuhnen et al., 2011). A utilização de partes do milho de menor aproveitamento, como as folhas, podem gerar novas alternativas de renda, primeiramente, porque elas são produzidas em grande quantidade, em segundo lugar, porque ainda não possuem uma finalidade comercialmente rentável (Lemos, 2010).

Em razão das fortes evidências quanto à presença, nos tecidos de *Zea mays*, de compostos que exercem ação antitumoral, aliado à relativa escassez de dados dos respectivos mecanismos de atividade e possíveis alvos biológicos dos princípios bioativos da variedade crioula de milho, o presente projeto é parte de uma estratégia de investigação científica multidisciplinar com a qual pretendeu-se: avançar na obtenção de informações sobre efeitos de compostos carotenóidicos e fenólicos na viabilidade celular (com base na avaliação da citotoxicidade) e em processos que determinem o comportamento de linhagens neoplásicas, tais como, morte, proliferação e adesão celular.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar *in vitro* a citotoxicidade de extratos obtidos de *Zea mays*, bem como de compostos puros em linhagens neoplásicas e linhagem não neoplásica, além da ação dos extratos sobre mecanismos celulares na linhagem de melanoma.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Detectar e quantificar os compostos presentes nos extratos de carotenóides e de polifenóis através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);

Avaliar a citotoxicidade/viabilidade dos extratos de carotenóides e de polifenóis, bem como aos compostos puro β -caroteno, luteína, ácido gálico, ácido cafeico e ácido ferúlico expostos as linhagens celulares de glioblastoma humano (U87-MG), carcinoma de mama humano (MCF-7), adenocarcinoma de rim humano (786-O), melanoma de camundongo (B16F10) e fibroblasto de camundongo (L929), por meio do ensaio colorimétrico do MTT (leitor de placas);

Determinar o efeito do tempo de exposição (12, 24, 36 e 48 h) aos extratos de carotenóides e de polifenóis e dos compostos puros β -caroteno, luteína e ácido gálico sobre a viabilidade das células da linhagem B16F10, por meio do ensaio colorimétrico do MTT (leitor de placas);

Avaliar por meio de microscopia óptica a morfologia de células da linhagem B16F10 expostas aos extratos de carotenóides e de polifenóis;

Analisar qualitativamente e quantitativamente o efeito dos extratos de carotenóides e de polifenóis sobre a proliferação celular da linhagem B16F10 por meio da técnica de imunocitoquímica e incorporação de BrdU;

Investigar o efeito dos extratos de carotenóides e de polifenóis sobre a capacidade de formação de colônias nas células da linhagem B16F10 (ensaio de clonogenicidade);

Investigar qualitativamente e quantitativamente a ocorrência de morte celular e/ou eventuais danos em células da linhagem B16F10 produzidos por exposição aos extratos de carotenóides e de polifenóis, com auxílio de biomarcação diferencial com Anexina-V FITC[®] e iodeto de propídio, por meio da técnica de citometria de fluxo;

Avaliar por meio de técnica imunocitoquímica, possíveis alterações no citoesqueleto de células da linhagem B16F10, com ênfase na formação de pontos de adesão focal, após os tratamentos com os extratos de carotenóides e de polifenóis.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COLETA DO TECIDO FOLIAR

Foi realizada a coleta de folhas de uma variedade crioula de milho Rajado 8 Carreiras (*Zea mays*) a partir de um cultivo estabelecido na Fazenda da Ressacada da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis/SC. As coletas foram realizadas no mês de janeiro de 2011. Para a coleta das folhas, 20 indivíduos da variedade crioula Rajado 8 Carreiras foram utilizados, sendo coletadas a segunda e a terceira folha a partir do ápice do colmo de cada indivíduo.

4.2. ANÁLISES FITOQUÍMICAS

As análises fitoquímicas foram realizadas no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV- Departamento de Fitotecnia/CCA/UFSC), coordenado pelo Prof. Dr. Marcelo Maraschin, - membro da equipe do presente projeto) em parceria com o Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (NEAbio), do CCA/UFSC, o qual possui um acordo de cooperação e transferência dos recursos genéticos com os representantes legais dos agricultores familiares daquela região, ASSO (Associação dos Pequenos Agricultores Plantadores de Milho Crioulo Orgânico e Derivados) e SINTRAF (Sindicato dos Trabalhadores na Agricultura Familiar)

4.2.1. Obtenção e detecção de carotenóides

As folhas de milho foram secas em estufa com ar circulante (42°C) até peso constante. Após, foram trituradas na forma de pó em moinho de laboratório e armazenadas em tubo falcon em ultra-freezer à - 80°C. No momento do ensaio, foi pesado 0,1g de tecido foliar na forma de pó. O tecido foi macerado com uma solução de hexano:acetona (1:1 v/v), contendo 100 mg/L de di-terc-butil metil fenol (BHT). O extrato foi mantido em repouso por 30 min na ausência de luz e posteriormente, filtrado sob vácuo. O solvente foi evaporado em rotaevaporador (70 rotações por minuto (RPM), 40°C ≈ 30 min; Fisatom 802) e após, o extrato foi ressuspenso em 10 mL de hexano e 1000 µL de KOH 10% em metanol PA (em frasco âmbar e atmosfera modificada com N₂ gasoso) para saponificação (para a quebra de ácidos graxos). O extrato foi mantido em repouso a temperatura ambiente em ausência de luz por

8 h. A amostra foi lavada em funil de separação (4 x 100 mL de água ultra-pura) para a remoção do álcali e também dos compostos polares ainda presentes no extrato. A fração remanescente foi concentrada em rotaevaporador (70 RPM, 40°C ≈ 30 min) e ressuspensão em 5 mL de hexano. Após, foi submetida a varredura em espectrofotômetro (comprimentos de onda de 200 a 700 nm), utilizando-se cubetas de quartzo, para análise de purificação e determinação da concentração dos carotenóides totais (CaT) presente na amostra. O solvente foi removido em N₂ gasoso e a amostra seca foi armazenada em ultra-freezer à -80°C (Lemos, 2010, com modificações). Os valores de absorvância encontrados em 450 nm (média das leituras de 3 extrações/amostras) foram utilizados para determinar a concentração de CaT, segundo a equação de Lambert-Beer (Mínguez-Mosquera, 2007), como segue:

$$C = \frac{(\text{média Abs.} \times V \times 10.000)}{2.500 \times 100}$$

As amostras também foram avaliadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para identificação e quantificação dos compostos carotenóides. Alíquotas (10 µL) de amostra foram analisadas em um cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna C₁₈ (Vydac 201TP54, 250 mm x 4,6 mm Ø) e com um detector espectrofotométrico UV-visível operando em 450 nm. A eluição utilizou MeOH: acetonitrila (90:10, v/v) como fase móvel, fluxo de 1 mL/min e a identificação dos compostos de interesse (i.e., α-caroteno, β-caroteno, β-criptoxantina, luteína, zeaxantina) foi efetuada através da comparação com os tempos de retenção obtidos para amostras padrões, sob as mesmas condições experimentais. Para efeitos de cálculo do conteúdo dos compostos carotenóides, foi utilizada curva-padrão externa de β-caroteno e a integral dos picos correspondentes. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão de 3 injeções consecutivas (Morais et al., 2009). Para os ensaios *in vitro* a amostra foi ressuspensa em tetrahidrofurano (THF) (Palozza et al., 2006; Lakshminarayana, et al., 2010; com modificações) (ver item 4.2.4., fluxograma A).

4.2.2. Obtenção e detecção de polifenóis totais

As folhas de milho foram secas em estufa (42°C) até peso constante. Após, foram trituradas na forma de pó em moinho de laboratório e armazenadas em tubo falcon em freezer -80°C. No

momento do ensaio, foram pesados 0,15g de tecido foliar na forma de pó. Foi acrescentado metanol PA (10 mL) a 25 °C. Após repouso por 30 min na ausência de luz, o extrato foi filtrado sob vácuo. O solvente foi evaporado sob fluxo de N₂ gasoso e particionado através da adição de 25 mL de metanol PA e 75 mL de heptano PA. Após agitação em vórtex durante 10 s, o extrato foi mantido em repouso por 10 min e o sobrenadante foi descartado (fração contendo heptano PA). Esse procedimento foi repetido (2 x) e, em seguida, o solvente foi removido em rotaevaporador (70 RPM, 40°C ≈ 30 min) e a amostra foi ressuspensa em 5 mL de metanol PA. Uma alíquota foi retirada para determinar o teor de polifenóis totais (PFT) pelo método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2001, com modificações). As amostras foram submetidas a leitura em ELISA (Thermoplate). O solvente foi removido em N₂ gasoso e a amostra seca foi armazenada em ultra-freezer à -80°C. Os valores de absorbância encontrados em 750 nm (média das leituras de 3 extrações/amostras) foram utilizados para os cálculos de determinação de PFT, a partir de uma curva-padrão externa de ácido gálico.

As amostras também foram avaliadas em CLAE para identificação e quantificação dos PFT presentes nas folhas de milho. Alíquotas (10 µL) de extrato foram analisadas em cromatógrafo líquido equipado com coluna C₁₈ (Shim-Pack CLC-ODS, 25 cm x 4,6 mm Ø) e detector espectrofotométrico UV-visível (280 nm). A eluição utilizou H₂O: AcOH: η-BuOH (350:1:10, v/v/v) como fase móvel, com fluxo de 0,8 mL/min e a identificação dos compostos de interesse (i.e., ácidos gálico, ferúlico, cafeico) foi efetuada através da comparação com os tempos de retenção e co-cromatografia de amostras padrões (Sigma), sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos PFT utilizou curva-padrão externa de ácido gálico e a integral da área dos picos correspondentes. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão de 3 injeções consecutivas (Morais et al., 2009). Para os tratamentos *in vitro* a amostra foi ressuspensa em THF (Palozza et al., 2006; Lakshminarayana et al., 2010, com modificações) (ver item 4.2.4., fluxograma B).

4.2.3. Purificação e detecção da luteína

Para verificar a pureza do composto puro luteína, adquirido comercialmente em pó (Phytomare), foi pesado 1g do pó o qual foi diluído em 10 mL da solução hexano:acetona (1:1, v/v) contendo BHT (10 mg/L). A amostra foi agitada em vórtex por 2 min e após,

centrifugada por 20 min a 3.000 RPM. O sobrenadante foi coletado e filtrado sob vácuo. O solvente foi evaporado sob fluxo de N₂ gasoso e a amostra ressuspensa em 5 mL de hexano. Após, foi submetida a varredura em espectrofotômetro (entre os comprimentos de onda de 200 a 700 nm), utilizando-se cubetas de quartzo, para análise de purificação e determinação da concentração de luteína e outros possíveis carotenóides presentes na amostra. O solvente foi removido em N₂ gasoso e a amostra seca foi armazenada em ultra-freezer à -80°C (Lemos, 2010, com modificações). Os valores de absorbância encontrados em 445 nm (média das leituras de 3 extrações/amostras) foram utilizados para determinar a concentração de luteína, segundo a equação de Lambert-Beer (Mínguez-Mosquera, 2007), como segue:

$$C = \frac{\text{média Abs.} \times V \times 10.000}{2.550 \times 100}$$

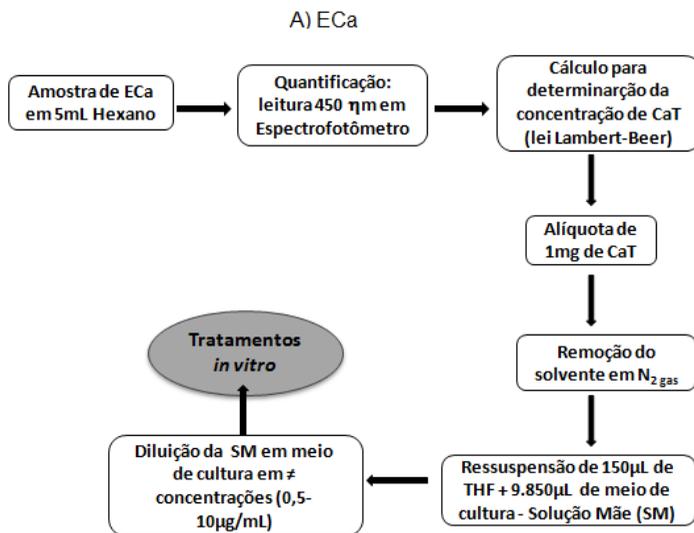
Uma alíquota da amostra ressuspensa em hexano:acetona (1:1, v/v) foi avaliada em CLAE para identificação e quantificação dos compostos. Alíquotas (10 µL) foram analisadas em um cromatógrafo líquido, equipado com coluna C₁₈ (Vydac 201TP54, 250 mm x 4,6 mm Ø) e com um detector espectrofotométrico UV-visível operando em 450 nm. A eluição utilizou MeOH: acetonitrila (90:10, v/v) como fase móvel, fluxo de 1 mL/min e a identificação do composto de interesse foi efetuada através da comparação com os tempos de retenção obtidos para amostras padrões, sob as mesmas condições experimentais. Para efeitos de cálculo do conteúdo dos compostos carotenóides, foi utilizada curva-padrão externa de Luteína e a integral dos picos correspondentes. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão de 3 injeções consecutivas (Morais, EC et al, 2009). Para os tratamentos *in vitro* a amostra foi ressuspensa em THF (Palozza et al., 2006; Lakshminarayana et al., 2010, com modificações) (ver item 4.2.4., fluxograma C).

4.2.4. Diluição e preparo dos extratos e compostos puros para os tratamentos *in vitro*

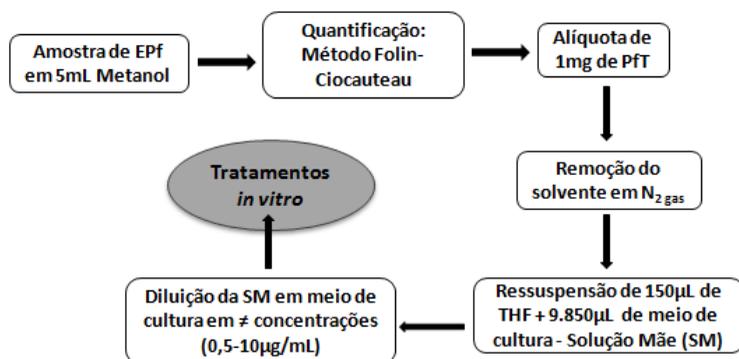
Os extratos ricos em carotenóides (ECA) e os extratos ricos em polifenóis (EPf), assim como os compostos puros luteína (Lut), β-caroteno (βC), ácido cafeico (AC) e ácido ferúlico (AF) possuem propriedades apolares. Devido a esta característica esses extratos e compostos puros foram diluídos em THF (Palozza et al., 2006;

Lakshminarayana et al., 2010, com modificações). Para este estudo foram realizados ensaios de citotoxicidade (pelo método do MTT (3-(4,5- 31dimetiliazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) – ver item 4.2.3.) com o solvente THF utilizado como veículo para avaliar possíveis interferências na viabilidade celular e, através deste, determinar a percentagem a ser utilizada nas diluições para os tratamentos nas linhagens celulares. Devido a sua polaridade, o ácido gálico foi o único composto diluído em água destilada autoclavada (Veluri et al., 2006).

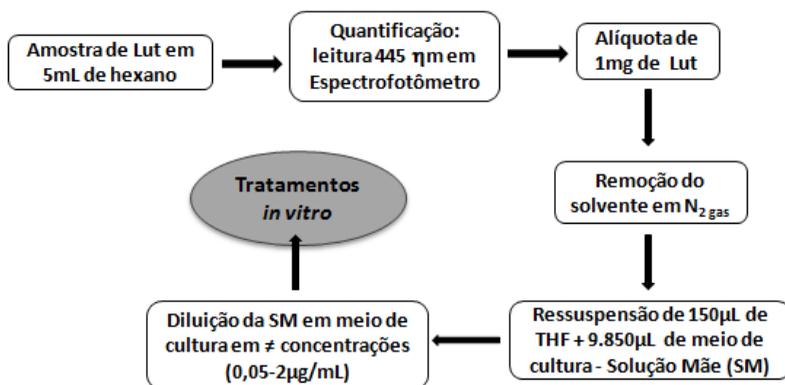
As diluições e preparo dos extratos e compostos puros para os tratamentos *in vitro* foram quantificados e padronizados conforme seguem os fluxogramas:

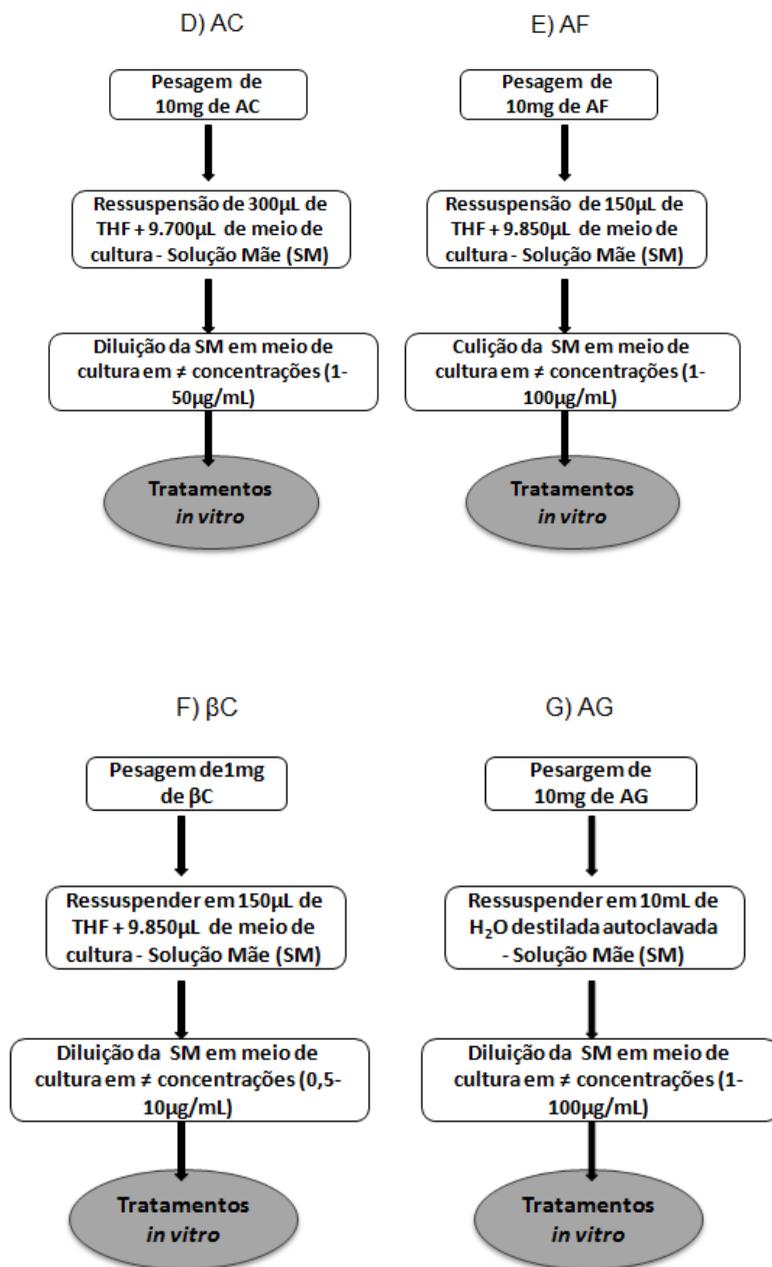


B) EPf



C) Lut





4.3 ESTUDOS *IN VITRO* DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.3.1. Cultura de células

As linhagens celulares glioblastoma humano (U87-MG), carcinoma de mama humano (MCF-7), adenocarcinoma de rim humano (786-O), melanoma de camundongo (B16F10) e fibroblasto de camundongo (L929), foram obtidas a partir da *American Type Culture Collection* (ATCC), USA. As linhagens celulares U87-MG, B16F10 e L929, foram mantidas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM); enquanto o meio RPMI *Medium* 1640, foi utilizado para as linhagens MCF-7 e 786-O. Ambos os meios foram suplementados com soro fetal bovino (SFB) (10%), L-glutamina (2 mM), Glicose (4,5 g/L), bicarbonato de sódio (1,5 g/L), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico (HEPES) (10 mL/L) e penicilina/estreptomicina (10 mL/L). O meio de cultura foi trocado a cada 3 ou 4 dias. As células foram cultivadas em placas de cultura e mantidas em estufa incubadora (Ultrafase HF212 UV) à temperatura de 37°C, 95% de umidade em ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂ (Locatelli et al., 2009). A linhagem L929 foi utilizada neste estudo com a finalidade de investigar o efeito citotóxico de linhagens neoplásicas paralelamente a esta linhagem não neoplásica.

4.3.2. Determinação da atividade citotóxica do solvente tetrahidrofurano (THF) pelo método colorimétrico MTT

Devido a insolubilidade dos extratos de carotenóides e de polifenóis, e dos compostos puro β -caroteno, luteína, ácido cafeíco e ácido ferúlico, foi necessário utilizar um solvente orgânico para as diluições em meio de cultura. Devido a alta toxicidade proveniente deste solvente, este experimento foi proposto para avaliar os efeitos nas diferentes linhagens sob estudo e verificar a percentagem máxima de THF que pudesse ser administrada sem causar prejuízo as células. Desta forma, células da linhagem U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) foram semeadas com meio de cultura DMEM ou RPMI em placas de cultura de 96 poços na densidade de $2,5 \times 10^3$ células/poço e incubadas em estufa por 24 h para adesão celular. Após este período, o meio de cultura foi substituído por um meio contendo diferentes percentagens de THF em meio de cultura (0,003 – 0,3%) pelo período de 24h. Transcorridas 24 h de tratamento, o meio foi removido e 100 μ L

de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) 0,5 mg/mL foram adicionados a cada poço. O ensaio colorimétrico do MTT tem como princípio a redução do sal MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromo tetrazólio, Sigma®) pela desidrogenase mitocondrial das células vivas, para um produto de reação MTT-formazana de cor azul escuro. Uma nova incubação por 3 h foi efetuada. Terminada esta etapa, o MTT foi removido sendo adicionados 200 µL de dimetil-sulfóxido (DMSO) para dissolução dos cristais de formazana (adaptado de Mosmann, 1983). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de ELISA (ThermoPlate) em comprimento de onda de 562 nm. Os valores obtidos foram expressos em percentual de células viáveis de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(\text{Abs teste} \times 100)}{\text{Abs controle negativo}}$$

Considerou-se os valores do controle negativo como 100% de viabilidade celular sem a presença do solvente. Foram realizados três experimentos independentes com cada concentração quadruplicata (n=12).

4.3.3. Determinação da atividade citotóxica dos extratos e compostos puros pelo método colorimétrico MTT

Para avaliação da citotoxicidade, células das linhagens U87-MG, MCF-7, 786-O, B16F10 e L929, foram tripsinizadas (tripsina e ácido etilenodiamino tetra-acético; EDTA a 0,25%), coletadas e contadas em câmara de Neubauer, após diluição (1:20) em solução corante Azul de Tripán 0,4 %, e ajustadas para $2,5 \times 10^3$ células/poço. Em seguida, foram semeadas com o respectivo meio de cultura, DMEM ou RPMI, em placas de 96 poços e mantidas em estufa incubadora por 24 h, possibilitando a adesão celular ao substrato. Após este período, o meio de cultura foi substituído por um meio contendo concentrações crescentes dos extratos e compostos puros, conforme descritos na Tabela 1. Transcorridas 24 h de tratamento, o meio foi removido e 100 µL de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados a cada poço. Uma nova incubação, em um período de 3 h, foi efetuada. Terminada esta etapa, o MTT foi removido sendo adicionados 200 µL de dimetil-sulfóxido (DMSO) para dissolução dos cristais de formazana (adaptado de Mosmann, 1983). A leitura espectrofotométrica da absorbância (Abs) foi realizada em leitor de ELISA (ThermoPlate) em comprimento de onda de 562 nm. A partir do teste de MTT, foram obtidos os percentuais

de viabilidade celular e os valores de concentração inibitória de 50% (CI50) (Cheng e Prusoff, 1973; Fisar et al., 2010) para os extratos e compostos puros e para cada linhagem celular em estudo. Os valores expressos em percentual de células viáveis foram obtidos de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Abs teste} \times 100}{\text{Abs controle negativo}}$$

Considerou-se os valores dos grupos - controle negativo (células incubadas na ausência dos extratos ou compostos puros sob estudo) correspondentes a 100% de viabilidade celular. Foram realizados três experimentos independentes com cada concentração em quadruplicata (n=12).

Tabela 1. Amostras utilizadas nos tratamentos das linhagens celulares, siglas, concentrações testadas e nome do fabricante.

<i>Amostras</i>	<i>Siglas</i>	<i>Concentrações</i>	<i>Fabricante</i>
(1) Controle Negativo – meio de cultura (DMEM ou RPMI)	CN	-	Invitrogen Corporation
(2) Extrato de Carotenóides	ECa	0,5 – 10 µg/mL	*
(3) Extrato de Polifenóis	EPf	0,5 – 10 µg/mL	*
(4) Composto puro β-caroteno	βC	0,5 – 10 µg/mL	Sigma
(5) Composto puro Luteína	Lut	0,05 – 2 µg/mL	Phytomare
(6) Composto puro Ácido Gálico	AG	1 – 100 µg/mL	Sigma
(7) Composto puro Ácido Cafeico	AC	1 – 50 µg/mL	Sigma
(8) Composto puro Ácido Ferúlico	AF	1 – 100 µg/mL	Sigma

(*) Derivados da variedade crioula de milho Rajado 8 Carreiras (*Zea mays*).

