



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

Nádia Sandrine Ramos Santos Mota

**EFEITO ANTITUMORAL DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICO
E SUPERCRÍTICO DA SEMENTE DE *Passiflora edulis f.*
flavicarpa Degener (PASSIFLORACEAE)**

Florianópolis/SC

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mota, Nídia Sandrine Ramos Santos
EFEITO ANTITUMORAL DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICO E
SUPERCRÍTICO DA SEMENTE DE *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*
Degener (PASSIFLORACEAE) / Nídia Sandrine Ramos Santos
Mota ; orientadora, Rozângela Curi Pedrosa -
Florianópolis, SC, 2015.
120 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*
Degener. 3. Atividade antitumoral. 4. Bloqueio do ciclo
celular. 5. Apoptose. I. Curi Pedrosa, Rozângela. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Bioquímica. III. Título.

Nádia Sandrine Ramos Santos Mota

**EFEITO ANTITUMORAL DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICO
E SUPERCRÍTICO DA SEMENTE DE *Passiflora edulis f.*
flavicarpa Degener (PASSIFLORACEAE)**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica, da Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial para a obtenção
do grau de mestre em Bioquímica.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rozangela
Curi Pedrosa**

**Florianópolis / SC
2015**

AGRADECIMENTOS

A todos que me acompanharam e ajudaram nesta caminhada.

À minha família adorada que mesmo distante, fez-se presente a cada instante.

Principalmente à minha querida mãe, pelo seu incondicional e verdadeiro amor.

Aos meus amigos, por me trazerem luz e alegria a minha vida.

À Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Centro de Ciências Biológicas.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

Ao Departamento de Bioquímica.

Ao Laboratório de Bioquímica Experimental – Labioex.

A CAPES pelo apoio financeiro que possibilitou a execução desse projeto.

À minha orientadora, Dra. Profa. Rozangela Curi Pedrosa, pela oportunidade de aperfeiçoamento pessoal, profissional e científico.

Aos meus colegas, Professores e funcionários do Departamento de Bioquímica.

Aos meus colegas, ex-colegas e associados do LABIOEX, com que convivi nestes últimos dois anos, pela amizade, pelas trocas de experiências, pelos ensinamentos e aprendizado mútuo: Valdelúcia Maria Alves de Souza Grinevicius, Fabiana Ourique, Luiza Sheyla Evenni Porfirio Will Castro, João Francisco Gomes Correia, Eduardo Benedetti Parisoto, Karina Bettega Felipe, Mirelle Sinfroni Farias, Daiane Schmeling e Josiane Hilbig.

À Dra. Profa. Sandra Regina Ferreira e sua orientanda Daniela A. de Oliveira pela disponibilização dos extratos da *Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener.

Aos membros da banca pela avaliação desse trabalho.

RESUMO

A utilização da extração supercrítica para a obtenção de compostos bioativos a partir das sementes da *P. edulis f. flavicarpa Degener*, consideradas como resíduos da indústria agroalimentar, demonstrou ser uma forma eficiente de usar estas sementes por recicla-las, além de ser uma excelente alternativa à extração convencional (maceração hidroalcoólica). Estudos prévios já evidenciaram o potencial efeito antitumoral da *P. edulis f. flavicarpa Degener*, contudo os prováveis mecanismos de ação responsáveis por tal efeito não estão totalmente elucidados. Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar comparativamente o potencial antitumoral dos extratos hidroalcoólico (EtOH) e supercrítico (300bar/40°C/CO₂/5% etanol, ESC) da torta de sementes da *P. edulis f. flavicarpa Degener*, utilizando para isso modelos *in vitro* (MCF-7), moleculares (CT-DNA e DNA plasmidial) e *in vivo* (camundongos Balb/c inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich - TAE). Para tanto, avaliou-se a citotoxicidade (MTT), a interação com o CT-DNA (espectrofotometria UV-Vis e fluorescência), a capacidade de induzir fragmentação ao DNA plasmidial, a capacidade antiproliferativa (efeito sobre o ciclo celular), o efeito pró-apoptótico (coloração com EtBr/LA), a atividade antitumoral *in vivo* (avaliações morfológicas) e por fim, o efeito antiangiogênico *in vivo* (contagem dos vasos). A citotoxicidade dos extratos foi avaliada sobre as células de MCF-7 tratadas por 72h (10 a 500 µg/mL), no qual o ESC foi mais citotóxico que o EtOH (CI_{50ESC} = 291,07±16,15µg/mL; CI_{50EtOH} = 320,63±1,15µg/mL). Ambos os extratos apresentaram compostos intercalantes no CT-DNA (hipocromismo e redução da fluorescência do EtBr) e causaram fragmentação simples do DNA plasmidial (FII_{EtOH50µg/mL} = 59,81%; FII_{ESC50µg/mL} = 87,30%). Nos ensaios *in vivo*, ambos os extratos diminuíram o peso corporal dos animais e o volume de líquido ascítico em decorrência do aumento na proporção de células tumorais inviáveis. O que culminou no aumento da inibição do crescimento tumoral (EtOH_{200mg/kg/dia} = 27,32±5,19% e ESC_{200mg/kg/dia} = 48,45±7,19%) e a sobrevida dos animais tratados (ESC_{200mg/kg/dia} aumentou em 12,0% a probabilidade dos animais estarem vivos em 30 dias; contra 17 dias de vida dos tratados com EtOH_{200mg/kg/dia}). A coloração com EtBr/LA revelou que o provável tipo de morte celular induzida pelos tratamentos foi por apoptose, uma vez que as células adquiriram uma coloração laranja, característica de células apoptóticas (EtOH_{200mg/kg/dia} = 30,57% e ESC_{200mg/kg/dia} = 48,22%). Ambos os extratos apresentaram o efeito antiproliferativo por bloquear o ciclo

celular. No entanto, o ESC apresentou tal efeito mais pronunciado do que o EtOH por induzir um atraso na fase G1 seguida de um bloqueio do ciclo celular na fase G2. Por fim, ambos os extratos exibiram atividade antiangiogênica *in vivo*, onde o ESC apresentou tal efeito mais acentuado (ESC_{200mg/kg/dia} = 90%). Os resultados obtidos demonstram que ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener apresentaram atividade citotóxica, antiproliferativa, pró-apoptótica e antitumoral tanto *in vitro* com *in vivo*, mediado pelo bloqueio do ciclo celular em resposta aos danos no DNA, com respectiva sinalização de apoptose. Adicionalmente, o efeito antiangiogênico contribuiu na atividade antitumoral observada. Ressaltando-se que, o ESC apresentou o feito antitumoral mais eficaz que o EtOH provavelmente devido a presença dos alcaloides β-carbolínicos, harmana e harmina. Concluindo-se que a extração supercrítica confere maior citotoxicidade e efeito antitumoral aos extratos obtidos por essa técnica, por aumentar o poder de extração de compostos com provável atividade antitumoral.

Palavras-chave: *Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener; Alcaloides β-carbolínicos; Atividade antitumoral; Fragmentação do DNA; Bloqueio do ciclo celular; Apoptose.

ABSTRACT

The use of supercritical extraction to obtain bioactive compounds from the seeds of *P. edulis f. flavicarpa* Degener, considered as waste of the food industry, proved to be an efficient way to use these seeds by recycling them. Besides being an excellent alternative to conventional extraction (hydro-alcoholic maceration). Previous studies have highlighted the potential antitumor effect of *P. edulis f. flavicarpa* Degener. However, the mechanisms of action responsible for this effect are not fully elucidated. In this context, this study aimed to comparatively evaluate the antitumor potential of hydro-alcoholic (EtOH) and supercritical extract (300bar/40°C/CO₂/5% ethanol, SFE) of seed cake of *P. edulis f. flavicarpa* Degener. For this purpose was conducted *in vitro* (MCF-7), molecular (CT-DNA and plasmid DNA) and *in vivo* (Balb/c mice inoculated with Ehrlich ascites carcinoma cells - EAC) models. Therefore, we assessed the cytotoxicity (MTT), interaction with the CT-DNA (UV-Vis spectrophotometry and fluorescence), ability to induce plasmid DNA fragmentation, antiproliferative activity (effect on cell cycle), pro-apoptotic effect (staining with EtBr/OA), antitumor activity *in vivo* (morphological evaluation) and finally the antiangiogenic effect *in vivo* (microvessel counting). The extracts cytotoxicity was determined on MCF-7 cells treated for 72 hours (10 to 500 µg/mL), where ESC was more cytotoxic than the EtOH (IC_{50SFE} = 291.07±16.15µg/mL; IC_{50EtOH} = 320.63±1,15µg/mL). Both extracts showed intercalating compounds on CT-DNA (hypochromism and fluorescence reduction of EtBr) and caused fragmentation of plasmid DNA (single strand break, FII_{EtOH50µg/mL} = 59.81%; FII_{SFE50µg/mL} = 87.30%). In the *in vivo* assays, both extracts decreased the body weight of the animals and the volume of ascites due to an increase in the proportion of unviable tumor cells. What led to increased inhibition of tumor growth (EtOH_{200mg/kg/day} = 27.32±5.19% e SFE_{200mg/kg/day} = 48.45±7.19%) and survival of the treated animals (ESC_{200mg/kg/day} increased in 12.0% the probability of animals were alive at 30 days compared to 17 days of life those treated with EtOH_{200mg/kg/day}). The staining with EtBr/OA revealed that apoptosis was the type of cell death induced by treatments, since the cells have acquired an orange color, characteristic of apoptotic cells (EtOH_{200mg/kg/day} = 30.57% e SFE_{200mg/kg/day} = 48.22%). Both extracts showed antiproliferative effect by blocking the cell cycle. However, ESC has a more pronounced effect than the EtOH by inducing a delay in the G1 phase followed by a block of the cellular cycle in the G2 phase.

Finally, both extracts exhibited antiangiogenic activity *in vivo*, where ESC had a greater effect ($SFE_{200\text{mg/kg/day}} = 90.0\%$). Indeed, the results showed that both extracts of *P. edulis f. flavicarpa* Degener showed cytotoxic, antiproliferative, pro-apoptotic and antitumor activity *in vitro* and *in vivo*, mediated by blocking the cell cycle in response to DNA damage, with relative apoptosis signaling. Additionally, the antiangiogenic effect has contributed to the observed antitumor effect. Emphasizing that ESC had showed the most effective antitumor effect than EtOH probably due to the presence of β -carboline alkaloids harman and harmine. In conclusion, the supercritical extraction provides greater cytotoxicity and antitumor effect to the extracts obtained by this technique due to increased power of extraction of compounds with possible antitumor activity.

Keywords: *Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener; β -carboline alkaloids; Antitumor activity; DNA fragmentation; Cell cycle arrest; Apoptosis.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Fármacos antitumorais consagrados, utilizados clinicamente, que tem o DNA como alvo molecular | 33 |
| Tabela 2. Estrutura química de alcaloides β -carbolínicos presentes na <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener | 40 |
| Tabela 3. Propriedades físicas de gás, líquido e fluido supercrítico | 44 |
| Tabela 4. Citotoxicidade dos extratos da <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener (10 a 500 $\mu\text{g/mL}$) contra as células MCF-7, após 72h de incubação | 64 |
| Tabela 5. Rendimento do procedimento de isolamento de compostos a partir da fração sólida do extrato supercrítico da <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener (ESC, 300bar/40°C/CO ₂ /5% etanol) versus citotoxicidade contra as células MCF-7, após 24h de incubação (1,0 a 500 $\mu\text{g/mL}$) | 70 |
| Tabela 6. Extensão de hipocromismo obtido a partir da interação entre CT-DNA e os extratos de <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ | 72 |
| Tabela 7. Parâmetros obtidos a partir da interação entre CT-DNA e os extratos de <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ | 74 |
| Tabela 8. Efeito dos extratos da <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener sob os parâmetros histomorfológicos dos animais inoculados com as células do TAE | 77 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1. As fases do ciclo celular e os complexos CDK/ciclina | 25 |
| Figura 2. Progressão do ciclo celular à fase S pela ativação da via pRB/E2F e os diferentes estados de fosforilação da proteína pRB: desfosforilado, hipofosforilado e hiperfosforilado | 26 |
| Figura 3. Via de sinalização apoptótica | 29 |
| Figura 4. Modelo da ligação BH3-sulco hidrofóbico das proteínas Bax e Bak, induzindo a mudança conformacional e oligomerização durante a apoptose | 30 |
| Figura 5. Representação esquemática da angiogênese | 31 |
| Figura 6. Classificação de agentes que interagem com o DNA e suas respectivas interações moleculares com o DNA | 34 |
| Figura 7. Estruturas de intercaladores típicos, intercaladores atípicos e os <i>groove binders</i> (moléculas que se ligam aos sulcos do DNA) | 35 |
| Figura 8. Imagem representativa da flor da <i>P. edulis f. flavicarpa Degener</i> | 38 |
| Figura 9. Imagens representativas do fruto da <i>P. edulis f. flavicarpa Degener</i> (A) e <i>P. edulis</i> Sims (B) | 38 |
| Figura 10. Diagrama esquemático do equipamento de ESC e processo de extração supercrítica | 43 |
| Figura 11. Diagrama de pressão/temperatura e os equilíbrios entre os estados sólido, líquido e gasoso. Definição de região supercrítica para o CO ₂ | 44 |
| Figura 12. Forma do DNA plasmidial superenovelada intacta (FI) | 55 |
| Figura 13. As diferentes formas da molécula de DNA plasmidial | 55 |
| Figura 14. Ilustração da mobilidade eletroforética distintas das diferentes formas do DNA | 55 |
| Figura 15. Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial citotóxico, antiproliferativo, antitumoral e antiangiogênico dos extratos hidroalcoólico e supercrítico de <i>P. edulis f. flavicarpa Degener</i> | 61 |
| Figura 16. Cromatografia de camada delgada dos extratos EtOH e ESC da <i>P. edulis f. flavicarpa Degener</i> , detecção UV (nm) sem tratamento químico | 65 |
| Figura 17. Ilustração das frações obtidas após o extrato supercrítico da <i>P. edulis f. flavicarpa Degener</i> (ESC, 300bar/40°C/CO ₂ /5%etanol) ser | |

| | |
|---|-----|
| submetido à centrifugação | 66 |
| Figura 18. Análise espectrofotométrica UV-Visível dos compostos isolados da fração supercrítica da <i>P. edulis f. flavicarpa Degener</i> (ESC, 300bar/40°C/CO2/5% etanol), harmina e harmana..... | 67 |
| Figura 19. Espectros de absorção no infravermelho dos alcaloides β -carbolínicos harmina e harmana isolados do extrato supercrítico da <i>P. edulis f. flavicarpa Degener</i> (ESC, 300bar/40°C/CO2/5% etanol) | 69 |
| Figura 20. A capacidade de interação entre CT-DNA e EtOH/ESC nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ (A) e 50 $\mu\text{g/mL}$ (B), avaliada por espectrofotometria de UV-Visível | 71 |
| Figura 21. A capacidade de intercalação de EtOH e ESC (10 e 50 $\mu\text{g/mL}$), por meio de medições de fluorescência | 73 |
| Figura 22. Avaliação da atividade nucleásica de EtOH e ESC (10 e 50 $\mu\text{g/mL}$) pelo método de ensaio de danos direto ao DNA plasmidial | 75 |
| Figura 23. Inibição do crescimento do tumor após o tratamento com os extratos EtOH e ESC (10 e 200 mg/kg/dia), com base na variação da circunferência abdominal | 79 |
| Figura 24. A taxa de sobrevivência dos animais (n=6) tratados com EtOH e ESC (10 e 200 mg/kg/dia) e observados por 30 dias, de acordo com o estimador de Kaplan-Meier | 80 |
| Figura 25. Morfologia das células de TAE e o tipo de morte celular induzido por EtOH (B) e ESC (C) (200 mg/kg/dia), em comparação com o controle negativo (A), avaliadas pelo método de coloração com EtBr/LA e visualizadas por microscopia de fluorescência | 82 |
| Figura 26. Percentagem de células em G0, G1, S e G2/M, após tratamentos com EtOH, ESC (200 mg/kg/dia) e analisadas por citometria de fluxo | 84 |
| Figura 27. Atividade antiangiogênica dos extratos EtOH e ESC (10 e 200 mg/kg/dia), com base na contagem de microvasos | 86 |
| Figura 28. Esquema dos mecanismos moleculares de controle do ciclo celular em resposta a danos no DNA | 102 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| AIF | Fator indutor de apoptose |
| Apaf-1 | Fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1 |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| CDK | Cinase dependente de ciclina |
| CI ₅₀ | Concentração inibitória 50% |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CT-DNA | Ácido desoxirribonucleico do timo de vitelo |
| DISC | Complexo sinalizador indutor de morte |
| DMEM | Meio Eagle modificado por Dulbecco |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| E2F-1 | Fator de transcrição E2F-1 |
| EcoRI | Enzima de restrição |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetracético |
| EtBr | Brometo de etídio (brometo de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridina) |
| FADD | Proteína adaptadora com domínio de morte associada à FAS |
| F-I | Forma superenovelada de DNA |
| F-II | Forma circular aberta de DNA |
| F-III | Forma linear de DNA |
| HEPES | Tampão N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2- ácido etanossulfônico) |
| HDAC | Proteína histona deacetilase |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| IP | Via intraperitoneal |

| | |
|-------|---|
| MAPK | Proteína ativada por mitógeno |
| MCF-7 | Célula de carcinoma de mama humana |
| MDR | Multirresistência a fármacos (<i>Multi-drug resistance</i>) |
| MMPs | Metaloproteinases |
| MMP2 | Metaloproteinase 2 |
| MMP9 | Metaloproteinase 9 |
| MPT | Poros de transição da permeabilidade mitocondrial |
| MTT | 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio |
| NFκ-β | Fator Nuclear κ-β |
| PARP | Poli ADP ribose polimerase |
| PBS | Tampão fosfato salina |
| PCD | Morte celular programada |
| PS | Fosfatidilserina |
| RIPA | Solução tampão (<i>Radio Immuno Precipitation Assay Buffer</i>) |
| RPM | Rotações por minuto |
| SDS | PAGE – Eletroforese |
| TAE | Tumor ascítico de Ehrlich |
| TBE | Tampão tris-borato EDTA |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 21 |
| 1.1 Câncer..... | 21 |
| 1.1.1 Aspectos gerais: Conceitos e Epidemiologia..... | 21 |
| 1.2 Bases moleculares do câncer | 22 |
| 1.3 Correlação câncer e ciclo celular..... | 24 |
| 1.4 Correlação câncer e apoptose | 27 |
| 1.5 Correlação câncer e angiogênese..... | 30 |
| 1.6 Antitumorais e interação com o DNA..... | 32 |
| 1.7 Plantas medicinais como fontes de quimioterápicos | 36 |
| 1.8 <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> Degener | 37 |
| 1.9 Extração com o fluido supercrítico..... | 42 |
| 2. OBJETIVOS | 47 |
| 2.1 Objetivo geral | 47 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 47 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 49 |
| 3.1 Reagentes | 49 |
| 3.1 Preparação dos extratos | 49 |
| 3.1.1 Extração convencional..... | 49 |
| 3.1.2 Extração supercrítica | 50 |
| 3.2 Caracterização fitoquímica dos extratos..... | 51 |
| 3.3 Estudos Biológicos..... | 51 |
| 3.4.1 Estudo da atividade antitumoral <i>in vitro</i> : | 51 |
| 3.4.1.1 Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT..... | 51 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 3.4.1.2 | Avaliação da interação com DNA de timo de vitelo (CT-DNA), por espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis)..... | 52 |
| 3.4.1.3 | Avaliação da interação com DNA de timo de vitelo (CT-DNA), através da medida de fluorescência | 53 |
| 3.4.1.4 | Avaliação de dano direto ao DNA plasmidial | 54 |
| 3.4.2 | Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i> : | 56 |
| 3.4.2.1 | Modelo do tumor ascítico de Ehrlich..... | 56 |
| 3.4.2.1.1 | Protocolo experimental..... | 56 |
| 3.4.2.1.2 | Avaliações morfológicas | 57 |
| 3.4.2.1.2.1 | Variação de peso | 57 |
| 3.4.2.1.2.2 | Inibição do crescimento tumoral..... | 57 |
| 3.4.2.1.2.3 | Variação do volume total de líquido ascítico e de células compactadas..... | 58 |
| 3.4.2.1.2.4 | Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do corante Azul de Tripan | 58 |
| 3.4.2.1.2.5 | Avaliação da sobrevivência dos animais..... | 58 |
| 3.4.2.1.3 | Avaliação do tipo de morte celular <i>in vivo</i> | 59 |
| 3.4.2.1.4 | Avaliação do ciclo celular <i>in vivo</i> | 59 |
| 3.4.2.1.5 | Avaliação da atividade antiangiogênica <i>in vivo</i> | 60 |
| 3.5 | Análises estatísticas..... | 61 |
| 4. | RESULTADOS | 63 |
| 4.1 | Ensaio <i>in vitro</i> :..... | 63 |
| 4.1.1 | Efeito citotóxico dos extratos da <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener..... | 63 |
| 4.1.1.1 | Correlação entre a caracterização fitoquímica dos extratos da <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener e a citotoxicidade | 64 |

| | |
|--|------------|
| 4.1.2 Interação do CT-DNA com os extratos da <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener..... | 70 |
| 4.1.3 Interação por intercalação dos extratos da <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener com o CT-DNA | 72 |
| 4.1.4 Potencial indução de danos diretos sobre o DNA plasmidial | 74 |
| 4.2 Ensaios <i>in vivo</i> :..... | 76 |
| 4.2.1 Efeito dos extratos da <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener sobre os parâmetros morfológicos | 76 |
| 4.2.1.1 Efeito dos extratos da <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener sobre o crescimento tumoral | 78 |
| 4.2.1.2 Efeito dos extratos da <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener sobre a sobrevivência dos animais..... | 80 |
| 4.2.2 Tipo de morte celular induzido pelos extratos da <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener..... | 81 |
| 4.2.3 Efeito dos extratos da <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener sobre o ciclo celular | 83 |
| 4.2.4 Atividade antiangiogênica dos extratos da <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener..... | 85 |
| 5. DISCUSSÃO | 87 |
| 6. CONCLUSÃO | 103 |
| 7. PERSPECTIVAS..... | 105 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 107 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

1.1.1 Aspectos gerais: Conceitos e Epidemiologia

O câncer, bioquimicamente, é considerado uma doença celular caracterizada por um descontrole e/ou desvio nos mecanismos de controle do ciclo celular, diferenciação, proliferação e morte celular, levando a um desequilíbrio entre os processos de proliferação e morte celular, prevalecendo à proliferação. Assim, culminando numa divisão celular descontrolada, perda total da função celular diferenciada (células menos especializadas) e no surgimento de tumores, podendo ser malignos (neoplasias) ou benignos (DE NEIRA, 2003; INCA 2014).

Do ponto de vista clínico, o câncer é definido como um conjunto de mais de cem doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células, que crescem para além dos seus limites usuais, invadindo os tecidos e órgãos adjacentes, podendo alcançar vasos sanguíneos ou linfáticos e, através desses, disseminar-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou. Este último processo é referido como metástase, sendo a principal causa de morte por câncer. Assim, a progressão dos tumores, em geral, segue uma sequência evolutiva: crescimento local, metástase e óbito (COZZI, 2003; INCA 2014; OMS 2014).

Já faz um tempo que o câncer deixou de ser considerada simplesmente como uma doença de países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros, passando a ser observada também em países em desenvolvimento, principalmente naqueles com poucos e médios recursos financeiros (INCA 2014).

Assim, nas últimas décadas, o câncer ganhou grande dimensão epidemiológica, tornando-se num tema fortemente discutido e convertendo-se num evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014) estimou que, até o ano 2030, ocorrerá uma incidência de 27 milhões de casos de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas, anualmente, com câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento.

Por outro lado, as estimativas do INCA para 2014/2015 apontam a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer no

Brasil, e os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos), são os cânceres de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (INCA 2014).

No Estado de Santa Catarina de 2000 a 2011, a taxa de mortalidade para todas as neoplasias, ajustada por idade pela população mundial, apresentou 78,67 casos de mulheres e 134,66 casos de homens para cada 100.000 indivíduos mortos, mundialmente, por câncer (INCA 2014; OMS 2014).

1.2 Bases moleculares do câncer

A carcinogênese, ou seja, a gênese do câncer é um processo que envolve várias etapas, durante o qual as células, ao longo dos anos, adquirem progressivamente múltiplas anormalidades genéticas e epigenéticas (PELLICANO, MUKHERJEE, HOLYOAKE, 2014). O conceito de multiestágio da carcinogênese foi proposto pela primeira vez por Berenblum e Schubik em 1948 e suportado por posteriores estudos. Assim, conceitualmente, a carcinogênese pode ser dividida em três fases distintas: iniciação, promoção e progressão (DEVI, 2001; MARTINEZ et al 2003).

A iniciação é considerada o primeiro passo no processo de carcinogênese e inicia-se quando uma célula normal sofre alterações no seu DNA, principalmente em genes-chaves envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celular, apoptose e sobrevivência, interação célula-célula e célula-matriz, sendo os mesmos classificados como oncogenes, proto-oncogenes e genes supressores tumorais (DEVI, 2001; MARTINEZ et al 2003). Alterações ocorridas nestes genes especiais podem acarretar a ativação de proto-oncogenes em oncogenes e inativação dos genes supressores tumorais. Os proto-oncogenes, que a princípio são inativos, quando ativados, transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização das células normais, ou seja, pelo descontrole no crescimento celular e oncogênese. Neste caso, a expressão de proteínas estimuladoras do crescimento ocorre em excesso ou numa forma mais ativa, levando a uma multiplicação celular excessiva. Os genes supressores de tumor, que estão relacionados ao controle da divisão celular ao detectarem alguma alteração durante o processo, promovem a parada da divisão celular. Se inativados por mutações, há uma perda da ação de genes supressores funcionais, privando a célula de controles cruciais para a inibição de crescimento

inapropriado, culminando numa divisão celular exacerbada. Os genes reguladores de apoptose, que são necessários para levar uma célula danificada à morte, e os genes de reparo do DNA, que são necessários para o reparo de danos no DNA, quando alterados ou mutados predispõem as células a novas mutações, afetando a proliferação e sobrevivência do mesmo (RIVOIRE Et al., 2006; INCA 2014).

Portanto, alterações em genes especiais, tais como proto-oncogenes, genes supressores de tumor, genes reguladores de apoptose e genes de reparo do DNA podem levar a multiplicação e divisão celular exacerbada, desvio de apoptose e o não reparo dos danos não letais no DNA, resultando na malignização das células normais (RIVOIRE Et al., 2006; INCA 2014).

Diferentes tipos de mutações podem ocorrer, tais como mutações pontuais, deleções, inserções, translocações e ampliações cromossômicas (DEVI, 2001; MARTINEZ et al 2003). As origens destas mutações podem ser genéticas (mutações herdadas) ou adquiridas ao longo da vida (mutações adquiridas e/ou externas). Cerca de 80% dos casos de câncer estão relacionadas às mutações adquiridas, devido à exposição a agentes cancerígenos ou carcinógenos, tais como a radiação ionizante, a poluição, o tabagismo, o alcoolismo, a excessiva exposição ao sol, o tipo de alimentação, a exposição a agentes infecciosos, o uso de medicamentos, dentre outros (AUDIC, HARTLEY, 2004; SOTO, SONNENSCHIN, 2004; KVIECINSKI, BENELLI, 2011).

A fase de promoção da carcinogênese é um processo reversível, em que a exposição repetida e prolongada a agentes químicos chamados de “agentes promotores ou oncopromotores” estimulam a proliferação das células iniciadas ou transformadas. Tipicamente, os agentes promotores não são genotóxico, isto é, são incapazes de formar adutos com o DNA ou de causar danos no DNA, mas são capazes de estimular a proliferação celular. Assim, a exposição a agentes promotores resulta na promoção de crescimento rápido das células iniciadas e formação de tumores não invasivos (MARTINEZ et al 2003).

A progressão é o processo através do qual, mudanças sucessivas na neoplasia dão origem a subpopulações cada vez mais malignas, pois a aquisição de mutações adicionais, ou seja, acúmulo de mais mutações genéticas que levam ao surgimento do fenótipo maligno ou invasivo (metástase) (MARTINEZ et al 2003).

Como exemplo de genes mutados em células tumorais, se destaca o gene supressor de tumor p53, sendo o gene mais frequentemente mutado em tumores humanos. Mutações no DNA que codifica o p53 ocorrem em mais de 50% de todos os tumores e em quase

todo tipo de tumores. Contudo, a função do p53 como supressor de tumor já está bem estabelecida, pois em resposta a uma vasta variedade de sinais intracelulares e extracelulares de estresse, incluindo danos no DNA, hipóxia, depleção nutricional e ativação de oncogenes, este gene é ativado principalmente através de modificações pós-traducionais. Uma vez ativada, a proteína p53 se liga em uma sequência de DNA específica nos seus genes-alvo, denominada elemento responsivo ao p53, causando assim o aumento da expressão de diversas proteínas, que estão envolvidas em vários mecanismos celulares, tais como na regulação da parada do ciclo celular, senescência e apoptose (LIANG, LIU, FENG, 2013).

As células tumorais são caracterizadas por produzirem ou superexpressarem certas proteínas, que podem ser usadas como marcadores tumorais. Dentre elas, destaca-se o antígeno carcinoembrionário (CEA), enolase neurônio-específica (NSE), proto-oncogenes *Ras*, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e o seu produto proteico (p185neu), dentre outros. Esses marcadores que anteriormente eram utilizados somente como ferramentas de diagnóstico e prognóstico, atualmente estão adquirindo papel de destaque no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento, direcionadas a bloqueio do ciclo biológico da progressão tumoral (PACHECO, PASCHOAL, CARVALHO, 2002).

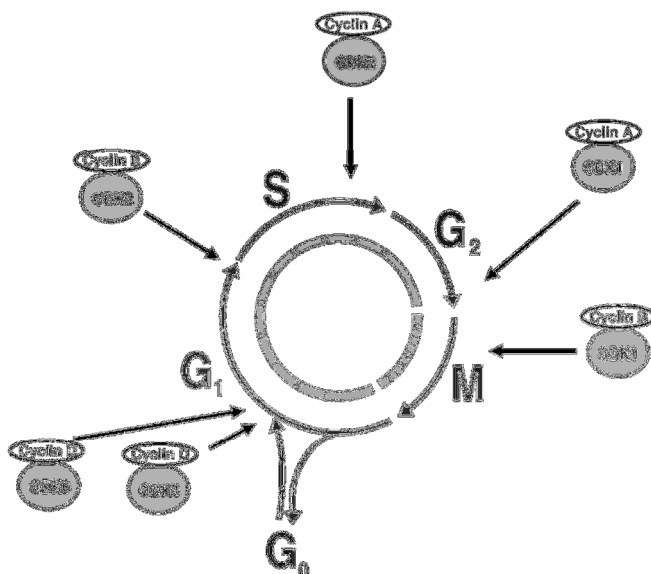
1.3 Correlação câncer e ciclo celular

Em 1951, Howard e Pele descreveram pela primeira vez o ciclo celular e suas fases, que foram divididas em duas fases: a interfase que inclui Gap1 (G1 ou G1), a síntese (S) e Gap2 (G2, GII ou GII/M) e mitose (M), que inclui a prófase, metáfase, anáfase e telófase. Na fase G1, a célula se prepara para a síntese do DNA, na fase S ocorre à replicação do DNA, seguida da fase G2 durante a qual a célula se prepara para a mitose (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003, GOLIAS, CHARALABOPOULOS, CHARALABOPOULOS, 2004). Foster e colaboradores (2011) sugeriram que a fase G1 seja dividida em duas partes: G1-pm para o G1-pós-mitótico, e G1-ps para G1-pré-Síntese, e entre G1-pm e G1-ps está a fase Gap0 (G0), considerada como a fase de repouso ou quiescência.

As principais famílias de proteínas reguladoras que desempenham um papel chave no controle da progressão do ciclo celular são as ciclinas, as cinases dependentes de ciclina (CDKs) e as

suas proteínas-substrato, os inibidores de CDK (CKIs), o fator de transcrição p53 (supressor de tumor) e produtos do gene de retinoblastoma (pRb). As CDKs são proteínas serina/treonina que são ativadas em pontos específicos do ciclo celular; nove já foram identificados e, destes, cinco são ativas durante o ciclo celular, isto é, nas fases G1 (CDK4, CDK2 e CDK6), S (CDK2), G2 e M (CDK1). Enquanto, que as ciclinas são classificadas em D (fase G1), E (fase S), A (fase G2) e B (mitose) (Figura 1) (GOLIAS, CHARALABOPOULOS, CHARALABOPOULOS, 2004).

Figura 1. As fases do ciclo celular e os respectivos complexos CDK/ciclina.

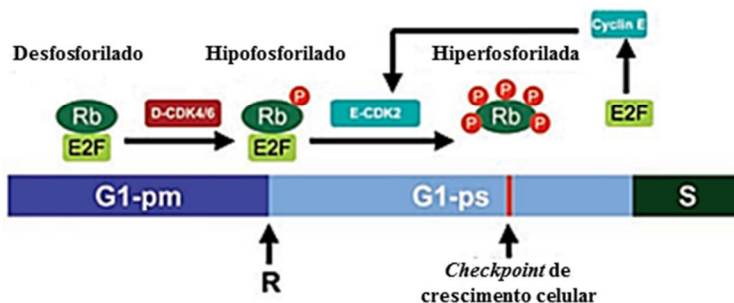


Fonte: VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003.

A entrada na fase G1 se dá pela ligação das ciclinas do tipo D (ciclina D1, D2 e D3) com as CDK4/6, formando os complexos CDK6/4-ciclina D. Enquanto que, a progressão da fase G1 para a fase S é regulada pela associação da ciclina E com a CDK2. Mas, para que isto aconteça, durante a fase G1, o pRb (supressor de tumores de retinoblastoma) precisa tornar-se hiperfosforilado, levando a dissociação do complexo com a proteína histona deacetilase (HDAC) e o fator de transcrição E2F-1, assim regulando positivamente a transcrição de genes promotores da fase S, tais como a ciclina A, ciclina E, Cdc25 (Figura 2).

A transição da fase S para G2 é realizada pelo complexo CDK2/ ciclina A. E, finalmente, o complexo ciclina CDK1/ ciclina B regula a progressão de G2 para M (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003).

Figura 2. Progressão do ciclo celular à fase S pela ativação da via pRb/E2F e os diferentes estados de fosforilação da proteína pRb: desfosforilado, hipofosforilado e hiperfosforilado.



Nota: Onde **R**: Ponto de Restrição. **Fonte:** FOSTER Et al., 2011.

As células cancerígenas são caracterizadas pela proliferação celular descontrolada e exacerbada, por apresentar: i) Uma desregulação dos mecanismos de controle do ciclo celular, principalmente no controle da progressão para a fase G1, um período onde decisões críticas são feitas a respeito de se iniciar a proliferação ou entrarem quiescência (G0); ou ii) Mutações em genes que codificam proteínas que regulam a progressão ciclo celular para a fase G1 (GOLIAS, CHARALABOPOULOS, CHARALABOPOULOS, 2004; FOSTER Et al., 2011).

Um aspecto crucial da regulação do ciclo celular é a existência de *checkpoints* ou pontos de verificação que identificam danos ao DNA e asseguram uma replicação e segregação cromossomal correta. Os *checkpoints* do dano ao DNA estão posicionados antes da célula entrar na fase S (*G1/S checkpoint*) ou após a replicação do DNA (*G2/M checkpoint*), os chamados *checkpoints* de replicação. Durante as fases S e mitose também existe *checkpoints* do DNA, *checkpoint* da síntese de DNA e do fuso mitótico, respectivamente (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003).

Existem evidências indicando que múltiplos processos celulares, incluindo ativação *checkpoint*, reparo do DNA e mudanças na

transcrição de genes são iniciados em resposta a danos no DNA ou replicação incompleta. E alguns dos genes requeridos para a *checkpoint* induzido por danos ao DNA são os mesmos requeridos para a parada do ciclo celular por bloqueio da replicação e, no caso de células severamente danificadas, o p53 induz a morte celular por ativação de genes (por exemplo: Bax) que estão envolvidos na sinalização apoptótica (DASIKA et al, 1999; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003; BERTOLI, SKOTHEIM, DE BRUIN, 2013).

Existem duas famílias distintas de proteínas inibidoras do ciclo celular, chamados inibidores de CDKs (CKIs): i) A família INK4 que inclui p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c), p19 (INK4d), inativam especificamente as CDK4 e CDK6 da fase G1 do ciclo celular; e ii) A família Cip/Kip que inclui p21 (WAF1/Cip1), p27 (CIP2), p57 (Kip2), que por sua vez inativam os complexos CDK/ciclina em geral (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003) e desta forma interferem no ciclo celular, bloqueando-o.

1.4 Correlação câncer e apoptose

A morte celular é um processo fisiológico necessário para remover células indesejadas ou danificadas, e está interligada com a sobrevivência e a proliferação celular (PRADELLI, BÉNÉTEAU, 2010; CHAABANE Et al., 2013).

A apoptose é frequentemente chamado de morte celular programada (PCD), embora para alguns pesquisadores o termo PCD refira-se a apoptose, autofagia e necrose programada, que são facilmente distinguidas devido a as suas características morfológicas e seus processos fisiológicos serem distintos (CHAABANE Et al., 2013, OUYANG Et al., 2012). Estas três formas de PCD podem juntamente decidir o destino das células malignas. A apoptose e a necrose programada invariavelmente contribuem para a morte celular, enquanto que a autofagia pode direciona a célula à morte ou pode mantê-la viva (OUYANG Et al., 2012).

A apoptose (tipo I PCD) foi descrita pela primeira vez por Kerr, Wyllie, e Currie, em 1972, e é caracterizada por alterações celulares, morfológicas e bioquímicas específicas, incluindo *shrinkage* celular, condensação de cromatina (picnose) e fragmentação do núcleo, ativação das caspases, desestruturação da membrana celular (*membrane blebbing*), formação de corpos apoptóticos, externalização das

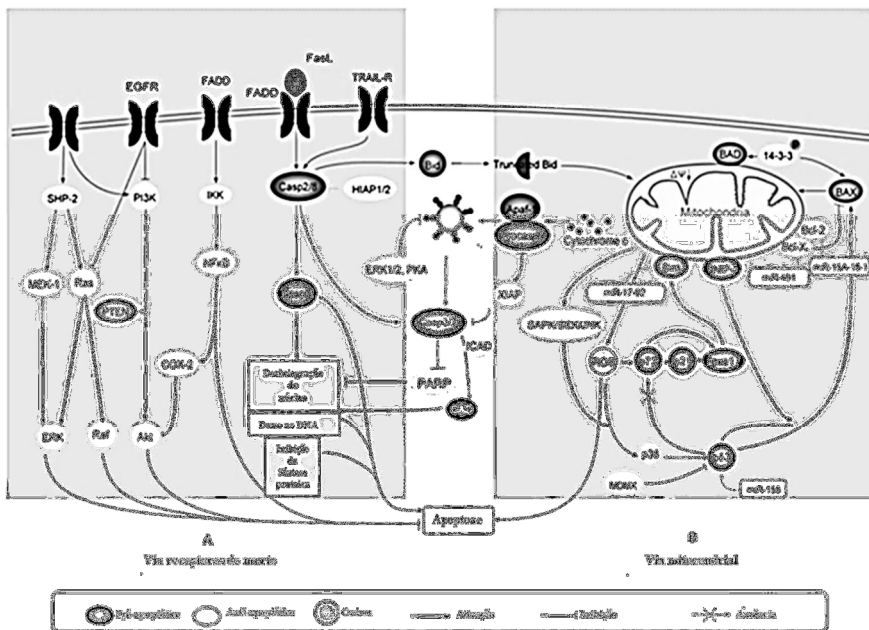
fosfatidilserinas e perda de adesão com as células vizinhas e com a matriz extracelular (OUYANG Et al., 2012).

A apoptose é um processo essencialmente sem reação inflamatória devido aos corpos apoptóticos serem subsequentemente fagocitadas pelas células circulantes e degradado dentro dos fagolisossomas, assim impedindo que os seus constituintes celulares sejam extravasados para o tecido intersticial circundante, prevenindo também a necrose secundária, além das células fagocitárias não produzem citosinas inflamatórias (ELMORE, 2007). Assim, a apoptose pode ser chamada de uma morte celular "limpa", sendo clinicamente o que se busca alcançar com uma quimioterapia mais seletiva.

Existem dois mecanismos apoptóticos interconectados parcialmente, a apoptose dependente de caspases e morte celular independente de caspases ou *necroptosis*. Dentre estas, a apoptose dependente de caspases é induzida por duas vias: a extrínseca – via domínio de receptor de morte e intrínseca – via mitocondrial (OUYANG Et al., 2012; CHAABANE Et al., 2013).

A via extrínseca é desencadeada pela ativação de receptores de morte expressos na superfície celular, como o receptor de Fas. A ligação do Fas ao seu receptor, formando um complexo de morte, recruta a proteína contendo o domínio de morte (FADD) e a pro-caspase-8, formando um complexo sinalizador indutor de morte (DISC), que conseqüentemente, ativa a caspase-8 que, por sua vez ativa a pro-caspase-3, levando a morte celular (Figura 3) (DEWSON, KLUCK, 2009; OUYANG Et al., 2012).

Figura 3. Via de sinalização apoptótica.



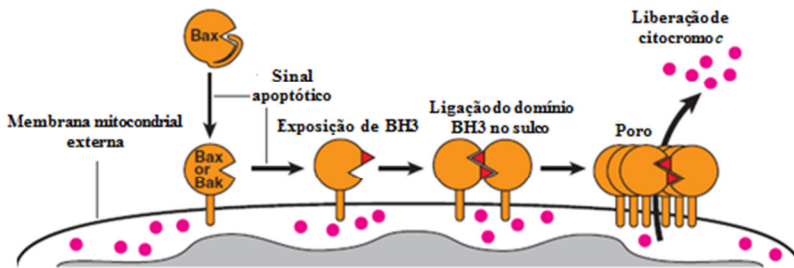
Fonte: OUYANG L. Et al., 2012

A apoptose é o principal tipo de morte celular que ocorre quando os danos no DNA são irreparáveis (OUYANG Et al., 2012). Comumente, o dano ao DNA leva à ativação das caspases durante a apoptose via mitocôndria (via intrínseca), que é regulada pela família de proteínas Bcl-2 (CHAABANE Et al., 2013), que inclui as proteínas pró-apoptóticas, tais como Bax, Bak, Bad, Bcl-XS, Bid, Bik, Bim e HRK, além das anti-apoptóticas, tais como Bcl-2, Bcl XL, Bcl-W, Bfl-1 e Mcl-1 (OUYANG Et al., 2012).

Inicialmente, ocorre a permeabilização da membrana mitocondrial externa, em que o domínio BH3 das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak são transientemente exposta antes da ligação umas nas outras pelo sulco hidrofóbico, levando a oligomerização e formação do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (MPT) (Figura 4), que contribui para a permeabilização da membrana mitocondrial externa, resultando na liberação de proteínas solúveis a partir do espaço intermembranar mitocondrial (incluindo citocromo c, fator indutor de apoptose entre outros), além da ocorrência da perda ou

redução do potencial de membrana mitocondrial. O citocromo *c* liga-se ao Apaf-1 (fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1), trifosfato de desoxiadenosina (dATP) e pro-caspase-9, formando um complexo de ativação de caspases (apoptossomo), com a consequente ativação de caspase-9. A caspase-9 ativa, recruta e cliva as caspases efetoras (-3, -6, e -7), ativando-as. Em seguida, as caspases efetoras clivam as suas proteínas alvo, culminando na morte celular (Figura 4) (WANG, LIU, CUI, 2005; DEWSON, KLUCK, 2009).

Figura 4. Modelo da ligação BH3-sulco hidrofóbico das proteínas Bax e Bak, induzindo a mudança conformacional e oligomerização durante a apoptose.



Fonte: DEWSON, KLUCK, 2009.

Recentemente, as caspases vêm atraindo atenção como potenciais alvos terapêuticos no tratamento do câncer, devido a sua função indispensável na apoptose (WANG, LIU, CUI, 2005).

1.5 Correlação câncer e angiogênese

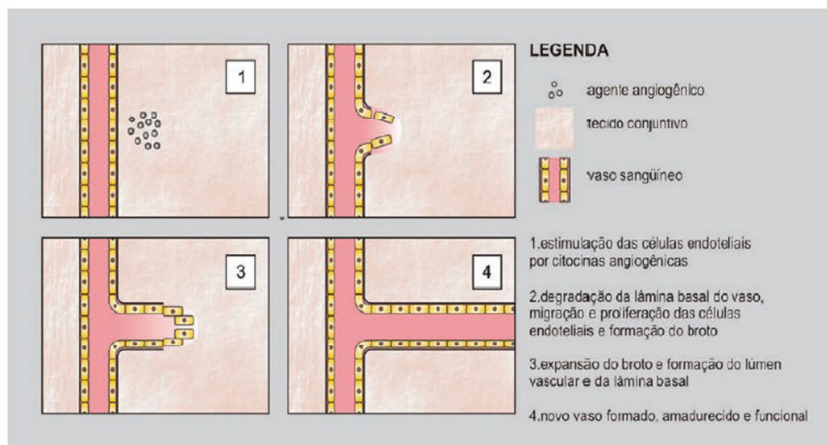
O processo chamado, genericamente, como angiogênese ou neovascularização foi descrito pela primeira vez em 1787 por Hunter, como sendo o crescimento de vasos sanguíneos semelhantes a galhos de árvores (DE OLIVEIRA Et al., 2010).

Sob circunstâncias fisiológicas controladas, a angiogênese é essencial e está presente no desenvolvimento embrionário, no sistema reprodutor feminino a cada ciclo menstrual, na gravidez, na cicatrização de feridas e na sequência de processos inflamatórios (DE OLIVEIRA Et al., 2010).

Porém, existem muitos estudos científicos, demonstrando que a angiogênese desempenha um papel crucial no crescimento tumoral e na

metástase, pois durante o desenvolvimento tumoral, as necessidades metabólicas teciduais excedem a demanda de oxigênio e nutrientes disponíveis pelos capilares existentes, com isso, há uma resposta fisiológica para aumentar a densidade da rede capilar, ocorrendo, assim, um desequilíbrio entre os fatores pró-angiogênicos e angiostáticos, secretados pelas células neoplásicas, resultando na proliferação vascular. O processo em si envolve a degradação proteolítica da matriz extracelular, seguida pela atração quimiotática e proliferação de células endoteliais e células musculares lisas para formar novos vasos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes (Figura 5) (JAKÓBISIAK, LA SEK, GOŁĄB, 2003; ADORNO, 2008, DE OLIVEIRA Et al., 2010).

Figura 5. Representação esquemática da angiogênese.



Fonte: DA SILVA Et al., 2007.

Dentre os vários indutores da angiogênese nos tumores, citam-se: o fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor -VEGF*), o fator de crescimento fibroblástico (*Fibroblastic growth factor -FGF*), a angionina, a interleucina 8, as metaloproteinasas (MMPs), o fator de crescimento transformador b, os ativadores de plasminogênio, o fator de crescimento da célula endotelial derivado de plaqueta (*Platelet-derived endothelial cell growth factor-PD-ECGF*), os fatores de crescimento derivados de plaquetas, como as prostaglandinas, a angiotensina e a heparina, e o fator de necrose

tumoral alfa (*Tumor necrosis factor α* – TNF α) (JAKÓBISIAK, LASEK, GOLAB, 2003; ADORNO, 2008).

E como inibidores da angiogênese, destacam-se: a angiostatina, endostatina, fator plaquetário, prolactina, trombospondina, os inibidores teciduais de metaloproteinase (*tissue inhibitor of metalloprotenase 1-TIMP-1*, *tissue inhibitor of metalloprotenase 2-TIMP-2*, *tissue inhibitor of metalloprotenase 3-TIMP-3*) (DE OLIVEIRA Et al., 2010).

1.6 Antitumorais e interação com o DNA

Os agentes antitumorais que têm como alvo molecular o DNA estão entre os agentes mais eficazes em uso clínico e produzem um aumento significativo na sobrevivência de pacientes com câncer quando utilizados em associação com fármacos que apresentam outros mecanismos de ação. Na Tabela 1 são apresentados alguns exemplos de fármacos antitumorais consagrados na clinica médica que tem o DNA como principal alvo molecular (HURLEY, 2002).

Tabela 1. Fármacos antitumorais consagrados, utilizados clinicamente, que tem o DNA como alvo molecular.

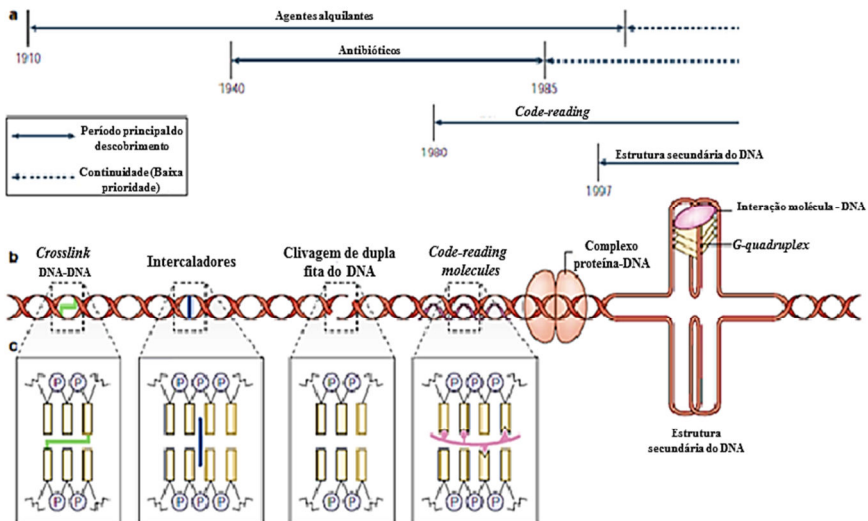
| Fármaco | Uso clínico | Mecanismo de ação |
|-----------------------|---|---|
| Ciclofosfamida | Neuroblastoma; Linfoma não-Hodgkin; Retinoblastoma; Câncer de mama; Câncer do pulmão. | <i>Crosslink</i> com o DNA (entre fitas) |
| Melfalano | Mieloma múltiplo | <i>Crosslink</i> com o DNA (entre fitas) |
| Mitomicina C | Câncer do trato gastrointestinal e de estômago | <i>Crosslink</i> com o DNA (entre fitas) |
| Cisplatina | Câncer de testículo; Câncer do ovário; Câncer de cabeça e pescoço. | <i>Crosslink</i> com o DNA (entre fitas) |
| Doxorrubicina | Rabdomiossarcoma; Câncer de mama; Leucemia aguda do adulto; Câncer endometrial; Câncer de estômago; Câncer do colo do útero; Linfoma não-Hodgkin. | Estabiliza o complexo de clivagem topoisomerase-II/DNA |
| Etoposídeo | Câncer de testículo; Câncer do pulmão. | Estabiliza o complexo de clivagem topoisomerase-II/DNA |
| Mitoxantrona | Leucemias (ALL, ANLL e CML); Câncer de mama; Câncer do ovário; Câncer de próstata. | Estabiliza o complexo de clivagem topoisomerase-II/DNA |
| Actinomicina D | Coriocarcinoma; Sarcomas de tecidos moles; Rabdomiossarcoma; Sarcoma de Ewing; Tumores de Wilms. | Inibe a síntese de RNA |
| Bleomicina | Câncer de testículo; Linfoma não-Hodgkin. | Fármaco radiomimético que causa de clivagem de cadeia dupla |

Fonte: Adaptado de HURLEY, 2002.

Entretanto, infelizmente, estes fármacos possuem elevada toxicidade e baixa especificidade. Com isso, grandes esforços têm sido feitos na busca de novos agentes terapêuticos mais seletivos. Logo, estudos científicos mais aprofundados que buscam a identificação de alvos moleculares específicos para o câncer com a finalidade de criar

nova geração de agentes terapêuticos menos tóxicos, se fazem necessários (HURLEY, 2002). A figura 6 apresenta a classificação dos agentes terapêuticos que interagem com o DNA e suas respectivas interações moleculares com o DNA.

Figure 6. Classificação de agentes que interagem com o DNA e suas respectivas interações moleculares com o DNA.



Nota: Onde **a)** Linha do tempo das descobertas e evolução dos agentes que interagem com o DNA até o presente momento; **b)** Ilustração dos tipos de modificações que podem formar com o DNA, inclusive, da esquerda para a direita temos as ligações cruzadas (*crosslinks*), a intercalação, a clivagem de cadeia de DNA e *code-reading molecules*. A hélice de DNA também se pode apresentar associada com proteínas, tais como topoisomerase II, e como estruturas secundárias de DNA - por exemplo, um *G-quadruplex*; **c)** Detalhe de modelos demonstrando os diferentes tipos de modificação do DNA. **Fonte:** HURLEY, 2002

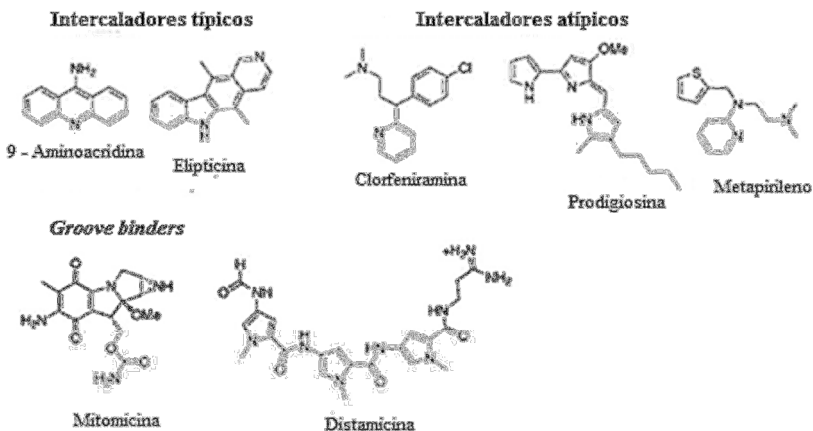
Há basicamente três diferentes formas com que uma molécula interage com o DNA, podendo ocorrer através: i) Do controle de fatores de transcrição em que as moléculas não interagem diretamente com o DNA, em vez disso, interagem com a proteína que se liga ao DNA e, por conseguinte, altera a função deste; ii) Da formação de híbridos RNA-DNA, pela ligação da molécula de RNA com o DNA de fita simples, formando um híbrido RNA-DNA, que interfere com a atividade

de transcrição, ou iii) Da ligação direta de moléculas no DNA. A ligação direta de moléculas no DNA é usualmente classificada e dividida em duas grandes categorias, intercalação e ligação aos sulcos (*groove binders*), podendo esta última ocorrer por ligação ao sulco menor ou ao sulco maior (GOWDA Et al., 2014).

A intercalação foi proposta pela primeira vez por Leeman e envolve a inserção de uma molécula planar entre pares de bases de DNA, o que resulta em uma diminuição na torção helicoidal de DNA e o alongamento do DNA, conduzindo a uma alteração conformacional molecular do mesmo (GOWDA Et al., 2014).