O critério para a escolha das concentrações foi referenciado a partir de outros estudos encontrados na literatura que apresentaram efeito antitumoral com concentrações muito relativas. Forame

Encontrados estudos demonstrando uma redução da viabilidade com concentrações menores que 1 µg/mL até 1000 µg/mL, em diferentes linhagens tumorais. Desta forma, nós estabelecemos, inicialmente, tratamentos com concentrações até 100 µg/mL. Devido a insolubilidade dos extratos e de alguns compostos puros, dos quais foram diluídos em solvente orgânico (THF), essa escala de concentração foi limitada até 10 µg/mL (para os ECa e EPf, e compostos puros: βC, AC) para que se pudesse utilizar ao máximo 0,15% de THF na concentração máxima, conforme estabelecido pelo ensaio colorimétrico do MTT para este solvente. A luteína também apresentou uma diluição em THF da qual não foi possível ultrapassar a concentração de 10 µg/mL. Entretanto, um ensaio piloto demonstrou que este composto reduziu a viabilidade em concentrações menores que 2 µg/mL. Por tal motivo, a escala para a Lut foi padronizada para 0,05-2 µg/mL.

4.3.4. Determinação do efeito do tempo de exposição sobre a viabilidade celular

Para determinar se os efeitos sobre a viabilidade celular no ensaio de citotoxicidade celular (MTT) são dependentes do tempo de exposição das células aos extratos/compostos puros, foi utilizada somente a linhagem B16F10. Devido aos dados exíguos na literatura sobre o efeito antitumoral desses extratos e compostos puros em linhagens de melanoma, e também, pelo fato dessa linhagem ter apresentado uma boa sensibilidade a esses tratamentos, a linhagem B16F10 foi selecionada para dar continuidade aos estudos. Foram semeadas $2,5 \times 10^3$ células/poço em placas de cultura de 96 poços contendo 100 µl de meio DMEM. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio contendo ECa, EPf, e os compostos puros βC, Lut e AG com suas respectivas concentrações obtidas a partir dos valores de CI50 (item 4.3.3.). Após 4 períodos de tratamento (12, 24, 36 e 48 h) os extratos e os compostos puros foram removidos e em cada poço foram acrescentados 100 µL de uma solução de meio de cultura DMEM contendo 0,5 mg/mL de MTT. Após incubação pelo período de 3 h a solução de MTT foi removida, sendo então adicionados 200 µL de DMSO. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de ELISA em comprimento de onda de 562 nm (Kampa et al., 2003). Considerou-se os valores referentes ao controle negativo correspondentes a 100% de viabilidade celular sem a presença dos extratos ou compostos puros testados. Foram realizados três experimentos independentes com cada concentração em quadruplicata (n=12).

4.3.5. Análise da morfologia celular por meio de microscopia óptica

Neste experimento, objetivando a avaliação da forma das células em cultura, células da linhagem B16F10 foram semeadas 5×10^3 células/poço em placas de 12 poços, em meio de cultura DMEM. Após 24 h, as células foram tratadas com extratos de carotenóides ou polifenóis (0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$) durante 12 e 24 h. As concentrações utilizadas neste ensaio e em ensaios posteriores foram estabelecidas com relação ao CI50 obtido para cada extrato e pelos resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular (MTT) nas concentrações de 0,5 – 10 $\mu\text{g/mL}$. Apesar do ECa ter apresentado um efeito apenas a partir da concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, seu CI50 foi de 0,9 $\mu\text{g/mL}$. O CI50 do EPf foi de 3,5 $\mu\text{g/mL}$, entretanto, a partir da concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, a linhagem B16F10 já apresentou um efeito significativo na redução da viabilidade. Desta forma, foi selecionada a concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ como a menor para estes ensaios. Conforme analisado no ensaio do MTT, concentrações acima de 5 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram um efeito estatístico semelhante as concentrações maiores de 7 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Assim, foi definido como concentração maior, 5 $\mu\text{g/mL}$.

Após os tratamentos, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA) (Sigma) diluído em Salina Tamponada Fosfatada Dulbecco's 1 x (PBS; Invitrogen), e posteriormente coradas com violeta cristal a 0,5% (metanol/água, 1:1 v/v). A morfologia das células foi avaliada sob microscópio invertido (Biosystems – XDS-1), utilizando aumento de 40 x e fotografadas. Foram registradas as características: (1) espriamento celular e (2) dimensões relativas do núcleo em relação à célula (formato do núcleo, e possível visualização de corpos apoptóticos) (Ledezma et al., 2004, com modificações).

4.3.6. Avaliação da ocorrência de morte celular por apoptose pela incorporação de Anexina – V FITC e iodeto de propídeo utilizando citometria de fluxo

Para determinar a ocorrência de um sinal inicial de morte celular por apoptose - a externalização de fosfolipídios internos à membrana celular (Koopman et al., 1994), foi feita a incorporação de Anexina – V conjugada ao fluorocromo (FITC) (AV) (Biosource Internat. Inc.) e iodeto de propídeo (IP), uma substância capaz de penetrar a membrana lisada, indicando ocorrência de necrose. Esta técnica é destinada à detecção de apoptose, em função da dosagem de fosfatidilserina (FS). A FS é predominantemente observada na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol. Nas células em início da apoptose, onde

a membrana celular ainda permanece intacta mas sofre uma desorganização, a FS é translocada para a superfície exterior da bicamada lipídica. O aparecimento de FS na superfície celular é reconhecido pelos fagócitos, que captam este sinal e removem a célula que sinalizou do respectivo ambiente, caracterizando-se o início do processo programado de “suicídio” celular. As células foram avaliadas em citometria de fluxo, sendo registrado um mínimo de 30.000 eventos. Foram semeadas 3×10^5 células/poço da linhagem B16F10 em placas de cultura de 6 poços, contendo 1,5 mL de meio de cultura DMEM. Após 24 h, o meio de cultura foi substituído pelos extratos (ECa e/ou EPf; 0,5 e 5 µg/mL, de cada extrato) por 12 e 24 h. Decorridos os períodos de incubação, foi coletado o sobrenadante e, em seguida, as células aderidas. Estas foram cuidadosamente coletadas por meio de tripsinização durante 2 min em estufa (37°C, 95% de umidade em ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂). As duas suspensões (sobrenadante e células tripsinizadas), de cada amostra, foram reunidas em microtubos, centrifugadas a 3.000 RPM por 1,5 min. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e as células ressuspensas em 250 µL de meio de cultura. As amostras foram incubadas por 15 min, no escuro, a temperatura ambiente, com AV. Com objetivo de marcar proteínas nucleares indicativas de necrose, 2 min antes do término do tempo de incubação com AV foi adicionado IP, seguindo-se as análises em citômetro de fluxo. Os dados, expressos como porcentagem de células, foram analisados utilizando-se o software *WinMDI 2.8*®, sendo as mesmas agrupadas por estágios em quatro quadrantes, representando: Q1 – células mortas em necrose (AV-, IP+); Q2 – células em estágio de apoptose tardia (AV+, IP+); Q3 – células não apoptóticas ou, viáveis (AV-, IP-); Q4 – células em estágio inicial de apoptose (AV+, IP-); adaptado de Matsura e colaboradores (2002). Foram realizadas três avaliações em dois experimentos independentes (n = 6).

4.3.7. Avaliação da proliferação celular por imunocitoquímica por BrdU

Para avaliar a ocorrência de proliferação celular, a linhagem B16F10 foi analisada através da técnica de imunocitoquímica para 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Millipore), o qual consiste de um análogo da timidina e incorpora-se ao DNA de células em processo de proliferação. As células foram semeadas em placas de 24 poços em uma densidade de 5×10^3 células/poço, com meio respectivo e incubadas em estufa (Kunimasa et. al., 2009). Após um período preliminar de cultura de 24 h as células foram tratadas com ECa e/ou EPf (0,5 e 5 µg/mL de

cada extrato), por 12 e 24 h. Nas últimas 4 h de tratamento foram adicionados 5 µL do marcador BrdU em cada poço. Após o período de incubação as células foram fixadas em PFA 4%, diluído em PBS, durante 30 min. Procedeu-se a 3 lavagens com PBS 1 x (5 min cada), e permeabilizadas com 0,25% de Triton X-100 durante 30 min, seguido de mais 3 lavagens (5 min cada), com PBS 1 x. Após este procedimento, as células foram incubadas com ácido clorídrico (2N), durante 30 min a 37°C. As culturas foram novamente lavadas em PBS (5 min cada). O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito utilizando-se solução bloqueadora, durante 30 min, contendo 0,5% de soro normal de cabra e 5% de SFB. Em seguida, o anticorpo primário anti-BrdU (Chemicon, MAB 3222) (1:200, v/v) foi adicionado e a incubação foi realizada por 2 h à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1 x (5 min cada). Posteriormente, foi adicionado o anticorpo secundário (20 µg/ml), obtido em ovelha e conjugado com FITC (Chemicon, AQ300F), incubado por 1 h a temperatura ambiente. A cultura foi então lavada com PBS 1 x, seguido da incubação e contra-coloração com 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (1:1000, v/v) por 30 s, a temperatura ambiente, para marcação do núcleo das células. As marcações fluorescentes foram observadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência em aumento de 10 x. O número total de células foi obtido por contagem de núcleos marcados. As proporções da expressão do marcador específico (BrdU) foram analisadas pela porcentagem de células marcadas em relação às células totais (DAPI), nas diferentes condições de culturas analisadas (Hahm et al., 2007, com modificações).

4.3.8. Avaliação da capacidade de formação de colônias

Para complementar a análise sobre a proliferação celular (item 4.3.7.) foi avaliado o efeito dos ECa e EPf sobre o potencial replicativo de uma única célula, com base no ensaio de formação de colônia ou ensaio de clonogenicidade, tendo sido utilizada somente a linhagem celular B16F10. Para tal, 1×10^3 células/poço em 1,5 mL de meio de cultura DMEM foram semeadas em placas de cultura de 6 poços. Após 24 h, as células foram incubadas com ECa e/ou EPf (0,5 e 5 µg/mL) por 12 e 24 h. Ultrapassados os períodos de incubação, o meio de cultura contendo os extratos foi retirado, os poços foram lavados 3 x com PBS e o meio de cultura foi adicionado, sendo esta, subsequentemente substituído a cada 3 dias. Após o período de 10 dias de experimento, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e coradas com violeta cristal 0,5% (metanol:água, 1:1, v/v). Agregados com mais de 50 células

foram reconhecidos como colônia e classificados como sobreviventes. As colônias foram identificadas através de análise por microscópio óptico no aumento de 5 x, com três campos randomizados para cada *n*. Considerou-se os valores referentes ao controle negativo correspondentes a 100% de viabilidade celular sem a presença dos extratos ou compostos puros testados. O percentual do número de colônias nos tratamentos foi calculado em relação ao controle negativo (Franken et al., 2006), de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Número de colônias (\%)} = \frac{\text{número de colônias da amostra} \times 100}{\text{número de colônias do controle negativo}}$$

A imagem representativa das colônias após os tratamentos foi obtida através de fotografia macroscópica dos poços da placa de cultivo. Foram realizadas três avaliações em dois experimentos independentes (*n* = 6).

4.3.9. Avaliação do citoesqueleto e pontos de adesão por imunofluorescência

Para avaliar possíveis efeitos dos extratos (Eca e EPf) na estrutura do citoesqueleto e nos pontos de adesão focal, 10×10^{10} células/poço da linhagem B16F10 foram semeadas em placas de cultura de 24 poços, contendo 500 μL de meio DMEM. Após o período de 24 h para adesão celular, o meio de cultura foi substituído por outro contendo Eca e/ou EPf (0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$) por um período de 24 h. Após, as células foram lavadas com PBS 1 x e imediatamente fixadas em paraformaldeído 4% diluído em PBS por 20 min. Posteriormente, foram lavadas com solução de PBS-Tween-20 0,05% (v/v) 2 x e em seguida lavadas com TritonX-100 0,1% em PBS por 3 min. As células foram lavadas novamente com PBS-Tween-20 0,05% 2 x e após foi adicionada uma solução contendo soro albumina bovina (BSA) 1% em PBS 1 x por 30 min. Foi então adicionado o anticorpo primário anti-vinculina (1:200, v/v em solução BSA 1% em PBS 1 x) para marcação dos pontos de adesão focal, mantido em temperatura ambiente e protegido de luz por 1 h. As células foram lavadas com PBS-Tween-20 0,05% 3 x por 5 min. Adicionou-se o anticorpo secundário conjugado com FITC (verde), em PBS (1:50, v/v em solução BSA 1% em PBS 1 x) e TRITC conjugado a faloidina (1:100, v/v em solução BSA 1% em PBS 1 x) foi utilizado para marcação das fibras de actina (vermelho), permanecendo em temperatura ambiente e protegido de luz por 30 min. As células foram lavadas com PBS-Tween-20 0,05% 3 x por 5 min e após, foi adicionado

DAPI (1:1000, v/v em PBS 1 x) para coloração dos núcleos (azul). Após a última lavagem com PBS-Tween-20 0,05% 3 x por 5 min, as células foram analisadas por microscopia de epifluorescência (Olympus IX71) e suas imagens fotografadas em aumento de 40 x (Kouloukoussa et al., 2004).

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em cada grupo experimental, as respostas obtidas nos grupos tratados e compostos padrão serão avaliadas em paralelo com as respostas dos tratamentos realizados com o veículo nos respectivos grupos controle, de modo a minimizar a interferência de possíveis flutuações de responsividade.

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey ou Dunnett, admitindo-se um nível de significância de, no mínimo, $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram efetuadas a partir de experimentos individuais, usando-se o programa Portable Statistica 8.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISES FITOQUÍMICAS

5.1.1. Obtenção e detecção de compostos carotenóides

Para determinação do teor de compostos carotenóides a partir do extrato hexânico obtido da folha da variedade crioula de milho Rajado 8 Carreiras de *Zea mays*, foi utilizada uma curva padrão externa de β -caroteno: $y = 97476x$, $r^2 = 0,99$, para calcular os picos correspondentes ao β -trans-caroteno e α -cis-caroteno e Luteína: $y = 8295x$, $r^2 = 0,99$, para calcular os picos correspondentes a luteína e zeaxantina.

Da análise dos compostos carotenóides nos produtos derivados de extrações hexânicas foram obtidos os resultados apresentados na Figura 5 e na Tabela 2.

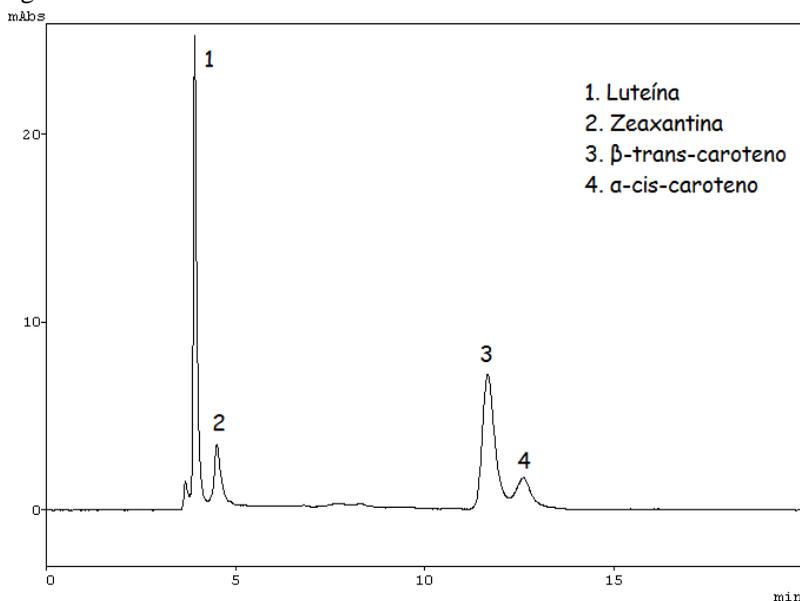


Figura 5. Perfil cromatográfico do extrato hexânico de carotenóides (Ca) derivado da folha da variedade crioula de milho Rajado 8 Carreiras de *Zea mays*. Os picos foram identificados de acordo com o tempo de retenção correspondente a cada composto. A quantificação dos Ca utilizou curva-padrão externa de β -caroteno e a integral da área dos picos correspondentes. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 3 injeções consecutivas.

Tabela 2. Resultados referentes à determinação de compostos carotenóidicos em amostras de extrato hexânico derivado da folha da variedade crioula de milho Rajado 8 Carreira de *Zea mays*, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acompanhadas dos respectivos \pm erro padrão da média (EPM) de três injeções consecutivas.

<i>Pico</i>	<i>Composto</i>	<i>Área Média do Pico</i>	<i>$\mu\text{g/g}$ (EPM)</i>
1	Luteína	166353	20,05 \pm 5,7
2	Zeaxantina	44327	5,34 \pm 2,8
3	β -trans-caroteno	167157	1,71 \pm 5,1
4	α -cis-caroteno	45031	0,46 \pm 2,1

Com base nos referidos produtos derivados do extrato hexânico de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) é possível estabelecer uma ordem crescente quanto ao composto majoritário do extrato, conforme segue: luteína > zeaxantina > β -trans-caroteno > α -cis-caroteno.

5.1.2. Obtenção e detecção de polifenóis totais

Para determinação do teor de polifenóis totais (PFT) do extrato metanólico obtido da folha da variedade crioula de milho Rajado 8 Carreira de *Zea mays*, foi utilizada uma curva padrão externa de ácido gálico: $y = 19466x$, $r^2 = 0,99$.

Da análise dos PFT nos produtos derivados de extrações metanólicas foram obtidos os resultados apresentados na Figura 6 e na Tabela 3.

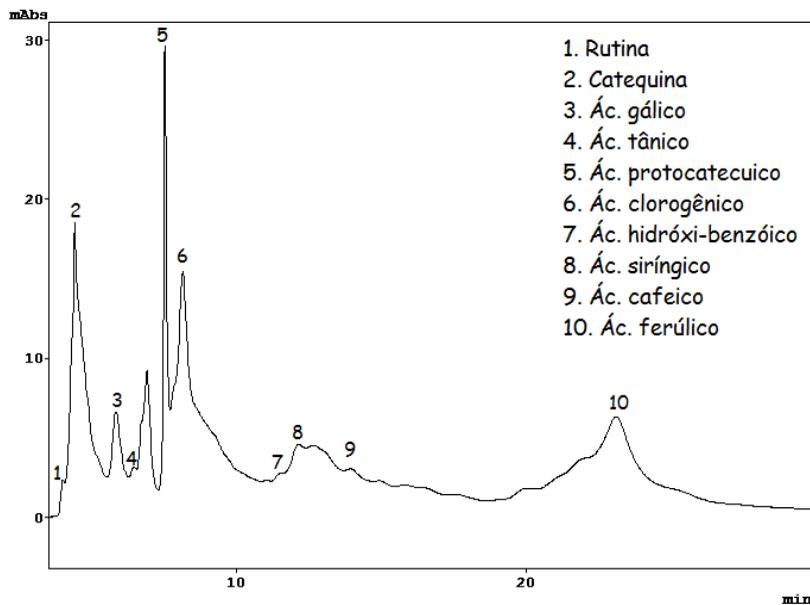


Figura 6. Perfil cromatográfico do extrato metanólico de polifenóis totais (PFT) derivado da folha da variedade crioula de milho Rajado 8 Carreiras de *Zea mays*. Os picos foram identificados de acordo com o tempo de retenção correspondente a cada composto. A quantificação dos PFT utilizou curva-padrão externa de ácido gálico e a integral da área dos picos correspondentes. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 3 injeções consecutivas

Tabela 3. Resultados referentes à determinação de PFT em amostras de extrato metanólico derivado da folha da variedade crioula de milho Rajado 8 Carreira de *Zea mays*, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acompanhadas dos respectivos \pm erro padrão da média (EPM) de três injeções consecutivas.

<i>Pico</i>	<i>Composto</i>	<i>Área Média do Pico</i>	<i>$\mu\text{g/g}$ (EPM)</i>
1	Rutina	19459	0,99 \pm 2,3
2	Catequina	618218	31,75 \pm 1,7
3	Ác. gálico	166952	8,57 \pm 2,3
4	Ác. tânico	38592	1,98 \pm 4,2
5	Ác. protocatecuico	245307	9,95 \pm 2,4
6	Ác. clorogênico	851058	43,72 \pm 1,2
7	Ác. hidróxi-benzóico	15849	0,81 \pm 1,8
8	Ác. siríngico	23661	1,21 \pm 2,4
9	Ác. cafeico	155015	5,14 \pm 0,7
10	Ác. ferúlico	574229	29,49 \pm 1,1

Com base nos referidos produtos derivados do extrato metanólico de polifenóis ($\mu\text{g/g}$) se pode estabelecer uma ordem crescente quanto ao composto majoritário, conforme segue: Ác. Clorogênico > Catequina > Ác. Ferúlico > Ác. Protocatecuico > Ác. Gálico > Ác. Cafeico > Ác. Tânico > Ác. Siríngico > Rutina > Ác. Hidroxi-benzóico.

Dentre os compostos acima, foram selecionados os ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido gálico (Sigma) para fins de análise de atividades biológicas no presente estudo.

5.1.3. Purificação e detecção da luteína

Para determinação da pureza do composto luteína (Phytomare) foi utilizada uma curva padrão externa de luteína: $y = 8295x$, $r^2 = 0,99$.

Apartir da análise dos compostos nos produtos derivados da purificação da amostra de luteína, foram obtidos os resultados apresentados na Figura 7 e na Tabela 4.

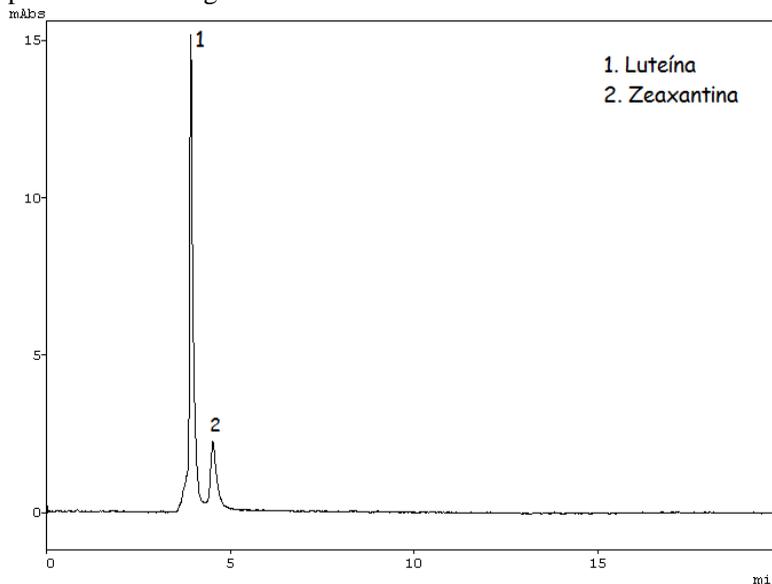


Figura 7. Perfil cromatográfico da purificação do composto de luteína. Os picos foram identificados de acordo com o tempo de retenção correspondente a cada composto. A quantificação dos compostos utilizou curva-padrão externa de luteína e a integral da área dos picos correspondentes. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 3 injeções consecutivas.

Tabela 4. Resultados referentes à purificação do composto de luteína por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acompanhadas dos respectivos \pm erro padrão da média de três análises independentes.

<i>Pico</i>	<i>Composto</i>	<i>Área Média do Pico</i>	<i>$\mu\text{g/g}$ (EPM)</i>
1	Luteína	114411	13,79 \pm 0,4
2	Zeaxantina	24414	2,94 \pm 0

Com base nos referidos produtos derivados ($\mu\text{g/g}$) pode-se verificar que o composto luteína apresentou-se 4 vezes mais concentrado, comparado ao composto zeaxantina.

5.2. ESTUDO *IN VITRO* DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.2.1. Determinação da atividade citotóxica do solvente, extratos e compostos puros pelo método colorimétrico MTT

Para avaliar o efeito de extratos e compostos puros sobre a viabilidade das linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo; linhagem não neoplásica), foi realizado o ensaio do MTT.

5.2.1.1. Efeito do solvente tetrahidrofurano (THF) na viabilidade celular

Devido a insolubilidade dos extratos de carotenóides e de polifenóis, e dos compostos puro β -caroteno, luteína, ácido cafeíco e ácido ferúlico, foi necessário utilizar um solvente orgânico para as diluições em meio de cultura. Diferentes testes de diluições foram realizados com diferentes solventes como, por exemplo, etanol, etanol:DMSO, DMSO apenas, hexano:acetona e hexano apenas, porém, não obtivemos a diluição desejada. Inicialmente, o solvente DMSO foi utilizado para diluir ácido ferúlico e ácido cafeíco, porém, a quantidade necessária para diluição completa dos compostos ultrapassou 0,3% e nessas concentrações, o DMSO apresentou um pequeno aumento na viabilidade celular ($p < 0,05$), interferindo nos resultados (dados não mostrados). Para os demais compostos e extratos o DMSO também foi testado, porém, mesmo em concentrações mais altas que 0,5% não foi suficiente para diluir os mesmos.

Testes envolvendo *pellets* de metilcelulose (1,5%) também foram desenvolvidos, porém, o solvente utilizado para diluir os compostos (hexano:acetona, 1:1, v/v) evaporou rápido fazendo com que as concentrações pipetadas nos *pellets* não fossem precisas. O solvente tetrahidrofurano (THF) foi o que apresentou melhor resultado dentre os testes realizados, diluindo as amostras de forma eficiente.

Devido a toxicidade proveniente deste solvente, um experimento inicial foi proposto para avaliar os efeitos nas diferentes linhagens celulares sob estudo e verificar a percentagem máxima de THF que pudesse ser administrada com segurança sem causar prejuízo às células. Diferentes percentagens de THF foram analisadas (0,003 – 0,3%) pelo período de 24 h. Após o período de incubação, foi realizado o ensaio do MTT.

A Figura 8 mostra uma diminuição da viabilidade das cinco linhagens celulares sob estudo, após a incubação com o THF nas

percentagens de 0,2 e 0,3% durante 24 h. Na linhagem U87-MG este solvente, na percentagem de 0,3%, reduziu a viabilidade celular em 16% comparada ao controle (somente meio de cultura). Nas demais linhagens, o solvente também diminuiu a viabilidade celular, conforme segue: em 22% (MCF-7, na percentagem de 0,2%); em 14% até 22% (786-O, 0,2 – 0,3%), em 27% (B16F10, 0, 3%) e em 21% (L929, com 0,3%).