Apesar de a intercalação ter sido tradicionalmente associada a moléculas contendo estruturas aromáticas constituídas por dois ou três anéis cíclicos fundidos, também existem os intercaladores atípicos, contendo um sistema de anéis não fundidos (Figura 7) (PALCHAUDHURI, HERGENROTHER, 2007).

Figura 7. Estruturas de intercaladores típicos, intercaladores atípicos e os *groove binders* (moléculas que se ligam aos sulcos).



Fonte: PALCHAUDHURI, HERGENROTHER, 2007.

As moléculas intercaladores de DNA têm sido amplamente utilizadas como agentes antitumorais, antimaláricos, antibióticos e antifúngicos (PALCHAUDHURI, HERGENROTHER, 2007). Contudo, nem todos ligantes ao DNA podem apresentar atividade nucleásica e, portanto, sejam capazes de induzir danos ao DNA. Em geral, a presença de grupos funcionais básicos, catiônicos ou eletrofílicos são muitas

vezes necessárias para que uma molécula apresente a atividade nucleásica.

A clivagem de DNA pode ocorrer diretamente sobre os seus componentes básicos como a base nitrogenada e o açúcar por uma via oxidativa ou por hidrólise das ligações fosfodiéster (GOWDA Et al., 2014).

Como os agentes intercalantes promoverem alterações conformacionais no DNA, isto pode impedir a ocorrência da replicação e transcrição do DNA, interferindo com a ação das topoisomerases, assim, tornando estes tóxicos para as células que apresentam uma alta taxa de proliferação. Desta forma, os agentes intercaladores são muitas vezes mais letais para as células cancerosas do que células normais (GOWDA Et al., 2014).

Assim como os agentes intercaladores, moléculas que se ligam nos sulcos do DNA também provaram ser úteis na clínica, como agentes antitumorais e antibacterianos, e assim temos como exemplo a mitomicina D (que também é um agente *Crosslink* de DNA) (Tabela 1) (PALCHAUDHURI, HERGENROTHER, 2007).

1.7 Plantas medicinais como fontes de quimioterápicos

Atualmente, existem quatro principais tipos de tratamentos para o câncer: excisão cirúrgica, radioterapia, imunoterapia e quimioterapia. Com o objetivo de erradicar o câncer, normalmente é usado a terapia combinada, associando mais de um tipo de tratamento, por exemplo, quimioterapia associada à radioterapia. Entretanto, as terapias atuais ainda apresentam várias dificuldades em termos de estratégia terapêutica, demonstrando, assim, ser insatisfatórias, uma vez que as alternativas existentes, frequentemente estão associadas a não regressão total da patologia e/ou a elevada toxicidade e inespecificidade, além da multirresistência celular ao quimioterápico (JENDIROBA Et al., 2002; ALMEIDA Et al., 2005).

Desta forma, é imperativa a busca constante por novas alternativas terapêuticas, com maior seletividade, que possam alterar este cenário adverso. Nas recentes décadas, o interesse público pelas terapias utilizando produtos naturais, tem crescido drasticamente nos países industrializados e em desenvolvimento (ZUIN, YARIWAKE, BICCHI, 2003). A OMS (2014), por outro lado, estimou que 80% da população dos países em desenvolvimento ainda dependem de medicamentos tradicionais.

Muitas das plantas utilizadas na medicina popular tradicional são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, podendo ser utilizadas como uma nova estratégia terapêutica contra o câncer, ou seja, serem utilizadas como fontes de moléculas protótipos para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antitumorais (INGALE, HIVRALE, 2010).

Como exemplos de fármacos antitumorais já consagrados, que são derivados de plantas, temos: os alcaloides da Vinca, como vincristina e vimblastina, os derivados de Lignanans, como o etoposídeo e tenoposídeos, os taxanos isolados de espécies do gênero *Taxus*, como o taxol e os derivados semissintéticos da camptotecina, irinotecano e topotecano, entre outros (FELIPE, 2010).

1.8 *Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener

Na medicina folclórica ou tradicional uma das famílias de plantas alimentícias e medicinais bastante utilizada é a Passifloraceae, família esta constituída por cerca de 16 gêneros e 650 espécies. O gênero *Passiflora*, a maior da família Passifloraceae, compreende cerca de 400 espécies segundo alguns autores e segundo outros 500 espécies, sendo popularmente conhecidas como flores da paixão ou maracujá. Estas plantas crescem em regiões tropicais e subtropicais, porém são mais raras na Ásia, Austrália e África tropical (BENINCÁ Et al., 2007; MONTANHER Et al., 2007; DEVAKI Et al., 2011; SILVA Et al., 2011, SATO Et al., 2012).

A Farmacopéia Brasileira tem descrito os efeitos farmacológicos de três espécies de *Passiflora*, a *P. incarnata* L., a *P. alata* Curtis e a *P. edulis* Sims, que são amplamente cultivadas e consumidas no Brasil. Entretanto, a *P. alata* é frequentemente substituída por *P. edulis*, que é usada principalmente na produção industrial de suco ou adoçante, pois o suco obtido a partir do fruto de *P. edulis* é caracterizado pela sua acidez, devido à predominância de dois ácidos, ácido cítrico e málico. Além do suco, os frutos são empregados na produção de geleias e compotas (GÓMEZ Et al., 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2011).

No Brasil, as espécies do gênero *Passiflora* são conhecidas como maracujeira ou fruto-da-paixão, e inclui a *Passiflora edulis*, que é constituída por duas subespécies, que são cultivadas comercialmente, uma forma roxa (*P. edulis* Sims) e uma forma amarela (*P. edulis* forma *flavicarpa* Degener). A *P. edulis*, é nativa da América do Sul e cultivada

na Índia, Nova Zelândia, Brasil, Colômbia, Equador, Indonésia, Peru, Austrália, África Oriental, Israel e África do Sul, e apresenta vários nomes populares, tais como maracujá azedo, maracujá-amarelo, maracujá-preto e maracujá-roxo (MONTANHER Et al., 2007; MACHADO Et al., 2008; BERNACCI, 2008; INGALE, HIVRALE, 2010; GÓMEZ Et al., 2010; ZERAİK Et al., 2011; SILVA Et al., 2012).

A *P. edulis f. flavicarpa* Degener (Figura 8 e Figura 9) apresenta, como características morfológicas, hastes, gavinhas, quatro glândulas foliares e duas peciolares, margem de folha serrilhada, estípulas pouco curvas, flores de cor branca ou branca e roxa, frutos globosos com polpa de cor amarela e laranja. Enquanto que a *P. edulis* Sims, mesmo apresentando as características já citadas, mostram folhas mais largas, maiores diâmetros de hastes e maiores comprimentos do lóbulo da folha e de internódios de haste (CROCHEMORE, MOLINARI, STENZEL, 2003).

Figura 8. Imagem ilustrativa da flor da *P. edulis f. flavicarpa* Degener.



Figura 9. Imagens ilustrativas do fruto da *P. edulis f. flavicarpa* Degener (A) e da *P. edulis* Sims (B).

A)



B)



Várias partes desta planta são biologicamente ativas onde o extrato do fruto tem demonstrado atividade antiinflamatória, antitumoral, citotóxica, antiproliferativa, antioxidativa, antimicrobiana,

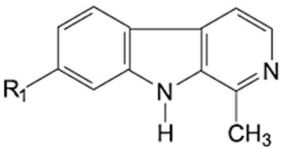
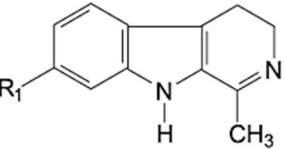
antiviral, antifúngica, hemolítica, anti-hipertensiva, vasodilatador, hipoglicêmica, hipolipidêmica, hipocolesterolêmica, cicatrizante, anticoagulante, ansiolítica, anticonvulsivante, sedativa, hipnótica, antidepressiva, antiespasmática, espermicida e antitussígena (MONTANHER Et al., 2007; REBELLO Et al., 2008; LAM, Ng, 2009; INGALE, HIVRALE, 2010; GÓMEZ Et al., 2010; MATSUI Et al., 2010; DEVAKI Et al., 2011; SANO Et al., 2011; ZERAIK Et al., 2011; SATO Et al., 2012).

Investigações fitoquímicas de *P. edulis* revelaram a presença de componentes bioativos, como alcaloides, fenóis, flavonoides, glicosídeos, compostos cianogênicos e ácidos orgânicos (PATEL Et al., 2011, ZERAIK Et al., 2010, DHAWAN K., DHAWAN S., SHARMA A., 2004).

Outros componentes químicos presentes são: carotenoides, ácido L-ascórbico, antocianinas, lactonas, aminoácidos (prolina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, alanina), hidratos de carbono (frutose, glicose, sacarose, maltose, lactose e pectina), ésteres, triterpenoides, saponinas, minerais (Na, K, Mg, Ca, Zn, Al, Mn, Fe), vitamina A, potássio, dentre outros (DE NEIRA, 2003; LAM, Ng, 2009; MATSUI Et al., 2010; SILVA Et al., 2012).

Os alcaloides presentes no gênero *Passiflora* são do tipo índole com diferentes graus de aromaticidade (alcaloides β -carbolínicos), compreendendo o segundo grande grupo de alcaloides conhecidos atualmente. Na *P. edulis f. flavicarpa Degener* foi verificada a presença de alcaloides β -carbolínicos em todas as partes da planta, exceto as raízes. São exemplos de alcaloides β -carbolínicos presentes na *P. edulis f. flavicarpa Degener*, a harmana, harmina, harmol e harmalina (Tabela 2) (ZERAIK Et al., 2010). Estudos anteriores descreveram um largo espectro de propriedades bioquímicas e farmacológicas de alcaloides β -carbolínicos, incluindo atividade antitumoral, antiviral, antiparasitário, bem como atividade antimicrobiana. O efeito citotóxico dos alcaloides β -carbolínicos foi relatado por estar relacionada à capacidade de se intercalarem no DNA, uma vez que os alcaloides são pequenas moléculas heterocíclicas com características básicas (CHEN Z Et al., 2011).

Tabela 2. Estrutura química de alcaloides β -carbolínicos presentes na *P. edulis f. flavicarpa* Degener.

| Estrutura geral | R1 | Denominação |
|---|------------------|--|
|  | H | Harmana (1-metil-9H- pirido [3, 4- b]-indol) |
| | OCH ₃ | Harmina (7-metóxi-1-metil-9H- pirido [3, 4- b]-indol) |
| | OH | Harmol (7- ol,1-metil-9H- pirido [3, 4- b]-indol) |
|  | OCH ₃ | Harmalina (4,7-dihidro-9-metoxi-1-metil-3H- pirido [3, 4- b]-indol) |

Fonte: PEREIRA, RODRIGUE, YARIWAKE, 2014.

Sabe-se que moléculas pequenas que podem se ligar ao DNA tem atraído considerável atenção para o desenvolvimento de agentes terapêuticos anticâncer mais eficazes. Além disso, os alcaloides β -carbolínicos inibem a topoisomerase I e II, as CDKs (ciclina dependente de cinases), a MK2 (*MAP kinase-activated protein kinase 2*), a PLK1 (*Serine/threonine-protein kinase PLK1*), a cinesina Eg5 e o IKK (inibidor do fator nuclear kappa- β cinase (CHEN Z Et al., 2011; SARKAR, BHADRA, 2014; SARKAR, PANDYA, BHADRA, 2014).

Vários estudos realizados comprovaram a citotoxicidade dos alcaloides β -carbolínicos. Segundo Sarkar e colaboradores (2014), o alcaloide β -carbolínico harmalol apresenta citotoxicidade sobre as células HepG2 (linhagem de células do carcinoma hepatocelular humano), devido a sua capacidade de interagir com o DNA por intercalação. Chen e colaboradores (2011) avaliaram a atividade citotóxica de uma serie de novos 1,9-disubstituídos β -carbolínicos sobre 10 diferentes linhagens celulares humanas, incluindo a MCF-7. Estes autores concluíram que o 3-clorobenzil e o 3-fenilpropil substituintes na posição 9 dos β -carbolínicos, apresentavam uma citotoxicidade mais significativa sobre as células tumorais, e que esse efeito citotóxico provinha da capacidade dos mesmos em intercalarem com o DNA. E por fim, Zhao e Wink (2013), demonstraram que o alcaloide β -carbolínico harmina apresentou múltiplas propriedades farmacológicas,

como atividade citotóxica e antiproliferativa sobre MCF-7, devido à capacidade deste em intercalar o DNA, juntamente com a inibição da atividade da telomerase e indução do fenótipo de senescência por aumentar a expressão dos constituintes da via p53/p21.

Recentemente, cientistas também têm demonstrado interesse na investigação de carotenoides e compostos polifenólicos, devido ao seu potencial de inibir o crescimento tumoral, pois promovem bloqueio do ciclo celular, alterando a cinética do ciclo celular, induzem a apoptose por aumentarem a atividade da caspase-3 e reduzem a viabilidade celular. Em estudos *in vitro*, estes compostos inibiram a proliferação de células leucêmicas e induziram a apoptose. Os carotenoides causaram bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 e induziram a apoptose em células leucêmicas mieloides (HL-60) na mesma concentração necessária para bloqueio do ciclo celular. Exemplos de carotenoides que apresentam tais propriedades anticancerígenas são: o licopeno, α e β -caroteno. Além disso, alguns polifenóis têm demonstrado serem responsáveis pela parada na fase G0/G1 nas células MOLT-4 da leucemia linfoblástica e na fase G2/M nas células HL-60; e induzem apoptose em células de leucemia humana K562. São exemplos de polifenóis que interferem na proliferação celular, a quercetina e catequina (DE NEIRA, 2003; ROWE Et al., 2004).

Experimentos realizados com o suco de maracujá corroboram com as informações citadas acima, pois a transformação neoplásica foi inibida na fase de promoção da carcinogênese, em vez de na fase de iniciação, onde houve a ativação da caspase-3 nas células HL-60 e MOLT-4, conseqüentemente, aumentando a ocorrência da morte celular e fornecendo indícios que os constituintes químicos de extrato do suco de maracujá foram capazes de induzir a morte celular por apoptose (ROWE Et al., 2004).

Nos últimos anos, têm sido descritas as propriedades antitumorais dos polissacarídeos naturais, geralmente relacionados à ativação e modulação do sistema complemento de macrófagos. Estes polissacarídeos geralmente têm baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais, o que os torna adequados para a imunoterapia contra o câncer (SILVA Et al., 2012).

Experimentos realizados com polissacarídeos extraídos da *P. edulis*, demonstraram uma inibição do crescimento tumoral, que não estava relacionada com a inibição da proliferação celular. Contudo, esta inibição estaria correlacionada com a ocorrência de extensas áreas de necrose, observada pela análise histopatológica. Sugerindo, que a atividade antitumoral estaria associada com a modulação do sistema

imunológico, por intermédio da ativação direta ou indireta dos componentes do sistema imunológico, tais como macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e células *Natural-killer*. Foi evidenciado, ainda, um aumento do número de leucócitos totais e uma normalização da percentagem de linfócitos e neutrófilos no sangue periférico, indicando que uma das ações destes polissacarídeos estaria envolvida no mecanismo de defesa primário (SILVA Et al., 2012).

Os mecanismos envolvidos na inibição tumoral via imunoestimulação ainda não estão totalmente elucidados, mas as respostas observadas em modelos animais incluem a inibição do crescimento de células cancerosas, da angiogênese e da metástase (SILVA Et al., 2012).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são constituídas por uma família multigênica de proteínas de matriz extracelular dependentes de zinco, implicadas em processos patológicos, tais como a carcinogênese, em que a MMP-2 e MMP-9 estão envolvidas nos processos de migração, invasão tumoral, metástase e angiogênese (GIALELI, THEOCHARIS, KARAMANOS, 2011). Extrato aquoso de *P. edulis* exibiu uma atividade inibidora em ambas as metaloproteinases, apresentando maior eficiência inibitória sobre a MMP-2 (PURICELLIA Et al., 2003; INGALE, HIVRALE, 2010).

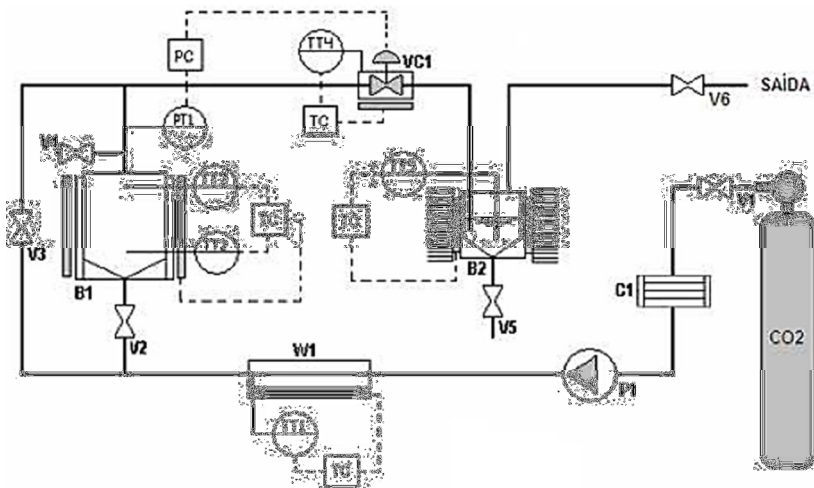
Portanto, a *P. edulis f. flavicarpa Degener* é uma fonte riquíssima de moléculas com atividades biológicas importantes, podendo ou não estar agindo em sinergismos. Com isso, a *P. edulis f. flavicarpa Degener* torna-se um alvo bastante interessante de estudos, abrindo assim um grande leque de possíveis rumos de estudos farmacológicos, em especial o estudo como antitumoral.

1.9 Extração com o fluido supercrítico

As atividades industriais geram uma grande variedade de subprodutos e resíduos. Com isso, o desenvolvimento de novas tecnologias e novos usos para estes materiais tem sido investigado a fim de reduzir seu impacto ambiental e recuperar componentes que possam agregar alto valor aos produtos. Neste contexto, uma das técnicas que pode ser utilizada é a extração com o fluido supercrítico (ESC), que vem ganhando interesse na academia, refletindo na grande quantidade de artigos científicos publicados nos últimos anos. Além disso, as aplicações industriais de ESC têm experimentado um forte desenvolvimento, desde o início de 1990, em termos de patentes

(HERRERO Et al., 2009). A figura 10 representa um diagrama esquemático do processo e equipamento de ESC.

Figura 10. Diagrama esquemático do equipamento e processo de extração supercrítica.



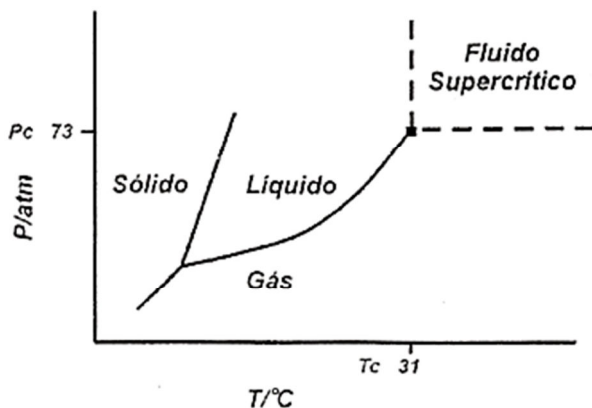
Nota: Onde C1: Condensador; P1: Bomba de alta pressão; W1: Pré-aquecedor; B1: Vaso de extração; B2: Vaso de separação; VC1: Válvula de expansão micrométrica; TC: Controlador de temperatura; V1 a V6: Válvulas; Fonte: CASSEL Et al., 2010.

A ESC tem sido muito utilizada para extrair compostos bioativos a partir de plantas. Para estudos fitoquímicos a ESC tem sido normalmente associada a outras técnicas, tais como a cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a fim de caracterizar os compostos responsáveis pela atividade funcional específica (HERRERO Et al., 2009).

A ESC utiliza o dióxido de carbono (CO₂) como o principal solvente de extração que nas condições críticas (30,9°C e 73,8bar) se transforma num fluido supercrítico (Figura 11). O CO₂ é barato, pouco nocivo ao ambiente e geralmente reconhecido como seguro pela FDA (*Food and Drug Administration*) e pela EFSA (*European Food Safety Authority*); e tendo como vantagem a sua alta difusividade combinada com sua eficácia de arraste, de acordo com a pressão, temperatura,

possibilitando a recuperação de analítos mais simples e sem contaminação por solventes orgânicos (HERRERO Et al., 2009).

Figura 11. Diagrama pressão/temperatura e os equilíbrios entre os estados sólido, líquido e gasoso. Definição de região supercrítica para o CO₂.



Nota: Onde **Tc**: Temperatura crítica; **Pc**: pressão crítica. **Fonte:** CARRILHO, TAVARES, LANÇAS, 2001.

Tabela 3. Propriedades físicas de gás, líquido e fluido supercrítico.

| Propriedade | Densidade (ρ) g/mL | Difusibilidade (D) cm ² /sec. | Viscosidade (η) Poise |
|---------------------|---------------------------------|--|------------------------------------|
| Gás | $10^{-4}/10^{-3}$ | $10^{-2}/1$ | $\cong 10^{-4}$ |
| Líquido | $\cong 1$ | $< 10^{-5}$ | 10^{-2} |
| Fluido supercrítico | 0,2/0,9 | $10^{-4}/10^{-3}$ | $10^{-4}/10^{-3}$ |

Fonte: CARRILHO, TAVARES, LANÇAS, 2001.

Segundo a Tabela 3, o fluido supercrítico apresenta: i) Densidade maior que a dos gases e muito próxima a dos líquidos; ii) Viscosidade muito similar a dos gases; e iii) Coeficientes de difusão dos solutos maiores que nos líquidos e menores que nos gases. Com isso, a transferência de massa é mais rápida em fluido supercrítico, culminando numa maior eficiência de arraste por unidade de tempo, velocidade linear ótima mais rápida e tempos de análises menores. Ou seja, a extração com o fluido supercrítico proporciona extrações mais rápidas e

com maiores rendimentos para certos compostos em comparação a extrações convencionais que utilizam como fases móveis os líquidos (CARRILHO, TAVARES, LANÇAS, 2001; HERRERO Et al., 2009).

Além disso, a ESC por utilizar baixas temperaturas e um meio de extração não oxidante (CO₂) permite a extração de compostos termicamente lábeis e/ou facilmente oxidados, evitando assim a degradação dos mesmos (HERRERO Et al., 2009).

Contudo, a principal desvantagem da extração com o fluido supercrítico é a sua baixa capacidade de extração de produtos com maior polaridade, podendo ser superado pela utilização de pequenas quantidades de modificadores de polaridade orgânicos (co-solventes) alterando a polaridade do fluido supercrítico e aumentando o seu poder de solvatação para obter o analito de interesse. Por exemplo, a adição de etanol (1-10%), expande a gama de extração, incluindo analitos mais polares (MORAES, VILEGAS, LANÇAS, 1997; HERRERO Et al., 2009; MICIE Et al., 2011).

Por outro lado, a ESC pode ser uma alternativa valiosa para as técnicas de extração convencionais, tendo em consideração todas as vantagens apresentadas pela própria técnica, principalmente a alta seletividade e pureza, além da economia de tempo e de solventes e a possibilidade da análise de pequenas quantidades de material vegetal (MORAES, VILEGAS, LANÇAS, 1997; MICIE Et al., 2011).

A ESC tem sido amplamente utilizada para o reaproveitamento de subprodutos da indústria agroalimentar. Estes subprodutos são produzidos durante o processamento de alimentos e, normalmente, não têm qualquer valor comercial. A extração a partir desses subprodutos permite a remoção de compostos valiosos e de interesse que, de outro modo, não poderiam ser utilizados. É o caso do maracujá, que embora seja normalmente consumido com as sementes, estas são descartadas durante o processamento industrial do fruto para a produção de suco. Desta forma, a extração de compostos de interesse pode apresentar vantagens no sentido de recuperar produtos com atividade farmacológica importante, e pode ser uma forma eficiente de utilização das sementes desperdiçadas durante a produção de suco de maracujá (HERRERO Et al., 2009; MATSUI Et al., 2010).

Assim, futuramente, compostos isolados da *P. edulis f. flavicarpa* Degener poderão ser utilizadas como moléculas protótipos para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos clinicamente úteis, convertendo-se, deste modo, em mais uma alternativa aos fármacos consagrados já existentes no tratamento do câncer, diminuindo

os efeitos adversos associados à elevada toxicidade e inespecificidade, além da resistência à quimioterapia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar comparativamente o potencial citotóxico, antiproliferativo, antitumoral e antiangiogênico dos extratos hidroalcoólico e supercrítico de *P. edulis f. flavicarpa* Degener, oriundos de resíduos da indústria de alimentos, utilizando para isso modelos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos extratos hidroalcoólico e supercrítico de *P. edulis f. flavicarpa* Degener, sobre a linhagem celular MCF-7, selecionando os mais citotóxicos;
- Avaliar a interação entre os extratos hidroalcoólico e supercrítico de *P. edulis f. flavicarpa* Degener com o DNA de timo de vitelo (CT-DNA);
- Avaliar a intercalação de fito-constituintes dos extratos hidroalcoólico e supercrítico de *P. edulis f. flavicarpa* Degener com o DNA de timo de vitelo (CT-DNA);
- Avaliar a atividade nucleásica dos extratos hidroalcoólico e supercrítico de *P. edulis f. flavicarpa* Degener sobre o DNA plasmidial;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* dos extratos hidroalcoólico e supercrítico de *P. edulis f. flavicarpa* Degener em camundongos Balb/C, inoculados com tumor ascítico de Ehrlich (TAE);
- Avaliar o tipo de morte celular induzida (apoptose/necrose) em células obtidas de camundongos tratados com os extratos hidroalcoólico e supercrítico de *P. edulis f. flavicarpa* Degener;
- Avaliar o efeito dos extratos hidroalcoólico e supercrítico de *P. edulis f. flavicarpa* Degener sobre o ciclo celular das células TAE obtidas dos camundongos tratados;
- Avaliar o efeito antiangiogênico *in vivo* dos extratos hidroalcoólico e supercrítico de *P. edulis f. flavicarpa* Degener.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

O meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o soro fetal bovino (FBS) e os antibióticos foram adquiridos da Gibco (EUA). O dimetilsulfóxido (DMSO), a agarose, o DNA de timo de vitela (CT-DNA), a albumina de soro bovino, o sal de tetrazólio (MTT) e o coquetel de inibidores de protease foram adquiridos do Sigma Aldrich (EUA). O kit de extração de plasmídeo - Perfectprep Mini Eppendorf foi adquirido da Eppendorf (Hamburgo, Alemanha). Todos os demais reagentes usados foram de grau analítico.

3.1 Preparação dos extratos

Os extratos hidroalcoólico e supercríticos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener foram produzidos e gentilmente cedidos pela equipe da Prof.^a Dra. Sandra R.S. Ferreira do Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC), situado no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico (CTC) da UFSC.

3.1.1 Extração convencional

As sementes da *P. edulis f. flavicarpa* Degener, fornecidas pela empresa Extrair Óleos Naturais, Rio de Janeiro, Brasil, foram moídas e submetidas à extração de óleo por prensagem, obtendo assim, a torta de sementes (subproduto). A torta de sementes da *P. edulis f. flavicarpa* Degener foi submetida à maceração a temperatura ambiente numa proporção de amostra-solvente 1:5, durante sete dias ao abrigo da luz (frasco de vidro âmbar), agitando-se o mesmo uma vez por dia. Como solvente foi utilizado uma mistura de etanol/H₂O (1/1, v/v). Após a extração, o sistema foi filtrado e o solvente evaporado utilizando-se um rotaevaporador sob pressão reduzida e 45°C de temperatura, obtendo-se assim o extrato bruto (extrato hidroalcoólico ou etanólico, EtOH) (OLIVEIRA et al 2013).