Com base nos resultados obtidos, padronizamos a percentagem máxima utilizada na administração dos extratos e composto em todas as linhagens, na qual não ultrapassou 0,15%.

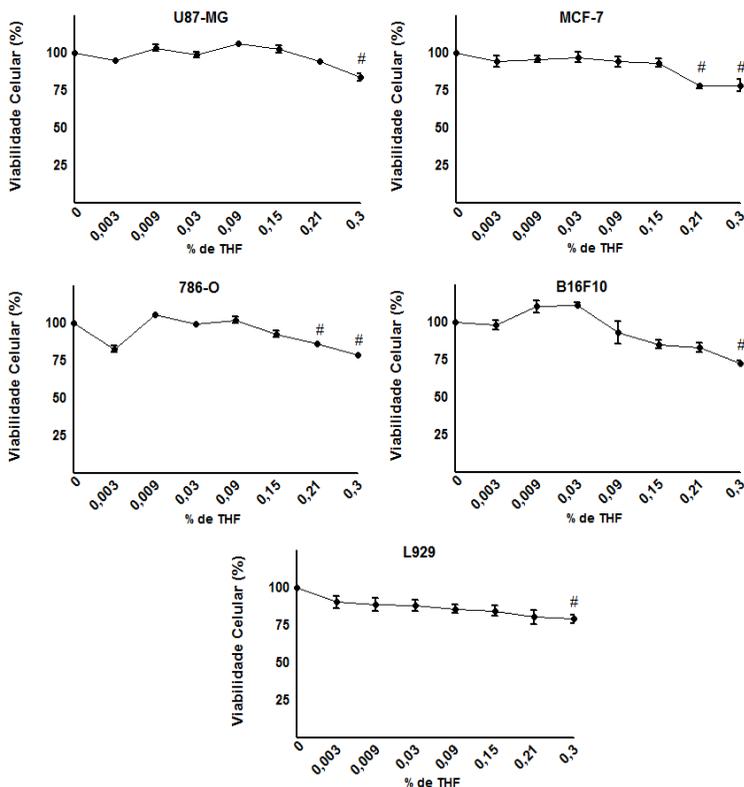


Figura 8. Efeito do solvente Tetrahydrofurano (THF) sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do MTT. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes com as concentrações em quadruplicatas. (#) $p < 0,001$ comparados com o controle negativo na mesma linhagem celular (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey).

5.2.1.2. Efeito do extrato de carotenóides na viabilidade celular

A Figura 9 mostra uma diminuição significativa da viabilidade das cinco linhagens celulares sob estudo, após a incubação com o extrato de carotenóides (ECa; 0,5 – 10 $\mu\text{g/mL}$, $n=12$), durante 24 h. Considerando apenas tipos celulares tumorais, o efeito citotóxico deste extrato expresso em percentagem de redução na viabilidade celular variou de 11% a 75% nas linhagens U87-MG (10 $\mu\text{g/mL}$) e 786-O (5

$\mu\text{g/mL}$), respectivamente, comparado ao controle (somente meio de cultura). Nas demais linhagens, o ECa reduziu a viabilidade celular, conforme segue: em 19% até 58% (MCF-7, nas concentrações de 0,5 – 7 $\mu\text{g/mL}$); em 49% até 75% (B16F10, 1 – 3 $\mu\text{g/mL}$) e em 17% (L929, com 7 $\mu\text{g/mL}$). Nas cinco linhagens celulares, os efeitos de concentrações maiores do que as que foram descritas acima, embora significativos, não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) das menores concentrações, não sendo, por isso, consideradas.

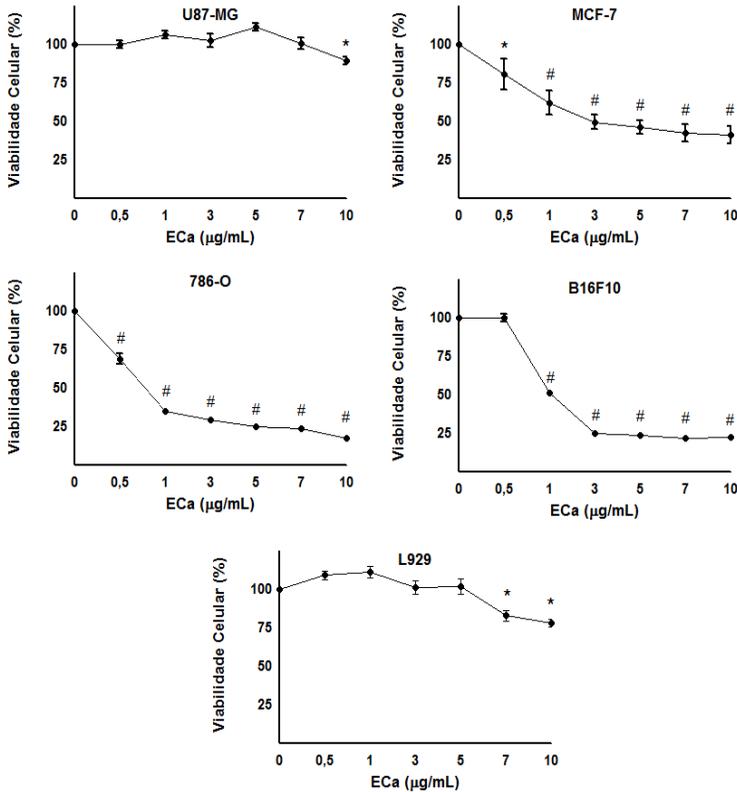


Figura 9. Efeito do extrato de carotenóides sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do MTT. Cada ponto representa a média \pm Erro Padrão da Média de três experimentos independentes com as concentrações quadruplicatas. * $P < 0,05$ e # $P < 0,001$ comparados com o controle negativo na mesma linhagem celular (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey).

Os valores mínimo e máximo de inibição da viabilidade celular obtidos com a administração do ECa em cada linhagem celular estão apresentados na Tabela 5, acompanhados do valor médio estimado para CI50. Com base nos referidos valores de CI50 obtidos se pode estabelecer a ordem crescente quanto à sensibilidade das células sob estudo ao extrato, conforme segue: U87-MG < L929 < MCF-7 < B16F10 < 786-O.

Tabela 5. Valores de CI50 obtidos nos testes de viabilidade celular após a administração de concentrações crescentes do extrato de carotenóides (0,5 - 10 µg/mL, n=12) nas linhagens U87-MG, L929, MCF-7, B16F10 e 786-O, e a respectiva porcentagem da inibição mínima (IMín) e máxima (IMáx) obtida.

<i>Linhagem Celular</i>	<i>CI50(µg/mL)</i>	<i>IMín(%)</i>	<i>IMáx(%)</i>
U87-MG	7,0	*	11 ± 2,3
L929	5,7	17 ± 3	22 ± 3
MCF-7	1,2	19 ± 9	58 ± 5,5
B16F10	0,9	49 ± 1	75 ± 0,8
786-O	0,8	31 ± 3	75 ± 0,7

(*) Apresentou valor significativo na redução da viabilidade celular apenas na maior concentração testada

5.2.1.3. Efeito do extrato de polifenóis na viabilidade celular

A Figura 10 mostra uma diminuição significativa da viabilidade das cinco linhagens celulares sob estudo, após a incubação com o extrato de polifenóis (EPf; 0,5 – 10 µg/mL, n=12), durante 24 horas. Na linhagem U87-MG este extrato, nas concentrações de 1 – 5 µg/mL, promoveu um aumento ao invés de uma redução na viabilidade celular em até 29%, comparada ao controle negativo (somente meio de cultura). Contudo, na concentração de 7 µg/mL, o EPf reduziu a viabilidade celular em 41%, comparado ao controle (somente meio de cultura). Considerando apenas os tipos celulares tumorais, o efeito citotóxico deste extrato expresso em porcentagem de redução na viabilidade celular variou de 23% a 77% nas linhagens 786-O (7 µg/mL) e B16F10 (7 µg/mL), respectivamente, comparado ao controle (somente meio de

cultura). Nas demais linhagens, o EPf diminuiu a viabilidade celular, conforme segue: em 26% até 42% (MCF-7, nas concentrações de 3 – 7 $\mu\text{g/mL}$); e em 24% até 56% (L929, 3 – 10 $\mu\text{g/mL}$). Nas cinco linhagens celulares, os efeitos significativos de concentrações maiores do que as que foram descritas acima não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) dos efeitos daquelas concentrações, não sendo, por isso, consideradas.

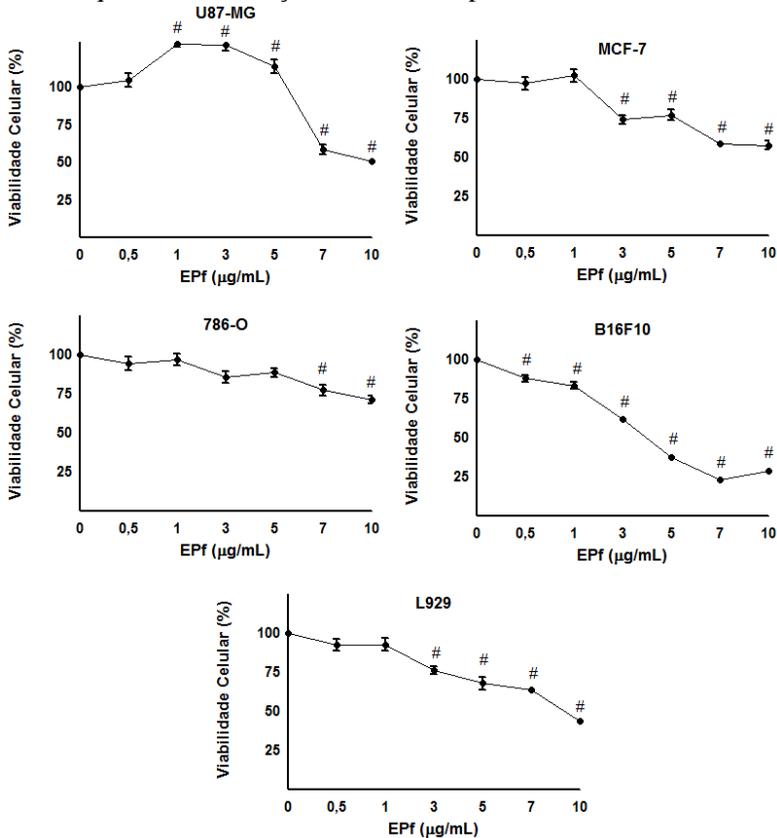


Figura 10. Efeito do extrato de polifenóis sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do do MTT. Cada ponto representa a média \pm Erro Padrão da Média de três experimentos independentes com as concentrações quadruplicadas. # $P < 0,001$ comparados com o controle na mesma linhagem celular (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey).

Os valores mínimo e máximo de inibição da viabilidade celular obtidos com a administração do EPf em cada linhagem celular estão apresentados na Tabela 6 acompanhados do valor médio estimado para CI50. Com base nos referidos valores de CI50 obtidos se pode estabelecer a ordem crescente quanto à sensibilidade das células sob estudo ao extrato, conforme segue: 786-O < U87-MG < L929 < B16F10 < MCF-7.

Tabela 6. Valores de CI50 obtidos nos testes de viabilidade celular após a administração de concentrações crescentes do extrato de polifenóis (0,5 - 10 µg/mL, n=12) nas linhagens 786-O, U87-MG, L929, B16-F10 e MCF-7, e a respectiva porcentagem da inibição mínima (IMín) e máxima (IMáx) obtida.

<i>Linhagem Celular</i>	<i>CI50 (µg/mL)</i>	<i>IMín(%)</i>	<i>IMáx(%)</i>
786-O	5,8	*	23 ± 3,4
U87-MG	5,8	*	41 ± 0,4
L929	4,8	24 ± 2,3	56 ± 1,2
B16F10	3,5	12 ± 2,4	77 ± 0,1
MCF-7	2,6	26 ± 2,9	42 ± 1,7

(*) Apresentou valor significativo na redução da viabilidade celular. apenas na maior concentração testada

5.2.1.4. Efeito do β-caroteno na viabilidade celular

A Figura 11 mostra uma diminuição significativa da viabilidade das cinco linhagens celulares sob estudo, após a incubação com composto puro β-caroteno (βC; 0,5 - 10 µg/mL, n=12), durante 24 horas. Considerando apenas tipos celulares tumorais, o efeito citotóxico deste extrato expresso em redução na viabilidade celular variou de 30% a 57% nas linhagens U87-MG (10 µg/mL) e 786-O (7 µg/mL), respectivamente, comparado ao controle. Nas demais linhagens, o composto puro βC diminuiu a viabilidade celular, conforme segue: em 13% até 33% (MCF-7, nas concentrações de 0,5 - 10 µg/mL); em 21% a 53% (B16F10, 1 - 5 µg/mL) e em 27% a 43% (L929, 1 - 7 µg/mL). Nas cinco linhagens celulares, os efeitos significativos de concentrações

maiores do que as que foram descritas acima não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) dos efeitos daquelas concentrações, não sendo, por isso, consideradas.

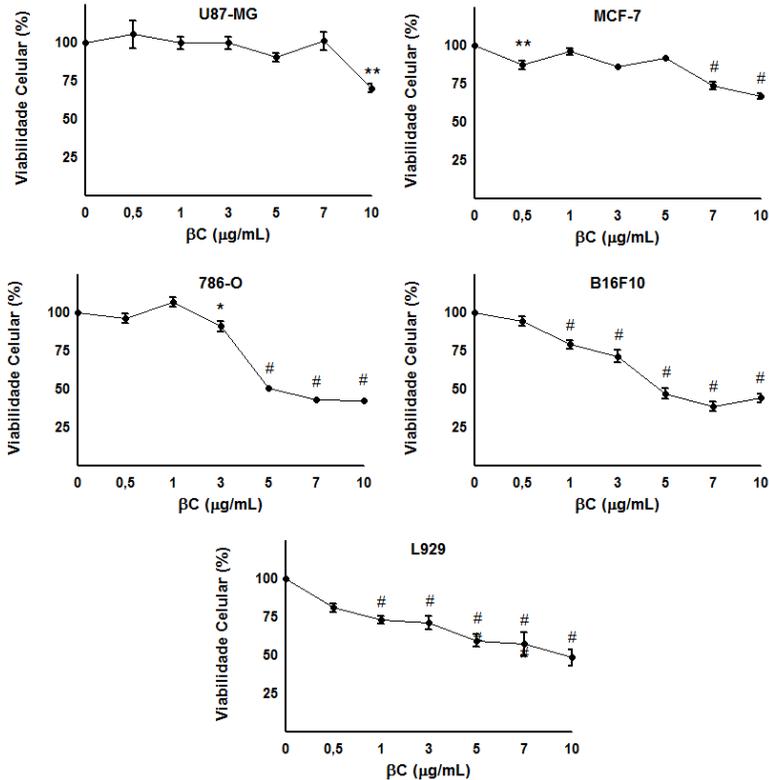


Figura 11. Efeito do β -caroteno sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do MTT. Cada ponto representa a média \pm Erro Padrão da Média de três experimentos independentes com as concentrações quadruplicatas. * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$, # $P < 0,001$ comparados com o controle da mesma linhagem celular (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey).

Os valores mínimo e máximo de inibição da viabilidade celular obtidos com a administração de concentrações crescentes do composto puro β C em cada linhagem celular estão apresentados na Tabela 7, acompanhados do valor médio estimado para CI50. Com base nos

referidos valores de CI50 obtidos pode-se estabelecer a ordem crescente quanto à sensibilidade das linhagens celulares sob estudo ao tratamento com o composto puro β C, conforme segue: U87-MG < MCF-7 < L929 < 786-O < B16F10.

Tabela 7. Valores de CI50 obtidos nos testes de viabilidade celular após a administração de concentrações crescentes do β -caroteno (0,5 – 10 μ g/mL, n=12) nas linhagens U87-MG, MCF-7, L929, 786-O e B16-F10 e a respectiva porcentagem da inibição mínima (IMín) e máxima (IMáx) obtida.

<i>Linhagem Celular</i>	<i>CI50 (μg/mL)</i>	<i>IMín(%)</i>	<i>IMáx(%)</i>
U87-MG	8,3	*	30 \pm 3,0
MCF-7	6,1	13 \pm 2,7	33 \pm 2,0
L929	4,1	27 \pm 2,4	43 \pm 7,7
786-O	3,8	9 \pm 3,5	57 \pm 1,0
B16F10	3,3	21 \pm 2,7	53 \pm 3,3

(*) Apresentou valor significativo na redução da viabilidade celular apenas na maior concentração testada

5.2.1.5. Efeito da luteína na viabilidade celular

A Figura 12 mostra uma diminuição significativa da viabilidade de quatro linhagens celulares sob estudo, após a incubação com o composto puro luteína (Lut; 0,05 - 2 μ g/mL, n=12), durante 24 horas. Considerando apenas células das linhagens tumorais, o efeito citotóxico deste extrato expresso em redução na viabilidade celular variou de 13% a 73% nas linhagens MCF-7 (0,05 μ g/mL) e B16F10 (2 μ g/mL), respectivamente, comparado ao controle. Na linhagem 786-O, a Lut diminuiu a viabilidade celular em 42 % até 64% (0,5 – 1 μ g/mL). Na linhagem U87-MG o composto Lut não apresentou redução significativa na viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas. Por outro lado, a linhagem não neoplásica L929 quando exposta a 0,1 e 0,5 μ g/mL de Lut curiosamente apresentou um aumento de viabilidade celular (até 10%). Nas cinco linhagens celulares, os efeitos significativos de concentrações maiores do que as que foram descritas acima não

diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) dos efeitos daquelas concentrações, não sendo, por isso, consideradas.

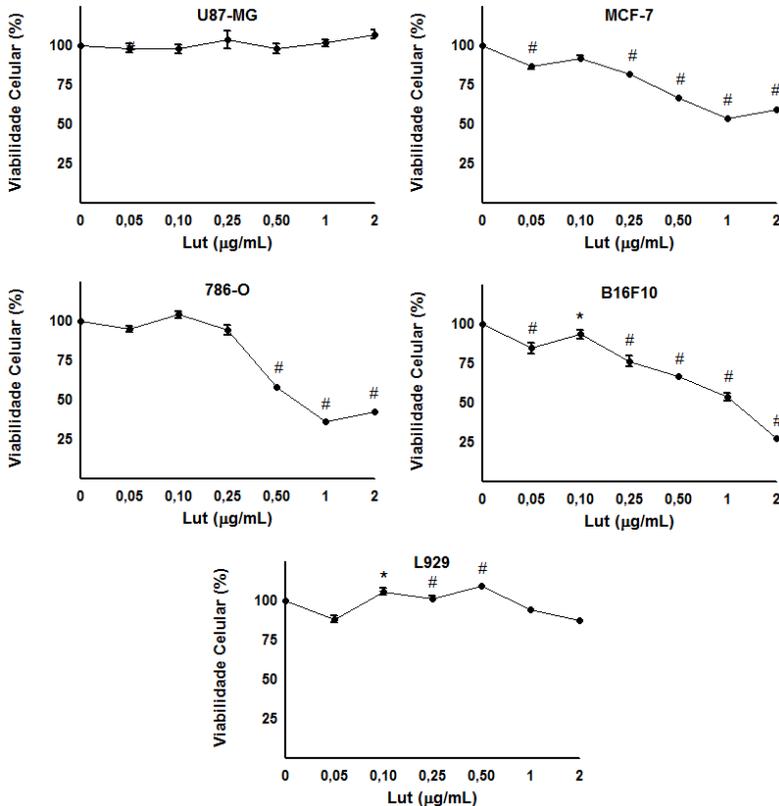


Figura 12. Efeito da luteína sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do MTT. Cada ponto representa a média \pm Erro Padrão da Média de três experimentos independentes com as concentrações quadruplicatas. * $P < 0,05$, # $P < 0,001$ comparados com o controle da mesma linhagem celular (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey).

Os valores significativos mínimo e máximo de inibição da viabilidade celular obtidos com a administração de concentrações crescentes de Lut em cada linhagem celular estão apresentados na Tabela 8, acompanhados do valor médio estimado para CI50. Com base nos referidos valores de CI50 obtidos pode-se estabelecer a ordem

crecente quanto à sensibilidade das linhagens celulares sob estudo ao tratamento com o composto, conforme segue: B16F10 < MCF-7 < 786-O. A linhagem não neoplásica L929 apresentou apenas aumento da viabilidade celular quando exposta a esse este composto.

Tabela 8. Valores de CI50 obtidos nos testes de viabilidade celular após a administração de concentrações crescentes de Lut (0,05 – 2 µg/mL, n=12) nas linhagens U87-MG, L929, B16-F10, MCF-7 e 786-O e a respectiva porcentagem da inibição mínima (IMín) e máxima (IMax) obtida.

<i>Linhagem Celular</i>	<i>CI50 (µg/mL)</i>	<i>IMín(%)</i>	<i>IMax(%)</i>
U87-MG	> 2	*	**
L929	> 2	*	**
B16F10	0,7	15 ± 3,4	73 ± 0,4
MCF-7	0,4	13 ± 1,8	46 ± 1,0
786-O	0,4	42 ± 1,5	64 ± 0,7

(> 2) Não foi possível estabelecer um valor de CI50 entre as concentrações administradas (0,05 - 2 µg/mL)

(*, **) Não apresentaram valores significativos na redução da viabilidade celular.

5.2.1.6. Efeito do ácido gálico na viabilidade celular

A Figura 13 mostra uma diminuição da viabilidade das cinco linhagens celulares sob estudo, após a incubação com o composto puro ácido gálico (AG; 1 – 50 µg/mL, n=12), durante 24 horas. Considerando apenas células das linhagens tumorais, o efeito citotóxico deste extrato expresso em redução na viabilidade celular variou de 57% a 81% nas linhagens MCF-7 (30 µg/mL) e B16F10 (30 µg/mL), respectivamente, comparado ao controle. Nas demais linhagens, o AG reduziu a viabilidade celular, conforme segue: em 11% até 64% (U87-MG, nas concentrações de 10 – 50 µg/mL); em 20% até 61% (786-O, 1 – 30 µg/mL); em 44% até 52% (L929, 30 – 50 µg/mL). Nas cinco linhagens celulares, os efeitos significativos de concentrações maiores do que as

que foram descritas acima não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) dos efeitos daquelas concentrações, não sendo, por isso, consideradas.

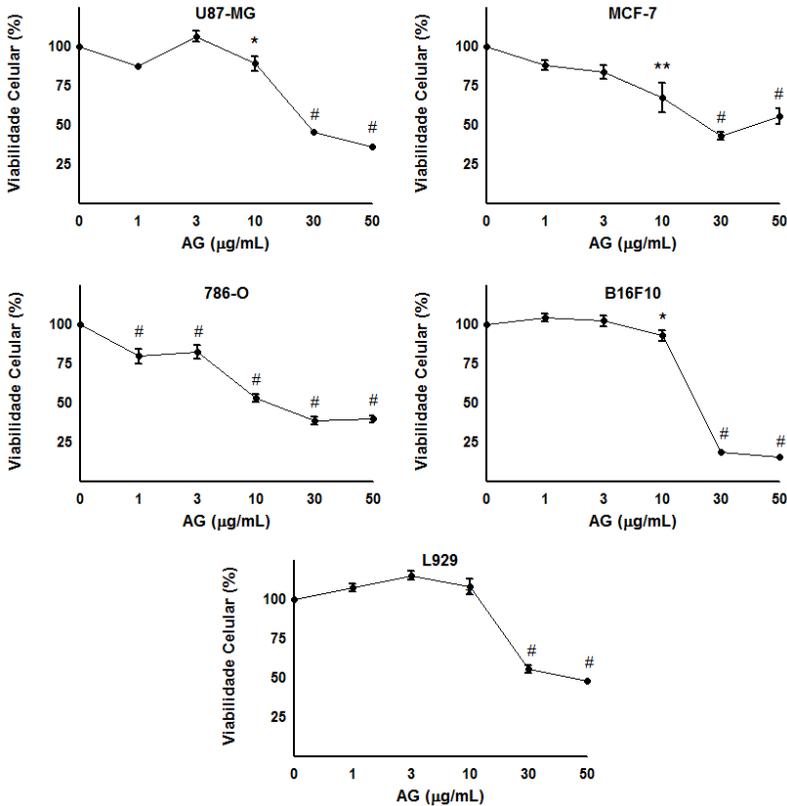


Figura 13. Efeito do ácido gálico sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do MTT. Cada ponto representa a média \pm Erro Padrão da Média de três experimentos independentes com as concentrações quadruplicatas. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, # $P < 0,001$ comparados com o controle da mesma linhagem celular (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey).

Os valores mínimo e máximo de inibição da viabilidade celular obtidos com a administração do composto puro AG em cada linhagem celular estão apresentados na Tabela 9, acompanhados do valor médio

estimado para CI50. Com base nos referidos valores de CI50 obtidos se pode estabelecer a ordem crescente quanto à sensibilidade das células sob estudo ao composto, conforme segue: L929 < B16F10 < U87-MG < MCF-7 < 786-O.

Tabela 9. Valores de CI50 obtidos nos testes de viabilidade celular após a administração de concentrações crescentes do composto puro ácido gálico (1 - 100 µg/mL, n=12) nas linhagens L929, B16-F10, U87-MG, MCF-7 e 786-O, e a respectiva percentagem da inibição mínima (IMín) e máxima (IMáx) obtida.

<i>Linhagem Celular</i>	<i>CI50 (µg/mL)</i>	<i>IMín(%)</i>	<i>IMax(%)</i>
L929	20,0	44 ± 2,5	52 ± 0,9
B16F10	18,8	7 ± 3,3	81 ± 0,9
U87-MG	18,2	11 ± 4,6	64 ± 0,7
MCF-7	11,5	32 ± 9,3	57 ± 2,5
786-O	8,8	20 ± 4,6	61 ± 2,6

5.2.1.7. Efeito do ácido cafeico na viabilidade celular

A Figura 14 mostra uma diminuição da viabilidade de três linhagens celulares sob estudo, após a incubação com o composto puro AC (1 - 50 µg/mL, n=12), durante 24 horas. Considerando apenas células das linhagens tumorais, o efeito citotóxico deste extrato expresso em redução na viabilidade celular variou de 31% a 56% nas linhagens U87-MG (50 µg/mL) e 786-O (50 µg/mL), respectivamente, comparado ao controle. Nas demais linhagens, o AC reduziu a viabilidade celular em 35% (MCF-7, na concentração de 30 µg/mL). Nas linhagens B16F10 e L929 este composto não apresentou diferenças significativas na redução da viabilidade celular, comparado ao controle negativo.