3.1.2 Extração supercrítica

Os extratos supercríticos da torta de sementes de *P. edulis f. flavicarpa* Degener foram obtidos pela técnica de extração com o fluido supercrítico (ESC). O equipamento utilizado foi previamente descrita por Zetzl Et al. 2003, enquanto que o procedimento metodológico utilizado na obtenção dos extratos ESC para o presente trabalho, propriamente dito, foi realizado segundo Michielin Et al. 2011.

O equipamento contém um reservatório de CO₂ pressurizado, um banho termostático (Microquímica -MQBTZ99-20, SC, Brasil) mantido a 5°C, uma bomba pistão alimentado por ar comprimido (Maximator M111, Alemanha), uma coluna de aço inoxidável revestida, com 2 centímetros de diâmetro interno, 32 centímetros de comprimento e 100cm³ de capacidade, com controle de temperatura de extração realizado por segundo banho termostático (Microquímica - MQBTZ99-20, SC, Brasil). A unidade de extração também contém válvulas, reguladores de fluxo e manômetros, para controle de fluxo. O processo utiliza o CO₂ 99,9% puro entregue na pressão desejada (White Martins, Brasil). O procedimento experimental consistiu na deposição de 20g da torta de sementes da *P. edulis f. flavicarpa* Degener, usadas para formar o leito fixo para a extração de alta pressão, em condições controladas de temperatura, pressão e taxa de fluxo de solvente. As condições de extração foram realizadas a 250 e 300 bar de pressão a 40°C de temperatura, com ou sem adição de co-solvente (etanol 5%), a uma taxa de fluxo constante de 0,5 kg CO₂/h em 3h de extração. Ressaltando-se que, o co-solvente foi evaporado utilizando um rotaevaporador sob pressão reduzida e 45°C de temperatura. As condições de extração supercrítico utilizadas neste presente trabalho foram previamente caracterizadas pela doutoranda Daniela A. de Oliveira orientada pela Prof.^a Dra. Sandra R.S. Ferreira e estão descritos no trabalho de tese intitulado: “Aplicação das tecnologias supercríticas e convencionais para o reaproveitamento dos resíduos do processamento de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)”. Os quarto extratos supercríticos da torta de sementes da *P. edulis f. flavicarpa* Degener obtidos, foram coletados em frascos âmbar e pesados em uma balança analítica para a obtenção de rendimentos de extração (OHAUS, AS200S Modelo, NJ, EUA). O procedimento foi repetido até se obter material suficiente para os ensaios biológicos (MICHIELIN Et al., 2009).

3.2 Caracterização fitoquímica dos extratos

Os extratos hidroalcoólico (EtOH) e supercrítico (ESC, 300bar/40°C/CO₂/5% etanol) da *P. edulis f. flavicarpa* Degener foram solubilizados em metanol P.A e submetidos à cromatografia de camada delgada (CCD) semi-preparativa, realizada no gel de sílica 60F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Alemanha), utilizando como fase móvel a solução de clorofórmio – metanol – hidróxido de amônia (10%) na proporção de 80:40:15, seguida de detecção UV (λ 365nm) sem tratamento químico (WAGNER, BLADT, 1996).

Seguidamente, o extrato supercrítico (ESC, 300bar/40°C/CO₂/5% etanol) da *P. edulis f. flavicarpa* Degener foi centrifugado (6 min a 16.10³ g), resultando em duas fases distintas, uma fase superior oleosa e uma inferior com aspecto de gel (fração sólida), que se subdividia em duas subfases. Posteriormente, utilizando-se o solvente n-hexano P.A aquecida foi realizado o ensaio de solubilidade com essas duas subfases, obtendo-se assim uma fase solúvel em n-hexano e outra insolúvel. Após a evaporação completa do n-hexano, alíquotas dessas frações obtidas foram dissolvidas em metanol P.A (MeOH) e submetidas à análise espectrofotométrica UV-Visível (Cirrus 80 ST, FENTO, São Paulo, Brasil). Por fim, as duas frações foram analisadas por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FIT-IR, PerkinEMLER, FT/NIR, Frontier). Os espectros obtidos foram comparados com dados da literatura.

3.3 Estudos Biológicos

3.4.1 Estudo da atividade antitumoral *in vitro*:

3.4.1.1 Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT

A atividade citotóxica foi avaliada por meio do ensaio de viabilidade celular pelo método de coloração de tetrazólio (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, MTT), de acordo com Mosmann (1983). Este método consiste na medida da redução do sal de tetrazólio (sal de coloração amarela) pelas redutases mitocondriais formando cristais violeta de formazan de cor violeta. Essa reação é realizada somente pelas células metabolicamente ativas. Desta forma, o ensaio do MTT atua como um indicador da função mitocondrial e, consequentemente, da viabilidade celular (FRESHNEY, 1999).

As células MCF-7 (linha celular de adenocarcinoma da mama humano, HERBERT SOULE Et al., 1973) obtidas a partir do banco de células de Rio de Janeiro, Brasil, foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de FBS, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL); e mantidas a 37°C na presença de 5% de CO₂ e 95% de humidade. As células foram semeadas (10⁴ células/poço) em placas de 96 poços. Após atingir a confluência, as células foram expostas á concentrações de 0, 10, 50, 100 e 500 µg/mL dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener dissolvidas no meio DMEM contendo 1% DMSO, por 72h. Em seguida, lavou-se duas vezes com PBS e incubou-se por 2h com MTT (0,5 mg/mL). Decorrido esse período, o MTT excedente foi removido e adicionou-se 100 µl/poço de DMSO para solubilizar os cristais de formazan. Após dissolução dos cristais, as placas foram avaliadas espectrofotometricamente com o auxílio de um Leitor de placas de ELISA automático (550nm), onde a densidade óptica (absorbância) observada era diretamente proporcional ao número de células vivas (MOSMANN, 1983).

Os resultados foram apresentados sob a forma de percentagem de viabilidade celular (percentual de redução do MTT), de acordo com a seguinte fórmula:

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

Consideraram-se os valores dos controles negativos, tratados apenas com o veículo de dissolução dos extratos (meio DMEM com 1% de DMSO), como sendo 100% de redução do sal de tetrazólio.

Os valores de CI₅₀ (concentração de inibição a 50%), foram determinados a partir do software GraphPad Prism (San Diego, EUA).

Para a avaliação citotóxica dos compostos isolados do extrato supercrítico da *P. edulis f. flavicarpa* Degener (ESC, 300bar/40°C/CO₂/5% etanol), foi realizado o mesmo ensaio descrito neste item, porém as células MCF-7 foram tratadas com os compostos por 24hs nas concentrações de 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 300 e 500 µg/mL.

3.4.1.2 Avaliação da interação com DNA de timo de vitelo (CT-DNA), por espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

O monitoramento da interação entre os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener com o DNA de timo de vitelo (CT-DNA), foi

realizado por meio da titulação espectrofotométrica de varredura UV-Visível, sendo utilizadas concentrações de CT-DNA previamente determinadas por espectrofotometria, concentrações estas que proporcionaram um sinal de boa qualidade com pico de absorção bem definido, 20 μ M de CT-DNA. Posteriormente, foram selecionados os extratos que apresentaram alguma alteração no espectro (10 e 50 μ g/mL) e os mesmos foram avaliados isoladamente, imediatamente após seu preparo. Com isso, foram determinadas as alterações na absorção das amostras, bem como o deslocamento do comprimento de onda de absorção máxima (NAVARRO Et al., 2003; BALDINI Et al., 2003; ZHANG Et al., 2004).

A extensão do hipocromismo das amostras lidas no comprimento de onda de 260nm foi calculada segundo a formula definida por Chen e colaboradores (2008):

$$H\% = 100\% \cdot (\text{Abs. DNA livre} - \text{Abs. DNA ligado}) / \text{Abs. DNA livre}$$

3.4.1.3 Avaliação da interação com DNA de timo de vitelo (CT-DNA), através da medida de fluorescência

Com intuito de definir se os extratos em estudo interagem com CT-DNA por intercalação, foi medido a fluorescência de soluções de brometo de etídio (EtBr, agente intercalante) e CT-DNA (20 μ M) diluído em tampão fosfato (50mM) contendo 0,1M de cloreto de sódio (NaCl, evitando uma segunda ligação do EtBr aos sítos do DNA), em pH = 7,4. O espectro de emissão do EtBr (5 à 50 μ M) foi determinado na presença e ausência de DNA, deste modo, verificando o ponto de saturação deste composto nos sítos de DNA (20 μ M de CT-DNA com 20 μ M de EtBr). Depois de estabelecida a concentração de EtBr, o estudo de fluorescência foi realizado com diferentes concentrações de extratos de *P. edulis f. flavicarpa Degener* (0, 10 e 50 μ g/mL). A fluorescência foi mensurada após 10 minutos á temperatura ambiente em um leitor de absorbância, luminescência e fluorescência (TECAN Infinity M200®), utilizando-se o comprimento de onda (λ) de excitação de 492nm e a fluorescência emitida, aproximadamente, de 620nm. Este ensaio foi adaptado da metodologia descrita por Silveira (2008).

De acordo com a clássica equação de extinção de fluorescência de Stern-Volmer, definido como:

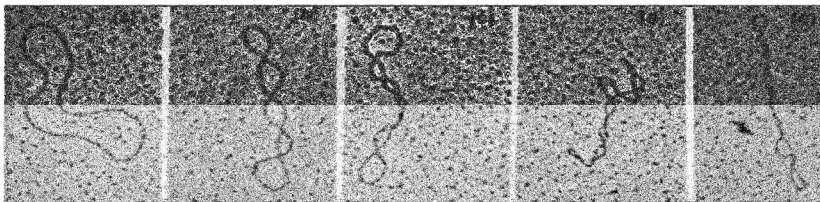
$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [E] = 1 + K_{SV} [E]$$

Avaliou-se a constante de extinção utilizada para determinar a eficiência de extinção de fluorescência, onde F_0/F : razão da intensidade de fluorescência na ausência do extintor (F_0) pela intensidade de fluorescência na presença do extintor (F); K_q : constante da taxa de extinção EtBr - DNA; τ_0 : Tempo de duração da fluorescência na ausência do extintor; $[E]$: concentração do extrato; K_{SV} : constante de extinção. No gráfico linear do F_0/F versus $[E]$, o valor K_{SV} é dada pela razão da inclinação da reta pela interceptação com o eixo X; e a K_q é calculada a partir $K_{SV} = K_q \tau_0$ (HELLER, GREENSTOCK, 1994, SUN et al, 2014).

3.4.1.4 Avaliação de dano direto ao DNA plasmidial

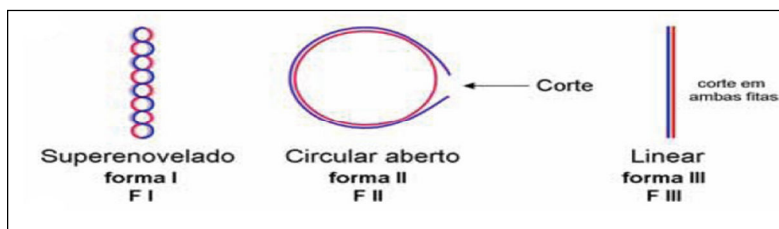
Além da estrutura secundária da dupla-hélice, o DNA assume uma conformação tridimensional denominada superenrolada ou superenovelada (Figura 12). A forma superenovelada ou normal (FI) do DNA plasmidial pode “adotar” a forma circular aberta (FII) e a forma linear (FIII), de acordo com o número de quebras sofridas. Quebras na dupla hélice fazem com que a forma superenovelada (original) transforma-se na forma circular aberta (através de quebras simples) e/ou na forma linear (através de quebra dupla de cadeia) (Figura 13). As diferentes formas da molécula de DNA plasmidial possuem mobilidade ou migração eletroforética diferenciadas, apresentando-se como bandas distintas em géis de eletroforese, o que possibilita a sua separação e quantificação (Figura 14) (SREDDHARA, COWAN, 2001).

Figura 12. Forma do DNA plasmidial superenovelada intacta (FI).



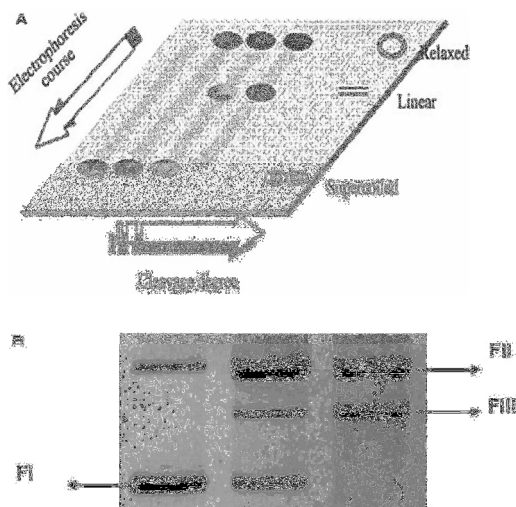
Fonte: SREDDHARA, COWAN, 2001.

Figura 13. As diferentes formas da molécula de DNA plasmidial.



Fonte: modificado de BERG Et al., 2008.

Figura 14. Ilustração da mobilidade eletroforética distintas das diferentes formas do DNA.



Fonte: MANCIN Et al., 2005.

Assim, a capacidade de indução de clivagem ao DNA plasmidial pelos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener, foi realizada através do ensaio de dano direto ao DNA plasmidial (DNA pBSK-II), extraído pelo método de lise alcalina, de acordo com as instruções da bula do kit de extração Perfectprep Plasmid Mini (Eppendorf); quantificada por espectrofotômetro UV (260nm), onde uma unidade de densidade ótica (260nm) corresponde a 50 µg/mL de DNA. O DNA plasmidial (412,5 ng), o tampão HEPES (pH 7,4) e os tratamentos (EtOH/ESC, 0, 10 e 50 µg/mL) foram incubados durante 16h a 37°C. Com o intuito de parar a reação, as amostras foram submetidas a um choque térmico (geladeira) por alguns minutos. Em seguida, foi realizada a eletroforese (40 V, durante 1h e 40 min), em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0,3 µg/mL), utilizando como tampão de corrida o TBE (89 Mm Tris Borato, 2 Mm EDTA). As bandas visualizadas foram fotografadas e analisadas pelo software ImageJ 1,46, comparando-se a intensidade das bandas e a quantidade de pixels apresentadas pelas diferentes formas de DNA. A intensidade das bandas foi corrigida por um fator de 1,47, como resultado de sua menor capacidade de corar com brometo de etídio. Como controle negativo foi utilizado uma solução de tampão HEPES e dimetilsulfóxido (DMSO 0,25%) e no controle positivo, a enzima de restrição EcoRI (SREDDHARA, COWAN, 2001; BISO, 2008).

3.4.2 Estudo da atividade antitumoral *in vivo*:

3.4.2.1 Modelo do tumor ascítico de Ehrlich

3.4.2.1.1 Protocolo experimental

Os ensaios *in vivo*, foram realizados utilizando camundongos isogênicos Balb/C (*Mus musculus*), machos (n = 12, 18-25 g), obtidos pela reprodução controlada pelo Biotério setorial do Laboratório de Bioquímica Experimental- LABIOEX. Os animais foram mantidos sobre condições ideais controladas (ciclo claro-escuro de 12h, 25 ± 2°C, aproximadamente 60% umidade do ar), recebendo ração comercial padrão e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos com animais foram realizados em conformidade com os requisitos legais adequados para a espécie (publicação do NIH nº 80-23, revisto em 1978) e com a autorização do Comitê de Ética local para o Uso de Animais (CEUA/UFSC PP00784).

O experimento propriamente dito foi organizado da seguinte forma: primeiramente, a fim de determinar a dose máxima tolerada (MTD), animais saudáveis foram tratados com os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener, avaliando, dessa forma, a ocorrência de morte, erexão dos pelos, comportamento agressivo, inatividade e a perda de apetite (KVICINSKI et al, 2011). A partir disso, duas doses foram escolhidas para dar seguimento aos experimentos, 10 e 200 mg/kg/dia de extrato diluído em salina e DMSO (10,0%).

Os animais foram inoculados com 0,2mL de células do TAE (linhagem celular murina derivada de carcinoma ascítico de Ehrlich, 5×10^6 células/mL) via intraperitoneal (dia zero). O tratamento com os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener, foi iniciado 24h após a inoculação das células tumorais, administrando-se soluções dos extratos nas doses citadas a cima, durante nove dias consecutivos. O grupo controle negativo (com tumor implantado) foi tratado somente com salina com 10,0% de DMSO, sendo mantidos nas mesmas condições experimentais dos animais tratados. No décimo dia, seis animais de cada grupo (aleatoriamente) foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical, retirando-se o líquido ascítico para a realização das posteriores análises. Os animais restantes de cada grupo foram mantidos pelo período de 30 dias para a avaliação da sobrevida em comparação ao grupo controle do tumor (grupo controle negativo).

3.4.2.1.2 Avaliações morfológicas

3.4.2.1.2.1 Variação de peso

A avaliação da variação de peso dos camundongos foi calculada a partir da diferença, em gramas, entre o peso final (após os nove dias de tratamento) e o peso inicial dos animais (dia zero, dia da inoculação do tumor). Os resultados obtidos foram expressos em gramas (KVICINSKI Et al., 2008).

3.4.2.1.2.2 Inibição do crescimento tumoral

A inibição do crescimento tumoral foi avaliada pela variação da circunferência abdominal dos camundongos, em centímetro, no qual se calculou à diferença entre a medida final (após os nove dias de tratamento) e a medida inicial (medida que os mesmos apresentavam no

dia da inoculação do tumor, dia 0) da circunferência abdominal, determinando, assim a regressão do tumor (KVICINSKI Et al., 2008). Os resultados obtidos foram expressos em percentual de inibição do crescimento tumoral, determinados segundo a seguinte fórmula:

Inibição do crescimento do tumor (%) = $100 - [(variação \text{ na circunferência abdominal do grupo tratado} \times 100) / variação \text{ da circunferência abdominal do grupo controle}]$.

3.4.2.1.2.3 Variação do volume total de líquido ascítico e de células compactadas

Todo o líquido ascítico foi retirado de cada animal e o volume (em mL) foi medido utilizando tubos falcons graduados. O volume das células compactadas (em mL) também foi anotado após a centrifugação a 1000g/5min (KVICINSKI Et al., 2008).

3.4.2.1.2.4 Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do corante Azul de Tripan

A atividade citotóxica *in vivo* foi avaliada pelo ensaio de viabilidade celular pelo método de exclusão do corante azul de tripan, um corante que só penetra em células mortas (inviáveis), cujas membranas são incapazes de excluí-lo. Este fenômeno permite estimar indiretamente o grau de integridade da membrana celular (FRESHNEY, 1999). Após a retirada do líquido ascítico dos animais, uma alíquota de 10µL do líquido ascítico foi incorporada a uma solução contendo 890µL de salina e 100µL do corante azul de tripan (0,4%). Em seguida, a viabilidade celular foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer, avaliado por microscópio de luz branca. O percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular, expressos na proporção de células inviáveis/viáveis (STROBER, 1996).

3.4.2.1.2.5 Avaliação da sobrevivência dos animais

A sobrevivência dos animais foi determinada pelo número de morte em cada grupo num período de 30 dias, a contar do primeiro dia de tratamento, usando para isto o método de Kaplan-Meier (GOEL, KHANNA, KISHORE, 2010).

3.4.2.1.3 Avaliação do tipo de morte celular *in vivo*

A detecção citológica do tipo de morte celular foi realizada através do método de coloração com Brometo de etídio/Laranja de acridina (EtBr /LA, agentes intercalantes), possibilitando a diferenciação das células viáveis (verde) daqueles em processo de morte por apoptose (laranja) ou necrose (vermelho intenso), tendo como base as alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticos. Após nove dias de tratamento, alíquotas do líquido ascítico dos animais foram coletadas, centrifugadas (10 min a 1000rpm) e ressuspensas em 500 μ L de PBS. Em seguida, 10 μ L da solução corante (1:1) de EtBr (100 μ g/mL) e LA(100 μ g/mL) foram adicionados à alíquotas de 25 μ L de soluções de células (10^6 células/mL). Alíquotas destas células coradas foram transferidas para lâminas e cobertas com lamínulas. Posteriormente, procedeu-se à leitura da fluorescência no microscópio Olympus (modelo BX41). Para cada amostra, 300 células foram contadas e fotografadas para registro visual. Os resultados foram expressos como percentagem de células viáveis, apoptóticas e necróticas (PARISOTTO et al, 2012, McGAHON Et al., 1995).

3.4.2.1.4 Avaliação do ciclo celular *in vivo*

A capacidade para interferir e/ou induzir a parada do ciclo celular dos extratos de *P. edulis f. flavicarpa* Degener foi analisada por citometria de fluxo, em que a intensidade de fluorescência é diretamente proporcional ao conteúdo de DNA das células em cada fase do ciclo celular (G0, G1, S, GII / M) (DE NEIRA, 2003).

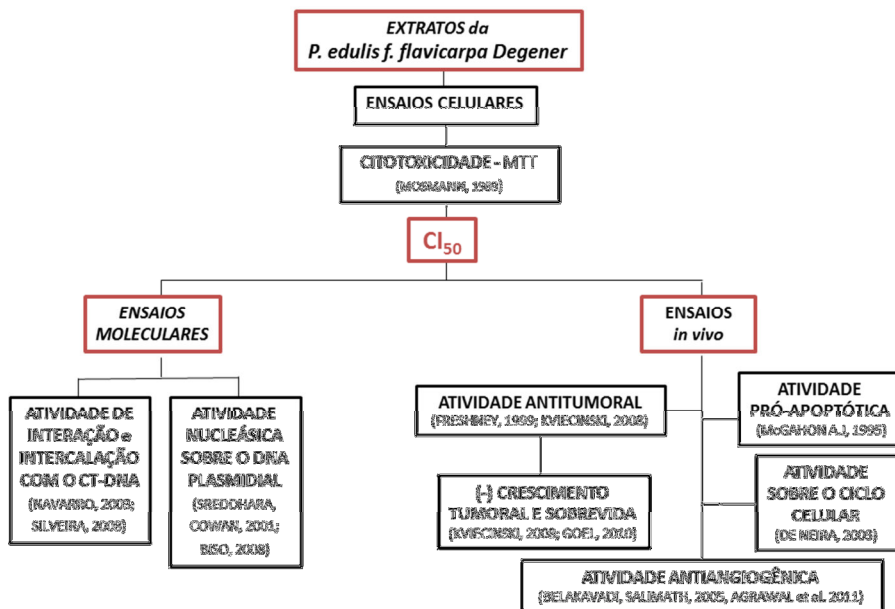
As células do fluido ascítico dos animais tratados com os extratos (10, 100 e 200 mg/kg/dia) durante 9 dias, foram coletadas, lavadas com solução salina e centrifugadas (10 min a 1000rpm). A seguir, as células foram fixadas durante a noite em 200 mL de etanol (70%) a -20 °C, para aumentar a permeabilidade da membrana celular ao iodeto de propídio (PI), um fluorocromo que interage com DNA por intercalação nas duplas hélices. No dia seguinte, as amostras foram lavadas (2x) para a retirada do excesso de etanol e as células foram incubadas com a solução de PI/RNAase durante 15 minutos sob temperatura ambiente no escuro, antes de serem analisadas por citometria de fluxo. A solução de PI contém RNAase no intuito de catalisar a degradação do RNA das

células tumorais, prevenindo assim que o RNA seja marcado e interfira no resultado do ensaio. O citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Biosciences) foi utilizado para a mensuração da fluorescência e o percentual de células em cada fase do ciclo celular. O resultado do número de células versus fluorescência e a área sob os picos foram analisados e calculados pelo software de fluxo 2.5.0 (DE NEIRA, 2003).

3.4.2.1.5 Avaliação da atividade antiangiogênica *in vivo*

A atividade angiointerferente ou antiangiogênica *in vivo* foi realizada utilizando os animais inoculados com as células de TAE e tratados com os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener, durante nove dias consecutivos. Os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina (15 mg/kg) e cetamina (90 mg/kg) administrado via intraperitoneal (ip.) e sacrificados para o estudo da atividade angiointerferente dos extratos. A área e a densidade dos microvasos do tumor na região subcutânea do peritônio dos animais foram fotografadas e quantificadas usando o software Image J. Os resultados foram expressos como percentual de inibição da angiogênese em relação ao grupo controle negativo (tratado somente com salina com 10,0% DMSO) (BELAKAVADI, SALIMATH, 2005, AGRAWAL Et al. 2011).

Figura 15. Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial citotóxico, antiproliferativo, antitumoral e antiangiogênico dos extratos hidroalcoólico e supercrítico de *P. edulis f. flavicarpa* Degener.



3.5 Análises estatísticas

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada pelo método de análise de variância *one-way* ANOVA complementada pelo teste de Bonferroni ou Tukey-Kramer, quando apropriado, admitindo-se um nível de significância de, no mínimo, $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Ensaio *in vitro*:

4.1.1 Efeito citotóxico dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener

Previamente a este presente estudo, a doutoranda Daniela A. de Oliveira pertencente ao laboratório LATESC realizou um estudo profundo utilizando a *P. edulis f. flavicarpa* Degener, o qual apresentava como foco principal a escolha das melhores condições supercríticas e convencionais para o reaproveitamento dos resíduos do processamento da espécie em questão. Portanto, a partir deste estudo foram selecionados cinco extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener para dar continuidade aos estudos, neste caso com o foco na atividade biológica (antitumoral) apresentada por tais extratos.

Um dos parâmetros utilizados para indicar quantitativamente a eficiência do processo de extração é o rendimento global (X_0), o qual é definido como a quantidade de soluto extraído por meio de solventes nas condições de extração estabelecidas (OLIVEIRA, 2013).

Segundo Oliveira (2015), o extrato bruto obtido a partir da maceração com etanol/H₂O (1:1) (extrato hidroalcoólico) apresentou um rendimento global igual a 6,0%. Enquanto que as extrações supercríticas obtidas em diferentes condições de pressão (250 e 300bar) a uma temperatura fixa (40°C) com e sem adição de co-solvente (etanol 5%) alcançaram um rendimento global menor. Os extratos supercríticos obtidos nas condições de 250bar/40°C/CO₂, 300bar/40°C/CO₂, 250bar/40°C/CO₂/5%etanol e 300bar/40°C/CO₂/5% etanol apresentaram um rendimento global igual a 4,40%, 4,60%, 4,90% e 4,93%, respectivamente. Desta forma, é possível verificar uma diferença na quantidade de soluto extraído pela extração supercrítica em comparação a extração convencional (maceração).

Comparando as extrações supercríticas, com e sem co-solvente (etanol 5%) adicionado, é possível observar a ocorrência de um ligeiro aumento no rendimento global obtido, possivelmente devido ao aumento na extração de compostos mais polares (DE OLIVEIRA Et al., 2010; MORAES, 1997).

A adição de co-solvente (5% etanol) proporcionou uma melhoria na citotoxicidade dos extratos. Os extratos (4) e (5) apresentaram um CI₅₀ de 320,63±1,15 e 291,07±16,15µg/mL,

respectivamente, enquanto que os extratos (1), (2) e (3) apresentaram um $CI_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 4).

Em relação ao CI_{50} , quando se compara o extrato (4) com o extrato (5) ocorreu uma diferença estatística significativa entre eles, enquanto que em termos do rendimento global não apresentaram diferença estatística. Portanto, como o extrato (5) demonstrou ter um efeito citotóxico mais eficiente sobre as células de MCF-7 este foi o escolhido para dar seguimento aos ensaios subsequentes.

Assim, as análises posteriores para o estudo da atividade antitumoral da *P. edulis f. flavicarpa* Degener, foram realizadas através do estudo comparativo entre o extrato bruto (extrato hidroalcoólico) e o extrato supercrítico (300bar/40°C/CO₂/5% etanol) da torta de sementes da *P. edulis f. flavicarpa* Degener, denominadas simplesmente como EtOH e ESC.

Tabela 4. Citotoxicidade dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener (10 a 500 $\mu\text{g/mL}$) contra as células MCF-7, após 72h de incubação.

| | CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|--|-----------------------------------|
| EtOH (1) | > 500 |
| ESC (250bar/40°C/CO ₂) (2) | > 500 |
| ESC (300bar/40°C/CO ₂) (3) | > 500 |
| ESC (250bar/40°C/CO ₂ /5% etanol) (4) | 320,63 ± 1,15 *** |
| ESC (300bar/40°C/CO ₂ /5% etanol) (5) | 291,07 ± 16,15 *** |

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média ± Desvio Padrão dos valores de CI_{50} dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener. (***) Representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os extratos (4) e (5). EtOH: Extrato hidroalcoólico; ESC: Extrato supercrítico.

4.1.1.1 Correlação entre a caracterização fitoquímica dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener e a citotoxicidade

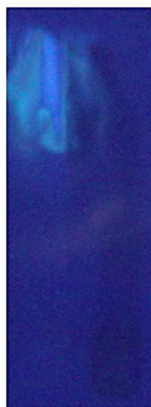
A fim de caracterizar os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener, foi realizada uma etapa preliminar utilizando a cromatografia em camada delgada (CCD) com revelação sob a luz UV no comprimento de onda de 365nm, com o intuito de verificar a presença

de compostos fluorescentes, alcaloides β -carbólicos (alcaloides harmônicos), tais como harmana e harmina.

Segundo Rodrigues (2013), os alcaloides harmônicos são caracterizados por apresentarem uma forte fluorescência sob a luz UV, sendo assim, podem ser detectados e identificados pelo surgimento de manchas fluorescentes de cor azul arroxeadada.

A análise preliminar por CCD indicou a presença de compostos fluorescentes (manchas fluorescentes de cor azul arroxeadada) somente na amostra referente ao extrato ESC, o que é indicativo da presença de alcaloides harmônicos. Enquanto, que a amostra do extrato EtOH foi negativa para a presença de tais compostos (Figura 16).

Figura 16. Cromatografia de camada delgada dos extratos EtOH e ESC da *P. edulis f. flavicarpa* Degener, detecção UV (nm) sem tratamento químico.



ESC EtOH

Nota: Onde ESC: Extrato supercrítico (300bar/40°C/CO₂/5% etanol); EtOH: Extrato hidroalcolóico.

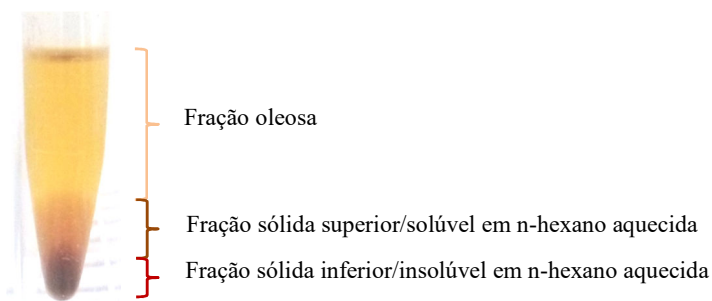
Com isso, deu-se continuidade ao experimento utilizado somente o extrato ESC (300bar/40°C/CO₂/5% etanol). Após a centrifugação, o extrato ESC apresentou duas principais frações, uma oleosa e outra sólida. A fração sólida por sua vez se subdividia em duas subfases (fração sólida superior e fração sólida inferior) (Figura 17).

Segundos dados da literatura, os alcaloides β -carbólicos harmina e harmana apresentam algumas propriedades físico-químicas distintas. O alcaloide harmana apresenta uma densidade igual a 1,252 g/cm³ e o alcaloide harmina igual a 1,35 g/cm³. Adicionalmente, esses

dois alcaloides β -carbolínicos também apresentam diferenças em relação à solubilidade. O alcaloide harmana é solúvel em n-hexano aquecida, enquanto que o alcaloide harmina é insolúvel (VOGEL, 1983; WAGNER, BLADT, 1996).

Tais dados corroboram com os resultados obtidos durante o estudo fitoquímico, pois a fração sólida superior apresentou-se solúvel em n-hexano aquecida, enquanto que a fração sólida inferior apresentou-se insolúvel em n-hexano aquecida, o que sugere que a fração sólida superior é constituída pelo alcaloide harmana e a fração sólida inferior é constituída pelo alcaloide harmina (Figura 17).

Figura 17. Ilustração das frações obtidas após o extrato supercrítico da *P. edulis f. flavicarpa Degener* (ESC, 300bar/40°C/CO₂/5%etanol) ser submetido à centrifugação.

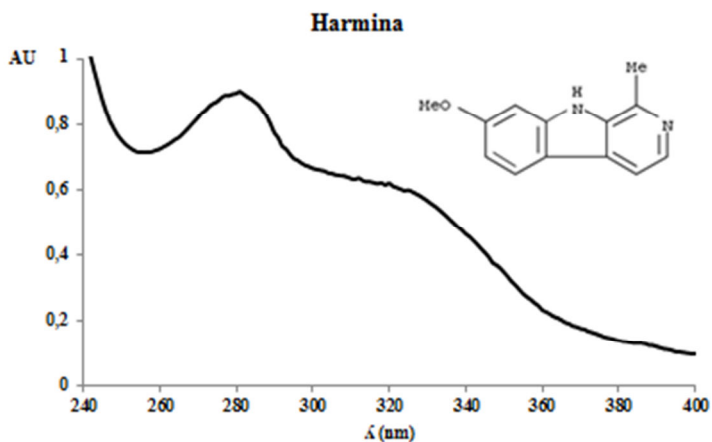


Após a evaporação completa do n-hexano as duas subfases da fração sólida foram ressuspensas em metanol P.A. e submetidas à análise espectrofotométrica UV-Visível (Figura 18). Os espectros de absorvância obtidos foram comparados com dados da literatura.

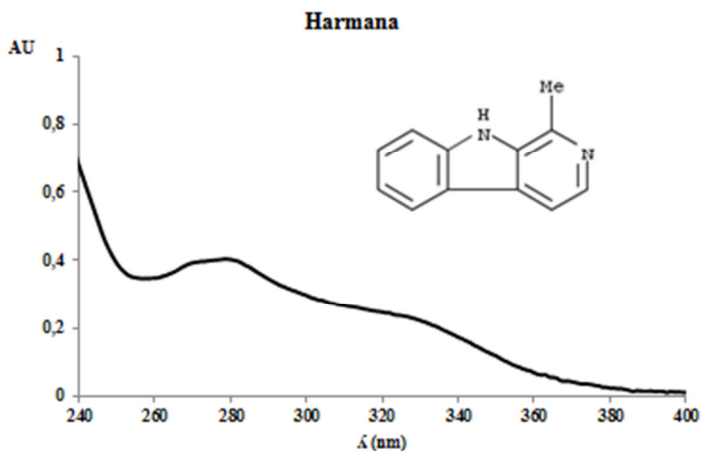
A análise espectrofotométrica UV-Visível confirmou a presença de alcaloides β -carbolínicos, obtendo-se dois alcaloides harmânicos, identificados com sendo os alcaloides harmina (insolúvel n-hexano aquecida) e harmana (solúvel em n-hexano aquecida) Os picos de máxima absorção foram registrados no $\lambda_{\text{máx}}$: 268, 279, 322 para harmana e 281, 320, 325 para harmina (Figura 18).

Figura 18. Análise espectrofotométrica UV-Visível dos compostos isolados do extrato supercrítico da *P. edulis f. flavicarpa Degener* (ESC, 300bar/40°C/CO₂/5%etanol), (A) harmina e (B) harmana.

A)



B)



Por fim, com o objetivo de melhor caracterizar os alcaloides β -carbolínicos harmina e harmana isolados a partir da fração sólido do extrato ESC (300bar/40°C/CO₂/5% etanol), estes foram submetidos à

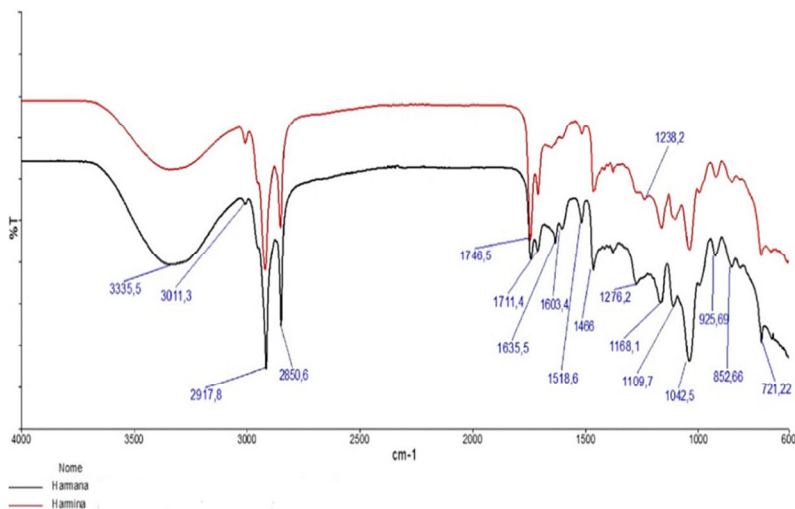
espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FIT-IR).

Conforme descrito na Tabela 2, os alcaloides β -carbolínicos harmina e harmana apresentam uma grande similaridade em termos de estrutura química devido a estes apresentarem o mesmo núcleo indólico. A única diferença estrutural entre estes dois alcaloides β -carbolínicos é a presença de um grupo metóxi ou metoxilo ($-\text{O}-\text{CH}_3$ ou OCH_3) no alcaloide harmina (ZERAİK Et al., 2010. PEREIRA, RODRIGUE, YARIWAKE, 2014).

Os alcaloides β -carbolínicos harmina e harmana exibiram um perfil de espectros de absorção no infravermelho bastante similar (Figura 19). Contudo, no espectro do alcaloide harmina foi observada uma banda em $1238,2 \text{ cm}^{-1}$, correspondente ao estiramento assimétrico C–O–C do grupo metóxi (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2005). No espectro do alcaloide harmana não foi observado tal banda. Este resultado está em concordância com os dados da literatura referentes aos alcaloides harmina e harmana, sugerindo assim a presença de tais alcaloides no extrato ESC da *P. edulis f. flavicarpa* Degener (ZERAİK Et al., 2010. PEREIRA, RODRIGUE, YARIWAKE, 2014)

Desta forma, avaliando os resultados referentes à densidade, solubilidade, espectroscopia UV- Visível e espectroscopia de absorção no infravermelho é possível sugerir que os dois compostos isolados a partir da fração sólido do extrato ESC da *P. edulis f. flavicarpa* Degener foram os alcaloides β -carbolínicos harmina e harmana.

Figura 19. Espectros de absorção no infravermelho dos alcaloides β -carbolínicos harmina e harmana isolados do extrato supercrítico da *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener (ESC, 300bar/40°C/CO₂/5%etanol).



Nota: Onde T: Transmitância.

A fim de averiguar se estes dois alcaloides harmânicos (harmina e harmana) são os possíveis responsáveis pela atividade antitumoral do extrato ESC ser mais eficaz que o extrato EtOH foi realizado o ensaio de redução do MTT, utilizando as células de MCF-7 incubadas por 24h com ambos os alcaloides (Tabela 5).

Ao analisar os resultados do rendimento do processo de isolamento dos dois alcaloides com a citotoxicidade dos mesmos sobre as células de MCF-7, observou-se que o alcaloide harmina, mesmo apresentando um rendimento menor, igual a 6,84%, exibiu uma citotoxicidade maior do que o alcaloide harmana, que apresentou um rendimento igual a 93,16% obtidos a partir de 67,2mg de alcaloides β -carbolínicos totais isolados do ECS. Visto que, o alcaloide harmina apresentou um valor de CI_{50} igual a $74,99 \pm 12,53 \mu\text{g/mL}$, enquanto que o alcaloide harmana obteve um $CI_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$, em 24hs de tratamento.

Este resultado nos sugere que o alcaloide harmina seja possivelmente o responsável pelo efeito antitumoral do extrato ESC ser mais pronunciado que o extrato EtOH.

Tabela 5. Rendimento do procedimento de isolamento de compostos a partir da fração sólida do extrato supercrítico da *P. edulis f. flavicarpa* Degener (ESC, 300bar/40°C/CO₂/5% etanol) versus citotoxicidade contra as células MCF-7, após 24h de incubação (1,0 a 500 µg/mL).

| | Rendimento dos isolados (%) | CI₅₀ (µg/mL) |
|---------|------------------------------------|--------------------------------|
| Harmana | 93,16 | > 500 |
| Harmina | 6,84 | 74,99±12,53*** |

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média ± Desvio Padrão dos valores de CI₅₀ dos alcaloides harmina e harmana. (***) Representam diferença estatisticamente significativa (p<0,001) entre eles.

4.1.2 Interação do CT-DNA com os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener

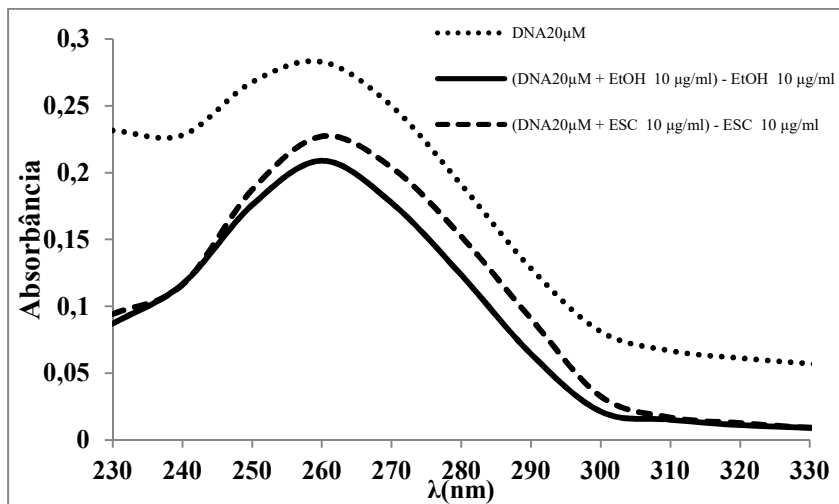
Atualmente, na prática clínica, o DNA é um dos mais importantes potenciais alvos terapêuticos anticancerígenos (CHEN et al, 2011), levando isto em consideração, foi avaliada a capacidade de extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener em interagir com o DNA e consequentemente causar dano ao mesmo.

Com isso, a interação DNA-extrato foi monitorizada ao longo do espectro de UV-visível determinando assim as alterações na absorbância e deslocamento do comprimento de onda máximo de absorção. Pode-se ressaltar que qualquer variação espectral referente aos extratos e o CT-DNA supostamente viria da interação do extrato com o CT-DNA (KELLY Et al., 1985).

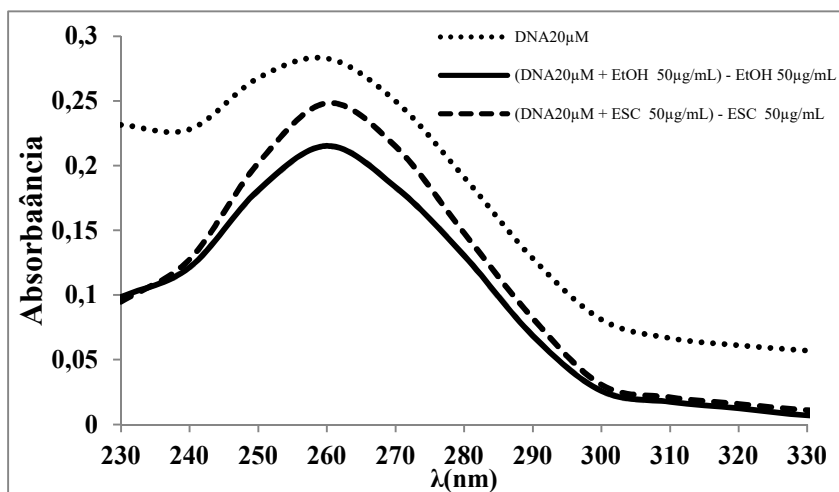
Os espectros de varredura eletrônica UV-visível de ambos os extratos nas concentrações de 10 e 50 µg/mL com o CT-DNA (20µM) (Figura 20) revelaram uma redução da absorvidade (hipocromismo) dos mesmos, o que sugere a presença de compostos em ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener capazes de interagir com o DNA.

Figura 20. A capacidade de interação entre CT-DNA e EtOH ou ESC nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ (A) e 50 $\mu\text{g/mL}$ (B), avaliada por espectrofotometria de UV-Visível.

A)



B)



Nota: Onde DNA: DNA de timo de vitela; EtOH: Extrato hidroalcoólico; ESC: Extrato supercrítico (300bar/40°C/CO₂/5% etanol).

A extensão da hipocromismo (H%) das bandas dos extratos EtOH e ESC (50 µg/mL) no comprimento de onda de 260nm, atingiu 23,91% e 12,23%, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Extensão de hipocromismo obtido a partir da interação entre CT-DNA e os extratos de *P. edulis f. flavicarpa Degener* na concentração de 50 µg/mL.

| Hipocromismo (H %) | |
|---------------------------|-------|
| EtOH | 23,91 |
| ESC | 12,23 |

Nota: Onde EtOH: Extrato hidroalcoólico; ESC: Extrato supercrítico (300bar/40°C/CO2/5% etanol).

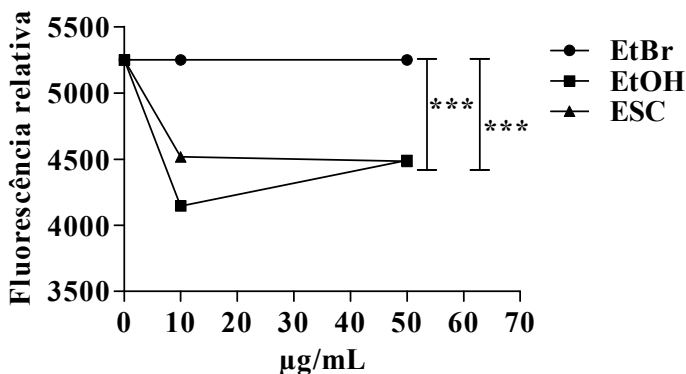
4.1.3 Interação por intercalação dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa Degener* com o CT-DNA

A fim de descobrir como os compostos presente em ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa Degener* interagem com o DNA, foi realizado o ensaio de intercalação com EtBr (agente intercalante) e CT-DNA.

Sabe-se que as substâncias capazes de se intercalarem ao DNA causam uma redução da quantidade de EtBr ligado ao DNA, com respectiva diminuição na intensidade de fluorescência da amostra (SREEDHARA, COWAN, 2001).

Ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa Degener* tiveram a capacidade de diminuir a intensidade de fluorescência das amostras (Figura 21).

Figura 21. A capacidade de intercalação de EtOH e ESC (10 e 50 µg/mL) no CT-DNA, por meio de medições de fluorescência.



Nota: Onde (***) Representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em comparação com o grupo de controle negativo (CN). CT-DNA: DNA de timo de vitela, CN: solução de salina; EtOH: Extrato hidroalcoólico; ESC: Extrato supercrítico (300bar/40°C/CO₂/5%etanol); EtBr: Brometo de etídio.

Na concentração de 50µg/mL, os extratos EtOH e ESC causaram a diminuição da intensidade de fluorescência em 14,50% e 14,60%, respectivamente, não apresentando diferença estatística entre eles.

Os resultados acima referidos estão em concordância com os resultados obtidos através das constantes de extinção da fluorescência das amostras (Tabela 7), a constante de extinção (K_{vs}) e a constante da taxa de extinção EtBr-DNA (K_q).

O extrato EtOH apresentou K_{vs} igual a $1,58 \times 10^{-3}$ e o K_q igual a $6,86 \times 10^{-5}$, enquanto que o extrato ESC obteve $1,51 \times 10^{-3}$ da K_{vs} e $6,57 \times 10^{-5}$ da K_q , não apresentando diferença estatística entre eles.

Assim, é possível propor a presença de compostos em ambos os extratos capazes de se ligarem ao DNA por intercalação e, conseqüentemente, causar a clivagem do DNA.

Tabela 7. Parâmetros obtidos a partir da interação entre CT-DNA e os extratos de *P. edulis f. flavicarpa* Degener na concentração de 50 µg/mL.

| Parâmetros | EtOH | ESC |
|---------------------------------|-------|-------|
| Diminuição da fluorescência (%) | 14,50 | 14,60 |
| K_{sv} (10^{-3} µg/mL) | 1,58 | 1,51 |
| K_q (10^{-5} µg/mL/s) | 6,86 | 6,57 |

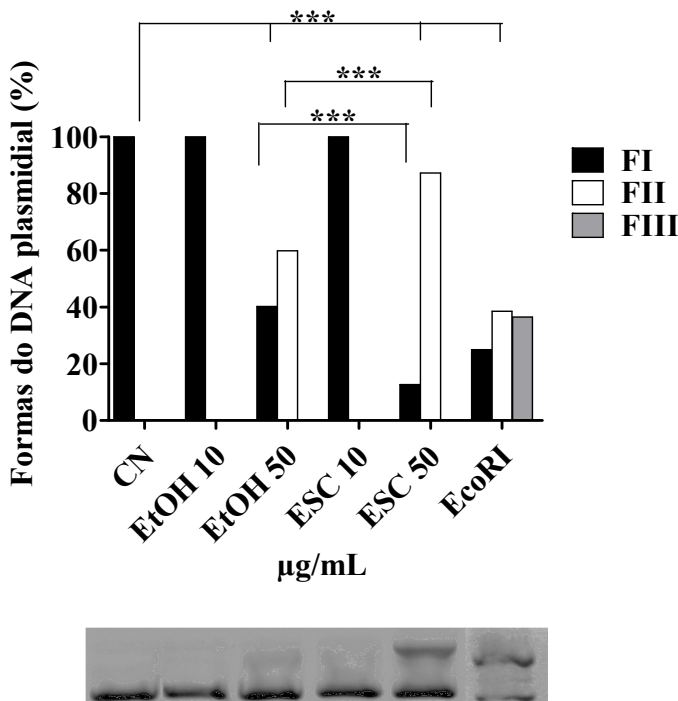
Nota: Onde K_{sv} : constante de extinção; K_q : constante da taxa de extinção EtBr-DNA; EtOH: Extrato hidroalcoólico; ESC: Extrato supercrítico (300bar/40°C/CO₂/5%etanol).

4.1.4 Potencial indução de danos diretos sobre o DNA plasmidial

Após verificar a presença de possíveis compostos capazes de se ligarem com o DNA por intercalação, foi investigada a capacidade dos extratos de *P. edulis f. flavicarpa* Degener em causarem danos diretos ao DNA plasmidial, promovendo a fragmentação ou clivagem do mesmo. E sendo que as diferentes formas existentes do DNA plasmidial possuem mobilidade/migração eletroforética distintas umas das outras, foi possível a separação e identificação das mesmas em géis de eletroforese (SREDDHARA, COWAN, 2001).

O aparecimento de bandas referente à forma circular aberta de DNA ($FII_{EtOH50\mu g/mL} = 59,81\%$; $FII_{SFE50\mu g/mL} = 87,30\%$) (Figura 22) causada por quebras de cadeias simples do DNA demonstra que ambos os extratos apresentam atividade nucleásica. No entanto, ao se comparar os dois extratos, o ESC demonstrou ter uma atividade nucleásica maior que o extrato EtOH, pois o ESC proporcionou um aumento de 29,5% a mais da forma circular aberta de DNA em comparação com extrato EtOH.

Figura 22. Avaliação da atividade nucleásica do EtOH e ESC (10 e 50 µg/mL) pelo método de ensaio de danos direto ao DNA plasmidial.



Nota: Onde (***) Representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em comparação com o grupo de controle negativo (CN) e/ou um extrato em relação ao outro. CN: tampão HEPES (DMSO 0,25%); EcoRI: enzima de restrição EcoRI; FI: forma superenovelada intacta; FII: forma circular aberta (quebra de cadeia simples); FIII: forma linear (quebra da fita dupla); CT-DNA: DNA de timo de vitela; EtOH: Extrato hidroalcoólico; ESC: Extrato supercrítico (300bar/40°C/CO₂/5% etanol).

Fato interessante, é que ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener na concentração de 10 µg/mL não tiveram a capacidade de causarem clivagem do DNA, pois o DNA plasmidial permaneceu 100% sob a forma superenovelada intacta (FI) (Figura 22).

Correlacionando estes resultados com os obtidos a partir do ensaio de intercalação com EtBr pode-se observar que na concentração

de 10 µg/mL, mesmo que os compostos presentes em ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener intercalem com o DNA, nesta concentração são incapazes de provocar a clivagem do DNA. O que indica fortemente que a atividade nucleásica apresentada pelos dois extratos é concentração dependente.

A enzima de restrição EcoRI foi utilizada como controle positivo, causando 36,50% de quebras de cadeia simples de DNA, que resulta no surgimento da forma circular aberta (FII) e 38,50% de quebras de cadeia dupla, que resulta no surgimento da forma linear (FIII). Enquanto o controle negativo (somente o veículo da reação) apresentou-se 100% na forma superenovelada intacta (FI).

4.2 Ensaios *in vivo*:

4.2.1 Efeito dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener sobre os parâmetros morfológicos

Para validar a atividade antitumoral demonstrada *in vitro*, foram realizados ensaios *in vivo*, utilizando o modelo experimental do TAE, caracterizado por ser um carcinoma agressivo, que cresce rapidamente e têm sido amplamente citado na literatura para investigação de propriedades antitumorais de vários possíveis novos candidatos de agentes terapêuticos (FARIAS, 2012).

Após a inoculação de células do TAE nos camundongos ocorre rapidamente o desenvolvimento da ascite abdominal, o que leva ao aumento exagerado de peso no animal portador do tumor e da circunferência abdominal.

Avaliando-se a variação do peso dos animais, antes da inoculação das células do TAE e no final do tratamento com os extratos EtOH e ESC nas concentrações de 10 e 200 mg/kg/dia observou-se uma redução do peso dos animais, quando estes foram comparados com os animais do grupo controle negativo, os quais foram tratados somente com solução salina (DMSO 10,0%) (Tabela 8).

Tabela 8. Efeito dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener sob os parâmetros morfológicos dos animais inoculados com as células do TAE.

| Tratamentos | Variação do peso corporal (g) | Volume de líquido ascítico (mL) | Volume de células compactadas (mL) | Proporção de células inviáveis/células viáveis |
|--------------------|--------------------------------------|--|---|---|
| CN salina | 11,42±2,6 | 10,90±1,9 | 2,20±0,5 | 0,010± 0,01 |
| EtOH 10 | 10,21±2,0 | 7,17±1,4** | 3,17±0,9 | 0,008±0,01 |
| EtOH 200 | 6,71±1,6** | 6,70±2,2** | 3,20±1,3 | 0,024± 0,03* |
| ESC 10 | 8,89±0,6 | 9,37±2,6 | 4,25±0,6 | 0,014 ±0,01 |
| ESC 200 | 4,40±2,3*** | 6,0±3,1*** | 2,62±1,4 | 0,110±0,05*** |

Os resultados são expressos como a Média ± desvio padrão, n = 6 (*, **, ***) representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) em comparação com o grupo de controle negativo (CN). CN: solução salina (DMSO 10,0%); EtOH: Extrato hidroalcoólico; ESC: Extrato supercrítico (300bar/40°C/CO₂/5% etanol).

Em ambos os casos, extratos EtOH e ESC, 200 mg/kg/dia foi a concentração que causou maior redução da variação do peso dos animais. Contudo, dos tratamentos testados aquele que causou o maior percentual de redução da medida de variação do peso foi o tratamento com ESC (200 mg/kg/dia) com 4,4±2,3%.