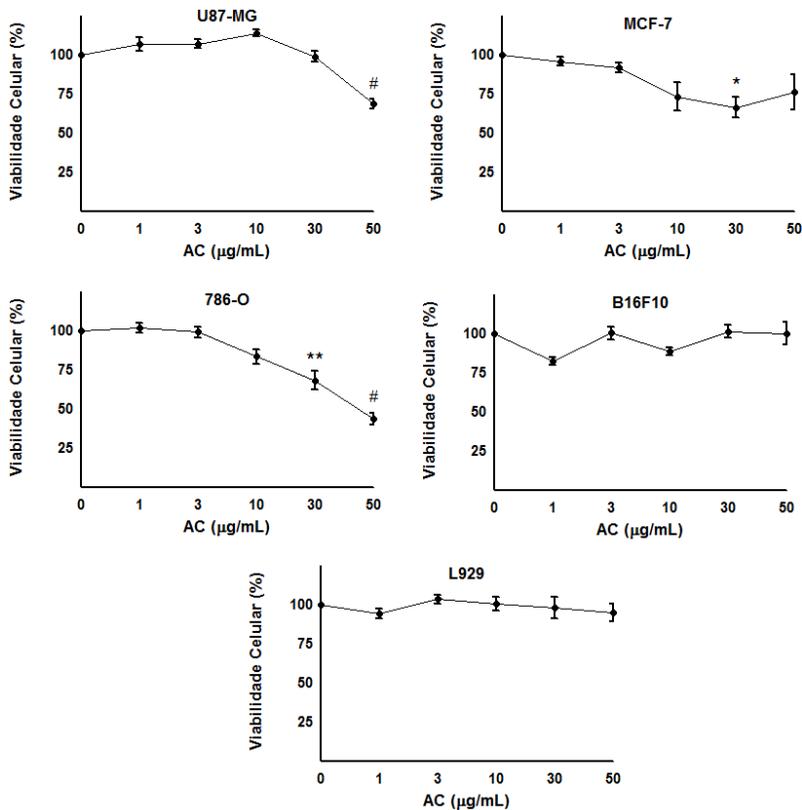


Figura 14. Efeito do ácido cafeico sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do MTT. Cada ponto representa a média \pm Erro Padrão da Média de três experimentos independentes com as concentrações quadruplicatas. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, # $P < 0,001$ comparados com o controle da mesma linhagem celular (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey).

Os valores mínimo e máximo de inibição da viabilidade celular obtidos com a administração do composto puro AC em cada linhagem celular estão apresentados na Tabela 10, acompanhados do valor médio estimado para CI50. Com base nos referidos valores de CI50 obtidos se pode estabelecer a ordem crescente quanto à sensibilidade das células sob estudo ao composto, conforme segue: U87-MG < 786-O < MCF-7.

Tabela 10. Valores de CI50 obtidos nos testes de viabilidade celular após a administração de concentrações crescentes do composto puro ácido cafeico (1 - 50 µg/mL, n=12) nas linhagens L929, B16-F10, U87-MG, 786-O e MCF-7, e a respectiva porcentagem da inibição mínima (IMín) e máxima (IMáx) obtida.

<i>Linhagem Celular</i>	<i>CI50 (µg/mL)</i>	<i>IMín(%)</i>	<i>IMáx(%)</i>
L929	> 50	*	**
B16F10	> 50	*	**
U87-MG	35,0	*	31 ± 3,0
786-O	24,0	32 ± 6,0	56 ± 3,5
MCF-7	7,0	*	35 ± 6,5

(>50) Não foi possível estabelecer um valor de CI50 entre as concentrações administradas (1 - 50 µg/mL)

(*, **) Não apresentaram valores significativos na redução da viabilidade celular.

5.2.1.8. Efeito do ácido ferúlico na viabilidade celular

Os resultados dos tratamentos administrados com o composto puro ácido ferúlico (AF; 1 - 100 µg/mL, n=12) não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, em nenhuma das linhagens estudadas (Fig. 15.).

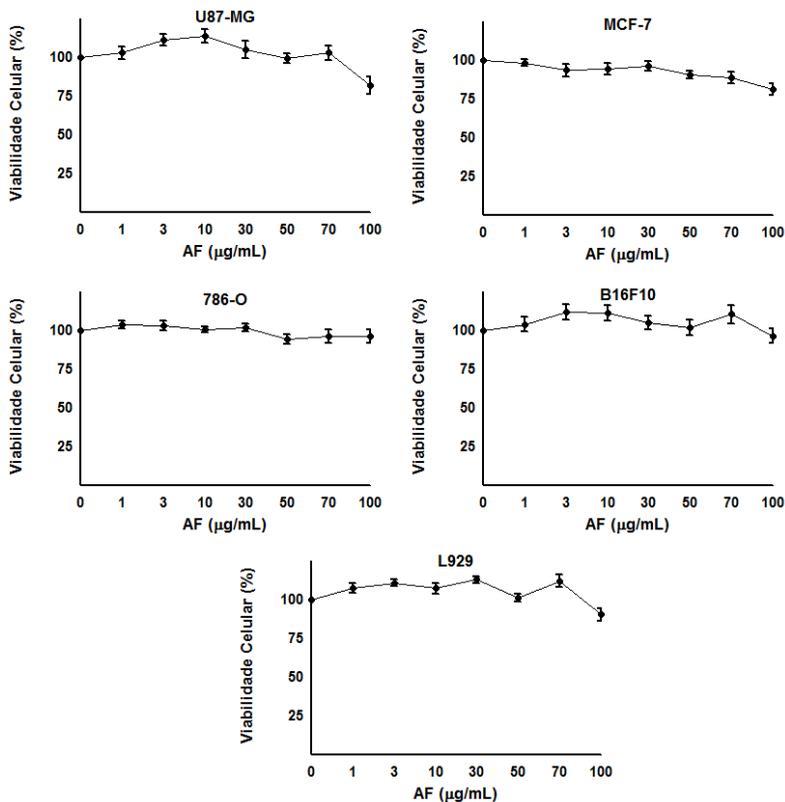


Figura 15. Efeito do ácido ferúlico sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares: U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e L929 (fibroblasto de camundongo) utilizando o ensaio colorimétrico do MTT. Cada ponto representa a média \pm Erro Padrão da Média de três experimentos independentes com as concentrações quadruplicatas. (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey).

De acordo com os resultados obtidos dos tratamentos nas linhagens sob estudo, podemos fazer as seguintes avaliações, conforme segue no Quadro 1:

- Para a linhagem U87-MG, a menor inibição da viabilidade celular (11%) foi obtida com ECa (10 µg/mL), e a maior (64%) foi com o composto puro AG (50 µg/mL);
- Para a linhagem 786-O, a menor inibição (23%) foi obtida com o EPf (7 µg/mL), e a maior (75%) foi com o ECa (5 µg/mL);

- Para a linhagem MCF-7, a menor inibição (33%) foi obtida com o composto puro β C (7 μ g/mL), e a maior (58%) foi com o ECa (7 μ g/mL);

- Para a linhagem B16F10, a menor inibição (53%) foi obtida com o composto puro β C (5 μ g/mL), e a maior (81%) foi com o composto puro AG (30 μ g/mL);

- Para a linhagem L929, a menor inibição (22%) foi obtida com o ECa (7 μ g/mL), e a maior (56%) foi com o EPf (10 μ g/mL). Além disso, o composto puro Lut (0,5 μ g/mL) aumentou a viabilidade celular em até 10%;

Com essas análises, podemos verificar que:

- A menor inibição da viabilidade celular (11%) ocorreu com a linhagem U87-MG, como o ECa (10 μ g/mL);

- A maior inibição da viabilidade celular (81%) ocorreu com a linhagem B16F10, com o composto puro AG (18,8 μ g/mL);

- O menor IC50 (0,4 μ g/mL) obtido foi com as linhagens 786-O e MCF-7, com o composto puro Lut;

- O maior IC50 (35 μ g/mL) obtido foi com as linhagens U87-MG, com o composto puro AC;

- O ECa e o composto puro Lut, foram os tratamentos que obtiveram melhor eficácia;

- As linhagens B16F10, 786-O e MCF-7, em geral, apresentaram maior susceptibilidade aos tratamentos;

- A linhagem L929, apresentou pouca sensibilidade aos extratos e compostos puros, além de ter mostrado aumento na viabilidade celular com o tratamento de Lut (como o esperado, pelo fato de ser uma linhagem não neoplásica).

Quadro 1. Avaliação entre os tratamentos administrados de ECa, EPf, β C, Lut, AG, AC e AF e as linhagens celulares sob estudo U87-MG, 786-O, MCF-7, B16F10 e L929.

Linagem → Tratamento ↓	U87-MG	786-O	MCF-7	B16F10	L929
ECa	<p>* < sensibilidade quanto ao CI50 para este extrato</p> <p>* < inibição 11% de todos os tratamentos</p> <p>* < CI50 para esta linhagem (7 μg/mL)</p>	<p>* > sensibilidade quanto ao CI50 para este extrato</p> <p>* 75% inibição (> inibição para esta linhagem)</p>	<p>* 58% de inibição (> inibição para esta linhagem)</p>	<p>* 75% de inibição</p> <p>* < CI50 para esta linhagem (0,9 μg/mL)</p>	<p>* 22% de inibição (< inibição para esta linhagem)</p>
EPf	<p>* \uparrow viabilidade 29% (5 μg /mL)</p> <p>* 41% de inibição</p>	<p>* < sensibilidade quanto ao CI50 para este extrato</p> <p>* 23 % de inibição (< inibição para esta linhagem)</p>	<p>* > sensibilidade quanto ao CI50 para este extrato</p> <p>* 42% de inibição</p>	<p>* 77% de inibição</p>	<p>* 56% de inibição (> inibição para esta linhagem)</p>
βC	<p>* < sensibilidade quanto ao CI50 para este composto</p> <p>* 30% de inibição</p>	<p>* 57% de inibição</p>	<p>* 33% de inibição (< inibição para esta linhagem)</p>	<p>* > sensibilidade quanto ao CI50 para este composto</p> <p>* 53% de inibição (< inibição para esta linhagem)</p>	<p>* 43% de inibição</p> <p>* < CI50 para esta linhagem (4,1 μg/mL)</p>

Lut	* Sem efeito	* < CI50 (0,4µg/mL) de todos os tratamentos * > sensibilidade quanto ao CI50 para este composto * 64% de inibição	* < CI50 (0,4µg/mL) de todos os tratamentos * 46% de inibição	* < sensibilidade quanto ao CI50 para este composto * 73% de inibição	* ↑ viabilidade 10% (0,5µg/mL)
AG	* 64% de inibição (>inibição para esta linhagem)	* > sensibilidade quanto ao CI50 para este composto 61% de inibição * > CI50 para esta linhagem (8,8µg/mL)	* 57% de inibição * > IC50 para esta linhagem (11,5µg/mL)	* > inibição 81% de todos os tratamentos * < inibição 7% (10 µg/mL) de todos os tratamentos	* > CI50 (20 µg/mL) de todas as linhagens * < sensibilidade quanto ao CI50 para este composto 52% de inibição
AC	* < sensibilidade quanto ao CI50 para este composto * 31% de inibição * > CI50 (35 µg/mL) das linhagens tumorais	* 56% de inibição	* > sensibilidade quanto CI50 para este composto * 35% de inibição	* Sem efeito	* Sem efeito
AF	*Sem efeito	*Sem efeito	* Sem efeito	* Sem efeito	* Sem efeito

5.2.2. Determinação do efeito do tempo de exposição na viabilidade celular

Para avaliar se os efeitos citotóxicos promovidos pelos tratamentos com ECa e EPf, e os compostos puros βC, Lut e AG, são dependentes de tempo, células da linhagem B16F10 foram expostas, nos períodos de tempo de 12 , 24, 36 e 48 h, nas concentrações definidas

pelos respectivos valores de CI50, de viabilidade celular, obtidos no ensaio de citotoxicidade pelo MTT. Os controles negativos foram realizados mediante a incubação das células na ausência do extrato ou composto puro sob estudo.

A Figura 16 mostra o efeito citotóxico tempo-dependente promovido pelos tratamentos com β C e Lut, devido à redução da viabilidade celular em relação ao tempo de exposição das células aos extratos e compostos analisados.

O ECa (1 μ g/mL) reduziu significativamente a viabilidade celular nos períodos de 12, 24, 36 e 48 horas em 13%, 22%, 28% e 36%, respectivamente, comparativamente ao controle (Fig. 16. A).

O EPf (3,5 μ g/mL) reduziu a viabilidade celular nos períodos de 24, 36 e 48 horas de exposição, diminuindo o número de células viáveis em 19%, 28% e 43%, respectivamente, comparado ao controle. Por outro lado, no período de tempo de 12 horas de exposição, o extrato de polifenóis surpreendentemente provocou um aumento de 21% na viabilidade, comparativamente ao controle (Fig. 16. B).

O β C (3,3 μ g/mL) reduziu a viabilidade celular nos períodos de 24, 36 e 48 horas de exposição, diminuindo o número de células viáveis em 24%, 38% e 50%, respectivamente, comparado ao controle negativo. Por outro lado, no período de tempo de 12 horas de exposição, o composto β C curiosamente provocou um aumento de 8% na viabilidade, comparativamente ao controle (Fig. 16. C).

A Lut (0,7 μ g/mL) reduziu a viabilidade celular nos períodos de 24, 36 e 48 horas de exposição, diminuindo o número de células viáveis em 26%, 43% e 68%, respectivamente, em relação ao controle (Fig. 16. D).

O AG (18,8 μ g/mL), nos períodos de 12, 24 e 48 horas de exposição, promoveu uma redução de 44%, 69% e 82% respectivamente, na viabilidade celular, comparativamente ao controle (Fig. 16. E).

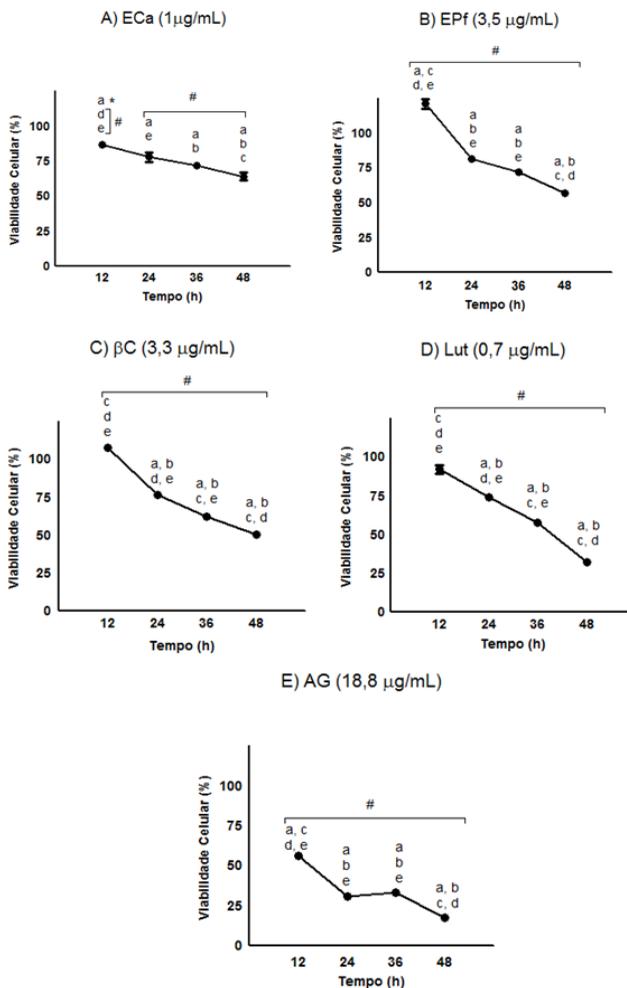


Figura 16. Determinação do efeito do tempo de exposição do extrato de carotenóides (Eca, A), extrato de polifenóis (EPf, B), β -caroteno (βC , C), luteína (Lut, D) e ácido gálico (AG, E) sobre a viabilidade celular da linhagem B16F10 após 12, 24, 36 e 48 horas de exposição. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão (n = 6) onde (*) e (#) representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) e ($p < 0,001$), respectivamente (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey). Considerou-se os valores do controle negativo como 100% de viabilidade celular na ausência dos extratos ou compostos puros testados. Os caracteres (letras) junto aos valores plotados nas curvas representam as diferenças estatísticas entre o controle negativo (a) e os diversos períodos tempo de exposição: 12 h (b); 24 h (c), 36 h (d) e 48 h (e).

Pelos dados apresentados podemos verificar que o tempo de exposição é um elemento importante para a diminuição da viabilidade celular. Todos os tratamentos apresentaram características tempo-dependente, onde a maior inibição ocorreu com o composto AG no período de 48 h, diminuindo a viabilidade das células B16F10 em até 82% (18,8 µg/mL), comparado ao controle (somente meio de cultura). Enquanto que a menor inibição se deu com o tratamento do EPf em 48 h, diminuindo a viabilidade em até 43% (3,5 µg/mL), quando comparado ao controle. Contudo, o composto Lut foi considerado o mais efetivo, inibindo a viabilidade celular em até 64% no período de 48 h com apenas 0,7 µg/mL.

Comparando este ensaio, de citotoxicidade (MTT) dependente do tempo de exposição, com o ensaio anterior de citotoxicidade do MTT em 24 h de exposição (item 5.2.1.), nós podemos verificar que, neste ensaio, a linhagem celular B16F10 mostrou-se menos sensível, conforme Tabela 11. No entanto, todas as percentagens de inibições no ensaio de citotoxicidade (MTT) em 24 h, relacionadas as concentrações do CI50, correspondem a inibição nos tempos de 24 h e 36 h do ensaio avaliando o tempo de exposição, com exceção do EPf, cuja percentagem ficou mais próxima do tempo de 48 h do ensaio tempo-dependente.

Quadro 2. Determinação do efeito do tempo de exposição do extrato de carotenóides (ECa) e extrato de polifenóis (EPf) e compostos puros, sobre a viabilidade celular da linhagem B16F10 após 12, 24, 36 e 48 horas de exposição. Comparação com o ensaio de MTT de 24 h.

Tratamento	MTT		TD				
	24 h		(CI50)	12 h	24 h	36 h	48 h
	µg/mL	Inibição (%)	µg/mL	Inibição (%)			
ECa	1	49	1	13	22	50	37
EPf	3	38	3,5	-	19	28	43
BC	3	29	3,3	-	24	38	50
Lut	0,5	33	0,7	8	26	43	68
AG	10 -30	7 – 82	18,8	44	69	67	82

5.2.3. Análise da morfologia celular por meio de microscopia óptica

Este experimento foi proposto com o objetivo de se avaliar efeitos na morfologia celular e aspectos do comportamento das células da linhagem B16F10 em cultura após a administração dos tratamentos com os extratos sob estudo (ECa e EPf; 0,5 e 5 µg/mL) pelos períodos de 12 e 24 h. Conforme descrito na metodologia, as células foram fixadas em PFA a 4%, coradas com violeta cristal e fotografadas em microscópio óptico invertido, utilizando-se objetiva de 40 x.

5.2.3.1. Efeito do extrato de carotenóides

A Figura 17 demonstra que a administração do ECa na concentração de 0,5 µg/mL, no período de 12 horas (Fig. 17. A), não causou alteração na morfologia celular comparada ao controle negativo (CN). Apesar da redução em número de células decorrente da exposição ao extrato, as células remanescentes permaneceram com aspecto espraiado e os núcleos acompanharam a extensão das células.

Na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, contudo, se pode observar que o ECa provocou alterações na morfologia celular. Células com aspecto arredondado sugerem início de um processo de morte celular, além de uma redução no número de células per se (Fig. 17. A).

No período de 24 horas (Fig. 17. B) além de uma importante redução do número de células, foi possível se observar alteração na morfologia celular em uma concentração tão baixa quanto 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de ECa. As células apresentaram um aspecto de espriamento reduzido, diminuição da dimensão celular e os núcleos apresentam uma forma arredondada. Na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, foi visualizada uma menor população de células com dimensões aparentemente reduzidas, devido à menor distribuição de citoplasma e o núcleo não definido.

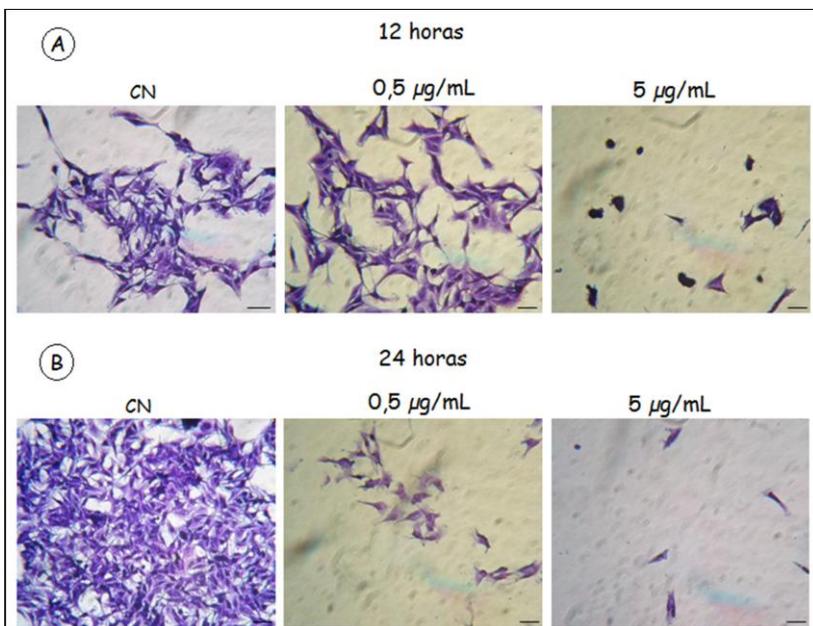


Figura 17. Análise morfológica por microscopia óptica da linhagem B16F10 após tratamentos com o extrato de carotenóides (0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$) pelo período de 12h (A) e 24h (B). Fotografias representativas utilizando aumento de 40 x. As barras representam escala de 10 μm .

5.2.3.2. Efeito do extrato de polifenóis

A Figura 18 demonstra que a administração do EPf na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, no período de 12 horas (Fig. 19. A), não provocou alterações na morfologia celular comparada ao controle.

Apesar da redução em número de células decorrente da exposição ao extrato, as células remanescentes permaneceram com aspecto espreado e os núcleos acompanharam a extensão das células.

Na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ também se pode observar que o extrato provocou alterações na morfologia celular. Células com aspecto, além de uma redução no número de células (Fig. 18. A).

No período de 24 horas (Fig. 18. B) se pode observar início de alteração na morfologia celular com 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Algumas células apresentam um aspecto de espreado reduzido, além da redução das dimensões celulares. Na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, uma menor população de células foi visualizada com menor espreado e núcleo não definido, sugerindo, possivelmente, início de formação de corpos apoptóticos.

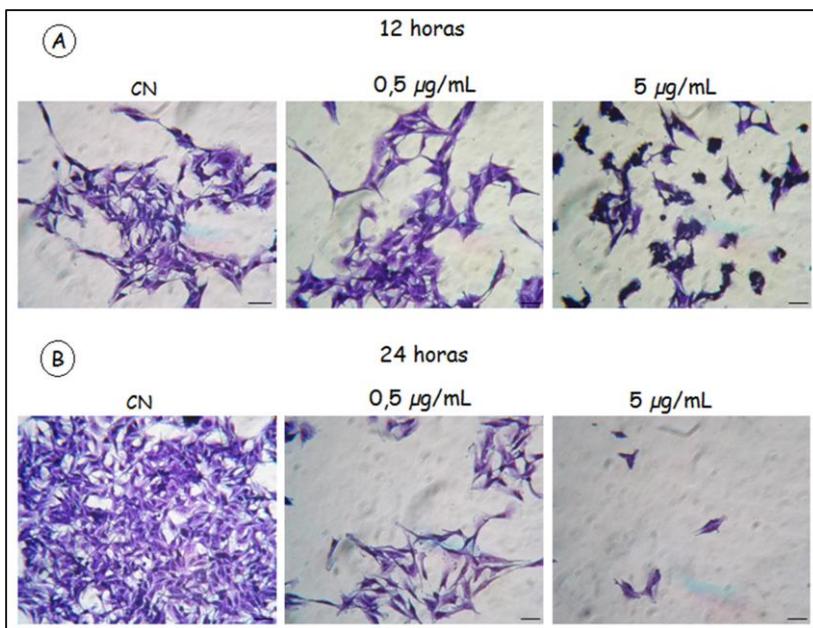


Figura 18. Análise morfológica por microscopia óptica da linhagem B16F10 após tratamentos com o extrato de polifenóis (0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$) pelo período de 12h (A) e 24h (B). Fotografias representativas utilizando aumento de 40 x. As barras representam escala de 10 μm .

Considerando-se os resultados da análise morfológica, os dois extratos (ECa e EPf) apresentaram modificações na forma das células da

linhagem B16F10 de modo muito semelhante. Porém, o ECa parece ter alterado de modo mais evidente. As diferenças descritas acima são decorrentes dos tratamentos administrados de forma dependente de tempo.

No entanto, a despeito das modificações no padrão da forma e dimensões das células verificadas nos experimentos acima (Fig. 18 e 19), torna-se mais uma vez evidente a ocorrência de morte celular.

5.2.4. Avaliação da ocorrência de morte celular por apoptose pela incorporação de Annexin – V FITC e iodeto de propídeo utilizando citometria de fluxo

Para investigar a ocorrência de externalização de fosfolipídeos internos à membrana celular, um dos sinais iniciais de morte apoptótica, células da linhagem B16F10 foram tratadas com os extratos de carotenóides e polifenóis (0,5 – 5 µg/mL) em períodos de 12 e 24 h. Em seguida, as células foram avaliadas por citometria de fluxo através da incorporação de Anexina – V FITC (AV) e iodeto de propídeo (IP).