A redução no peso dos animais pode estar relacionada à diminuição do tamanho do tumor, o que sugere uma possível atividade antitumoral dos tratamentos, com especial destaque, o extrato ESC.

Considerando-se que o líquido ascítico (meio onde as células do TAE crescem em suspensão) é a fonte nutricional direta para as células tumorais. Um aumento rápido no volume do líquido ascítico pode ser um meio para satisfazer os requisitos nutricionais de tais células (GÜNTHER, 2013; FARIAS, 2012). Sendo assim, uma diminuição do líquido ascítico pode provocar uma diminuição do crescimento da massa tumoral.

Ambas as concentrações utilizadas no tratamento dos animais (10 e 200 mg/kg/dia) foram capazes de diminuir significativamente o volume de líquido ascítico, dessa forma, podendo-se correlacionar o

desenvolvimento de menor volume de líquido ascítico com um provável efeito antitumoral de ambos os extratos (Tabela 8).

Outro parâmetro morfológico avaliado foi o volume de células compactadas obtidas após centrifugação. Ao se comparar o volume de células compactadas obtido dos animais tratados (EtOH/ESC, 10 e 200 mg/kg/dia) com os do controle negativo não se observou diferença estatística entre eles (Tabela 8).

Um dos métodos tradicionais para avaliar a viabilidade celular é o método de exclusão do corante azul de tripan, que permite a diferenciação das células viáveis dos inviáveis, pois o azul de tripan é um corante que só penetra em células mortas (inviáveis), cujas membranas não podem mais o excluir, mostrando-se então coloridas (FRESHNEY, 1999).

A partir disso, foi possível a determinação da proporção de células inviáveis/células viáveis (Tabela 8), observando-se que ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener (200 mg/kg/dia) aumentaram significativamente esta proporção em relação ao controle negativo, demonstrando um aumento na proporção de células inviáveis. No entanto, o extrato ESC demonstrou ter um maior efeito citotóxico sobre as células do TAE, quando comparado com o extrato EtOH.

Em suma, os dois extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener diminuíram a variação do peso corporal e o volume de líquido ascítico; e aumentaram a proporção de células inviáveis em relação às células viáveis, o que sugere que ambos os extratos apresentam atividade antitumoral *in vivo*, destacando-se o extrato ESC apresentou os melhores resultados até este ponto do trabalho.

4.2.1.1 Efeito dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener sobre o crescimento tumoral

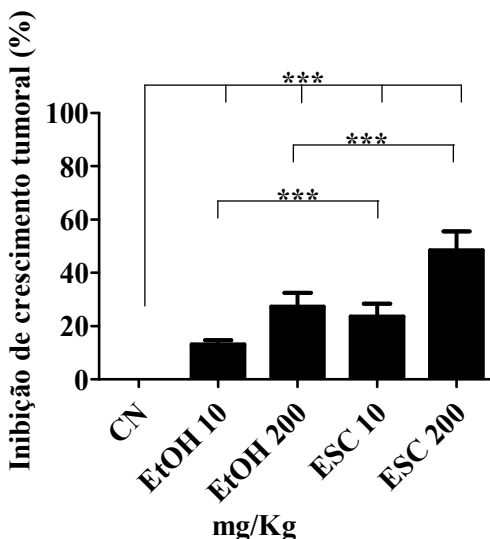
Segundo Gunther Et al. (2013), o crescimento tumoral está diretamente relacionada com a proliferação celular e o tamanho do tumor (volume do tumor). Desta forma, a inibição do crescimento tumoral foi estimada a partir da medição da circunferência abdominal (cm) dos animais, antes da inoculação das células de TAE (dia zero) e no final do experimento (dia 10), avaliando assim a regressão ou inibição tumoral.

Comparando-se os resultados dos animais tratados com os controles negativos observou uma redução significativa na variação da

circunferência abdominal e, conseqüentemente, da proliferação celular e do tamanho do tumor, ou seja, ambos os extratos foram capazes de inibir o crescimento tumoral (Figura 23).

Ao se comparar os dois extratos (EtOH versus ESC), observa-se uma diferença estatisticamente significativa entre eles. Os extratos EtOH e ESC na concentração de 10 mg/kg/dia, inibiram o crescimento tumoral em $13,24 \pm 1,46\%$ e $23,59 \pm 4,88\%$, respectivamente. Enquanto que na concentração de 200 mg/kg/dia, os extratos EtOH e ESC inibiram o crescimento tumoral em $27,32 \pm 5,19\%$ e $48,45 \pm 7,19\%$, respectivamente. Esses resultados demonstram que o extrato ESC apresenta um maior efeito inibitório sobre o crescimento tumoral e sendo assim apresenta um efeito antitumoral mais eficaz, pois o extrato ESC reduziu o crescimento do tumor em quase 21% a mais do que o EtOH.

Figura 23. Inibição do crescimento do tumor após o tratamento com os extratos EtOH e ESC (10 e 200 mg/kg/dia), com base na variação da circunferência abdominal.



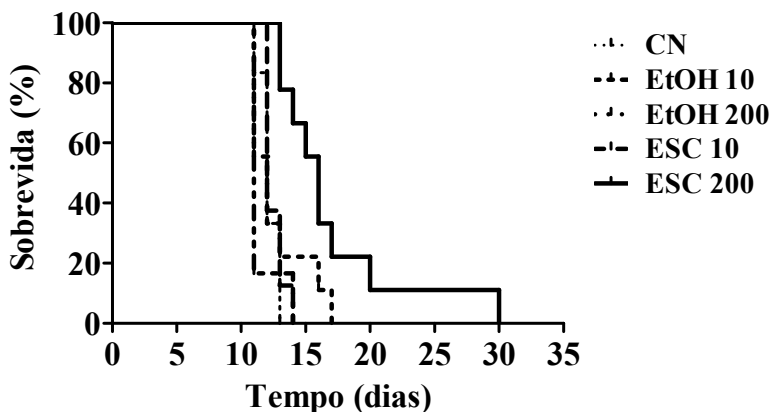
Os resultados são expressos como a Média \pm desvio padrão, $n = 6$. (***) representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em comparação com o grupo de controle negativo (CN) e/ou um extrato em relação ao outro. CN: solução salina (DMSO 10,0%); EtOH: Extrato hidroalcoólico; ESC: Extrato supercrítico (300bar/40°C/CO₂/5% etanol).

4.2.1.2 Efeito dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener sobre a sobrevida dos animais

O prolongamento do tempo de vida dos animais é um dos critérios mais confiáveis para julgar a eficácia de qualquer fármaco antitumoral (CLARKSON, BURCHENAL, 1965).

A probabilidade de sobrevivência dos animais tratados com EtOH e ESC foi estimada utilizando o método de Kaplan-Meier (Figura 24), uma forma simples de se calcular a fração de indivíduos/animais vivos por certo período de tempo (GOEL, 2010), por exemplo, durante e após o tratamento com EtOH e ESC (30 dias).

Figura 24. Taxa de sobrevivência dos animais (n=6) tratados com EtOH e ESC (10 e 200 mg/kg/dia) e observados por 30 dias, de acordo com o método de Kaplan-Meier.



Nota: Onde CN: solução salina (DMSO 10,0%); EtOH: Extrato hidroalcoólico; ESC: Extrato supercrítico (300bar/40°C/CO₂/5% etanol).

Observando os resultados, verifica-se claramente o aumento da probabilidade de sobrevivência dos animais tratados com ESC, em comparação com os tratados com EtOH e os tratados somente com solução salina contendo 10,0% de DMSO (controle negativo). Os animais tratados com ESC na concentração de 200 mg/kg/dia apresentaram 12,0% de probabilidade de estarem vivos em 30 dias, a contar do primeiro dia de tratamento, enquanto que os tratados com

EtOH e o grupo controle negativo não excederam 17 e 13 dias de vida, respectivamente.

Contudo, na concentração de 10 mg/kg/dia, ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener não apresentaram um bom efeito sobre a sobrevivência dos animais tratados, pois a sobrevivência desses animais não ultrapassou os 14 dias de vida, o que nos sugere que o efeito dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener depende da dose utilizada, ou seja, é um efeito dose-dependente.

Os resultados obtidos estão em concordância com o resultado da inibição do crescimento tumoral, pois o extrato que demonstrou maior poder de inibição sobre o crescimento tumoral foi o que mais aumentou a probabilidade de sobrevivência dos animais.

Com isso, é possível afirmar que o extrato ESC foi mais ativo que o extrato EtOH em combater o tumor, pois foi o extrato que apresentou melhor efeito sobre os parâmetros morfológicos, demonstrando possuir um efeito antitumoral mais significativo e eficaz que o extrato EtOH.

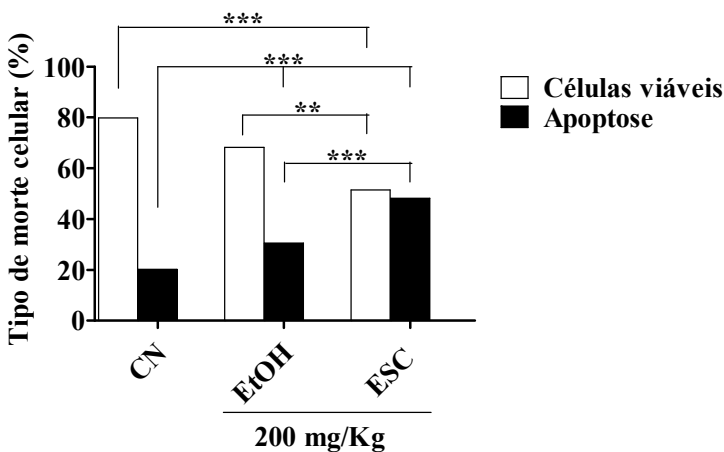
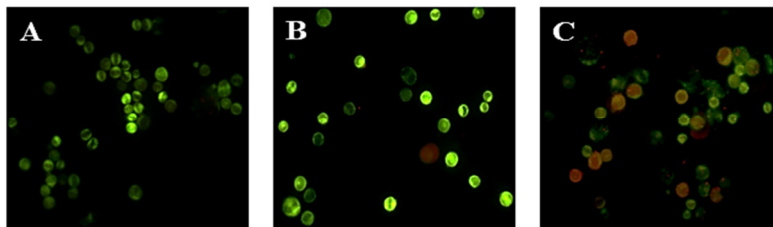
4.2.2 Tipo de morte celular induzido pelos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener

Para avaliar o tipo de morte celular induzido pelos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener, utilizou-se a concentração que até esse ponto dos experimentos vinha apresentando os melhores resultados, 200 mg/kg/dia.

As células do TAE foram coradas com uma solução de EtBr/LA e visualizadas por microscopia de fluorescência, permitindo, dessa forma, a diferenciação das células viáveis (verde brilhante) daqueles em processo de morte celular por apoptose (laranja) ou necrose (vermelho intenso) (McGAHON Et al., 1995).

Ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener aumentaram a frequência de células apoptóticas (células não viáveis) em comparação com o controle negativo, enquanto que diminuíam o número de células viáveis (Figura 25).

Figura 25. Morfologia das células de TAE e o tipo de morte celular induzido por EtOH (B) e ESC (C) (200 mg/kg/dia), em comparação com o controle negativo (A), avaliadas pelo método de coloração com EtBr/LA e visualizadas por microscopia de fluorescência.



Coloração verde e laranja denotam células viáveis e células em apoptose, respectivamente. (**, ***) representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) em comparação com o grupo de controle negativo (CN) e/ou um extrato em relação ao outro. CN: solução salina (DMSO 10,0%); EtOH: Extrato hidroalcoólico; ESC: Extrato supercrítico (300bar/40°C/CO₂/5%etanol).

O controle negativo apresentou 79,75% de células viáveis, ao passo que os extratos EtOH e ESC foram capazes de diminuir a frequência de células viáveis a 68,29% e 51,46%, respectivamente.

O ESC reduziu significativamente a frequência de células viáveis, atingindo um valor de 28,29% a menos de células viáveis em relação ao controle negativo, enquanto que o extrato EtOH não mostrou diferença estatística em relação ao controle negativo.

Ambos os extratos foram capazes de aumentar a frequência de células apoptóticas em comparação com o controle negativo (20,25%), especialmente o ESC que aumentou significativamente as células apoptóticas (48,22%) em comparação com extrato EtOH (30,57%).

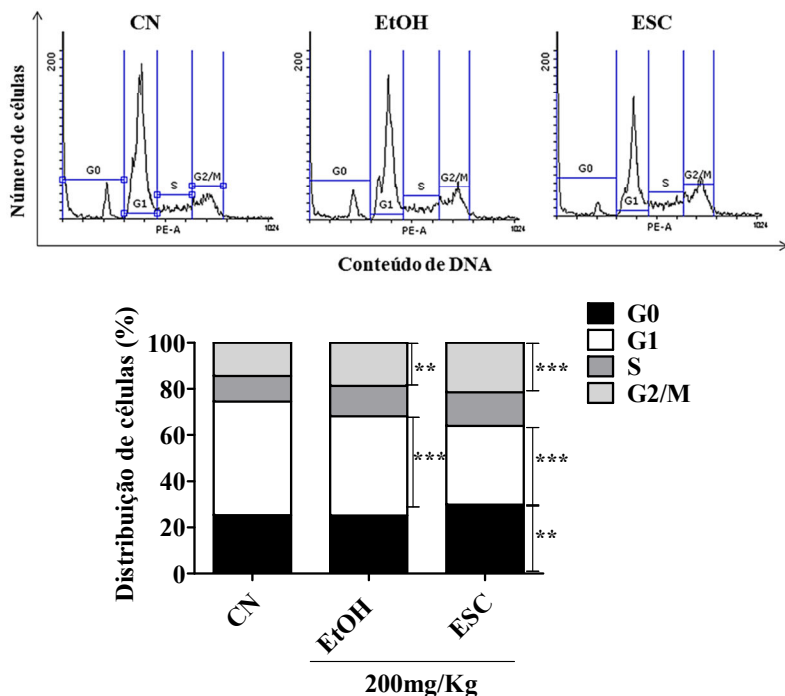
Além disso, quando se compara os dois extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener em relação à frequência de células em apoptose, há uma diferença estatística bem significativa entre eles.

O extrato ESC aumentou 17,65% a mais a frequência de células em apoptose, em comparação com o extrato EtOH, demonstrando ter um efeito pró-apoptótico mais eficaz. Curiosamente, nenhum dos tratamentos, incluindo o controle negativo, observou-se a presença de células necróticas.

4.2.3 Efeito dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener sobre o ciclo celular

Após verificar que ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener aumentam a inibição do crescimento tumoral (Figura 23), provavelmente devido a inibição da proliferação das células do TAE, deu-se seguimento a investigação do efeito dos mesmos sobre o ciclo celular, utilizando a concentração de 200 mg/kg/dia (Figura 26).

Figura 26. Percentagem de células em G0, G1, S e G2/M, após tratamentos com EtOH e ESC (200 mg/kg/dia), analisadas por citometria de fluxo.



Nota: Onde (**, ***) representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) em comparação com o grupo de controle negativo (CN). CN: solução salina (DMSO 10,0%); EtOH: Extrato hidroalcoólico; ESC: Extrato supercrítico (300bar/40°C/CO2/5% etanol).

A distribuição das células tratadas com os extratos EtOH e ESC em cada fases do ciclo celular foi comparada com o grupo controle negativo que, por sua vez, apresentou 25,35% de células na fase G0, 49,18% na fase G1, 11,12% na fase S e 14,33% na fase G2/M.

O número de células tratadas com EtOH e ESC na fase G1 foi reduzido à 42,99% e 34,04%, enquanto que número de células na fase G2/M foi aumentada para 18,68% e 21,44%, respectivamente. Como ambos os extratos diminuíram o número de células na fase G1 e aumentaram na fase G2/M, o que sugere um bloqueio do ciclo celular na fase G2.

Contudo, além do extrato ESC aumentar o número de células na fase G2/M, ele também aumenta o número de células na fase G0 (29,91%), sugerindo a ocorrência de um possível atraso na fase G1 devido às células ficarem presas na fase G0, e não entrarem na fase G1-ps (G1-pré-Síntese), induzindo, assim, uma senescência celular, que consequentemente evita a entrada das células tumorais na fase S.

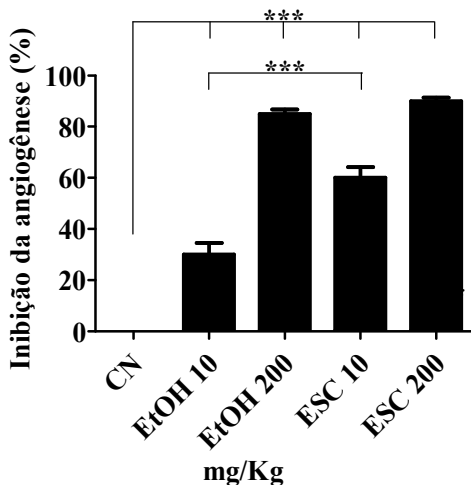
O extrato EtOH também aumenta o percentual de células na fase G0, mas não ao ponto de demonstrar diferença estatística, o que não exclui o fato de que um aumento na sua concentração poderia melhorar o seu efeito em induzir a senescência celular.

Assim, é possível sugerir que, ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa Degener* provocam um atraso na fase G1, por indução da senescência, e bloqueiam o ciclo celular em G2. Tais resultados sugerem um provável efeito antiproliferativo de ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa Degener*. Contudo, o extrato ESC apresenta um maior efeito bloqueador sobre ciclo celular, sugerindo um maior efeito antiproliferativo.

4.2.4 Atividade antiangiogênica dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa Degener*

Sabe-se que a supressão da disponibilidade de oxigênio e nutrientes para as células tumorais, por meio da redução ou inibição da angiogênese/neovascularização, afeta o crescimento e a proliferação celular, além de contribuir para a ocorrência de morte celular e diminuição da probabilidade de metástases (JAKÓBISIAK, LASEK, GOŁĄB, 2003; ADORNO, 2008). Assim, avaliamos a atividade antiangiogênica de ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa Degener*, pela medição da área e densidade de microvasos na região subcutânea do peritônio dos animais (Figura 27).

Figura 27. Atividade antiangiogênica dos extratos EtOH e ESC (10 e 200 mg/kg/dia), com base na contagem de microvasos.



Os resultados são expressos como a Média \pm desvio padrão, $n = 6$. (***) representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em comparação com o grupo de controle negativo (CN) e/ou um extrato em relação ao outro. CN: solução salina (DMSO 10,0%); EtOH: Extrato hidroalcoólico; ESC: Extrato supercrítico (300bar/40°C/CO₂/5% etanol).

Os dois extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener nas concentrações 10 e 200 mg/kg/dia causaram inibição da angiogênese quando comparados com o controle negativo (0% de inibição), demonstrando que ambos os extratos apresentam um efeito angiointibitório ou antiangiogênica.

Comparando-se um extrato com o outro, observa-se que na concentração de 10 mg/kg/dia ambos os extratos aumentaram a inibição da angiogênese em 30,0 \pm 4,60% e 60,0 \pm 4,24%, respectivamente, apresentando diferença estatística significativa entre eles.

Enquanto, que na concentração de 200 mg/kg/dia, tanto o extrato EtOH como o ESC, também aumentaram a inibição da angiogênese para 82,0 \pm 1,71% e 90,0 \pm 1,41%, respectivamente, porém não apresentando diferença estatística entre eles.

5. DISCUSSÃO

O câncer é uma das principais doenças responsáveis pelo aumento da morbidade e mortalidade mundial. Este fato se deve em parte ao aumento da expectativa de vida da população mundial que ocorreu nas últimas décadas em consequência da redução na mortalidade infantil e mortes por doenças infecciosas, além do grande progresso científico e tecnológico decorrente do avanço das ciências biológicas e médicas (INCA 2014). E como já é de conhecimento geral, a carcinogênese (aquisição progressiva de múltiplas anormalidades genéticas e epigenéticas) é um processo lento que pode levar anos até o surgimento de sintomas clínicos. Por isso, o câncer se caracteriza como uma doença do envelhecimento (PELLICANO, MUKHERJEE, HOLYOAKE, 2014).

Apesar dos significativos progressos alcançados na medicina tanto no diagnóstico precoce quanto nas estratégias terapêuticas, o tratamento do câncer ainda apresenta várias dificuldades, pois as terapias disponíveis atualmente estão frequentemente associadas à elevada toxicidade, baixa especificidade e a ocorrência de multirresistência aos fármacos antitumorais (MDR), o que evidencia a necessidade da busca por novas alternativas medicamentosas com maior seletividade e consequentemente diminuindo o risco da ocorrência de efeitos adversos (JENDIROBA Et al., 2002; ALMEIDA Et al., 2005).

Dentro desse contexto as plantas medicinais (fonte riquíssima de moléculas com atividade biológicas importantes) têm despertado grande interesse no tratamento do câncer. Sabe-se que 70% dos fármacos antitumorais utilizados na clínica são derivados direta ou indiretamente de plantas, como é o caso dos alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina) (KVIECINSKI, 2011; PARISOTTO, 2011).

Assim, o presente estudo objetivou avaliar comparativamente o efeito citotóxico, antiproliferativo, antitumoral e antiangiogênico dos extratos hidroalcoólico e supercrítico de *P. edulis f. flavicarpa* Degener, uma vez que existem relatos na literatura que indicam que esta planta e alguns de seus compostos bioativos teriam atividade antitumoral (INGALE, HIVRALE, 2010; GÓMEZ Et al., 2010; DEVAKI Et al., 2011; ZERAIK Et al., 2011).

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram escolhidas duas linhagens de células cancerígenas humanas, as células MCF-7 como o modelo *in vitro* de câncer de mama e as células da TAE como o modelo *in vivo*, uma vez que tais células (linhagem celular murina) surgiram a partir de uma das várias linhagens do carcinoma de Ehrlich,

provenientes de tumores epiteliais originários de glândulas mamárias (GUPTA Et al., 2004).

Como já citado anteriormente, o câncer é considerado uma doença celular caracterizada por um descontrole em vários mecanismos celulares importantes, como a perda da regulação dos mecanismos de controle do ciclo celular, proliferação e morte celular (DE NEIRA, 2003; INCA 2014). Estas características apresentadas pelas células tumorais são normalmente utilizadas como prováveis alvos de estudo para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais com o objetivo de bloquear o ciclo biológico da progressão tumoral. Levando isso em consideração, o presente estudo avaliou a citotoxicidade, o tipo de morte celular, a capacidade de induzir bloqueio do ciclo celular, a interação com CT-DNA, a atividade nucleásica, a atividade antitumoral e efeito antiangiogênico *in vivo* de extratos da *P. edulis f. flavicarpa Degener*.

Inicialmente, foi feita uma triagem com cinco extratos *P. edulis f. flavicarpa Degener* levando-se em conta dois parâmetros: o rendimento global (eficiência do processo de extração) e a citotoxicidade destes sobre as células MCF-7, dado pelo o valor do CI_{50} . A partir dos resultados obtidos foi possível observar a existência de uma relação entre o rendimento e a CI_{50} .

O extrato EtOH (1) alcançou um rendimento global maior do que as frações supercríticas (2, 3, 4, 5), este resultado que já era esperado, pois a extração convencional por ser uma extração menos seletiva e mais ampla do que a extração com o fluido supercrítico extrai uma variedade maior de compostos, inclusive impureza. Enquanto, que a extração com o fluido supercrítico é caracterizada pela sua alta seletividade conferida pela utilização de parâmetros ideais para as diferentes variáveis que influenciam tal extração, principalmente a temperatura, pressão, tempo de extração, tipo e percentagem de co-solvente, entre outros, o que melhora significativamente o poder de extração para certos compostos de interesse. Assim sendo, o rendimento da extração com o fluido supercrítico pode ter sido menor que a extração convencional, pelo fato de que os solutos que foram extraídos a partir da matéria-prima vegetal foram os que apresentavam características moleculares específicas que permitia o seu arraste pelo meio de extração (CO_2), excluindo assim a extração de certos compostos, por exemplo, compostos com ação citoprotetoras e impurezas.

Entre as extrações supercríticas, a adição de 5% de etanol como co-solvente levou a um ligeiro aumento no rendimento das extrações supercríticas, podendo estar relacionado com a mudança de polaridade

do fluido supercrítico (CO₂), aumentando o seu poder de arraste e solvatação em relação aos compostos polares.

No que diz respeito aos resultados de CI₅₀ dos cinco extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener observa-se um aumento da citotoxicidade dos extratos (4) e (5) em comparação aos restantes extratos (Tabela 4). Provavelmente, esta maior citotoxicidade esteja relacionada à adição de 5% de etanol, aumentando a extração de compostos polares, pois muito destes compostos polares são descritos na literatura como sendo detentoras de certas atividades farmacológicas importantes (MORAES, 1997). Portanto, a adição de modificadores de polaridade orgânicos (co-solvente) no processo de extração supercrítica, muitas vezes torna-se relevante para a seletividade de compostos com atividade citotóxica.

Michelin e colaboradores (2011), obtiveram resultados similares ao estudarem a atividade antimicrobiana dos extratos supercríticos da *Cordia verbenacea*, demonstrando que o uso de 5 a 8% de etanol como co-solvente, levou a uma redução nos valores do CI₅₀, aumentando assim o efeito antimicrobiano dos extratos supercríticos em comparação com os obtidos sem a adição de um co-solvente, durante o processo de extração realizado nas mesmas condições de temperatura e pressão. O que sugere que o uso de maiores quantidades de co-solvente, por exemplo, concentrações de 8 a 10% de etanol, poderia proporcionar uma maior citotoxicidade dos extratos supercríticos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener, melhorando, assim os resultados CI₅₀ obtidos.

Também é importante observar que possivelmente este maior efeito citotóxico sobre as células tumorais apresentado pelo ESC se deve às vantagens apresentadas pelo próprio processo de extração supercrítico, nomeadamente a alta seletividade e pureza na obtenção de produtos, para além da adição do co-solvente (HERRERO Et al., 2009), o que estaria em acordo com os resultados dos estudos realizados por Kwiecinski Et al. (2011) e Parisotto Et al. (2012), em que se verificou uma melhoria na atividade biológica (citotoxicidade *in vitro* e a atividade antitumoral *in vivo*) de extratos de *Bidens pilosa* e *Cordia verbenacea* obtidos por extração com o fluido supercrítico em comparação com a extração convencional.

Após avaliar os resultados obtidos observou-se que o extrato (5), ESC (300bar/40°C/CO₂/5% etanol), apresentava um efeito citotóxico maior sobre a linhagem tumoral MCF-7, em comparação com os outros extratos. Sendo assim, esse extrato foi o escolhido para dar seguimento aos experimentos, comparando-se os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* com os do extrato (1), EtOH.

A fim de esclarecer melhor os resultados de citotoxicidade apresentados pelos extratos EtOH e ESC da *P. edulis f. flavicarpa* Degener, foi realizada a caracterização fitoquímica de ambos os extratos, em que detectou-se e identificou-se dois alcaloides β -carbólicos (alcaloides harmônicos) no extrato ESC, os alcaloides harmina e harmana (Figura 16, 17, 18 e 19). Curiosamente no extrato EtOH não se observou a presença de tais compostos (Figura 16). É importante ressaltar que de acordo com a literatura estes dois alcaloides presentes na *P. edulis f. flavicarpa* Degener estão caracterizados entre os principais compostos bioativos dessa planta responsáveis pelas atividades antiproliferativa e antitumoral (CHEN Z Et al., 2011; SARKAR, BHADRA, 2014; SARKAR, PANDYA, BHADRA, 2014).