Nesses experimentos, após os tratamentos, as células foram coletadas, marcadas com AV e IP e analisadas quanto as condições apresentadas. Na seqüência as células foram classificadas em quatro estágios (quadrantes) conforme o descrito na metodologia.

5.2.4.1. Efeito do extrato de carotenóides na morte celular

A Figura 19 mostra a ocorrência de mortalidade nas células B16F10 tratadas com o extrato de carotenóides (ECa) nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL durante 12 h. Após o período de tratamento com 0,5 µg/mL de ECa, ocorreu um aumento significativo ($p < 0,001$) da marcação com AV, evidenciando morte celular apoptótica inicial (quadrante Q4; $13,2\% \pm 2,5$), comparado ao grupo controle ($2,5\% \pm 0,9$). Na concentração de 5 µg/mL, o grupo tratado com 0,5 µg/mL de ECa apresentou resultado similar ($13,1\% \pm 3$). As células mostrando marcação apenas com IP, relacionadas como células necróticas (quadrante Q1), correspondem a $2,6\% \pm 0,4$ e $2,1\% \pm 0,2$ nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL, respectivamente. A ocorrência de apoptose tardia, evidenciada pela fluorescência de ambos os marcadores (quadrante Q2) foi observada em $15,6\% \pm 0,1$ e $15,7\% \pm 3$ das células expostas a 0,5 e 5 µg/mL de ECa, respectivamente). O restante da população de células B16F10 incubadas com 0,5 e 5 µg/mL de ECa, $68,5\% \pm 3$ e $68,9\% \pm 5$, respectivamente, não exibiu marcação

fluorescente (AV-, IP-; quadrante Q3), caracterizando-se, portanto, como células viáveis.

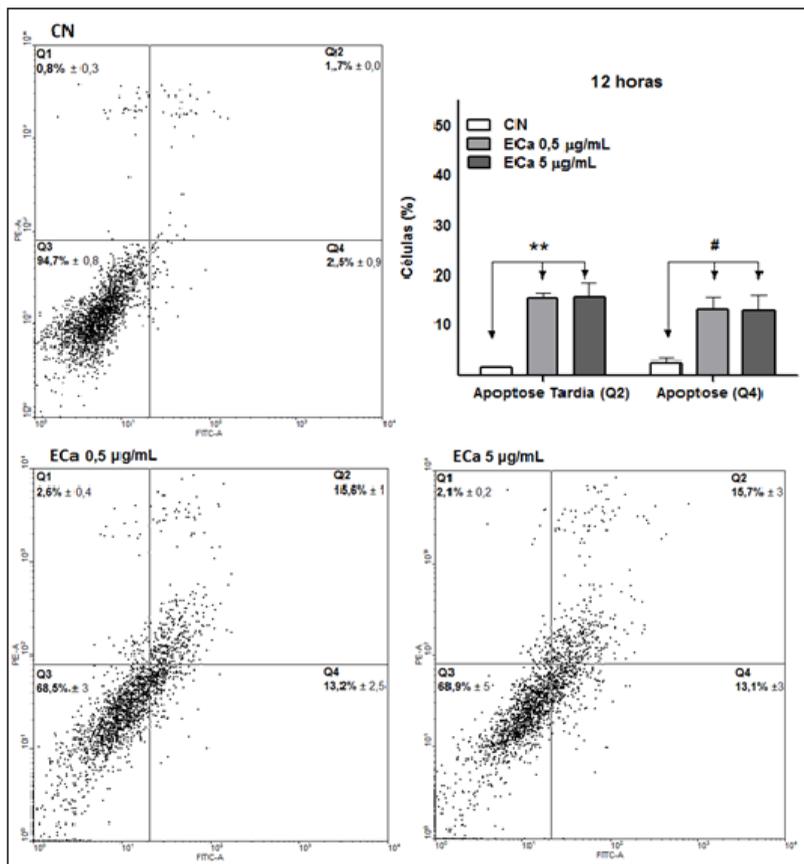


Figura 19. Avaliação da morte celular da linhagem B16F10 exposta ao ECa (0,5 e 5 µg/mL) pelo período de exposição de 12 h através da marcação com Anexina - V FITC (AV) e iodeto de propídeo (IP) por citometria de fluxo. Os quadrantes representam: Q1 – células mortas em necrose (AV+, IP+); Q2 – células em estágio de apoptose tardia (AV+, IP+); Q3 – células viáveis (AV-, IP-); Q4 – células em estágio inicial de apoptose (AV+, IP-). No gráfico de colunas estão representadas as frequências relativas das células nos três grupos experimentais, distribuídas nos quadrantes Q2 e Q4. As barras verticais representam a média das porcentagens e o respectivo erro padrão. (**) $p < 0,01$ e (#) $p < 0,001$ representam as diferenças estatísticas significativas.

A Figura 20 mostra a ocorrência de mortalidade nas células B16F10 tratadas com o ECa nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL durante 24 h. Após o tratamento com 0,5 µg/mL desse extrato, ocorreu um aumento significativo da marcação das células com AV, evidenciando morte celular apoptótica inicial (quadrante Q4; $19,1\% \pm 0,8$), comparado ao grupo controle ($3,4\% \pm 2$). É importante destacar que o grupo tratado na concentração de 5 µg/mL de ECa apresentou uma importante ocorrência de morte celular apoptótica em estágio inicial ($47,4\% \pm 5$), efeito que elevou-se de forma estatisticamente significativa em relação ao efeito do ECa na concentração de 0,5 µg/mL ($p < 0,001$). As células marcadas apenas com IP, classificadas como células necróticas, correspondem a $3,1\% \pm 2$ e $0,4\% \pm 0,2$ (quadrante Q1) nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL, respectivamente. Em $20,5\% \pm 5$ e $11,3\% \pm 1,9$ das células (0,5 e 5 µg/mL, respectivamente) foi observado apoptose tardia, evidenciada pela fluorescência de ambos os marcadores (quadrante Q2). O restante da população de células B16F10 tratadas com o ECa ($57,7\% \pm 5$ e $40,7\% \pm 3$; 0,5 e 5 µg/mL, respectivamente) não exibiu marcação fluorescente (Anexina V-, IP-; quadrante Q3), caracterizando-se como células viáveis.

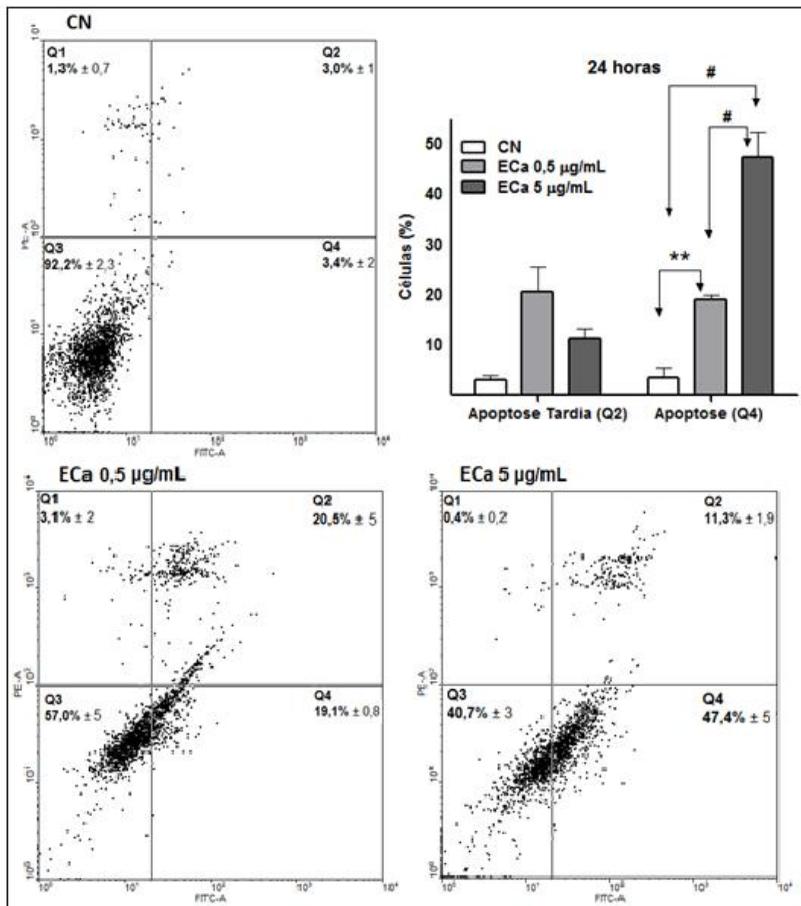


Figura 20. Avaliação da morte celular da linhagem B16F10 exposta ao ECa (0,5 e 5 µg/mL) pelo período de exposição de 24 h através da marcação com Anexina – V FITC (AV) e iodeto de propídeo (IP) por citometria de fluxo. Os quadrantes representam: Q1 – células mortas em necrose (AV-, IP+); Q2 – células em estágio de apoptose tardia (AV+, IP+); Q3 – células viáveis (AV-, IP-); Q4 – células em estágio inicial de apoptose (AV+, IP-). No gráfico de colunas estão representadas as frequências relativas das células nos três grupos experimentais, distribuídas nos quadrantes Q2 e Q4. As barras verticais representam a média das porcentagens e o respectivo erro padrão. (**) $p < 0,01$ e (#) $p < 0,001$ representam as diferenças estatísticas significativas.

5.2.4.2. Efeito do extrato de polifenóis na morte celular

A Figura 21 mostra a ocorrência de mortalidade nas células B16F10 tratadas com o extrato de polifenóis (EPf) nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL durante 12 h. Após o período de tratamento com 0,5 µg/mL com EPf, ocorreu um aumento significativo da marcação com AV, evidenciando morte celular apoptótica inicial (quadrante Q4; $9,2\% \pm 1$), comparado ao grupo controle ($2,5\% \pm 0,9$). Na concentração de 5 µg/mL, o grupo tratado com 0,5 µg/mL de EPf apresentou resultado similar ($11,7\% \pm 2$). As células mostrando marcação apenas com IP relacionadas como células necróticas (quadrante Q1), corresponderam a $3,1\% \pm 0,5$ e $2,7\% \pm 1,5$ nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL, respectivamente. A ocorrência de apoptose tardia, evidenciada pela fluorescência de ambos os marcadores (quadrante Q2) foi observada em $14,4\% \pm 0,3$ e $24,6\% \pm 4$ das células expostas a 0,5 e 5 µg/mL de EPf, respectivamente. O restante da população de células B16F10 incubadas com 0,5 e 5 µg/mL de EPf, $73,1\% \pm 0,3$ e $61\% \pm 5$, respectivamente, não exibiu marcação fluorescente (AV-, IP-; quadrante Q3), caracterizando-se como células viáveis.

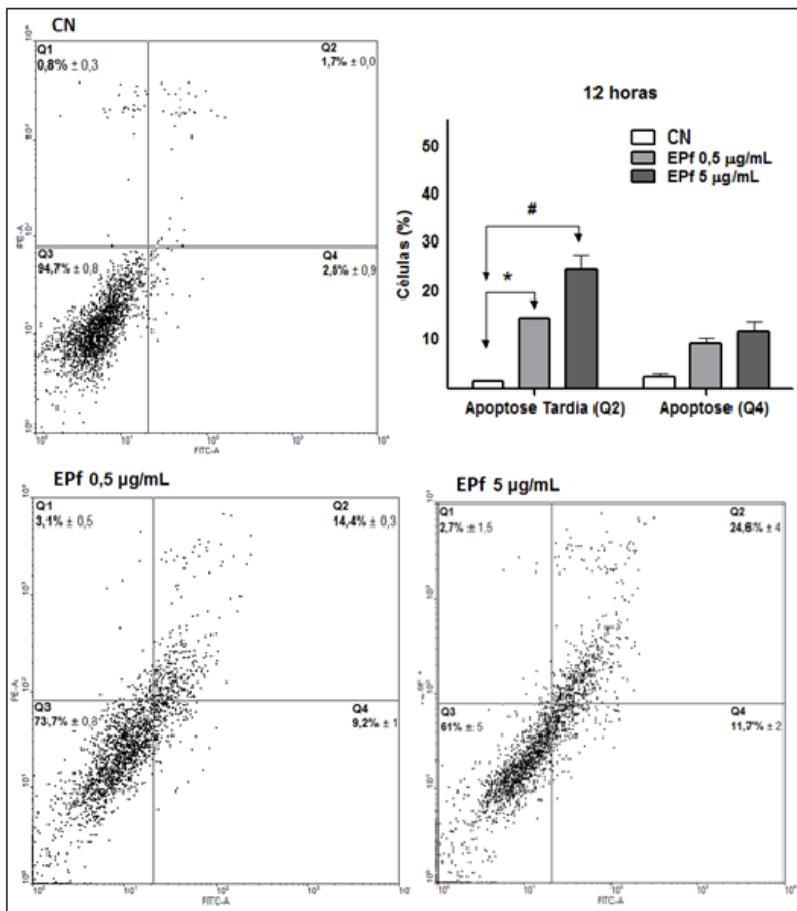


Figura 21. Avaliação da morte celular da linhagem B16F10 exposta ao EPf (0,5 e 5 µg/mL) pelo período de exposição de 12 h através da marcação com Anexina – V FITC (AV) e iodeto de propídeo (IP) por citometria de fluxo. Os quadrantes representam: Q1 – células mortas em necrose (AV-, IP+); Q2 – células em estágio de apoptose tardia (AV+, IP+); Q3 – células viáveis (AV-, IP-); Q4 – células em estágio inicial de apoptose (AV+, IP-). No gráfico de colunas estão representadas as frequências relativas das células nos três grupos experimentais, distribuídas nos quadrantes Q2 e Q4. As barras verticais representam a média das porcentagens e o respectivo erro padrão. (***) $p < 0,01$ e (#) $p < 0,001$ representam as diferenças estatísticas significativas.

A Figura 22 mostra a ocorrência de mortalidade nas células B16F10 tratadas com o EPf nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL durante

24 h. Após o tratamento com 0,5 µg/mL desse extrato, ocorreu um aumento significativo da marcação com AV, evidenciando morte celular apoptótica inicial (quadrante Q4; 14,4% ± 0,6), comparado ao grupo controle (3,4% ± 2). Na concentração de 5 µg/mL, o EPf apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,01$) comparado ao tratamento com 0,5 µg/mL (29,2% ± 1,7). As células marcadas apenas com IP, classificadas como células necróticas, equivaleram a 2,3% ± 0,3 e 0,2% ± 0,0 (quadrante Q1) nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL, respectivamente. Em 7,5% ± 0,4 e 7,4% ± 0,1 das células (0,5 e 5 µg/mL, respectivamente) foi observado apoptose tardia, evidenciada pela fluorescência de ambos os marcadores (quadrante Q2). O restante da população de células B16F10 tratadas com o EPf (75,7% ± 0,9 e 63% ± 1,7; 0,5 e 5 µg/mL, respectivamente) não exibiu marcação fluorescente (Anexina V-, IP-; quadrante Q3), caracterizando-se como células viáveis. Os resultados na tabela (Figura 15 A e B) demonstram que ambas as concentrações acima referidos foram capazes de promover morte celular apoptótica, porém, na concentração de 5 µg/mL no período de tratamento de 24 h, ocorreu maior porcentagem de células em apoptose tardia.

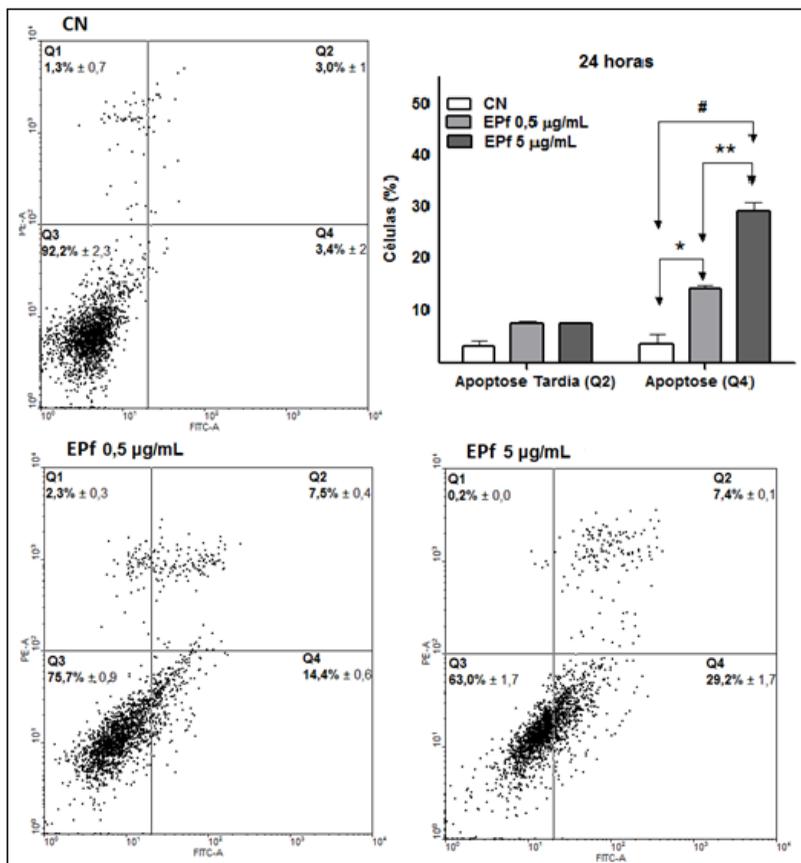


Figura 22. Avaliação da morte celular da linhagem B16F10 exposta ao EPf (0,5 e 5 µg/mL) pelo período de exposição de 24 h através da marcação com Anexina – V FITC (AV) e iodeto de propídeo (IP) por citometria de fluxo. Os quadrantes representam: Q1 – células mortas em necrose (AV-, IP+); Q2 – células em estágio de apoptose tardia (AV+, IP+); Q3 – células viáveis (AV-, IP-); Q4 – células em estágio inicial de apoptose (AV+, IP-). No gráfico de colunas estão representadas as frequências relativas das células nos três grupos experimentais, distribuídas nos quadrantes Q2 e Q4. As barras verticais representam a média das porcentagens e o respectivo erro padrão. (**) $p < 0,01$ e (#) $p < 0,001$ representam as diferenças estatísticas significativas.

Os resultados obtidos representados no Quadro 2 mostram que, ambas as concentrações do ECa (0,5 e 5 µg/mL) foram capazes de promover morte celular apoptótica em estágio inicial no período de 12 h

($p < 0,001$), comparado ao controle. O EPf, entretanto, não apresentou diferença estatística neste quadrante comparado ao controle. No período de 24 h de tratamento, o ECa e o EPf na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ demonstram um aumento significativo ($p < 0,001$) na porcentagem de células em início de apoptose (Q4).

Quadro 3. Avaliação da morte celular da linhagem B16F10 após incubação com meio de cultura (CN) ou com extrato de carotenóides (ECa) e extrato de polifenóis (EPf) (0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$), pelo período de exposição de 12 e 24 h. Média das porcentagem e o respectivo erro padrão da média em cada quadrante (Q1, Q2, Q3 e Q4), avaliadas por citometria.

Extrato	Tempo	Quadrante (%)			
		Q1	Q2	Q3	Q4
CN	12 h	0,8 \pm 0,3	1,7 \pm 0	94,7 \pm 0,8	2,5 \pm 0,9
ECa 0,5 $\mu\text{g/mL}$		2,6 \pm 0,4	15,6 \pm 1,0 ^{a**}	68,5 \pm 3,0	13,2 \pm 2,5 ^{a#}
ECa 5 $\mu\text{g/mL}$		2,1 \pm 0,2	15,7 \pm 3,0 ^{a**}	68,9 \pm 5,0	13,1 \pm 3,0 ^{a#}
EPf 0,5 $\mu\text{g/mL}$		3,1 \pm 0,5	14,4 \pm 0,3 ^{a#}	73,1 \pm 0,3	9,2 \pm 1,0
EPf 5 $\mu\text{g/mL}$		2,7 \pm 1,5	24,6 \pm 4,0 ^{a#}	61,0 \pm 5,0	11,7 \pm 2,0
CN	24 h	1,3 \pm 0,7	3,0 \pm 1	92,2 \pm 2,3	3,4 \pm 2
ECa 0,5 $\mu\text{g/mL}$		3,1 \pm 2,0	20,5 \pm 5,0	57,0 \pm 5,0	19,1 \pm 0,8 ^{a** b#}
ECa 5 $\mu\text{g/mL}$		0,4 \pm 0,2	11,3 \pm 1,9	40,7 \pm 3,0	47,4 \pm 5,0 ^{a# b#}
EPf 0,5 $\mu\text{g/mL}$		2,3 \pm 0,3	7,5 \pm 0,4	75,7 \pm 0,9	14,4 \pm 0,6 ^{a** b#}
EPf 5 $\mu\text{g/mL}$		0,2 \pm 0	7,4 \pm 0,1	63,0 \pm 1,7	29,2 \pm 1,7 ^{a# b#}

(a) diferença estatística significativa ao controle;

(b) diferença estatística significativa entre 0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$;

(*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (#) $p < 0,001$.

5.2.5. Avaliação da proliferação celular por imunocitoquímica por BrdU

A fim de se investigar a ocorrência de processos concomitantes a morte celular apoptótica, foram avaliados os efeitos da administração dos extratos de carotenóides e de polifenóis (0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$) na proliferação celular, das células da linhagem B16F10. Tais efeitos foram analisadas e quantificadas por meio da técnica de imunocitoquímica utilizando-se 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Fig. 23.), o qual consiste de um análogo da timidina e incorpora-se ao DNA de células em processo de proliferação.

As células da linhagem B16F10 foram incubadas com ECa e EPf (0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$) em períodos de 12 ou 24 h.

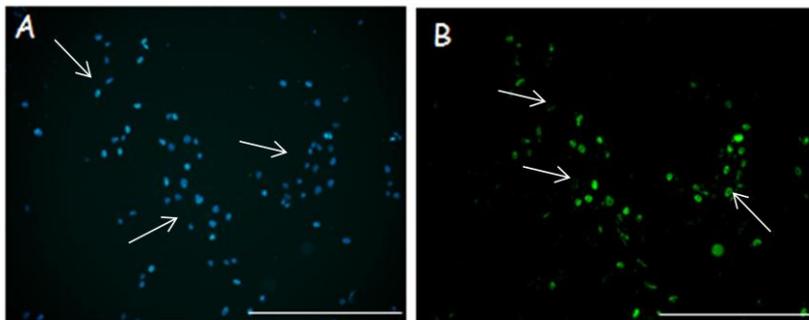


Figura 23. Fotografias representativas (40 x) da imunofluorescência por BrdU para avaliação da proliferação celular da linhagem B16F10. (A) setas indicando núcleos totais marcados com DAPI, (B) setas indicando núcleo das células positivas para BrdU. As barras equivalem a 500 μm .

5.2.5.1. Efeito do extrato de carotenóides

A análise quantitativa da incorporação por BrdU no período de 12 h de incubação das células com ECa demonstrou que estas apresentaram uma taxa de proliferação celular semelhante ao controle (CN). A taxa de proliferação dos grupos expostos às concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de ECa, corresponde a $50\% \pm 4,6$ e $51\% \pm 7,7$, respectivamente, e não difere estatisticamente do controle ($56\% \pm 6,3$) (Fig. 24).

No período de 24 h de incubação, a taxa de proliferação celular dos grupos expostos às concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de ECa, corresponde a $69\% \pm 4,5$ e $68\% \pm 6,3$, respectivamente, não diferindo também do observado no grupo controle ($77\% \pm 7$).

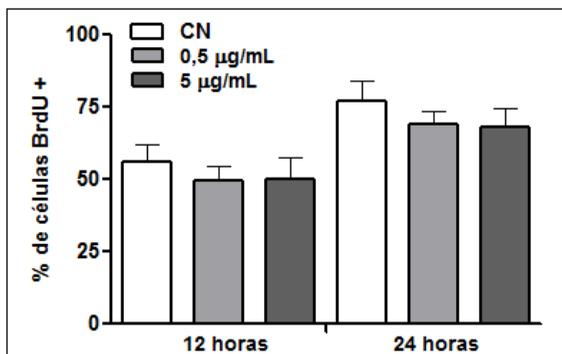


Figura 24. Efeito do ECa na linhagem B16F10 sobre a proliferação celular através da técnica de imunocitoquímica utilizando-se BrdU como marcador. Análise quantitativa das células em diferentes concentrações e tempo. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. (*) $p < 0,05$ comparados com o controle negativo (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Dunnett).

5.2.5.2. Efeito do extrato de polifenóis

A análise quantitativa da incorporação por BrdU no período de 12 h de incubação das células com EPf demonstrou que a taxa de proliferação dos grupos expostos às concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de EPf, corresponde a $53\% \pm 5$ e $52\% \pm 4$, respectivamente, e não difere do observado no controle ($56\% \pm 6,3$) (Fig. 25).

No período de 24 h de incubação, a taxa de proliferação celular dos grupos expostos às concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de EPf, corresponde a $70\% \pm 4,7$ e $76\% \pm 5,6$, respectivamente, não diferindo também do observado no grupo controle ($77\% \pm 7$).

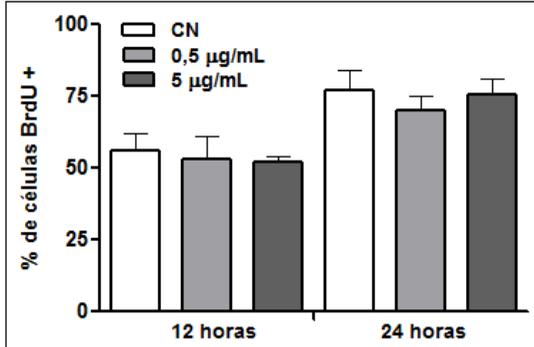


Figura 25. Efeito do EPf na linhagem B16F10 sobre a proliferação celular através da técnica de imunocitoquímica utilizando-se BrdU como marcador. Análise quantitativa das células em diferentes concentrações e tempo. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. (*) $p < 0,05$ comparados com o controle negativo (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Dunnett).