Posteriormente, foi realizado o ensaio de redução do MTT, utilizando as células de MCF-7 tratadas por 24h com ambos os alcaloides harmônicos (harmina e harmana) isolados a partir do extrato ESC, sendo verificado, que o alcaloide harmina é mais citotóxico que o alcaloide harmana (Tabela 5), o que sugere que a harmina seja o possível composto responsável pela atividade antitumoral do ESC. Porém, não se descarta o fato de que um aumento no tempo de exposição das células ao alcaloide harmana poderia possivelmente aumentar seu efeito citotóxico. Além disso, a uma grande possibilidade da ocorrência de um efeito sinérgico entre estes dois alcaloides ou destes em relação aos demais compostos presentes no ESC.

Sabe-se, que um grande número de quimioterápicos utilizados atualmente na terapêutica é constituído de compostos que interagem diretamente com o DNA ou previnem o relaxamento adequado do DNA (através da inibição da topoisomerase), conseqüentemente, conduzindo a danos extensos ao DNA das células, o que pode desencadear um processo de apoptose, levando à célula a morte (GOWDA et al, 2014; PALCHAUDHURI, HERGENROTHER, 2007). Assim, na tentativa de investigar preliminarmente o mecanismo de citotoxicidade induzido pelos extratos EtOH e ESC, foi avaliada a ação desses sobre o CT-DNA e DNA plasmidial.

A avaliação da interação dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com o CT-DNA (20 μM), revelou uma variação no espectro de varredura UV-visível de ambos os extratos com o CT-DNA (Figura 20), ocorrendo uma redução de absorvidade das amostras, ou seja, hipocromismo. Porém, a extensão da hipocromismo (H%) das bandas dos extratos EtOH e ESC (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 260nm atingiram valores distintos (Tabela 6). O extrato ESC apresentou um valor de H% menor que o extrato EtOH. Esses resultados

sugerem que em ambos os extratos há compostos capazes de ligarem ou interagirem com o DNA, mas em proporções diferentes.

Devido à ocorrência de efeito hipocromico entre CT-DNA e extratos, é provável que a interação entre os compostos presentes em ambos os extratos e o CT-DNA seja devido à ligação direta destes com o DNA por intercalação ou somente por ligação aos sulcos.

Segundo GOWDA Et al. (2014), a intercalação envolve a inserção de uma molécula planar entre pares de bases de DNA, o que resulta em uma diminuição na torção helicoidal e no alongamento do DNA, conduzindo a uma alteração conformacional no DNA.

O brometo de etídio (EtBr) é uma molécula catiônica capaz de interagir com polinucleotídeos, como o DNA, por intercalação. Sendo amplamente utilizado em ensaios moleculares devido ao fato deste composto apresentar fluorescência e que quando ligado ao DNA ocorre um aumento das emissões de fluorescência deste em 24 vezes (HELLER, GREENSTOCK, 1994; PALCHAUDHURI, HERGENROTHER, 2007). Assim, a intensidade de fluorescência de soluções CT-DNA após atingir o ponto de saturação com EtBr foi determinada na ausência e na presença dos extratos EtOH e ESC. Onde observou-se uma diminuição na intensidade de fluorescência das amostras contendo os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener quando comparados com o controle negativo (solução salina) (Figura 21). Tal resultado sugere que ambos os extratos apresentam compostos capazes de intercalarem o DNA, desta forma, causando uma redução na quantidade de moléculas de EtBr ligados ao DNA devido à uma competição pelos mesmos sítios de ligação, conseqüentemente deslocando as moléculas de EtBr dos seus sítio de ligação, assim, diminuindo a fluorescência das amostras. Este resultado está em concordância com os dados obtidos pela constante de extinção de fluorescência (K_v) e constante da taxa de extinção EtBr-DNA (K_q) (Tabela 7). O que comprova a ocorrência de uma extinção de fluorescência devido à diminuição da emissão de fluorescência e do tempo de duração da fluorescência das moléculas de EtBr (HELLER, GREENSTOCK, 1994).

Avaliando os resultados apresentados nas Tabelas 6 e 7 foi possível observar que ambos os extratos não apresentaram diferença estatística entre eles em relação à intensidade de fluorescência e eficiência de extinção de fluorescência, dada pelas constantes K_v e K_q . Contudo, há uma diferença de quase duas vezes na extensão da hipocromismo, onde EtOH atingiu 23,91% e o ESC atingiu 12,23%,

comprovando novamente o potencial seletivo da extração com o fluido supercrítico.

Visto que, a extração convencional (maceração, EtOH) por se tratar de uma extração menos seletiva, a quantidade final de soluto extraído tem uma diversidade maior de compostos com características moleculares diferenciadas e distintas, o que possivelmente possibilita a ocorrência de mais de uma forma de interação destes compostos com o CT-DNA, podendo ocorrer simultaneamente intercalação e ligação aos sulcos. Enquanto que, a extração com fluido supercrítico realizadas nas condições de extração pré-determinadas (300bar/40°C/CO₂/5% etanol) proporcionou a obtenção de um extrato (ESC) com uma maior seletividade para certos compostos com características moleculares específicas, conferindo a estes a capacidade de interagir com o CT-DNA somente por intercalação.

Em outras palavras, é possível sugerir que o extrato EtOH teria compostos capazes de interagir com o CT-DNA por intercalação e ligação aos sulcos, enquanto que os compostos presentes no extrato ESC possivelmente interagem com o CT-DNA somente por intercalação, como é o caso dos alcaloides β -carbolínicos. Assim, explicando a diferença dos resultados obtidos pela extensão de hipocromismo em comparação com a diminuição da intensidade de fluorescência obtido pelo ensaio de intercalação com EtBr e CT-DNA.

As moléculas intercaladoras de DNA, em geral, apresentam atividade nucleásica e causam estresse oxidativo ao DNA e, por conseguinte, promovem sua clivagem. Dessa forma, desencadeando uma cascata de eventos que conduzem a morte celular (PALCHAUDHURI, HERGENROTHER, 2007).

Neste contexto, a capacidade dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener em provocar danos ao DNA, a ponto de cliva-lo (atividade nucleásica), foi investigada. Para isso, foi realizado o ensaio de dano direto ao DNA para detecção das diferentes formas de DNA plasmidial existentes, ou seja, a forma superenovelada intacta (FI, sem quebras), a circular aberta (quebra simples de cadeia, FII) e a linear (quebra de fita dupla, FIII) que indicam o grau de conservação e/ou dano a este ácido nucleico (SREDDHARA, COWAN, 2001).

Ambos os extratos apresentaram a capacidade de induzir danos ao DNA por promoverem quebras simples das cadeias, comprovada pelo aparecimento de bandas eletroforética referentes à forma FII do DNA (Figura 22). O que sugere a presença de compostos capazes de se ligarem ao DNA por intercalação e, conseqüentemente, causar clivagem do mesmo, ou seja, ambos os extratos apresentam atividade nucleásica.

Porém, os dois extratos somente apresentaram atividade nucleásica na concentração de 50 µg/mL (Figura 22), sugerindo que a atividade nucleásica apresentada por ambos os extratos é concentração dependente. Entretanto, é importante ressaltar que o ESC (50 µg/mL) apresentou uma atividade nucleásica maior que o extrato EtOH.

Uma variedade de componentes bioativas da espécie *P. edulis* têm sido descritos na literatura, tais como alcaloides, flavonoides, fenóis, glicosídeos, compostos cianogênicos e ácidos orgânicos (PATEL Et al., 2011, ZERAIK Et al., 2010, DHAWAN, DHAWAN, SHARMA, 2004). Destacando-se os alcaloides β-carbolínicos como harmana e harmina, que têm sido apontados como uma nova classe de potenciais agentes antitumorais (ZERAIK Et al., 2010; CHEN Et al., 2011). Os principais alvos moleculares dos alcaloides β-carbolínicos incluem DNA, RNA, algumas enzimas associadas à transcrição e tradução, proteínas de biossíntese e proteínas de membranas. Estudos relatam que o efeito citotóxico dos alcaloides β-carbolínicos está relacionada com a capacidade de intercalarem no DNA, além de inibirem as topoisomerasas I e II, as CDKs, a MK2, a PLK1, a cinesina Eg5 e o IKK, interferindo assim na proliferação celular (CHEN Et al., 2011; ZHAO, 2013; SARKAR, BHADRA, 2014; SARKAR, PANDYA, BHADRA, 2014).

Assim, relatos apresentados na literatura científica nos permite associar o efeito citotóxico e atividade nucleásica do ESC da *P. edulis f. flavicarpa* Degener com a presença de alcaloides β-carbolínicos (alcaloides harmânicos), detectados e identificados no presente trabalho (Figura 16, 17, 18 e 19).

Portanto, podemos supor que o efeito citotóxico do ESC seria proveniente da presença dos alcaloides harmânicos, em particular a harmana (Tabela 5), cujas características moleculares próprias, como molécula heterocíclica pequena, planar e com caráter básico (devido à presença do nitrogênio), facilita a inserção da mesma entre os pares de bases do DNA, podendo interferir na replicação e/ou transcrição de DNA. Tal fato corrobora com os estudos realizados por Sarkar et al. (2014) e Chen et al. (2011), em que demonstram que os alcaloides β-carbolínicos apresentam efeito citotóxico significativo sobre várias linhagens tumorais, tais como as células 769-P, 786-0 e OS-RC-2 (carcinoma renal), KB (carcinoma de nasofaringe), BGC-823 (carcinoma gástrico), HepG2 (hepatocarcinoma), A375 (melanoma), HT-29 (carcinoma de cólon), 22RV1 (carcinoma de próstata) e MCF-7. E tal efeito citotóxico provinha do fato destes alcaloides serem capazes de intercalarem com o DNA.

Soma-se a isto o fato de tais alcaloides apresentarem um coeficiente de partição (logP) maior que 1,0 (harmana e harmina tem um logP igual a $3,06 \pm 0,24$ e $3,05 \pm 1,02$, respectivamente) (ACD/Labs 2014), o que aumenta a probabilidade de ultrapassarem a membrana celular e serem absorvidos pelas células alvo, exercendo, assim o seu efeito.

Após a determinação da citotoxicidade *in vitro* e a capacidade de intercalação ao DNA de ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener, o terceiro passo do presente trabalho foi avaliar *in vivo* se os extratos seriam capazes de confirmar o mesmo efeito citotóxico, assim validando a atividade antitumoral demonstrada *in vitro*.

Desta forma, foi investigado o efeito dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener sobre os parâmetros histomorfológicos dos animais inoculados com as células de TAE.

Os resultados obtidos após o tratamento por nove dias consecutivos com os dois extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener em relação ao volume de células compactadas, obtidos após centrifugação, não apresentaram diferença estatística com relação ao controle negativo. Porém, ambos os extratos aumentaram a proporção de células inviáveis em relação às células viáveis e, por conseguinte houve uma diminuição no volume de líquido ascítico e na variação do peso corporal dos animais (Tabela 8). Ou seja, ambos os extratos causaram morte celular e possivelmente diminuíram a proliferação celular, interferindo assim no desenvolvimento da ascite abdominal, diminuindo o peso dos animais, e consequentemente, a circunferência abdominal.

Estes resultados sugerem que, ambos os extratos apresentam atividade antitumoral *in vivo*, atividade esta dose dependente, pois a concentração de 200 mg/kg/dia apresentou os melhores resultados. Contudo, o extrato ESC apresentou um efeito antitumoral mais pronunciado, em comparação ao EtOH.

Segundo várias referências, o principal parâmetro que pode indicar o quão eficaz foi o tratamento com os extratos de *P. edulis f. flavicarpa* Degener é a inibição do crescimento tumoral dado pela redução da circunferência abdominal. De acordo GUNTHER et al (2013), o crescimento do tumor está diretamente relacionado com a proliferação celular e o tamanho do tumor (volume do tumor). Avaliando a variação da circunferência abdominal ocorrida entre o dia 0 (dia da inoculação das células de TAE) e dia 10 (fim do experimento com EtOH e ESC), foi observado uma redução significativa no crescimento tumoral (Figura 23). A inibição do crescimento tumoral ou regressão tumoral, novamente demonstrou ser um efeito dose dependente, pois na concentração de 200 mg/kg/dia, ambos os extratos

apresentaram uma maior eficácia em reduzir o crescimento tumoral. Mais uma vez é importante ressaltar que o ESC demonstrou um maior efeito inibitório do crescimento tumoral, com uma redução do crescimento tumoral em 21% a mais do que o EtOH.

Outro critério confiável para avaliar o efeito de qualquer fármaco antitumoral é o prolongamento do tempo de vida dos animais, ou seja, a sobrevida destes (CLARKSON, BURCHENAL, 1965), que em geral esta diretamente relacionada com a diminuição do volume do tumor.

A probabilidade de sobrevivência dos animais tratados com os extratos EtOH e ESC nas concentrações de 10 e 200 mg/kg/dia, foi estimada utilizando o método de Kaplan-Meier, onde é possível observar um aumento significativo da probabilidade de sobrevivência dos animais tratados com o ESC, em comparação com o grupo tratado com o EtOH e o grupo controle negativo, efeito este dose dependente (Figura 24). Este resultado está em concordância com o resultado da inibição do crescimento tumoral. O ESC (200mg/kg/dia) apresentou o maior poder de inibição sobre o crescimento tumoral, aumentando assim ainda mais a probabilidade de sobrevivência dos animais. Portanto, é possível afirmar que o ESC exerce um efeito antitumoral mais significativo do que o EtOH.

A inibição do crescimento tumoral pode estar ocorrendo devido à diminuição da proliferação celular e ao aumento da morte celular, previamente aferido pelos resultados da Tabela 8. Assim, a fim de investigar os prováveis mecanismos de ação responsável pela inibição de crescimento das células tumorais foi avaliado o efeito de ambos os extratos sobre o ciclo celular e o tipo de morte celular induzida.

Como já informado anteriormente, as células tumorais são caracterizadas pela proliferação celular exacerbada causada por descontrole nos mecanismos normais de regulação do ciclo celular e diminuição da remoção de células mutadas ou danificadas, devido à capacidade das mesmas em desviar do processo de morte celular (ELMORE, 2007).

A morte celular é um processo fisiológico necessário para a remoção de células indesejadas ou danificadas (PRADELLI, BÉNÉTEAU, 2010; CHAABANE Et al., 2013). E a apoptose (tipo I da PCD), um dos processos pelo qual uma célula afetada entra em processo de morte celular, é caracterizada por alterações celulares, morfológicas e bioquímicas específicas (OUYANG Et al., 2012), que confere vantagens ao organismo como um todo, pois a apoptose é um processo essencialmente sem reação inflamatória, devido aos corpos apoptóticos

serem fagocitados pelas células circundante e degradados dentro de fagolisossomas, prevenindo assim o extravasamento dos constituintes celulares para o tecido intersticial circundante, além de impedir a ocorrência da necrose secundária. Adicionalmente, as células fagocitárias não produzem citosinas inflamatórias (ELMORE, 2007). Assim, fármacos antitumorais capazes de induzir a apoptose traz um benefício muito maior para os pacientes em tratamento, em comparação com aqueles indutores de necrose ou morte celular inespecífica.

Com base nas alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticos foi possível diferenciar as células viáveis (verde brilhante) daqueles em processo de morte por apoptose (laranja) ou necrose (vermelho intenso), através do método de coloração com EtBr/LA (McGAHON Et al. 1995).

Ambos os extratos na concentração de 200 mg/kg/dia aumentaram a frequência de células apoptóticas em comparação com o controle negativo, enquanto que diminuía o número de células viáveis (Figura 25). Além disso, ao se comparar os dois extratos de *P. edulis f. flavicarpa* Degener, há uma diferença significativa entre eles em relação à frequência de células apoptóticas, onde o ESC aumentou a proporção de células apoptóticas em 17,65% a mais que o EtOH, assim demonstrando uma maior eficiência pró-apoptótica.

Tendo em vista que a apoptose é o principal tipo de morte celular que ocorre quando o dano ao DNA é irreparável (OUYANG Et al., 2012) e os extratos EtOH e ESC apresentaram atividade nucleásica *in vitro*, clivando o DNA plasmidial, é possível propor que o aumento na frequência de apoptose induzida por ambos os extrato, pode ter sido originado dos danos irreparáveis ao DNA, desencadeando, assim uma cascata de eventos que sinalizou para este tipo de morte celular programada.

Tal resultado corrobora com o estudo realizado por Cao e colaboradores (2011), que demonstraram que o alcaloide harmina induzia apoptose nas células HepG2 via ativação das caspases (-3 e -9) e inibição da expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Mcl-1 e Bcl-xl. Além disso, De Neira (2003) e Rowe e colaboradores (2004) demonstram que extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener contendo compostos polifenólicos (quercetina e catequina) reduziram o potencial de crescimento de células leucêmicas (K562, HL-60 e MOLT-4) devido a aumentarem a ocorrência da morte celular por apoptose em consequência do aumento da atividade da caspase-3 e reduziram a viabilidade celular.

Em resumo, ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa Degener* demonstraram atividade antitumoral *in vivo* por: i) Diminuir o peso corporal dos animais e o volume de líquido ascítico; ii) Aumentar a proporção de células inviáveis em relação as células viáveis; iii) Aumentar a inibição do crescimento tumoral, provavelmente devido a inibição da proliferação das células do TAE, e iiiii) Causar a morte celular por apoptose desencadeada por danos no DNA. Por conseguinte, aumentando a sobrevida dos animais tratados.

De acordo com Golias e colaboradores (2004), o ciclo celular e a apoptose são parte de uma rede molecular integrada. Assim, uma interrupção do ciclo celular, como resposta a danos no DNA, poderia ser o ponto inicial que desencadearia uma cascata de eventos sinalizando a morte celular por apoptose, sendo desta forma o mecanismo responsável pelos efeitos antitumorais apresentados pelos extratos de *P. edulis f. flavicarpa Degener*.

Assim, a capacidade de interferir e/ou induzir a parada do ciclo celular pelos extratos da *P. edulis f. flavicarpa Degener*, foi investigada através da citometria de fluxo, em que a intensidade da fluorescência do iodeto de propídio (agente intercalante) é diretamente proporcional ao conteúdo de DNA das células em cada fase do ciclo (G0, G1, S, G2/M), assim, monitorou-se o comportamento do ciclo celular das células expostas a ambos os extratos.

A distribuição das células tratadas com ambos os extratos em cada fase do ciclo celular foi comparada com o controle negativo, observando-se assim uma redução no número de células na fase G1 acompanhado de um aumento do número de células na fase G2/M, o que sugere um bloqueio do ciclo celular na fase G2 (Figura 26). Além disso, o ESC foi capaz de induzir o fenótipo de senescência, pois este aumentou o número de células na fase G0, sugerindo a ocorrência de um possível atraso na fase G1, devido às células ficarem aprisionadas na fase G0 e não entrarem na fase G1-ps.

A fase G0 é referida como o estágio de repouso ou quiescência, em que ao contrario das células apoptóticas, as células senescentes permanecem viáveis, metabolicamente ativas, porém exibem uma perda gradual de potencial proliferativo, resultando numa redução da densidade celular e conseqüentemente num bloqueio irreversível da proliferativa celular. Contudo, certos autores afirmam que este bloqueio é possível de ser revertido (ZHAO, 2013; FELIPE, 2014).

Assim, é possível sugerir que o ESC da *P. edulis f. flavicarpa Degener* apresentou um efeito antiproliferativo devido a este causar um

atraso na fase G1 por induzir a senescência celular seguida de um bloqueio do ciclo celular na fase G2.

Dados da literatura demonstram que danos ao DNA induzido por vários agentes estressores são capazes de ativar a *ataxia-telangiectasia-mutated* (ATM), uma proteína cinase "reconhecadora" de dano ao DNA, que normalmente está presente nas células não estressadas ou danificadas como um homodímero. Danos ao DNA com consequente mudança na estrutura da cromatina provocam alteração conformacional na ATM, causando sua dissociação e ativação, este por sua vez pode agora fosforilar diretamente o fator de transcrição p53 (fator supressor de tumor), no seu domínio de ativação amino terminal (serina 15), ativando-o (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003; KASTAN, BARTEK, 2004).

Estudos recentes sobre a função da p53 demonstram que o seu efeito antiproliferativo é mediado pela estimulação da transcrição de diferentes genes, com funções no controle do ciclo celular, incluindo p21/WAF1/CIP1, GADD45, Mdm2 e proteína 14-3-3 sigma (14-3-3 σ), através dos elementos de ligação de p53 nas regiões promotoras (GOLIAS, CHARALABOPOULOS, CHARALABOPOULOS, 2004; DASIKA Et al., 1999), assim interferindo na progressão normal do ciclo celular. A p53 fosforilada (serina 15), inibe parcialmente a sua interação com Mdm2, impedindo assim a sua degradação via ubiquitina-proteassoma (DASIKA Et al., 1999), com isso, a p53 fica livre para exercer sua função.

O principal alvo transcricional da p53 é a p21/CIP1/WAF1, uma das proteínas inibidoras do ciclo celular, chamadas de inibidores de CDKs (CKI). A p21 inibe a atividade das cinase dependente de ciclina (CDKs), mediada pela inibição da via pRB/E2F (Figura 2) e também por inibir a iniciação da síntese do DNA, provocando, assim, um atraso ou parada do ciclo na fase G1 (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003; GOLIAS, CHARALABOPOULOS, CHARALABOPOULOS, 2004; KASTAN, BARTEK, 2004).

Geralmente, antes de ocorrer à condensação cromossomal e divisão nuclear, as células precisam certificar se seu DNA é totalmente replicável e não está danificada, assim, quando um dano não reparado, infligido durante a fase G1 é detectado pelos *checkpoints* da fase G2/M, estes impedem as células de iniciarem a mitose (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003; KASTAN, BARTEK, 2004).

Existem relatos na literatura de que a proteína ATM também fosforila e ativa a cinase *checkpoint*-transdutor serina/treonina, CHK2, que fosforila a fosfatase Cdc25, promovendo a sua ligação a proteína

14-3-3 σ (proteína do citoesqueleto regulada pela p53), que a sequestra para fora do núcleo, assim, impedindo o Cdc25 de ativar o complexo CDK1/ciclina B e consequentemente bloqueando o ciclo celular na fase G2, prevenindo a ocorrência da mitose (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003; KASTAN, BARTEK, 2004; NOVÁK, SIBLE, TYSON, 2002; DASIKA Et al., 1999).

Por outro lado, evidências recentes sugerem que a p53 também pode desempenhar um papel importante no ciclo celular na fase G2/M, por *up*-regular o GADD45 (gene responsivo de dano ao DNA e parada do crescimento), o qual pode desestabilizar o complexo CDK1/ciclina B, levando a sua dissociação e inativação (DASIKA Et al., 1999; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003; GOLIAS, CHARALABOPOULOS, CHARALABOPOULOS, 2004). Adicionalmente, a p53 suprime a transcrição da CDK1 e dos promotores do ciclina B, podendo também contribuir para o bloqueio do ciclo celular na fase G2 (DASIKA Et al., 1999).

Com isso, é possível supor que o dano ao DNA causado por ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener (EtOH e ESC), levaram ao atraso na fase G1 e parada do ciclo celular na fase G2, possivelmente através da via ATM/p53-CHK2/Mdm2-p21-GADD45/CDC25 (Figura 28), conferindo, assim, o efeito antiproliferativo aos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener. Ressaltando, que o ECS apresentou tal efeito mais pronunciado, provavelmente devido à presença dos alcaloides β -carbolínicos.

Segundo Zhao e Wink (2013), o alcaloide β -carbolínico harmina apresentou citotoxicidade e efeito antiproliferativo sobre as células tumorais HeLa, SiHa (câncer cervical) e MCF-7, devido este ser um agente intercalante do DNA e induzir a senescência por inibir a atividade das telomerasas e ativar a via p53/p21.

Além disso, a presença de carotenoides e compostos polifenólicos em extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener foram relacionados com a inibição do crescimento tumoral devido ao bloqueio do ciclo celular, em que os carotenoides (licopeno, α e β -caroteno) causaram bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 em células leucêmicas mieloides (HL-60), enquanto que os polifenóis (quercetina e catequina) foram responsáveis pela parada do ciclo celular na fase G0/G1 nas células MOLT-4 da leucemia linfoblástica e na fase G2 nas células HL-60 (DE NEIRA, 2003; ROWE Et al., 2004).

Contudo, faz-se necessário, mais estudos para melhor elucidar o efeito antiproliferativo aos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener,

por exemplo, caracterizar a expressão das proteínas envolvidas nas vias de sinalização e mesmo no processo de bloqueio do ciclo celular.

No entanto, é possível relacionar o bloqueio do ciclo celular em resposta aos danos no DNA induzidos por ambos os extratos com o aumento da morte celular por apoptose, conferindo assim o efeito antitumoral aos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener.

Outro evento celular importante que também contribui para a ocorrência de morte celular e diminuição da proliferação celular é a inibição da angiogênese/neovascularização.

E estudos científicos, demonstraram que a angiogênese desempenha um papel crítico no crescimento tumoral e metástase, pois esta é uma resposta fisiológica desencadeada pelas células tumorais devido à demanda pelo oxigênio e nutrientes ultrapassar a quantidade disponibilizada pelos capilares existentes. Esta demanda leva a um desequilíbrio entre os fatores pró-angiogênicos e angiostáticos secretados pelas células neoplásicas, conduzindo à proliferação vascular, culminando na formação de novos vasos capilares a partir dos já existentes, o que contribui para a sobrevivência das células tumorais (JAKÓBISIAK, LASEK, GOŁĄB, 2003; ADORNO, 2008, DE OLIVEIRA Et al., 2010).

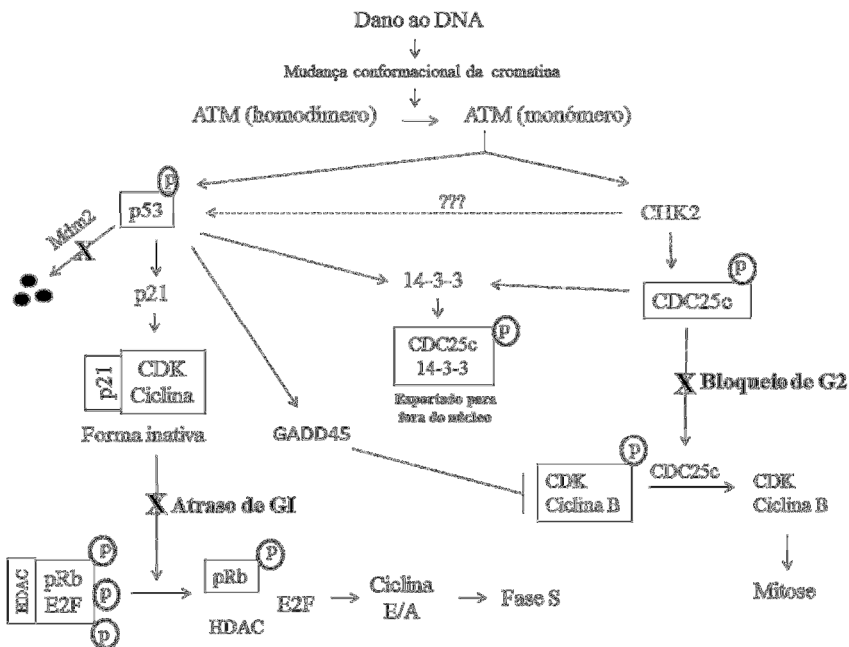
Portanto, seria importante avaliar o possível efeito antiangiogênico de ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener, pois ao se reduzir ou inibir a angiogênese, há uma diminuição de oxigênio e nutrientes disponíveis para as células tumorais, prejudicando, assim o crescimento e manutenção das mesmas, além de reduzir a probabilidade de metástase.