Quadro 4. Efeito na proliferação celular da linhagem B16F10 após incubação com meio de cultura (CN) ou com extrato de carotenóides (ECa) e extrato de polifenóis (EPf) (0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$), pelo período de exposição de 12 e 24 h. Média do número total de células marcadas com DAPI e BrdU, seguido pela porcentagem de células com marcação positiva para BrdU e o respectivo erro padrão da média.

<i>Tratamento</i>	<i>Tempo</i>	<i>DAPI</i>	<i>BrdU</i>	<i>(%)BrdU +</i>
CN	12 h	768 \pm 11	430 \pm 8	55 \pm 4,8
ECa 0,5 $\mu\text{g/mL}$		651 \pm 7,0	324 \pm 6,0	50 \pm 4,5
ECa 5 $\mu\text{g/mL}$		620 \pm 8,0	310 \pm 5,0	51 \pm 7,7
EPf 0,5 $\mu\text{g/mL}$		559 \pm 5,0	296 \pm 2,0	53 \pm 5,0
EPf 5 $\mu\text{g/mL}$		545 \pm 7,3	283 \pm 6,1	52 \pm 4,0
CN	24 h	870 \pm 6,3	669 \pm 4,8	77 \pm 7,0
ECa 0,5 $\mu\text{g/mL}$		312 \pm 5,6 ^{a*}	215 \pm 8,0 ^{a*}	69 \pm 4,5
ECa 5 $\mu\text{g/mL}$		328 \pm 7,0 ^{a*}	224 \pm 6,8 ^{a*}	68 \pm 6,3
EPf 0,5 $\mu\text{g/mL}$		437 \pm 2,8 ^{a*}	306 \pm 4,0 ^{a*}	70 \pm 4,7
EPf 5 $\mu\text{g/mL}$		502 \pm 4,5 ^{a*}	379 \pm 5,3 ^{a*}	75 \pm 5,6

(a) diferença estatística significativa ao controle; (*): $p < 0,05$

A análise quantitativa da incorporação de BrdU revelou que as células incubadas com os ECa e EPf apresentaram uma taxa de proliferação celular muito semelhante à taxa de proliferação celular do grupo controle, não diferindo estatisticamente.

5.2.6. Avaliação da capacidade de formação de colônias

O ensaio de formação de colônia ou ensaio clonogênico de sobrevivência da célula determina a capacidade de uma única célula de manter-se indefinidamente, mantendo assim, sua capacidade de sobrevivência para formar uma grande colônia ou um clone. Desta

forma, esta célula é chamada de clonogênica. A curva de sobrevivência da célula neste caso é, portanto, definida como a relação entre a concentração do agente usado para produzir um determinado efeito, e a fração de células de uma determinada linhagem que mantém a sua capacidade de se reproduzir (MUNSHI et al., 2005). Este experimento foi proposto para avaliar este efeito na linhagem B16F10 após a administração dos tratamentos com ECa e EPf (0,5 e 5 µg/mL) em dois períodos de tempo (12 e 24 h), completando assim, o ensaio de proliferação celular (item 5.2.5.).

5.2.6.1. Efeito do extrato de carotenóides

Como representado na Figura 26 - A, houve uma redução significativa na capacidade de sobrevivência das células B16F10, conforme foi expresso pelo número de colônias após a administração do ECa. O tratamento com a menor concentração do ECa, 0,5 µg/mL durante 12 horas, foi suficiente para inibir significativamente a formação de colônias em $25\% \pm 8$. O tratamento com a maior concentração, 5 µg/mL, reduziu significativamente, em $96\% \pm 0,4$, o número de colônias destas células, comparado ao grupo controle (Fig. 26. B).

No período de tratamento de 24 h, o ECa promoveu uma redução expressiva no número de colônias da ordem de $56\% \pm 7$ e $99,5\% \pm 0,4$ nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL, respectivamente, bloqueando, nesta última concentração, a proliferação celular (sobrevivência da população de células B16F10) quando comparado ao número de colônias no grupo controle.

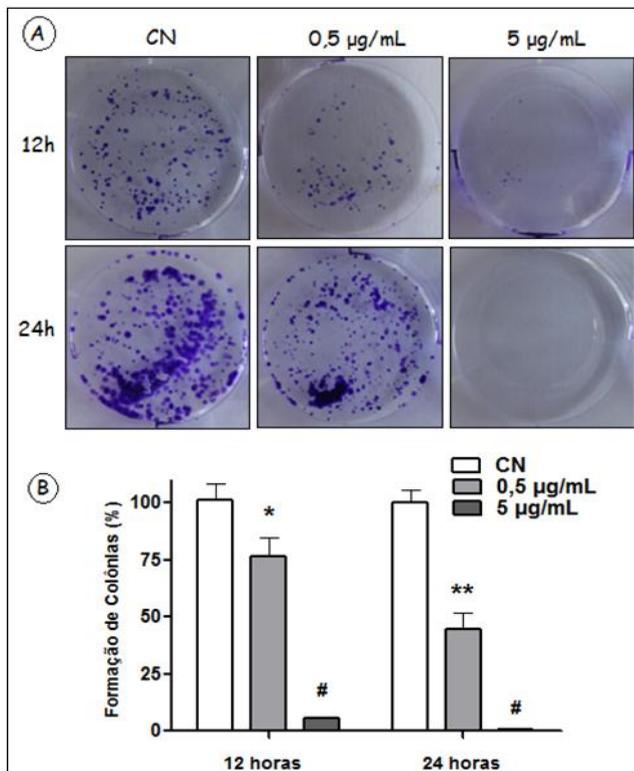


Figura 26. Efeito da concentração nos tratamentos com ECa (0,5 e 5 µg/mL) em dois períodos de tempo (12 e 24 h), sobre a capacidade de formação de colônias das células B16F10. A) Fotografias dos poços das placas de cultivo (as imagens são representativas das colônias após os tratamentos); B) Gráfico dos valores referentes a média \pm erro padrão da média de três avaliações em dois experimentos independentes. (*) $p < 0,05$, (**), $p < 0,01$ e (#) $p < 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas comparadas ao controle negativo (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Dunnett).

5.2.6.2. Efeito do extrato de polifenóis

Como representado na Figura 27 - A, houve uma redução significativa na capacidade de sobrevivência das células B16F10, conforme foi expresso pelo número de colônias após a administração do EPf. O tratamento com a menor concentração do EPf, 0,5 µg/mL durante 12 horas, foi suficiente para inibir significativamente a formação de colônias em $19\% \pm 4$. O tratamento com a maior concentração, 5

$\mu\text{g/mL}$, reduziu significativamente, em $92\% \pm 2$, o número de colônias destas células, comparado ao grupo controle (Fig. 27. B).

No período de tratamento de 24 h, o EPf promoveu uma redução expressiva no número de colônias da ordem de $70\% \pm 11$ e $99\% \pm 0,5$ nas concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, bloqueando, nesta última concentração, a proliferação celular (sobrevivência da população de células B16F10) quando comparado ao número de colônias no grupo controle.

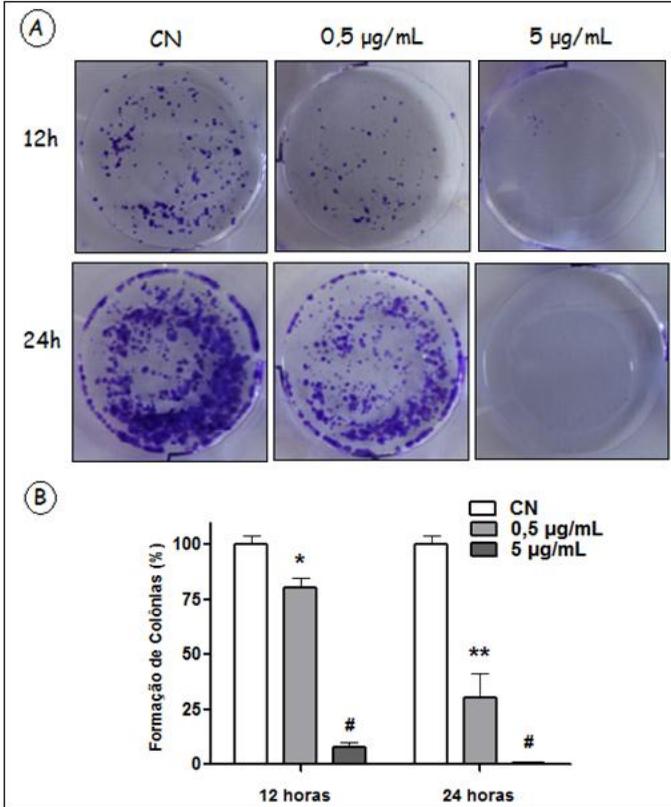


Figura 27. Efeito da concentração nos tratamentos com EPf (0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$) em dois períodos de tempo (12 e 24 h), sobre a capacidade de formação de colônias das células B16F10. A) Fotografias dos poços das placas de cultivo (as imagens são representativas das colônias após os tratamentos); B) Gráfico dos valores referentes a média \pm erro padrão da média de três avaliações em dois experimentos independentes. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (#) $p < 0,001$ representam diferenças estatisticamente significativas comparadas ao controle negativo (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Dunnett).

A análise quantitativa das colônias revelou que as células incubadas com os ECa e EPf apresentaram uma significativa diferença comparado ao grupo controle no período de 12 h de incubação com os extratos. No período de 24 h a diferença significativa foi ainda mais expressiva, comparado ao grupo controle.

Quadro 5. Efeito na formação de colônias da linhagem B16F10 após incubação com extrato de carotenóide (ECa) e extrato de polifenóis (EPf) (0,5 e 5 µg/mL), pelo período de exposição de 12 e 24 h. Média da porcentagem de colônias e o respectivo erro padrão da média.

<i>Tratamentos</i>	<i>Tempo</i>	<i>Formação de Colônia (%)</i>
ECa 0,5 µg/mL	12 h	75 ± 8 *
ECa 5 µg/mL		4 ± 0,4 #
EPf 0,5 µg/mL		81 ± 4 *
EPf 5 µg/mL		8 ± 2 #
ECa 0,5 µg/mL	24 h	44 ± 7 **
ECa 5 µg/mL		0,5 ± 0,4 #
EPf 0,5 µg/mL		30 ± 11 **
EPf 5 µg/mL		1 ± 0,5 #

(*), $p < 0,05$, (**), $p < 0,01$ e (#) $p < 0,001$ representam diferenças estatísticas significativas comparado ao grupo controle (100%).

Conforme podemos visualizar no Quadro 4, os tratamentos administrados com o ECa promoveram maior efeito de inibição de formação de colônias, comparado aos tratamentos administrados com o EPf.

5.2.7. Avaliação do citoesqueleto e pontos de adesão por imunofluorescência

Para determinar se os extratos de carotenóides (ECa) e polifenóis (EPf) podem promover alterações relevantes no citoesqueleto, com base

em moléculas responsáveis pelos em pontos de adesão, logo após o período de exposição ao extrato, as células foram marcadas com anticorpo anti-vinculina conjugado a FITC para a visualização dos pontos de adesão focal bem como com faloidina (phalloidin-TRITC conjugate) e DAPI para visualização dos filamentos de actina e do núcleo, respectivamente.

Os resultados na Figura 289 e Figura 29 mostram que os ECa e EPf alteram o padrão de organização da estrutura de actina e vinculina, e alteram a distribuição dos pontos de adesão, de um modo relacionado ao aumento das concentrações administradas (0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$).

Comparando a marcação da vinculina entre os grupos tratados e o controle, nota-se que os primeiros deixam de apresentar pontos heterogêneos da marcação focal que estão bem evidentes no controle. O padrão de marcação da vinculina em células expostas aos extratos se mostra mais homogênea do que no controle.

As alterações verificadas com estes experimentos nos padrões de marcação das células de grupos tratados em relação ao controle, indicam a ocorrência de possíveis danos ou alterações diretamente ao nível do citoesqueleto, especificamente em moléculas que integram pontos de adesão focal, das células da linhagem tumoral B16F10.

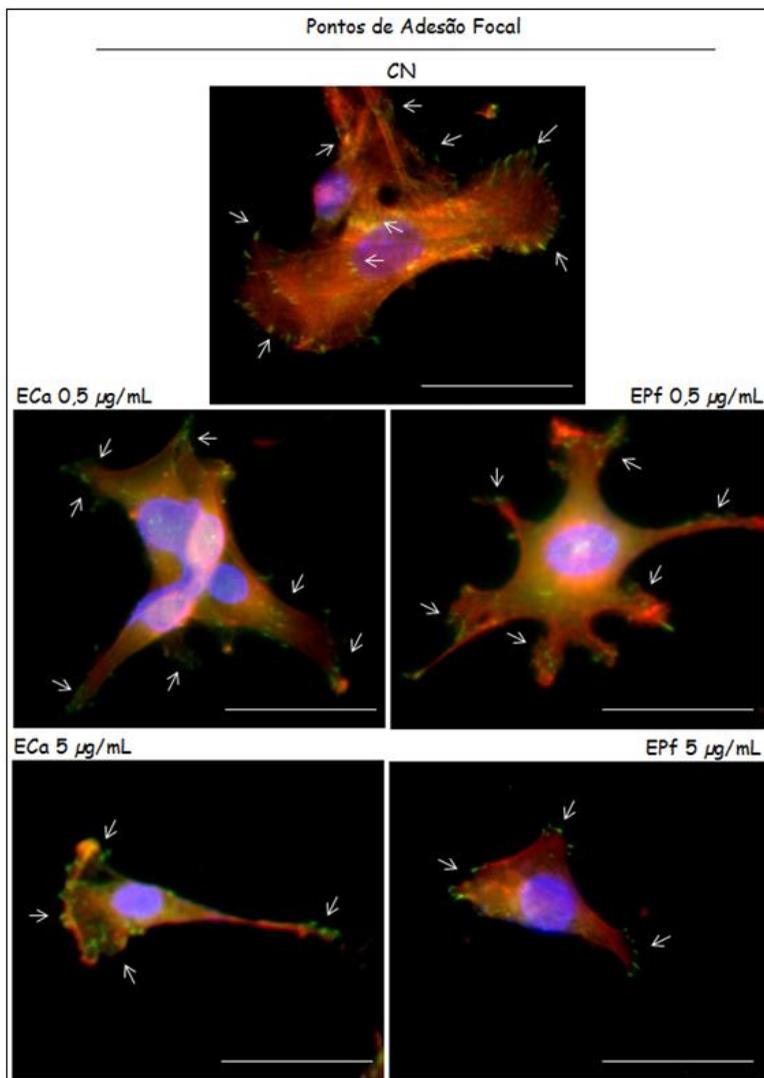


Figura 28. Influência dos extratos de carotenóides (ECa) e polifenóis (EPf) (0,5 e 5 µg/mL) sobre o citoesqueleto, núcleo e pontos de adesão de células B16F10, avaliada por microscopia de fluorescência (imagens sobrepostas). As células foram marcadas com anticorpo primário anti-vinculina /anticorpo secundário AP 124F para marcação dos pontos de adesão (verde-setas), faloidina para marcação de fibras de actina(vermelho) e DAPI para marcação de núcleo celular (azul). Imagens capturadas com objetiva de 40 x. As barras representam escala de 50 µm.

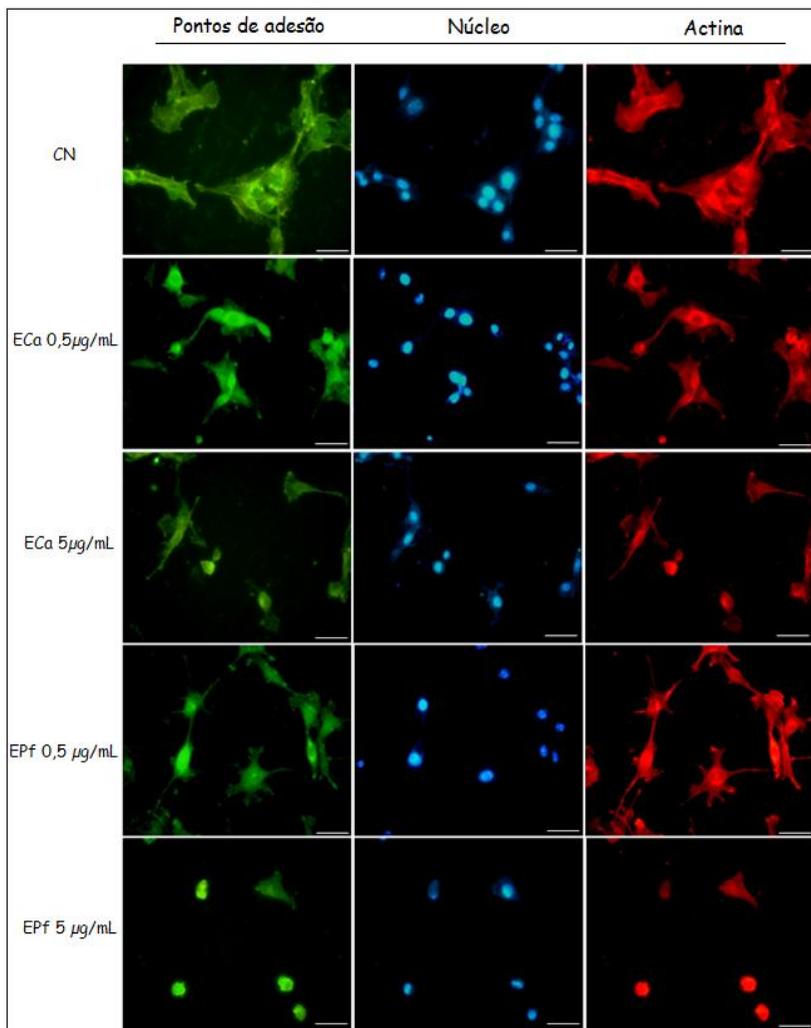


Figura 29. Influência dos extratos de carotenóides (Eca) e polifenóis (EPf) (0,5 e 5 µg/mL) sobre o citoesqueleto, núcleo e pontos de adesão focal de células B16F10, avaliada por microscopia de fluorescência. As células foram marcadas com anticorpo primário anti-vinculina /anticorpo secundário AP 124F para marcação dos pontos de adesão (verde), faloidina para marcação de fibras de actina(vermelho) e DAPI para marcação de núcleo celular (azul). Imagens capturadas com objetiva de 40 x. As barras representam escala de 50 µm.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a potencial ação antitumoral de substâncias de origem vegetal. Foram avaliados *in vitro* os efeitos de dois extratos (Eca e EPf) derivados da variedade crioula de milho Rajado 8 Carreiras (*Zea mays*) e os compostos puros β -caroteno (β C), luteína (Lut), ácido gálico (AG), ácido cafeico (AC) e ácido ferúlico (AF), sobre os principais mecanismos celulares de sobrevivência, morte, proliferação e adesão celular em linhagens neoplásicas e de uma linhagem não neoplásica.

Produtos naturais desempenham um papel relevante na terapia do câncer, com substancial número de agentes anticancerígenos derivados de produtos naturais provenientes de várias fontes tais como, plantas, animais e microorganismos (Nobili et al., 2009).

O câncer é a principal causa de morte nos países desenvolvidos economicamente e a segunda causa principal de morte em países em desenvolvimento (Jemal et al., 2011). O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, principalmente a partir do século passado, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial (Guerra et al., 2005).

Fenótipos cancerosos resultam da desregulação de mais de 500 genes em várias vias de sinalização na célula. Isto indica que a inibição de um produto único para um determinado gene ou via de sinalização celular é pouco provável que venha a prevenir ou tratar o câncer. No entanto, a maioria das terapias atuais antitumorais são baseadas na modulação de um único alvo. Essas terapias são muitas vezes ineficazes e tóxicas ao organismo. Portanto, o paradigma atual para o tratamento do câncer se reflete em combinar um número variado de fármacos ou para projetar fármacos que modulem alvos múltiplos. Como resultado, as empresas farmacêuticas têm se interessado cada vez mais em desenvolver terapias com alvos múltiplos. Muitos agentes dietéticos derivados de plantas, chamados nutracêuticos, têm propriedades em alvos múltiplos. Além disso, esses produtos são mais baratos, mais seguros e mais acessíveis comparados aos sintéticos (Gupta et al., 2010).

Alguns nutracêuticos estão atualmente em ensaios clínicos, mas outros já foram aprovados para uso humano. A nutracêutica (um termo formado pela combinação das palavras "Nutrição" e "farmacêutica") é qualquer substância considerada um alimento ou parte de um alimento que provê benefícios médicos e de saúde (Gupta et al., 2010).

Estudos epidemiológicos sugerem fortemente que a dieta desempenha um papel importante na prevenção de doenças crônicas. Carotenóides, polifenóis, tióis, tocoferóis e glucosinolatos comumente encontrados em frutas, legumes e grãos, proporcionam efeitos quimiopreventivo para combater o estresse oxidativo no corpo e manter o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, por exemplo, para melhorar a saúde humana (Wu et al., 2006).

Com relação aos tecidos do milho, vêm sendo relatadas diversas propriedades farmacológicas de interesse, relacionadas aos carotenóides, bem como polifenóis e outras classes de compostos. Além do efeito antioxidante, a literatura descreve as atividades citotóxica (Zielinski, 2003; Jeong et al., 2004), anti-proliferativa, anti-angiogênica (Rao et al., 1993; Rodrigues-Caso et al., 2003; Seeram et al., 2005), antimutagênica e anti-carcinogênica (Yang et al., 2001; Orsolic et al., 2003).

6.1. ANÁLISES FITOQUÍMICAS

Inicialmente, buscou-se detectar e quantificar compostos presentes nos extratos de carotenóides (ECa) e extratos de polifenóis (EPf) através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Em relação ao ECa, foram feitos ensaios para determinar o tempo de saponificação e garantir a precisão das quantificações. Condições alcalinas em um meio de saponificação contribuem para a degradação e remoção de compostos indesejados, tais como as clorofilas (Aman et al., 2005). Desta forma, foram analisadas amostras com tempos de 4 e 8 h de saponificação. Através da análise por espectrofotometria, a amostra com tempo de saponificação de 8 h apresentou uma diminuição dos picos correspondentes, provavelmente, à clorofila (Dados não-mostrados).

Observando-se o perfil cromatográfico dos extratos de carotenóides (Fig. 5.), nota-se que o emprego de CLAE possibilitou a identificação de 4 compostos carotenóides. A luteína corresponde ao constituinte majoritário deste material, seguido de zeaxantina, β -trans-caroteno e α -cis-caroteno. Estes resultados concordam parcialmente com os resultados obtidos por Lemos (2010) onde foi encontrado ainda um pico (no tempo de 4,8 min) correspondente ao licopeno. Neste último estudo, também não foram encontrados picos relacionados, especificamente, ao α -cis-caroteno (no tempo de 12,6 min).

Quando comparamos o teor de carotenóides obtidos no presente estudo, com os resultados obtidos por Kuhnen e colaboradores (2011), observamos que, em grãos da mesma variedade crioula de milho, cujos valores situaram-se entre 0,3 e 0,1 $\mu\text{g/g}$ para zeaxantina e luteína,

respectivamente, os extratos foliares obtidos nos nossos ensaios apresentaram um conteúdo bem mais elevado desses carotenóides, de 5,34 e 20,05 $\mu\text{g/g}$, para zeaxantina e luteína, respectivamente. Estes resultados salientam o potencial de aproveitamento desta biomassa como fonte de metabólitos bioativos.

Analisando o perfil cromatográfico do EPf (Fig. 6.), notou-se que o emprego de CLAE possibilitou a identificação de 10 compostos fenólicos. Comparando-se com os dados de Lemos (2010), compostos como quercetina, ácido sináptico, ácido vanílico, ácido cumárico e ácido cinâmico, não foram identificados nas amostras sob estudo, embora, rutina e catequina tenham sido detectadas. Porém, nossos resultados concordam com os de Lemos (2010) que identificou e quantificou o ácido clorogênico com um dos seus compostos majoritários para a variedade crioula Rajado 8 Carreiras. Os compostos majoritários encontrados em nossas amostras de EPf foram: o ácido clorogênico (43,72 $\mu\text{g/g}$), seguido de catequina (31,5 $\mu\text{g/g}$), ácido ferúlico (29,49 $\mu\text{g/g}$), ácido protocatecuico (9,95 $\mu\text{g/g}$) e ácido gálico (8,57 $\mu\text{g/g}$).

Alguns dos principais ácidos fenólicos detectados nas amostras sob estudo, obtidas das folhas de *Z. mays*, também foram observados, embora como componentes majoritários nos grãos dessa espécie, como o ácido gálico e o ácido protocatecuico que, segundo Kuhnen e colaboradores (2007), apresentaram um teor médio correspondente a 176 e 147 $\mu\text{g/g}$ de farinha, respectivamente. Todavia, foram também observadas diferenças marcantes, em relação aos constituintes químicos, entre esses órgãos vegetais. Por exemplo, o ácido cinâmico, composto não detectado nas amostras de extrato sob estudo, foi o ácido fenólico mais abundante no grão. Entretanto, o ácido clorogênico, ácido fenólico mais abundante detectado e quantificado nas amostras de extratos das folhas, foi detectado em baixa concentração nos grãos (Kuhnen et al., 2007).

Os agentes quimiopreventivos encontrados na dieta humana são um grupo muito promissor de compostos, devido a sua segurança ou baixa toxicidade e aceitação geral. Numerosos compostos fenólicos têm sido investigados em razão de seu potencial como agentes quimiopreventivos contra o câncer. Ácidos fenólicos de ocorrência natural e análogos (por exemplo, os ácidos cafeico e gálico) são conhecidos por exercerem uma variedade de funções biológicas, além de sua principal atividade antioxidante em relação à modulação da carcinogênese (Fresco et al., 2006).

Praticamente insolúveis em água, os carotenóides e alguns compostos fenólicos na maioria dos estudos *in vitro*, são fornecidos como *pellets* dispersíveis em água, soluções detergentes, ou diluídos em

solventes diversos, tais como álcoois, dimetilsulfóxido (DMSO), tetrahidrofurano (THF) e hexano (Palozza et al., 2005). Foram avaliadas diferentes diluições com diferentes solventes como, por exemplo, etanol, etanol: DMSO, DMSO apenas, hexano:acetona e hexano apenas, porém, não obtivemos como os mesmos, a adequada diluição dos extratos e dos compostos sob estudo. O solvente DMSO apresentou uma boa diluição para alguns dos compostos, porém, na porcentagem utilizada ($> 0,3\%$) influenciou a viabilidade celular ($p < 0,05$). Além dos solventes acima relacionados, para fins de dispersão de substâncias de caráter polar no meio aquoso das células foi também avaliada a atividade de *pellets* de metilcelulose (1,5%), por serem dispersíveis nesse tipo de meio. Porém, o volume pipetado dos compostos diluídos em hexano nos *pellets* não resultou em volume preciso, devido à volatilidade do solvente.

O solvente tetrahidrofurano (THF) foi o que apresentou melhor resultado nos testes realizados, diluindo as amostras de forma eficiente e adequada. Contudo, devido a alta toxicidade deste solvente, foram realizados ensaios prévios no presente estudo para avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico do MTT para que subsequentemente se pudesse avaliar os efeitos nas linhagens celulares sob estudo, e determinar a porcentagem máxima de THF administrada, sem causar prejuízo as células.

6.2. ESTUDO *IN VITRO* DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os ensaios para controle do THF demonstraram que a citotoxicidade deste solvente nas culturas celulares, apresenta-se somente em concentrações acima de 0,15%, diferentemente das porcentagens máximas preconizadas na literatura por Palozza e colaboradores (2006) e Lakshminarayana e colaboradores (2010), que reportaram como máximo, 0,2% e 0,5% de THF, respectivamente.

Os carotenóides e compostos fenólicos têm sido relacionados à inibição da transformação neoplásica e imunoproteção. Um dos objetivos do presente estudo foi verificar a atividade de ECa e Epf, e dos compostos puros β C, Lut, AG, AC e AF, nas linhagens tumorais U87-MG (glioblastoma humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), 786-O (adenocarcinoma de rim humano), B16F10 (melanoma de camundongo) e da linhagem não neoplásica L929 (fibroblasto de camundongo).

Após os ensaios para verificação da porcentagem do THF (0,15%) a ser utilizado como diluente, foi investigada a citotoxicidade

dos extratos e dos compostos puros no período de 24 h de exposição pelo ensaio colorimétrico do MTT.

A amostra do extrato de carotenóides foi quantificada por espectrofotometria. Os valores de absorvância encontrados em 450 nm (média das leituras de 3 extrações/amostras) foram utilizados para determinar a concentração de carotenóides totais. Já a amostra de EPf, foi quantificada através do método de Folin-Ciocalteu conforme fluxograma do item 4.2.4.).

Os resultados da avaliação da citotoxicidade dos extratos e compostos puros, com exceção do AF, evidenciam a eficácia dessas substâncias, que reduziram significativamente a viabilidade de todas as linhagens de células tumorais sob estudo.

A literatura dedicada à atividade antitumoral dos extratos de carotenóides e de polifenóis derivados da variedade crioula de milho Rajado 8 Carreiras (*Zea mays*), é exígua. No presente estudo foi verificado que o ECa (Fig. 9.) promoveu maior efeito sobre as linhagens B16F10 e 786-O, inibindo a viabilidade celular em até 75% em ambas as linhagens, com 3 e 5 µg/mL, respectivamente. O menor efeito com esse extrato foi verificado na linhagem U87-MG, onde houve redução de apenas 11% da população das células do glioma (10 µg/mL). Entre os compostos puros, o βC promoveu maior inibição na viabilidade celular das linhagens 786-O e B16F10 (em até 57% com 7 µg/mL; e 53% com 5 µg/mL, respectivamente) e o menor efeito obtido com βC (10 µg/mL) se deu sobre a linhagem U87-MG que apresentou uma redução de 30% na viabilidade. Outro carotenóide sob estudo, a Lut (2 µg/mL), inibiu até 73% a viabilidade das células da linhagem B16F10, enquanto que o menor efeito foi observado com a linhagem MCF-7 (46%, com administração de apenas 1 µg/mL) (Fig. 12.). De um modo similar aos achados no presente estudo, outros pesquisadores mostraram inibição de 64% da linhagem celular HeLa em concentrações tão baixas quanto 3,4 µg/mL de Lut (Lakshminarayana et al., 2010). Cha e colaboradores (2008) sugerem que tais efeitos promissores dos carotenóides em células tumorais podem ser devidos às propriedades antioxidantes mas que esses carotenóides também podem atuar através de outros mecanismos, como diretamente em junções comunicantes, pela regulação do crescimento celular ou por meio da modulação da expressão gênica.

Analisando os compostos fenólicos sob estudo, podemos observar que com a administração do EPf (7 µg/mL) o maior efeito de inibição da viabilidade celular observado ocorreu também sobre a linhagem B16F10, reduzindo em 77% a população das células. O menor efeito na mesma concentração desse extrato (7 µg/mL) foi verificado

sobre a linhagem 786-O, com a redução da população de células em 23%. Outros estudos prévios também demonstraram a forte inibição, de até 80%, sobre a viabilidade celular, devido à exposição em diferentes tempos, ao EPf. Esse nível de redução na sobrevivência em resposta a diferentes concentrações do extrato foi reportado sobre linhagens celulares também utilizadas no presente estudo, tais como a MCF-7 (EPf; 41 µg/mL) e a 786-O (EPf; 155 µg/mL), e em outras linhagens de células tumorais como a PC-3 (câncer de próstata humano; EPf; 250 µg/mL) e K562 (linfoma humano; EPf; 3,6 µg/mL) (Karna et al., 2011; Predes et al., 2011).

Analisando a citotoxicidade do composto puro AG (Fig. 13.), verificamos que a viabilidade celular da linhagem B16F10 foi a mais susceptível, tendo reduzido em 81% o número de células, na concentração de 30 µg/mL de AG. Esses resultados corroboram os estudos realizados por Indap e colaboradores (2006) e Locatelli e colaboradores (2009) que haviam demonstrado redução do número de células viáveis da B16F10 em 90% da população, com a administração de 25 µg/mL até 150 µg/mL de AG. No presente estudo, o menor efeito obtido com AG foi na linhagem MCF-7, reduzindo a viabilidade celular em 57%, com 30 µg/mL. O composto AC (Fig. 14.) apresentou a maior taxa de inibição na linhagem 786-O (em 57%, com 50 µg/mL) e a menor taxa de inibição na linhagem U87-MG (em 31%, com 50 µg/mL). Serafim e colaboradores (2011) a partir de tratamentos administrados com AC mostraram que esse composto também não foi eficaz em inibir a viabilidade celular de algumas linhagens de câncer de mama humano, como MCF-7, HS578, MDA-MB-231. Os resultados de Indap e colaboradores (2006) também mostraram que o AF não interferiu na viabilidade dessas linhagens, assim como também não interferiu na viabilidade das linhagens do nosso estudo.

A linhagem não neoplásica L929 apresentou as menores percentagens de inibição celular (22% - 56%), além disso, quando exposto ao composto puro Lut (0,5 µg/mL), ao contrário, aumentou em até 10% a viabilidade celular (Fig. 12.).

Segundo Suffines e Pezzuto (1990), somente tratamentos com valor de CI50 < 200 µg/mL podem ser considerados eficazes. Analisando os dados obtidos no presente estudo, com base nos valores de CI50, nós concluímos que todos os compostos que promoveram efeito, com excessão do AF (Fig. 15.), podem ser considerados eficazes na redução da viabilidade celular. Ressaltamos ainda, que o menor valor de CI50 encontrado foi relativo ao tratamento com o composto puro Lut (0,4 µg/mL), nas linhagens 786-O e MCF-7, e o maior CI50 foi verificado

com a administração do composto AC (35 µg/mL), na linhagem U87-MG. Esses achados indicam que o composto puro Lut foi o que exerceu a ação citotóxica mais potente nas células sob estudo (Quadro 1).

Para dar continuidade aos nossos ensaios, a linhagem B16F10 foi escolhida. Trata-se de um melanoma cujas células em metástase, possui grande afinidade por células pulmonares. A escolha dessa linhagem se deu devido a alguns fatores essenciais. A linhagem B16F10 apresentou uma redução significativa em relação à todos os extratos e compostos administrados. Além disso, existem relativamente poucos estudos demonstrando a ação de carotenóides e polifenóis em melanoma maligno. O terceiro fator essencial, está relacionado com a elevada taxa de incidência de casos de melanoma no Brasil.

Em seguida, para avaliar se a atividade citotóxica mostrada no ensaio de viabilidade com o MTT estaria relacionada também ao tempo de exposição aos extratos e compostos, foi avaliado o efeito tempo-dependente dos compostos que apresentaram importante inibição sobre a linhagem B16F10 (ECa, EPf, Lut, βC e AG). As concentrações encontradas no CI50 foram utilizadas como referência para este ensaio. Segundo os resultados, todos os tratamentos apresentaram características tempo-dependente, nos intervalos de tempo de 12 - 48h (Fig. 16.). Os resultados do nosso estudo concordam com os obtidos por Locatelli e colaboradores (2009) que mostraram a ocorrência de até 100% de inibição na viabilidade na linhagem B16F10 após exposição das células ao composto AG por um período de exposição de 72 h. Outros estudos também reportam efeito tempo-dependente com o AG na linhagem K562 (Indap et al., 2006), com a Lut na linhagem HeLa (Lakshminaravana et al., 2010), e com EPf na linhagem PC-3 (Karna et al., 2009).

Quando foi avaliada a morfologia das células de melanoma B16F10 expostas 0,5 e 5 µg/mL de EPf e de ECa, verificou-se (principalmente na presença deste último) a ocorrência de modificações na morfologia celular. As alterações morfológicas verificadas, uma redução tanto na dimensão celular como do espriamento (principais aspectos avaliados), são evidenciadas nas células expostas aos extratos (Fig. 17. e 18.).

Com a redução da atividade mitocondrial verificada pelo ensaio colorimétrico do MTT expressa pela redução pronunciada do número de células viáveis e também em razão das alterações verificadas na respectiva morfologia, foi realizado o ensaio de morte celular afim de esclarecer se a ação citotóxica dos extratos estaria relacionada a morte apoptótica. Para isso, após o período de incubação das células da linhagem B16F10 com os extratos (ECa ou EPf) nos períodos de 12 e 24

h, foi adicionado as o marcador Anexina – V conjugado com FITC e o iodeto de propídeo (IP) por citometria de fluxo.

Na análise dos resultados da citometria de fluxo, relativos ao período de 12 h de tratamento com os extratos (Fig. 19. e 21.), verificou-se que as células exibem, em função da marcação/coloração com Anexina V-FITC e IP, uma clara evidência de apoptose inicial e tardia em ambas as concentrações (0,5 e 5 µg/mL) com o ECa. Para o EPf a diferença significativa em relação ao controle se deu apenas com células marcadas em fase de apoptose tardia. No período de 24 h o ECa e o EPf apresentaram uma diferença significativa com células marcadas em fase de apoptose inicial (Fig. 20. e 22.). Esses resultados demonstram claramente a ocorrência de uma translocação do fosfolípido fosfatidilserina do interior para a parte externa da membrana plasmática, característica do processo de apoptose, e onde se torna acessível à ligação à Anexina V, como confirmado com a análise por citometria de fluxo. Avaliando o período de 24 de tratamento, 47% e 29% das células expostas a concentrações de 5 µg/mL) do ECa e do EPf , respectivamente, entraram em apoptose.

Na literatura, está amplamente estabelecido que a apoptose é regulada por várias proteínas, incluindo p53 e Bcl-2 e proteínas da família das caspases. Neste contexto, vários agentes quimiopreventivos, especialmente em altas concentrações, podem ativar caspases que reconhecem e clivam precursores da molécula da interleucina-1 β (IL-1 β) em uma forma biologicamente ativa. A ativação destas proteínas de morte celular pode resultar em toxicidade, quando ocorrem em células normais, porém, este mecanismo pode ser considerado altamente benéfico, se ocorrer em células pré-neoplásicas ou de tumores. Notadamente, alguns compostos fenólicos, como a curcumina parecem induzir a apoptose especificamente em células imortalizadas (malignizadas), tais como, sarcoma 180 de rato, células cancerígenas do cólon humano (HT-29), células humanas de câncer de rim 293 e carcinoma de fígado humano (Hep-G2). Cabe destacar ainda que outros polifenóis, como o resveratrol, desencadeiam processo apoptótico em células de carcinoma Hep-G2, em células de leucemia linfoblástica aguda, leucemia humana aguda monocítica (THP-1) e em linhagens de células de câncer bucal. Outro exemplo, a epigalocatequina (um composto majoritário neste estudo), também é capaz de promover indução de apoptose em células de câncer de pulmão da linhagem H661 (Fresco et al., 2006).

Em células tratadas com concentrações eficazes de carotenóides, muitas das modificações estruturais típicas que acontecem durante a apoptose têm sido evidenciadas. Na linhagem humana de câncer de colo

do útero (CICCN), o β -caroteno causou condensação da cromatina, uma característica da apoptose. Além disso, foi evidenciada a fragmentação de DNA após a exposição a neoxantina e fucoxantina, sendo que ambos foram capazes de induzir apoptose em células humanas de câncer de próstata. A indução de apoptose por fucoxantina também tem sido observada em células leucêmicas humanas (HL-60). Além disso, cantaxantina induziu apoptose em células de adenocarcinoma de cólon humano (WiDr) e em células de melanoma humano (SK-MEL-2). É importante destacar que a luteína, bem como o ácido retinóico, induziram apoptose em células mamárias transformadas (SV-40) e células de carcinoma mamário humano (MCF-7) (Palozza et al., 2003), conferindo suporte aos resultados relacionados a morte celular, bem como aos relativos à morfologia (redução da dimensão celular e nuclear) nas células tumorais, obtidos com os extratos sob estudo.

De acordo com Palozza e colaboradores (2003), com algumas exceções, os carotenóides são moléculas capazes de induzir apoptose em células tumorais, agindo como potentes agentes antitumorais. E sua capacidade de modificar a expressão de fatores de transcrição e/ou proteínas envolvidas no processo apoptótico depende de vários fatores (por exemplo, concentração, sinergismo propiciado pelos diferentes carotenóides, uma ação concentrada de vários micronutrientes, tipo de célula e estado redox). No entanto, numerosas lacunas ainda existem na compreensão do papel dos carotenóides como moduladores da apoptose. Muitos dos resultados sobre os efeitos pró-apoptóticos de carotenóides tem sido demonstrados apenas *in vitro*. Além disso, não está claro se essas moléculas modulariam a sinalização de apoptose através da molécula intacta, ou através de seus produtos de oxidação (ou seja, os retinóides). Um melhor conhecimento do papel dos carotenóides na apoptose *in vitro e in vivo* será fundamental na compreensão do seu potencial na saúde e na doença.

A partir dos resultados obtidos com o ensaio de Anexina V e IP, onde ECA e EPf mostraram ser capazes de induzir a morte celular através da via apoptótica, foi avaliado o potencial desses extratos com o objetivo de verificar se esses incidiriam também, em vias celulares relacionadas a proliferação celular.

A análise quantitativa do processo de proliferação celular por meio da incorporação por BrdU revelou que as células incubadas com os ECA e EPf apresentaram uma taxa de proliferação celular a qual não diferiu estatisticamente da apresentada pelo grupo controle. A partir dos dados analisados, nós sugerimos que a concentração de 0,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$ utilizadas nesse ensaio de proliferação foi alta (Fig. 24. e 25.). Como consequência,

a toxicidade (dano causado as células) pode ter resultado em indução de apoptose. Diminuição das concentrações e no tempo de exposição talvez fossem necessários para que se possa aprimorar a técnica em relação a tratamentos com os ECa e EPf na linhagem B16F10.

Ainda, no contexto levantado acima, de acordo com o estudo de Jiménez-Medina (2006), o extrato derivado de calêndula, rico em carotenóides, inibiu a proliferação celular de várias linhagens neoplásicas, a tomar como exemplo, a linhagem de melanoma murino (B16) e fibrosarcoma murino (B9). O extrato de carotenóides obtidos a partir de calêndula, inibiu a proliferação celular de 70% até 100% nos períodos de 48 e 72 h nas concentrações de 125 - 500µg/mL. Este extrato também induziu as células à apoptose no quarto dia de exposição ao extrato nas concentrações de 250 - 1000 µg/mL em 34% e 60%, respectivamente. Analisando tais dados, podemos notar que ocorreu inibição da proliferação celular em concentrações muito mais altas que as administradas em nossos ensaios. Porém, podemos observar também que, a indução a apoptose demorou até o quarto dia de exposição, para apresentar um efeito significativo. Assim, avaliando os resultados obtidos por Jiménez-Medina (2006) em paralelo aos nossos resultados, acreditamos que as potenciais atividades terapêuticas dos extratos derivados de *Zea mays* analisadas estariam possivelmente relacionadas ao sinergismo entre os componentes presentes nos extratos. Uma variação também pode ocorrer de uma linhagem celular para outra, onde devido a estrutura apolar dos compostos sob estudo, algumas células podem ser mais susceptíveis a absorção desses compostos do que outras.

Para complementar os ensaio de incorporação por BrdU e Anexina V, foi realizado um ensaio de formação de colônia ou ensaio clonogênico.

Para o ensaio de formação de colônia foi igualmente utilizada a linhagem B16F10. Este ensaio determina a capacidade de uma única célula de proliferar, mantendo assim sua capacidade reprodutiva para formar uma grande colônia ou um clone. Esta célula então é considerada clonogênica.

A análise quantitativa das colônias revelou que as células incubadas com ECa e EPf apresentaram uma diferença significativa quando comparado ao grupo controle no período de 12 h de incubação com os extratos (Fig. 26. e 27.). No período de 24 h a diferença foi ainda mais expressiva, comparado ao grupo controle. Os tratamentos administrados com o ECa promoveram maior efeito na inibição de formação de colônias (25% até 99,5% de inibição), comparado aos

tratamentos administrados com o EPf (19% até 99% de inibição) (Quadro 4.).

Conforme analisado nos ensaios de análise morfológica e incorporação por BrdU, estes resultados corroboram a idéia de que havendo uma redução do número de colônias, está implícito que houve uma redução na taxa proliferativa dessas células em face dos tratamentos com os extratos nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL. Devido as já referidas alterações evidenciadas na morfologia das células, bem como, aos efeitos inibitórios dos tratamentos sobre a atividade proliferativa das células sob estudo, é possível sugerir a ocorrência de uma ação específica dos extratos diretamente sobre componentes do citoesqueleto, responsáveis pela manutenção da forma e/ou pela mobilidade celular.

Por fim, para avaliar a hipótese mencionado acima, foi realizado o ensaio de adesão celular, por meio da técnica de imunofluorescência, através da marcação com anticorpos anti-vinculina (para marcação dos pontos de adesão focal), faloidina (para marcação das fibras de actina) e DAPI (para marcação dos núcleos).

Os resultados deste ensaio demonstraram que os ECa e EPf de fato estariam interferindo na organização das estruturas de actina e vinculina, e alterando a distribuição dos pontos de adesão, de um modo relacionado ao aumento das concentrações administradas (0,5 – 5 µg/mL) (Fig. 28. e 29.). As alterações verificadas com este experimento indicaram, portanto, a ocorrência de possíveis danos ou alterações mais diretamente ao nível do citoesqueleto, ou seja, especificamente em moléculas que integram pontos de adesão, das células da linhagem tumoral B16F10.

Sugerimos que, essas supostas alterações no citoesqueleto, particularmente nos pontos de adesão, poderiam indicar que os efeitos produzidos pelos tratamentos com os extratos sob estudo nas células da linhagem B16F10 teriam como alvos biológicos seletivos, moléculas de adesão e/ou do citoesqueleto. Além disso, os referidos efeitos estariam preponderantemente relacionados a tais alvos específicos do citoesqueleto (mediante o bloqueio de moléculas como a actina e/ou a vinculina), impedindo assim sua reorganização, e/ou na membrana celular, ao invés de atuarem (de um modo indireto) em processos de migração ou diferenciação celular, ou ainda influenciando de uma forma inespecífica a viabilidade celular. Os dados obtidos com o ensaio de Anexina, corroboram esta idéia.

Os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular pelo método do MTT conferem também suporte a hipótese acima, pois demonstram que embora a população das células expostas às

concentrações dos extratos ou compostos sob estudo tenha sido diminuída significativamente, as células remanescentes nesses grupos mostravam-se espalhadas, o que sugere não necessariamente estabilidade do citoesqueleto, mas uma possível incapacidade de reorganização daquela estrutura molecular. Ressaltamos ainda que a exata proteína, ou conjunto de proteínas, responsáveis pela reorganização da actina não são conhecidas (Jordan e Sessa, 2007).

É importante considerar também que a aderência celular mediada por integrinas fornece uma ligação bidirecional entre a matriz extracelular e o citoesqueleto. Além de ter um papel central na migração celular e na morfogênese, os pontos de adesão são estruturas que perfazem transmissão de informações através da membrana celular (regulando também a estrutura da matriz), e influenciando diretamente nos mecanismos de proliferação, diferenciação e morte celular. A adesão celular, é em geral, um evento mediado por integrinas que fazem ligação do meio extra celular para o meio intracelular e interagem com o citoesqueleto da actina. Entretanto, existem outras proteínas adicionais que participam de diferentes maneiras da adesão. Adesões por podossomos, por exemplo, que são pequenas estruturas cilíndricas contendo proteínas típicas de contato focal, como vinculina e paxilina, são encontradas em diferentes células tumorais e em algumas células com fenótipos normais. A vinculina é um grupo adicional de proteínas de adesão focal, associadas a actina, mas que não são diretamente associadas as integrinas. Algumas moléculas de integrina não interagem diretamente com a actina, mas podem ligar-se indiretamente a outros componetes, um deles é a proteína quinase de adesão focal (FAK) (Geiger et al., 2001).

A metástase através de linfonodos é um dos primeiros recursos do tumor para a disseminação de células tumorais. Dos pacientes que possuem melanoma maligno, 60% possuem metástase nos linfonodos (Kawada et al., 2004). As metástases hematogênicas originam-se de células inicialmente aderidas a órgãos específicos. Essa adesão é mediada por contatos célula tumoral/endotelial e adesão celular ligante/receptor. Células B16F10 com mutação em genes de proteínas FAK (bloqueio), apresentaram redução em 50% no número de colônias de células metastizadas em pulmão de ratos (Abdel-Ghany et al., 2002), evidenciando a importância da modulação da adesão na patogénia do câncer.

De acordo com os resultados obtidos e com os dados na literatura, nós podemos sugerir que, a administração dos ECA e EPF possivelmente induza a morte celular por apoptose, devido a alterações na regulação da estrutura do citoesqueleto e reduziria a adesão celular,

inibindo assim, a proliferação e migração celular, diminuindo, consecutivamente, o risco de metástase.

Contudo, há necessidade de se desenvolver novos ensaios baseados em mecanismos celulares, assim como ensaios para determinar o efeito antioxidante desses compostos naturais. Torna-se, portanto, necessário avaliar de forma mais aprofundada a ação destes compostos com potencial atividade antitumoral, a fim de que se possa empregá-los, futuramente, em procedimentos terapêuticos contra o câncer.

7. CONCLUSÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência revelou a presença de luteína e ácido clorogênico como compostos majoritários de EC e EPf, respectivamente.

Ambos os extratos e os compostos puros, com exceção do AF reduziram a viabilidade de todas as linhagens de células tumorais sob estudo. No entanto, a única linhagem não-neoplásica, de fibroblasto de camundongo (L929), foi a menos susceptível, tendo, inclusive, apresentado um aumento (ao invés de redução) de 10% na viabilidade celular no grupo tratado com Lut (0,5 µg/mL).

Ambos os extratos e os compostos βC e Lut (principalmente) causaram efeito citotóxico sobre a linhagem celular B16F10, sendo esse efeito dependente do tempo de exposição (12 - 48 h).

Os ECa e EPf (5 µg/mL) produziram alterações na morfologia celular e, após 24 h de incubação, induziram até 47% e 29%, respectivamente, de morte apoptótica nas células da linhagem B16F10, como evidenciado na citometria de fluxo.

Os resultados do ensaio de incorporação de BrdU mostraram que ECa e EPf (5 µg/mL, 24h) não inibiram a proliferação celular nas células B16F10. Entretanto, aqueles extratos bloquearam em até 99,5%, com base na redução do número de células, a capacidade das mesmas formarem colônias (ensaio de clonogenicidade).

O ensaio de imunocitoquímica para detecção de actina e vinculina mostrou ocorrência de alterações nessas microestruturas evidenciadas pela distribuição dos pontos de adesão das células B16F10 expostas aos extratos (ECa e EPf).