Assim, avaliou-se a atividade antiangiogênica dos extratos EtOH e ESC nas concentrações de 10 e 200mg/kg/dia, através da medição da área e densidade dos microvasos na região subcutânea do peritônio dos camundongos (Figura 27). Os resultados obtidos demonstraram que ambos os extratos causaram inibição da angiogênese quando comparados com o controle negativo, efeito este dose dependente, o que demonstra que os dois extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener apresentam o efeito antiangiogênico. No entanto, ao se comparar os dois extratos na concentração de 200 mg/kg/dia, não há diferença estatística entre eles (Figura 27).

Entretanto, é possível sugerir que, a capacidade de ambos os extratos em inibir a angiogênese pode estar contribuindo para a diminuição da proliferação celular e aumento da ocorrência de morte celular por apoptose, conseqüentemente, aumentando a inibição do crescimento tumoral e sobrevivência dos animais tratados.

Em resumo, a partir dos resultados obtidos com o presente estudo é possível supor que ambos os extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener apresentam compostos intercalantes de DNA com atividade nucleásica. O que provoca danos irreparáveis ao DNA levando a uma parada do ciclo celular em consequência da ocorrência de um atraso do ciclo celular na fase G1, provavelmente devido à indução do fenótipo de senescência, seguida de bloqueio do ciclo celular na fase G2, conseqüentemente, inibindo a proliferação celular e desencadeando uma cascata de eventos que levou as células tumorais à morte por apoptose. Adicionalmente, a diminuição do fornecimento de oxigênio e os nutrientes disponíveis para as células tumorais em consequência da inibição da angiogênese, estes seriam os prováveis mecanismos de ação responsáveis pela atividade antitumoral dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener. Ressaltando-se que, o ESC exibiu uma atividade antitumoral maior que o EtOH certamente devido as próprias vantagens apresentadas pela extração com o fluido supercrítico, principalmente devido ao elevado grau de pureza e seletividade; além do uso de co-solvente (etanol 5%), desta forma aumentando o poder de arraste para compostos com possível atividade antitumoral, tais como os alcaloides β -carbolínicos, harmana e harmina.

Figura 28. Esquema dos mecanismos moleculares de controle do ciclo celular em resposta a danos no DNA.



Fonte: Adaptada de DASIKA Et al., 1999; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003 e KASTAN, BARTEK, 2004.

6. CONCLUSÃO

Com base nos objetivos propostos e nos resultados obtidos com o presente trabalho, pode-se concluir que:

- O extrato bruto e supercrítico (300bar/40°C/CO₂/5% etanol) da torta de sementes da *P. edulis f. flavicarpa Degener* apresentaram atividade citotóxica para as células MCF-7, porém o extrato supercrítico apresentou maior atividade citotóxica.
- Ambos os extratos apresentaram atividade nucleásica, por conter compostos capazes de interagirem com o DNA por intercalação, levando a clivagem/fragmentação do mesmo. Contudo, o extrato supercrítico apresentou maior atividade nucleásica.
- Ambos os extratos apresentaram importante efeito antiproliferativo por induzirem um atraso do ciclo celular na fase G1 seguida de bloqueio na fase G2.
- O provável tipo de morte celular induzida pelos extratos seria a apoptose. Porém, o extrato supercrítico causou o maior percentual de morte celular por apoptose.
- Ambos os extratos possuem atividade antitumoral *in vivo*, pois foram capazes de promover pelo aumento da inibição do crescimento tumoral e sobrevida dos animais tratados. Entretanto, o extrato supercrítico apresentou maior atividade antitumoral.
- Ambos os extratos apresentaram atividade antiangiogênica *in vivo*. Porém, o extrato supercrítico apresentou maior poder inibitório sobre a formação de novos vasos.
- A atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do extrato supercrítico provavelmente se deve à presença de alcaloides β -carbolínicos (harmana e harmina) neste extrato, demonstrando que a extração com o fluido supercrítico confere maior citotoxicidade e efeito antitumoral aos extratos obtidos por essa técnica, por aumentar o poder de extração de compostos com provável atividade antitumoral.

7. PERSPECTIVAS

O desenvolvimento desse estudo abre novas propostas de trabalho que possam servir de complemento aos resultados já obtidos ou, até mesmo, abrir novas possibilidades ou rumos para estudos futuros mais aprofundados, tais como:

- O efeito citotóxico deve ser avaliado sobre outras linhagens de células tumorais e também em células normais, através da execução do ensaio do MTT, para melhor caracterização do efeito e a seletividade dos compostos presentes nos extratos;
- Para melhor aferir e caracterizar a atividade antiproliferativa dos extratos deve-se realizar o ensaio de colônia ou ensaio clonogênico, utilizando as células MCF-7;
- Investigar o mecanismo de morte celular induzido pelos extratos, através da análise da expressão de marcadores de apoptose, tais como p53, Bcl-2, Bax e citocromo *c*;
- Investigar o mecanismo de morte celular induzido pelos extratos, através da, através da avaliação da atividade de caspase-3;
- Investigar as proteínas envolvidas no bloqueio do ciclo celular, p21 e ciclinas (A, E e B), através de *Western Blot*;
- Investigar as proteínas indicadoras de dano ao DNA, tais como a H2AX fosforilada, através de *Western Blot*;
- O extrato etanólico e supercrítico da *P. edulis f. flavicarpa* Degener devem ser melhores avaliados fitoquimicamente (LC-MS, CLAE), para assim, permitir fazer correlações mais aproximadas sobre a estrutura dos constituintes químicos dos extratos e suas atividades bioquímicas;
- Por fim, testar o efeito dos alcaloides β -carbolínicos (harmana e harmina) nos modelos de avaliação de atividade antitumoral apresentados no presente estudo para caracterizar especificamente o mecanismo de ação desses compostos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADORNO G.L.A.R. Angiogênese em carcinomas de mama: análise de expressão de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e suas correlações com outros fatores prognósticos. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

AGRAWAL S.S., SARASWATI S., MATHUR R., PANDEY M. Antitumor properties of Boswellic acid against Ehrlich ascites cells bearing mouse. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.1924–1934, 2011.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO A.; REINA L.d.C.B.; MONTANARI C.A.; DONNICI C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28 (1), p.118-129, 2005.

AUDIC, Y.; HARTLEY, R.S. Post-transcriptional regulation in Cancer – **Review. Biology of the Cell**, v. 96, p. 479–498, 2004.

BALDINI, M.; BELICCHI F.M; BISCEGLIE F.; PELOSI G.; PINELLI S.; TARASCONI P. Cu(II) complexes with heterocyclic substituted thiosemicarbazones: the case of 5-formyluracil. Synthesis, characterization, X-ray structures, DNA interaction studies, and biological activity. **Inorganic Chemistry**, v.42 (6), p.2049-2055, 2003.

BELAKAVADI M.; SALIMATH B.P. Mechanism of inhibition of ascites tumor growth in mice by curcumin is mediated by NF-kB and caspase activated Dnase. **Mol Cell Biochem**, v.273(1-2), p.57-67, 2005.

BENINCÁ J.P.; MONTANHER A.B.; ZUCOLOTTO S.M.; SCHENKEL E.P.; FRODE T.S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry** v.104, p.1097–1105, 2007.

BERCACCI L.C, SCOTT M.D.S, JUNQUEIRA N.T.V, PASSOS I.R.D.S, MELETTI L.M.M. *Passiflora edulis* Sims: The correct taxonomic way to cite the yellow fruit (and of others colors). *Revista Brasileira Fruit*. V.30, n.2, p.566-576, 2008.

BERG, T. A. **Iron Catalyzed Oxidation Chemistry from C-H bond Activation to DNA Cleavage**. Tese de Doutorado. Faculdade de Matemática e Ciências Naturais, Universidade de Groningen, 2008.

BERTOLI C., SKOTHEIM J.M., DE BRUIN R.A.M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature*, v.14, p. 518-528, 2013.

BISO F.I. Avaliação da atividade mutagênica e fitoestrogênica das plantas *Davilla nitida* Vahl e *Davilla elliptica* St. Hil (Dilleniaceae). Dissertação de Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicadas a Farmácia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2014 ACD/Labs).

CAO M.R, LI Q., LIU Z.L., LIU H.H, WANG W. , LIAO X.L , PAN Y.L., JIANG J.W. Harmine induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial signaling pathway. **Hepatobiliary & Pancreatic diseases international**, v.10, n.6, pag. 599–604, 2011.

CARRILHO E., TAVARES M.C.H., LANÇAS F.M. Fluidos supercríticos em química analítica. i. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. **Química Nova** v.24 n.4, 2001.

CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F.; BRUN, G.W.; ALMEIDA, D.E.; COGOI, L.; FERRARO, G.; FILIP, R. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Food Engineering**, v.100, p.656-661, 2010.

CHAABANE W., USER S.D., EL-GAZZAH M., JAKSIK R., SAJJADI E., WOLNY J.R., ŁOS M.J. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and

Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v.61, p.43–58, 2013.

CHEN L.M., LIU J., CHEN J.C., SHI S., TAN C.P., ZHENG K.C., JI L.N. Experimental and theoretical studies on the DNA-binding and spectral properties of water-soluble complex [Ru(MeIm)₄(dpq)]²⁺. **Journal of Molecular Structure**, v.881, p.156–166, 2008.

CHEN Z., CAO R., SHI B., GUO L., SUN J., MA Q., FAN W., SONG H. Synthesis and biological evaluation of 1,9-disubstituted b-carbolines as potente DNA intercalating and cytotoxic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, p.5127-5137, 2011.

CLARKSON B.D., BURCHENAL J.H. Preliminary screening of antineoplastic drugs, *Progress in Clinical Cancer*, v.1, p.625–629, 1965.

COZZI P. The discovery of a new potential anticancer drug: a case history. **Il Farmaco**. v.58(3), p.213-220, 2003.

CROCHEMORE M.L.; MOLINARI H.B.; STENZEL N.M.C. Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). **Rev. Bras. Frutic.**, v.25(1), p.5-10, Abril 2003.

DA SILVA T.H.A, BUTERA A.P, LEAL D.H.S, ALVES R.J. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese – Modelos farmacológicos para inibidores da integrina $\alpha\beta 3$. *Revesta Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 433, n. 1, p. 1-16. 2007.

DASIKA G.K, LIN S.C.J, ZHAO S., SUNG P., TOMKINSON A., LEE E.Y.H.P. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. **Oncogene**, v.18, p.7883-7899, 1999.

DE NEIRA C.M. The effects of yellow passion fruit, *Passiflora edulis* flavicarpa, phytochemicals on cell cycle arrest and apoptosis of Leukemia Lymphoma MOLT-4 cell line. Thesis, University of Florida, Degree of Master of Science, 2003.

DE OLIVEIRA L.B.O., GOMES C.F., BAMPI V., RHEINGANTZ M.G., VITTALLE M.A.L.S. Angiogênese e Tumorigênese: Onde ocorre a intersecção e as possibilidades de terapias. Rio Grande, v.22, n.2, p.11-22, 2010.

DEVAKI K.; GOVINDRAJ U.B.; SUNITHA M.; GOPALAKRISHNAN V.K. Hypoglycemic activity of *Passiflora edulis* Sims leaf extract in wister albino rats. **International Research Journal of Pharmacy**, v.2 (9), p.170-172, 2011.

DEVI P.U. Basics of Carcinogenesis. **Health Administrator**, v. XVII, n.1, p.16-24, 2001.

DEWSON G., KLUCK R.M. Mechanisms by Bak and Bax permeabilise mitochondria durant apoptosis. **Journal of Cell Science**, v.122, p. 2801-2808, 2009.

DHAWAN K., DHAWAN S., SHARMA A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.1-23, 2004.

DU W., WANG B., LI Z. Interaction of harmine with oligonucleotide d(GTGCAC). **Thermochimica Acta**, v.416, p. 59-63, 2004.

ELMORE S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v.35, p. 495-516, 2007.

FARIAS M.S. Modulação do ciclo redox e potencialização seletiva do efeito antitumoral de derivados de 1,4 Naftoquinonas em associação ao Ascorbato de sódio. Relatório para Exame de Qualificação de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Formulário de Fitoterápicos. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1ª edição, p. 45-47, 2011.

FELIPE B.K. Estudo do efeito antitumoral do extrato bruto e frações de *Casearia sylvestris*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

FELIPE B.K. Estudo do mecanismo de ação antiproliferativa e antitumoral de extratos de fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

FOSTER. D.A, YELLEN P. XU L., SAQCENA M. Regulation of G1 cell cycle progression: Distinguishing the restriction point from a nutrient-sensing cell growth checkpoint(s). **Genes and Cancer**, v.1, n.11, p. 1124-1131, 2011.

FRESHNEY, R. I. Freshney's Culture of animal cell – a multimedia guide. New York, CD-ROM, 1999.

GIALELI C.; THEOCHARIS A.D.; KARAMANOS N.K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. **The FEBS Journal**, v.278, p.16–27, 2011.

GOEL M.K, KHANNA P., KISHORE J. Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. **Int J Ayurveda Res.**, v.1 (4), p.274–278, 2010.

GOLIAS C.H., CHARALABOPOULOS A., CHARALABOPOULOS K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. **Int J Clin Pract**, v.58, n.12, p.1134–1141, 2004.

GÓMEZ A.M.A.; MAYA W.C.; FORERO J.; CADAVID A.P. Human Spermicidal Activity of *Passiflora edulis* Extract. **Journal of Reproduction & Contraception**, v.21 (2), p.95-100, 2010.

GOWDA K.R.S., MATHEW B.B., SUDHAMANI C.N, NAIK H.S.B. Mechanism of DNA Binging and Cleavage. **Biomedicine and Biotechnology**, v.2, n.1, p.1-9, 2014.

GÜNTHER T.M.F. Atividade antitumoral das associações de Vitamina C com Vitamina K3 microencapsuladas ou com Ortovanadato de sódio. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina , 2011.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; KUMAR, R.S.; SIVAKUMAR, T.; VAMSI, M.L. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich Ascites Carcinoma in Swiss Albino Mice. **Journal Pharmacological Sciences**, v. 94, p. 177-184, 2004.

HELLER D.P., GREENSTOCK C.L. Fluorescence lifetime analysis of DNA intercalated ethidium bromide and quenching by free dye. **Biophysical Chemistry**, v.50, p.305-312, 1994.

HERRERO M.; MENDIOLA J.A.; CIFUENTES A.; IBÁÑEZ E. Review: Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, p.01–17, 2009.

HURLEY L.H., 2002. DNA and its associated processes as targets for Cancer therapy. **Macmillan Magazines Ltd**,v.2, p. 188-200, 2002.

INCA - Ministério da Saúde. Câncer. **Available at:** <<http://www.inca.gov.br>>. **Accessed on: November, 2014.**

INGALE A.G.; HIVRALE A.U. Pharmacological studies of *Passiflora* sp. and their bioactive compounds. **African Journal of Plant Science**, v.4 (10), p. 417-426, October, 2010.

JAKÓBISIAK, M.; LASEK W.; GOLAB J. Natural mechanisms protecting against cancer. **Immunology Letters**, v.90 (2-3), p.103-22, 2003.

JENDIROBA D.B.; KLOSTERGAARD J.; KEYHANI, A.;PAGLIARO L.; FREIREICH E. J. Effective cytotoxicity against human leukemias and chemotherapeutic-resistant leukemia cell lines by N-N-dimethylsphingosine. **Leukemia Research**, v.26, p.301-310, 2002.

KASTAN M.B., BARTEK J. Cell-cycle checkpoints and câncer. **Nature**, v.432, n.18, p.316-323, 2004.

KELLY, J.M. Et al. A study of the interactions of some polypyridylruthenium(I) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. **Nucleic Acids Research**, v. 13, p. 6017-6034, 1985.

KVIECINSKI M.R., PEDROSA R.C., FELIPE K.B., FARIAS M.S., GLORIEUX C., VALENZUELA M., SID B., BENITES J., VALDERRAMA J.A., VERRAX J., CALDERON P.B. Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.421, p.268–273, 2012.

KVIECINSKI, M. R.; BENELLI, P.; FELIPE, K. B.; CORREIA, J. F. G.; PICH, C. T.; FERREIRA, S. R. S.; PEDROSA, R.C. SFE from *Bidens pilosa* Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetilenes with antitumor activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v.56, p. 243 – 248, 2011.

KVIECINSKI, M. R.; BETTEGA, K. F.; SCHOENFELDER, T.; WIESE, L. P. L.; ROSSI, M. H.; GONÇALVEZ, E.; FELICIO, J.D.; WILHELM, D. F.; PEDROSA, R. C. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v.117, p.69-75, 2008.

LAM S.K.; Ng T.B. Passiflin, a novel dimeric antifungal protein from seeds of the passion fruit. **Phytomedicine**, v.16, p.172–180, 2009.

LIANG Y., LIU J., FENG Z. The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. **Cell & Bioscience**, v.3, n.9, p. 1-10, 2013.

MACHADO L.L.; MONTE F.J.Q.; Da CONCEIÇÃO M.; De OLIVEIRA F.; De MATTOS M.C.; LEMOS T.L.G. Bioreduction of

aromatic aldehydes and ketones by fruits' barks of *Passiflora edulis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.54, p.130–133, 2008.

MANCIN, F. Et al. Artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, p. 2540–2548, 2005.

MANS D.R.A., DA ROCHA A.B., SCHWARTSMANN G. Anti-Câncer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Câncer Compounds. **The Oncologist**, v.5, p.185-198, 2000.

MARTINEZ J.D.; PARKER M.T.; FULTZ K.E.; IGNATENKO N.A.; GERNER. E.W. Molecular Biology of Cancer. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, Ed. 6, v.5, ISBN 0-471-37031-2, 2003.

MATSUI Y.; SUGIYAMA K.; KAMEI M.; TAKAHASHI T.; SUZUKI T.; KATAGATA Y.; ITO T. Extract of Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seed Containing High Amounts of Piceatannol Inhibits Melanogenesis and Promotes Collagen Synthesis. **J. Agric. Food Chem.**, v.58, p.11112–11118, 2010.

McGAHON, A. J.; MARTIN, S. M.; BISSONNETTE, R. P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R. J.; NISHIOKA, W. K.; GREEN, D. R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods in Cell Biology**, v.46, p.153-185, 1995.

MICHIELIN E.M.Z., WIESE L.P.L., FERREIRA E.A., PEDROSA R.C., FERREIRA S.R.S. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods. **J. Supercritical Fluids**, v.56 (1), p.89–96, 2011.

MICIE V., NOVAKOVIC D., LEPOJEVIC Ž., JOTANOVIC M., PEJOVIC B., DUGIE P., PETROVIC Z. Supercritical fluid extraction with carbon dioxide at different pressures. **Contemporary Materials II**, v.1, p.84-87, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa | 2014 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014.

MONTANHER A.B.; ZUCOLOTTO S.M.; SCHENKEL E.P.; FRODE T.S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.281–288, 2007.

MORAES M.L.L.; VILEGAS J.H.Y.; LANÇAS F.M. Supercritical Fluid Extraction of Glycosylated Flavonoids from *Passiflora* leaves. **Phytochemical analysis**, v.8, p.257–260, 1997.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.16, p.55-63, 1983.

NAVARRO M.; CISNEROS F.E.J.; FERNANDEZ M.M.; ARRIECHE D.; MARCHAN E. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania uinine* of $[Cu(dppz)_2]BF_4$. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, n. 4, p. 364-369, 2003.

NOVÁK B., SIBLE J.C, TYSON J.J. Checkpoints in the Cell Cycle. **Encyclopedia of life sciences**, p.1-8, 2002.

OLIVEIRA D.A., ANGONESE M., FERREIRA S.R.S. Supercritical fluid extraction of passion fruit seeds and its processing residue (cake). III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids Cartagena de Indias (Colombia), 2013.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <<http://www.paho.org/bra/>>. Acesso em: Agosto, 2014.

OUYANG L., SHI Z., ZHAO S., WANG F.T., ZHOU T.T., LIU B., BAO J.K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Prolif.**, v.45, p. 487–498, 2012.

PACHECO F.A., PASCHOAL M.E.M., CARVALHO M.G.C. Marcadores tumorais no câncer de pulmão: um caminho para a terapia biológica. **J Pneumol.** v.28 (3), p.143-149, 2002.

PALCHAUDHURI R., HERGENROTHER P.J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. **Current Opinion in Biotechnology**, v.18, p.497-503, 2007.

PARISOTTO E.B., MICHIELIN E.M.Z., BISCARO F., FERREIRA S.R.S., WILHELM FILHO D., PEDROSA R.C. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenaceae* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. **J. of Supercritical Fluids**, v.61 , p.101-107 , 2012.

PARISSOTO E.B. Avaliação da atividade antitumoral do extrato bruto e supercrítico de *Cordia verbenacea*. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

PATEL S.S., SONI H., MISHRA K., SINGHAI A.K. Recent updates on the genus *Passiflora*: A review. **Int. J. Res. Phytochem. Pharmacol.**, v.1, n.1, p.1-16, 2011.

PELLICANO F., MUKHERJEE L., HOLYOAKE T.L. Concise Review: Cancer Cells Escape from Oncogene Addiction: Understanding the Mechanisms Behind Treatment Failure for More Effective Targeting. **Stem Cells**, v.32, p.1373–1379, 2014.

PEREIRA C.A M.; RODRIGUE T.R.; YARIWAKE J.H. Quantification of Harman Alkaloids in Sour Passion Fruit Pulp and Seeds by a Novel Dual SBSE-LC/Flu (Stir Bar Sorptive Extraction-Liquid Chromatography with Fluorescence Detector) Method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 8, p.1472-1483, 2014.

PRADELLI A.L., BÉNÉTEAU M. Mitochondrial control of caspases-dependent and independent cell death. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.67, p. 1589-1597, 2010.

PURICELLI L.; DELL'AIC I.; SARTOR L.; GARBIS S.; CANIATO R. Preliminary evaluation of inhibition of matrix-metalloprotease MMP-2

e MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P. foetida* aqueous extracts. **Fitoterapia**, v. 74; p. 302-304, 2003.

REBELLO B.M.; MORENO S.R.F.; GODINHO C.R.; NEVES R.F.; FONSECA A.S.; BERNARDO-FILHO M.; MEDEIROS A.C. Effects of *Passiflora edulis* flavicarpa on the radiolabeling of blood constituents, morphology of red blood cells and on the biodistribution of sodium pertechnetate in rats. **Applied Radiation and Isotopes**, v.66, p.1788–1792, 2008.

RIVOIRE W.A., CORLETA H.V.E., BRUM I.S., CAPP E. Biologia molecular do câncer cervical. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.** V.6 (4), p. 447-451, 2006.

RODRIGUES T.R. Estudo de alcaloides harmônicos em sementes de *Passiflora edulis* Sims f. flavicarpa Degener (Maracujá Azedo) por SBSE/CLAE-Flu dual. Dissertação em Ciências, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2013.

ROWE C.A.; NANTZ M.P.; De NIERA C.; GREEN K.; TALCOTT S.T.; PERCIVAL S.S. Inhibition of Neoplastic Transformation of Benzo[α]pyrene-Treated BALB/c 3T3 Murine Cells by a Phytochemical Extract of Passionfruit Juice. **Journal of medicinal food. J Med Food**, v.7 (4), p.402–407, 2004.

SANO S.; K. SUGIYAMA; ITO T.; KATANO Y.; ISHIHATA A. Identification of the Strong Vasorelaxing Substance Scirpusin B, a Dimer of Piceatannol, from Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.6209–6213, 2011.

SARKAR S., BHADRA K. Binding of alkaloid harmalol to DNA: Photophysical and calorimetric Approach. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.130, p.272–280, 2014.

SARKAR S., PANDYA P., BHADRA K. Sequence Specific Binding of Beta Carboline Alkaloid Harmalol with Deoxyribonucleotides: Binding

Heterogeneity, Conformational, Thermodynamic and Cytotoxic Aspects. **Plos One**, v.9 (9), p. 1-14, 2014.

SATO A.C.; ANDRADE S.A.; BRITO M.V.; MIRANDA A.; SAMPAIO M.U.; MAFFEI F.H.A.; OLIVA M.L.V. Effects of Compounds from *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Juice on Blood Coagulation and on Proteolytic Enzymes. **Protein & Peptide Letters**, v.19, p.501-508, 2012.

SILVA D.C.; FREITAS A.L.P.; BARROSA F.C.N.; LINS K.O.A.L.; ALVES A.P.N.N.; ALENCAR N.M.N., De FIGUEIREDO I.S.T., PESSOA C., De MORAES M.O., LOTUFO L.V.C.; FEITOSA J.P.A.; MACIEL J.S.; De PAULA R.C.M. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.139– 145, 2012.

SILVA D.C.; FREITAS A.L.P.; PESSOA C.D.S.; MESQUITA J.X.; LEAL L.K.A.M.; BRITO G.A.C.; GONÇALVES D.O.; VIANA G.S.B. Pectin from *Passiflora edulis* Shows Anti-inflammatory Action as well as Hypoglycemic and Hypotriglyceridemic Properties in Diabetic Rats. **Journal of medicinal food. J Med Food**, v.14 (10), p.1118–1126, 2011.

SILVEIRA, V.C. Investigação da Atividade Biológica de Complexos de Cobre (II) com Ligantes Inspirados em Biomoléculas. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, 2008.

SILVERSTEIN R.M., WEBSTER F.X., KIEMLE D. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 7th Edition, John Wiley, New York, 2005.

SOTO, A.M.; SONNENSCHNIG, C. The somatic mutation theory of Cancer: growing problems with the paradigm?. **Bioassays**, v.26, p.1097-1107, 2004.

SREEDHARA A.; COWAN J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.4, p.337-347, 2001.

STROBER W. Common immunologic techniques: Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in immunology**. V.3, pag. 1-2, 1996.

SUN Y., PENG T., ZHAO L., JIANG D., CUI Y. Studies of interaction between two alkaloids and double helix DNA. **Journal of Luminescence**, v.156, p.108–115, 2014.

VERMEULEN K., VAN BOCKSTAELE D.R., BERNEMAN Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v.36, p.131–149, 2003.

VOGEL A. I. Análise Orgânica Qualitativa. v.2, 2 ed. Ao Livro Técnico S.A. Rio de Janeiro - RJ. 1983.

WAGNER H., BLADT S. Plant Drug Analysis – A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer, 2º Ed. 1996.

WANG Z.B., LIU Y.Q., CUI Y.F. Pathways to caspase activation. **Cell Biology International**, v.29, p.489-496, 2005.

ZERAIK M.L., PEREIRA C.A M, ZUIN V.G., YARIWAKE J.H. Maracujá: um alimento funcional?. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.3, p.459-471, 2010.

ZERAIK M.L.; SERTEYN D.; DUPONT G.D; WAUTERS J.N.; TITS M.; YARIWAKE J.H.; ANGENOT L.; FRANCK T. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. **Food Chemistry**, v.128, p.259–265, 2011.

ZETZL C., BRUNNER G., MEIRELES M.A.A. Standardized low-cost batch SFE-units for university education and comparative research, in:

Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids, Versailles, 2003.

ZHANG S.; ZHU Y.; TU C.; WEI H.; YANG Z.; LIN L.; DING J.; ZHANG J.; GUO Z. A novel cytotoxic ternary copper(II) complex of 1,10-phenanthroline and lthreonine with DNA nuclease activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98(12), p.2099-2106, 2004.

ZHAO L., WINK. M. The β -carboline alkaloid harmine inhibits telomerase activity of MCF-7 cells by down-regulating hTERT mRNA expression accompanied by an accelerated senescent phenotype. **PeerJ** 1:e174; DOI 10.7717/peerj.174.

ZUIN V.G.; YARIWAKE J.H.; BICCHI C. Fast supercritical fluid extraction and high-resolution gas chromatography with electron-capture and flame photometric detection for multiresidue screening of organochlorine and organophosphorus pesticides in Brazil's medicinal plants. **Journal of Chromatography A**, v.985, p.159–166, 2003.