Com estes resultados sugere-se que os extratos de carotenóides e de polifenóis sob estudo teriam promovido alterações na estrutura do citoesqueleto (refletidas na morfologia celular), mais do que efeitos específicos nos mecanismos de viabilidade, migração e proliferação celular, os quais seriam uma consequência daquelas alterações.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GHANY, M.; CHENG, H.; ELBLE, R. C.; PAULI, B. U. Focal Adhesion Kinase Activated by β_4 integrin ligation to mCLCA1 mediates early metastatic growth. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 37, p. 34391-34400, 2002.
- AGADIR, A.; SHEALY, Y.F.; HILL, D.L; ZHANG, X.K. Retinyl methyl ether down-regulates AP-1 transcriptional activation in breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 57, n. 16, p. 3444-3450, 1997.
- ALBERTS, B. ANDRADE, A.; BRENDA, E.; VANZ, A. L. S.; VILLELA, A. D. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2010. p. 1268.
- ALTEKRUSE, S. F.; KOSARY, C. L.; KRAPCHO, M.; NEYMAN, N.; AMINOU, R.; WALDRON, W.; RUHL, J.; HOWLADER, N.; TATALOVICH, Z.; CHO, H.; MARIOTTO, A.; EISNER, M. P.; LEWIS, D. R.; CRONIN, K.; CHEN, H. S.; FEUER, E. J.; STINCHCOMB, D. G.; EDWARDS, B. K.; SEER CANCER STATISTICS REVIEW, 1975–2007. BETHESDA, MD: NATIONAL Cancer Institute, 2010. http://seercancer.gov/csr/1975_2007/
- AMAN, R.; CARLE, R.; CONRAD, J; BEIFUSS, U.; SCHIEBER, A. Isolation of arytenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter current chromatography. **Journal of Chromatography**, v.1074, p. 99-105, 2005.
- ARAUJO, P. M.; NASS, L. L. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002.
- BACHMAN, K. E.; PARK, B. H.; RHEE, I.; RAJAGOPALAN, H.; HERMAN, J. G.; BAILIN, S. B. Kenneth W. Kinzler, and Bert Vogelstein Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. **Cancer Cell**, v. 3, p. 89-95, 2003.
- BAI, L.; ZHU, W. p53: structure, function and therapeutic applications. **Journal of Cancer Molecules**, v. 2, n. 4, p. 141-153, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relações entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARTLEY, G.E.; SCOLNICK, P.A. Plant carotenoids: Pigments for photo protection, visual attraction and human health. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1027-1038, 1995.

BENDICH, A. 1989. Carotenoids and the immune response. *Journal of Nutrition*, v. 119, p. 112–115, 1989.

BERTRAM, J.S.; VINE, A.L. Cancer prevention by retinoids and carotenoids: Independent action on a common target. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, p. 170– 178, 2005.

BIANCHI, M. L. P; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, 1999.

BRAVO, A.; SARAIBA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ANABEL, O.; ORTIZ, M.; LIMA, LAURA.; VILLALOBOS, F. J.; PENA, G.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERON, M.; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.4965-4972, 1998.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, 118-132, 2004.

CHA, K. H.; KOO, S. Y.; LEE, D. Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10521-10526, 2008.

CHENG, Y. C.; PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. **Biochemistry and Pharmacology**, v. 22, p. 3099–3108, 1973.

CHEW, B.P.; BROWN. C.M.; PARK, J.S.; MIXTER, P.F. Dietary lutein inhibits mouse mammary tumor growth by regulating

angiogenesis and apoptosis. **Anticancer Research**, v. 23, p. 3333-3339, 2003.

CHEW, B.P.; PARK, J.S. Carotenoid action on the immune response. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 257-261, 2004.

COIMBRA, R. R. et al. Caracterização e divergência genética de populações de milho resgatadas do Sudeste de Minas Gerais. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 41, n. 1, p. 159-166, 2010.

DALL'OGGIO, M.; SROUGI, M.; ORTIZ, V. NESRALLAH, L.; GONÇALVES, P. D.; LEITE, K. M.; HERING, F. Carcinoma de células renais incidentais e sintomáticos: Fatores patológicos e sobrevida. **Revista da Associação de Medicina Brasileira**, v. 50, n. 1, p. 27-31, 2004.

DHANDAPANI, K. M.; MAHESH, V. B.; BRANNET, D. W. Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFjB transcription factors. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 2, p. 522-538, 2007.

DONADUZZI, C. M. CARDOZO J. R.; E. L.; DONADUZZI, E. M.; SILVA, M. M.; STURION, J. A.; CORREA, G. Variação nos teores de polifenóis torais e taninos em dezesseis progenies de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) cultivadas em três municípios do Paraná. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/erva_mate_compostos.pdf

DULINSKA, J.; GIL, D.; ZAGAJEWSKI, J.; HARTWICH, J.; BODZIOCH, M.; SKA-KIEC, A. D.; LANGMANN, T.; SCHMITZ, G.; LAIDLER, P. Different effect of beta-carotene on proliferation of prostate cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 189– 201, 2005.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, p. 342-348, 2001.

EVAN, G.; LITTLEWOOD, T. A matter of life and cell death. **Science**, v. 281, p. 1317-1322, 1998.

FERRIER, C.M.; MUIJEN, G.N.P.; RUITER, D.J. Proteases in cutaneous melanoma. **Annals of Medicine**, v. 30, n. 5, p. 341 – 442, 1998.

FISAR, Z.; HROUDOVÁ, J.; RABOCH, J. Inhibition of monoamine oxidase activity by antidepressants and mood stabilizers. **Neuro Endocrinology Letters**, v. 31, n. 5, p. 645-656, 2010.

FRANKEN, N.A.P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.;BREE, C. V. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2315- 2319, 2006.

FRESCO, P.; BORGES, F.; DINIZ, C.; MARQUES, M. P. M. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 6, p. 747-766, 2006.

GABRIELSKA, J.; OSZMIANSKI, J.; KOMOROWSKA, M.; LAGNER, M. Anthocyanin extracts with antioxidant and radical scavenging effects. **Zeitschrift für Naturforsch. C, Journal of Bioscience**, v. 54, p. 319-324, 1999.

GEIGER, B.; BERSHADSKY, A.; PANKOV, R.;YAMADA, K. M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 11, p. 793-805, 2001.

GERMAN, J.B.; WATKINS, S.M.; FAY, L. Metabolomics in practice: emerging knowledge to guide future dietetic advice toward individualized health. **Journal of American Dietetic Association**, v. 105, p. 1425-1432, 2005.

GHOBRIAL, I. M.; WITZING, T. E.; ADJEI, A. A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, n. 3, p. 178-194, 2005.

GORDAN, J. D.; THOMPSON, C. B.; SIMON, C. HIF and c-Myc: Sibling Rivals for Control of Cancer Cell Metabolism and Proliferation. **Cancer Cell**, v. 12, p. 108-113, 2007.

GRUNE, T.; SCHRODER, P.; BIESALSKI, H. K. Low molecular weight antioxidants. **The Handbook of Environmental Chemistry**, v. 2, p. 77–90, 2005.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revisão de Literatura Risco de câncer no Brasil**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

GUPTA, C. S.; KIM, J. H.; PRASAD, S. BHARAT, B. A. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 29, n. 3, p. 405-434, 2010.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, 2005.

GYSIN, R.; AZZI, A.; VISARIUS, T. Gamma-Tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 14, p. 1952-1954, 2002.

HAGIWARA, A.; MIYASHITA, T.; NAKANISHI, T.; SANO, M.; TAMANO, S.; KADOTA, T. KODA, T.; KAKAMURA, M.; IMAIDA, K.; ITO, N.; SHIRAI, T. Pronounced inhibition by natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer Letters**, v. 171, p. 17-25, 2001.

HAHN, E.; JIN, D.; KANG, J. S.; KIM, Y.; HONG, S.; LEE, S. K.; KIM, H. N.; JUNG, D. J.; KIM, J. E.; SHIN, D. H.; HWANG, Y. I.; KIM, Y. S.; HUR, D. Y.; YAHNG, Y.; CHO, D.; LEE, M.; LEE, W. J. The molecular mechanisms of vitamin C on cell regulation in B16F10 murine melanoma. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 102, n. 4, p. 1002-1010, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HARTWELL, L.H.; KASTAN, M.B. Cell cycle control and cancer. **Science**, v. 266, p. 1821-1828, 1994.

HASHIMOTO, Y. Structural development of synthetic retinoid and thalidomide-related molecules. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 52, p. 16–23, 2003.

HODI, F. S.; O'DAY, S.; MCDERMOTT, D. F.; WEBER, R. W.; SOSMAN, J. A.; HAANEN, J. B.; GONZALEZ, R.; ROBERT, C.; SCHADENDORF, D.; HASSEL, J. C.; AKERLEY, W.; EERTWEGH, A. J. M.; LUTZKY, J.; LORIGAN, P.; VAUBEL, J. M.; LENETTE, G. P.; HOGG, D.; OTTENSMEIER, C. H.; LEBBÉ, C.; PESCHEL, C.; QUIRT, I.; CLARK, J. I.; WOLCHOK, J. D.; WEBER, J. S.; TIAN, J.; YELLIN, M. J.; NICHOL, G. M.; HOOS, A.; URBA, W. J. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 8, p. 711-723, 2010.

HOSOKAWA, M.; KUDO, M.; MAEDA, H.; KOHNO, H.; TANAKA, T.; MIYASHITA, K. Fucoxanthin induces apoptosis e enhances the antiproliferative effect of the PPAR γ ligand, troglitazone, on colon cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1675, p. 113– 119, 2004.

HOWITT, C.A.; POGSON, B. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. **Plant Cell Environment**, v. 29, p. 435-445, 2006.

HWANG, H-T.; MENDELL, J. T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. **British Journal of Cancer**, v. 94, p. 776–780, 2006.

INDAP, M. A.; RADHIKA, S.; MOTIWALE, L.; RAO, K. W. K. Inhibitory effect cinnamoyl compounds against human malignant cell line. **Indian of Journal Experimental Biology**, v. 44, p. 216-220, 2006.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. **Nature Reviews**, v. 2, p. 277-288, 2002.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Estimativas do câncer para 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 27/06/2010.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Estimativas do câncer para 2012. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 10/01/2012.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E. Global cancer statistics. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

JEONG, W.; KIM, I.; HU, R.; KONG, A. T. Modulation of AP-1 by natural chemopreventive compounds in human colon HT-29 cancer cell line. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 649-660 2004.

JIMÉNEZ-MEDINA, E.; LORA-GARCIA, A.; PACO, L.; ALGARRA, I.; COLLADO, A.; GARRIDO, F. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. **BMC Cancer**, v. 6, p. 1-14, 2006.

JORDAN, S. P.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 803-815, 2007.

KALLURI, R.; WEINBERG, A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, 2009.

KAMPA M.; ALEXAKI, V.; NOTAS, G.; NIFLI, A.; NISTIKAKI, A.; HATZOGLOU, A.; BAKOGEORGOU, E.; KOUIMTZOGLOU, E.; BLEKAS, G.; BOSKOU, D.; GRAVANIS, A.; CASTANAS, E. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 2, p. 63-74, 2004.

KANG, Y.; MASSAGUÉ, J. Epithelial-Mesenchymal Transitions: Twist in Development and Metastasis. **Cell**, V. 118, P. 277-279, 2004.

KARNA, P.; GUNDALA, S. R.; GUPTA, M. V.; SHAMSI, S. A.; PACE, R. D. YATES, C.; NARAYAN, S.; ANEJA, R. Polyphenol-rich sweet potato greens extract inhibits proliferation and induces apoptosis in prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 12. P. 1872-1880, 2011.

KAWADA, K. Pivotal Role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes. **Cancer Research**, v. 64, n. 11, p. 1010-1017. 2004.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, 52-67, 2010.

KILANI-JAZIRI, A.; NEFFATI, A.; LIMEM, I.; BOUBAKER, J.; SKANDRANI, I.; SGHAIR, M. B.; BOUHLER, I.; BHOURI, W.; MARIOTTE, A. M.; GHERIDA, G.; FRANCA, M. D.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Relationship correlation of antioxidant and antiproliferative capacity of *Cyperus rotundus* products towards K562 erythroleukemia cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, n. 1, p. 85-94, 2009.

KIM, S.; DOUGHERTY, E. R.; SHMULEVICH, I.; HESS, K. R.; HAMILTON, S. R.; TRENT, J. M. FULLER, G. N.; ZHANG, W. Identification of combination gene sets for glioma classification. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, n. 13, p. 1229-1236, 2002.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. KUIJTEN, G. A. M.; KEEHENEN, R. M. J.; PALS, S. T.; OERS, M. H. J. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v. 84, p. 1415-1420, 1994.

KOULOUKOUSSA, M.; MARINOU-ALEPOROU, V.; ANGELOPOULOU, B.; TROUGAKOS, I. P.; PANAGOPOULOU, E.; KITTAS, C.; MARINOS, E. Phorbol myristate acetate induces changes on F-actin and vinculin content in immature rat Sertoli cells. **Tissue & Cell**, v. 36, p. 149-155, 2004.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BANANOME, A.; COVAL, S. M.; GRIEL, A. E.; ETHERNON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, p. 71-88, 2002.

KU, B. M. Caffeine inhibits cell proliferation and regulates PKA/GSK3 β pathways in U87MG human glioma cells. **Molecules and Cell**, v. 31, n. 3, p. 275-279, 2011.

KUHNEN, S.; LEMOS, P. M. M.; CAMPESTRINIA, L. H.; OGLIARI, J. B.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. *Zea mays*: Etnofarmacologia e metabolismo secundário. No prelo, 2007.

KUHNEN, S.; LEMOS, P. M. M.; CAMPESTRINIA, L. H.; OGLIARI, J. B.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. Antiangiogenic properties of carotenoids: A potencial role of maize as functional food. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 3, p. 284-290, 2009.

KUHNEN, S.; LEMOS, P.; CAMPESTRINI, L.; OGLIARI, J.; MARASCHIN, M.; DIAS, P. Carotenoid and anthocyanin contents of grains of Brazilian maize landraces. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 9, p. 1548-1553, 2011.

KUNIMASA, K.; AHN, M.; KOBAYASHI, T.; EGUCHI, R.; KUMAZAWA, S.; FUJIMORI, Y.; NAKANO, T.; NAKAYAMA, T.; KAJI, K.; OHTA, T. Brazilian propolis suppresses angiogenesis by inducing apoptosis in tube-forming endothelial cells through inactivation of survival signal ERK1/2. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, p. 1-7, 2009.

KURILICH, A.C.; JUVIK, J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 1948-1955, 1999.

LAKSHMINARAYANA, R.; SATHISH, U. V.; DHARMESH, S. M.; BASKARAN, V. Antioxidant and cytotoxic effect of oxidized lutein in human cervical carcinoma cells (HeLa). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1811-1816, 2010.

LEDEZMA, E.; CASTRO-APITZ, R.; CARDIER, J. Apoptotic and anti-adhesion effect of ajoene, a garlic derived compound, on the murine melanoma B16F10 cells: possible role of caspase-3 and the $\alpha 4\beta 1$ integrin. **Cancer Letters**, v. 206, p. 35-41, 2004.

LEIST, M.; NICORETA, P. The shape of cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 236, n. 1, p. 1-9, 1997.

LEMONS, P. M. M. Determinação do metaboloma foliar parcial de variedades crioulas de milho (*Zea mays*), visando a caracterização dos extratos foliares contendo (poli)fenóis e carotenóides. 2010. 220 f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos e Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

LOCATELLI, C.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, p. 175–184, 2009.

LU, K. V.; JONG, K. A.; RAJASEKRAN, A. K.; CLOUGHESY, T. F.; MISCHER, P. S. Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line. **Laboratory Investigation**, v. 84, n. 1, p. 8-20, 2004.

MALAFA, M. P.; FOKUM, F.D.; MOWLAVI, A.; ABUSIEF, M. KING, M. Vitamin E inhibits melanoma growth in mice. **Surgery**, v. 131, p. 85-91, 2002.

MARTINEZ, M. A. R.; RUIZ, I. R. G.; FRANCISCO, G.; NETO, C. F.; CABRAL, L. S. Molecular genetics of non-melanoma skin cancer. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 5, p. 405-419, 2006.

MATSURA, T.; SERINKAN, B. F.; JIANG, J.; KAGA, V. E. Phosphatidylserine peroxidation/externalization during staurosporine-induced apoptosis in HL-60 cells. **FEBS Letters**, v. 524, p. 25-30, 2002.

MIGLIACCIO, A.; CASTORIA, G.; DOMENICO, M. D.; FALCO, A.; BILANCIO, A.; LOMBARDI, M.; BARONE, M. V.; AMETRANO, D.; ZANNINI, M. S.; ABBONDANZA, C.; AURICCHIO, F. Steroid-induced androgen receptor- α estradiol receptor B-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 20, p. 5406-5417, 2000.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; HORNERO_MÉNDEZ, D.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids and provitamin A in functional foods. In: HURST, W. J. **Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals**. 2.ed. New York: CRC Press, 2008.

MORAIS, E. C.; STEFANUTO, A.; KLIN, G. A.; BOAVENTURA, A. F.; WAZLAWIK, E.; DI PIETRO, P. F.; MARASCHIN, M.; DA SILVA, E. L. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional

LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, p. 8316–8324, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Produtos Naturais e a Apoptose: um enfoque promissor para a descoberta de novos fármacos. **Revista Fitos**, v. 1, p. 46-53, 2006.

NILSSON, J. A.; CLEVELAND, J. L. Myc pathways provoking cell suicide and cancer. **Oncogene**, v. 22, p. 9007–9021, 2003.

NOBILI, S.; LIPPI, D.; WITORT, E.; DONNINI, M.; BAUSI, L.; MINI, E.; CAPACCIOLI, S.; Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 365-378, 2009.

NUSSER, N. N.; BARTKOWIAK, D.; ROTTINGER, E. M. The Influence of bromodeoxyuridine on the induction and repair of DNA double-strand breaks in glioblastoma cells. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 178, n. 9, p. 504-509, 2002.

OLIVEIRA, N. F. P.; PLANELLO, A. C.; ANDIA, D. C.; PARDOA, A. P. S. DNA Methylation and Cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 4, p. 493-499, 2010.

ORSOLIC, N.; SVER, L.; TERZIC, S.; TADIC, Z; BASIC, I. Inhibitory effect of water soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds on tumor growth and metastasizing ability: a possible model of antitumor action. **Nutrition and Cancer**, v. 47, p. 156-163, 2003.

PALOZZA, P.; MUZZALUPO, R.; TROMBINO, S.; VALDANNINI, A.; PICCI, N. Modulation of apoptotic signalling by carotenoids in cancer cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 430, n. 1, p. 104-109, 2004.

PANSERA, M. R. et al. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 13, n. 1, p. 17-22, 2003.

PARIHAR, A.; PARIHAR, M. S.; MILNER, S.; BHAT, S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. **Burns**, v. 34, n. 1, p. 6-17, 2008.

PAULINELLI, R. R.; FREITAS JÚNIOR, R.; CURADO, M. P.; SOUZA, A. A. A situação do câncer de mama em Goiás, no Brasil e no mundo: tendências atuais para a incidência e a mortalidade. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.3, n. 1, p.17-24, 2003.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). **Food Chemistry**, *in press*, 2007.

PRASAD, K.; KUMAR, B.; YAN, X.; HANSON, A. J.; COLE, W. C. α -Tocopheryl Succinate, the Most Effective Form of Vitamin E for Adjuvant Cancer Treatment: A Review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, n.2, p. 108-117, 2003.

PREDES, F. S.; RUIZ, A. L. T. J.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A.; DOLDER, H. Antioxidative and in vitro antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 25, p. 1-5, 2011.

RAK, J.; FILMUS, J.; FINKENZELLER, G.; GRUGEL,S.; MARME, D.; KERBEL, R.S. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 14, p. 263-277, 1995.

RAO, C.V.; DESAI, D.; SIMI, B.; KULKARNI, N.; AMIN, S.; REDDY, B.S. Inhibitory effects of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. **Cancer Research**, v. 53, p. 4182-4188, 1993.

REDDIVARI, L.; VANAMALA, J.; CHINTHARLAPALLI, S.; SAFE, S. H.; MILLER, J. C. J. Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 10, p. 2227-2235, 2007.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 99, p. 1-13, 2003.

RIEDL, S. J.; SHI, J. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 11, p. 897-907, 2004.

RILEY, B. R.; DESAI, D. C. The molecular basis of cancer and the development of targeted therapy. **The Molecular Basis of Cancer**, v. 89, p. 1 – 15, 2009.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, n. 364 – 369, 2001.

RODRIGUES-CASO, C.; RODRÍGUEZ AGUDO, D.; SÁNCHEZ JIMÉNEZ, F.; MEDINA, M. Green tea epigallocatechin-3-gallate is an inhibitor of mammalian histidine decarboxylase. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 1760–1763, 2003.

ROSSIGNOL, R.; GILKERSON, R.. AGGELER, R.; YAMAGATA, K.; REMINGTON, S. J.; CAPALDI, R. A. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. **Cancer Research**, v. 64, p. 985-993, 2004.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; ÜNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 73, p. 39–85, 2004.

SAPIENZA, M T.; TAVARES, M. G. M.; ENDO, I .S.; NETO, G. C. C.; LOPES, M. M. M. F.; NAKAGAWA, S. BELFORT, F. A.; JR, J. S.; LEWIN, S.; MARONE, M. M. S. Pesquisa do linfonodo sentinela em pacientes com melanoma: experiência com fitato marcado com Tecnécio-^{99m} e revisão da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.79, n. 2, p. 181-191, 2004.

SEERAM, N.P.; ADAMS, L.S.; HENNING, S.M.; NIU, Y.; ZHANG, Y.; NAIR, M.; HEBER, D. *In vitro* antiproliferative, apoptotic e antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid e a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 360– 367, 2005.

SEO, H.; SUZUKI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; OH, M.; KIM, H.; KIM, J.; NAGATA, T. Extraction and identification of antioxidant components from *Artemisia capillaris* herba. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 58, p. 1–12, 2003.

SERAFIM, T. L.; CARVALHO, F. S.; MARQUES, M. P. M.; CALHEIROS, R.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; ROLEIRA, F.; SILVA, E. T.; HOLY, J.; OLIVEIRA, P. J. Lipophilic Caffeic and Ferulic Acid Derivatives Presenting Cytotoxicity against Human Breast Cancer Cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, p. 763-774, 2011.

SHARONI, Y.; DANILENKO, M.; DUBI, N. ; BEN-DOR, A.; LEVY, J. Carotenoids e transcription. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 430, p. 89–96, 2004.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, 2002.

SOUZA, A. R. R. Predição de ganho genético em população crioula de milho branco. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 19-24, 2009.

SOUZA, R. J. S.; MIRANDA, G. V.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, L. V. An estimate of the cost of treating melanoma disease in the state of Sao Paulo – Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, 2009.

STEBBINS, W. G.; GARIBYAN, L.; SOBER, A. J. S. Sentinel lymph node biopsy and melanoma: 2010 update Parte I. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 62, n. 5, p. 723-734, 2010.

SUFFINESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in Plant Biochemistry: Assays Bioactivity**, v. 6, p. 71-133, 1990.

THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281, p. 1312-1316, 1998.

TSUDA, T.; SHIGA, K.; OHSHIMA, K.; KAWAKISHI, S. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effects of

anthocyanins pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. **Biochemistry and Pharmacology**, v. 52, p. 1033-1039, 1996.

VELURI, R., SINGH R. P., LIU Z., THOMPSON J. A., AGARWAL R., AGARWAL C. Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 7, p. 1445-1453, 2006.

VERNON, A. E.; LABONNE, C. Tumor Metastasis: A New Twist on Epithelial–Mesenchymal Transitions. **Current Biology**, v. 14, p. 719-721, 2004.

VILLANUEVA, J.; VULTUR, A.; LEE, J. T.; SOMASUNDARAM, R.; FUKUNAGA-KALABIS, M.; CIPOLLA, A. K.; WUBBENHORST, B.; XU, X.; GIMOTTY, P.A.; KEE, D.; SANTIAGO-WALKER, A. E.; LETRERO, R.; D'ANDREA, K.; PUSHPARAJAN, A.; HAYDEN, J. E.; BROWN, K. D.; LAQUERRE, S.; MCARTHUR, G. A.; SOSMAN, J. A.; NATHANSON, K. L.; HERLYN, M. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. **Cancer Cell**, v. 18, n. 6, p. 683-695, 2010.

WALTON, N.J.; BROWN, D.E. Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products. **Wiley & Sons, London**. 425p., 1999.

WATERHOUSE, A.L. Determination of Total Phenolics, in Current Protocols in Food Analytical Chemistry, II.1.1-II.1.8, Wrolstad, R.E., Wiley, 2001.

WEBER, M.; DAVIES, J. J. WITTIG, D.; OAKELEY E. J.; HAASE, M.; LAM, W. L.; SCHÜBELER, D. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. **Nature Genetics**, v. 37, n. 8, p. 853-862.

WEINBERG, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, n. 3, p. 323-330, 1995.

WRONA, M.; ROZANOWSKA, M.; CZUB-PELECH, B.; SARNA, T. et al. Antioxidant action of zeaxanthin in protection of human RPE cells

against oxidative damage. **Association Research on Vision Ophthalmology**, v. 42, p. 576, 2001.

WU, L.; CHIANG, Y.; CHUANG, H.; WANG, S.; YANG, G.; CHEN, Y.; LAI, L.; SHYUR, L. Polyacetylenes function as anti-angiogenic agents. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 11, p. 2212-2219, 2004.

WU, L.; HSU, H.; CHEN, Y. C.; CHIU, C.; LIN, Y.; HO, J. A. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. **Food Chemistry**, v. 95, n. 2, p. 319-327, 2006.

YANG, C.Y.; LIAO, J.; KIMI, K.; YOUKOW, E. J.; YANG, C. S. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 381-406, 2001.

YANG, G.; et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 4, p. 611-616, 1998.

YANG, J.; WEINBERG, R. A. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. **Developmental Cell**, v. 14, p. 818-829, 2008.

YI, W.; AKOH, C. C.; FISHER, J.; KREWER, G. Effects of phenolic compounds in blueberries and muscadine grapes on HepG2 cell viability and apoptosis. **Food Research International**, v. 39, p. 628-638, 2006.

YI, W.; FISCHER, J.; KREWER, G.; AKOH, C. C. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 7320-7329, 2005.

YILMAS, M.; CHRISTOFORI, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 28, p. 15-33, 2009.

YOSHIMOTO, M.; OKUNO, S.; YOSHINAGA, M.; YAMAKAWA, O.; YAMAGUCHI, M.; YAMADA, J. Potential mechanisms on cancer chemoprevention by anthocyanins. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, p. 537-541, 1999.

ZHANG, S.; HUNTER, D. J.; FORMAN, M. R.; ROSNER, B. A.; SPEIZER, F. E.; COLDITZ, G. A.; MANSON, J. E.; HANKINSON, S. E.; WILLET, C. Dietary carotenoids and Vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 6, p. 547-556, 1999.

ZIELINSKI, H. Contribution of low molecular weight antioxidants to the antioxidant screen of germinated soybean seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 58, p. 1-20, 2003.