

Julheli Rohrbeck Girardelo

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DOS
FRUTOS E SEMENTES DE *Eugenia involucrata* DC.
(CEREJEIRA-DO-RIO-GRANDE) E DOS FRUTOS DE
DIFERENTES GENÓTIPOS DE *Rubus* spp. (AMOREIRA
PRETA).**

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Greicy
Michelle Marafígia Conterato.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Evelyn
Winter da Silva.

Florianópolis
2019

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

Girardelo, Julheli Rohrbeck
Potencial antioxidante e antitumoral dos frutos
e sementes de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira
rio-grande) e dos frutos de diferentes genótipos de
Rubus spp. (Amoreira-preta). / Julheli Rohrbeck
Girardelo ; orientador, Greicy Michelle Marafiga
Conterato, coorientador, Evelyn Winter da Silva,
2019.
145 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Antioxidante.. 3. Antitumoral..
4. Amora-preta.. 5. Cerejeira-do-rio-grande.. I.
Conterato, Greicy Michelle Marafiga . II. da Silva,
Evelyn Winter. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV.
Título.

Julheli Rohrbeck Girardelo

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DOS
FRUTOS E SEMENTES DE *Eugenia involucrata* DC.
(CEREJEIRA-DO-RIO-GRANDE) E DOS FRUTOS DE
DIFERENTES GENÓTIPOS DE *Rubus* spp. (AMOREIRA
PRETA).**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Farmácia” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Florianópolis, 04 de Fevereiro de 2019.

Prof. Elenara Lemos Senna, Dra.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Evelyn Winter da Silva, Dra.
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Maique Weber Biavatti, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Claudriana Locatelli, Dra.
Universidade do Oeste de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me conceder saúde e sabedoria para a execução desse passo na vida acadêmica. Pela proteção em todas as idas e vindas realizadas até Florianópolis e Curitiba.

Agradecer aos meus pais pelo apoio durante essa jornada, pela compreensão diante da minha ausência como filha para que esse trabalho pudesse ser realizado. Ao meu namorado, também pela compreensão e paciência frente a distância.

Às minhas orientadoras, Greicy e Evelyn, as quais contribuíram sem medida para meu aprendizado. Agradeço por cada orientação, correção e contribuição durante as disciplinas, projeto de pesquisa, dissertação e artigos. Cada uma contribuiu na parte técnica científica, sem esquecer do lado humano, muitas vezes por outros negligenciado. Vocês foram excelentes! Muito obrigada!

Aos meus empregadores pela liberação e possibilidade de compensar as horas que precisaram ser dedicadas ao mestrado. É preciso lembrar também dos colegas de mestrado e de laboratório... A todos da equipe do Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal (LAFRA) da Universidade Federal de Santa Catarina, campus de Curitiba, Professores Dr. Cristian Soldi e Dr. Luciano Picolotto e colegas André, Eduarda, Júlio, Gustavo, Luziane e Ana. Muito obrigada a todos vocês pela ajuda nas análises e troca de conhecimento gerada em virtude dos projetos executados de forma compartilhada. Ao colega Sebastião pelo fornecimento das amoras. A todos da Central de Cromatografia (CentralCrom) da UFSC, campus de Florianópolis, especialmente ao Professor Dr. Flávio Reginatto e ao Dr. Vitor Chaves que colaboraram imensamente nas análises de caracterização anticôncica das espécies. A todo Grupo de Estudos de Interação entre Micro e Macromoléculas (GEIMM), principalmente a prof. Dra. Tania B. C. Pasa por ceder as células usadas nesse estudo, bem como os equipamentos para as análises de fluorescência. Às professoras Dra. Claudriana Locatelli, Dra. Maique W. Biavatti e Dra. Tania B. C. Pasa por terem aceitado o convite para a banca de avaliação deste trabalho. É preciso agradecer também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo auxílio financeiro concedido a este projeto.

Por fim, este trabalho é resultado de muitas mãos que acreditam que o conhecimento pode transformar a vida das pessoas. A todos os que acreditaram junto comigo no propósito deste trabalho, meu muito obrigada!

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.” (Albert Einstein, 1879 – 1955)

RESUMO

O estresse oxidativo está envolvido nos mecanismos e na progressão das doenças tumorais. Neste sentido, duas espécies cultivadas na região Sul do Brasil, a *Eugenia involucrata* DC. e *Rubus* spp., podem representar alternativas para a prevenção e/ou tratamento dessas patologias, pois são fontes de compostos bioativos, além do fato da *Rubus* spp. ser alvo de programas de melhoramento genético. Esse estudo avaliou a atividade antioxidante e antitumoral *in vitro* dos frutos e sementes de *E. involucrata* e dos frutos de cinco genótipos de *Rubus* spp. O extrato dos frutos de *E. involucrata* extraído à 50°C (P50), recuperou um teor de antocianinas 84,3% maior em relação ao extraído a 26°C (P26), mas não resultou em diferença qualitativa dos componentes antociânicos identificados, cuja antocianina majoritária foi a cianidina-3-*O*-glicosídeo. Os extratos de sementes apresentaram maior teor de fenólicos totais em relação aos respectivos extratos da polpa, com aumento de 15x para S26 vs P26 e de 4x para S50 vs P50, além de maior atividade antioxidante por FRAP. Somente o extrato S50 apresentou maior teor de flavonoides totais (67x maior em relação ao P50 e 4x maior em relação ao S26 e P26) e exerceu citotoxicidade (CC50 712 µg.mL⁻¹) em linhagem tumoral de câncer de pâncreas (PANC-1), induzindo estresse oxidativo e morte celular por apoptose e necrose. Em relação aos extratos dos frutos de *Rubus* spp., observou-se que a acidificação resultou em diferentes perfis de antocianinas, mantendo-se a cianidina-3-*O*-glicosídeo como majoritária. Os extratos acidificados apresentaram um aumento na concentração de antocianinas para Xavante (1,7x), *Black* 145 (1,8x) e *Black* 178 (1,7x) e maior atividade sequestrante do radical DPPH para Xavante, *Black* 178, Tupy e Xingu em relação aos respectivos extratos não acidificados. Independentemente da acidificação, a cultivar Xavante apresentou maior teor de compostos fenólicos e antocianinas, e maior potencial antioxidante (FRAP) em relação aos demais genótipos. Nenhum dos genótipos de *Rubus* spp. apresentou atividade antitumoral em linhagem tumoral PANC-1. Os dados indicam que o melhoramento genético de *Rubus* spp. parece não alterar o teor de compostos bioativos e a atividade biológica das seleções avançadas (*Black* 145 e *Black* 178) em relação às cultivares (Xavante, Xingu, Tupy). Além disso, evidenciam pela primeira vez, o potencial antitumoral das sementes de *E. involucrata*, cujos mecanismos e compostos envolvidos necessitam ser melhor elucidados.

Palavras-chave: Antioxidante. Antitumoral. Amora-preta. Cereja-do-rio-grande.

ABSTRACT

Oxidative stress has been involved in the mechanisms and progression of tumor diseases. In this sense, two native species cultivated to the southern region of Brazil, *Eugenia involucrata* DC. and *Rubus* spp., may constitute alternatives for the prevention and/or the treatment of these pathologies, since they are sources of bioactive compounds, besides the fact of *Rubus* spp. be targeted for breeding programs. This study evaluated the antioxidant and antitumor activity in vitro of fruits and seeds of *E. involucrata* and fruits of five genotypes of *Rubus* spp. The extracts from *E. involucrata* fruits extracted at 50°C (P50), recovered an anthocyanin content 84.3% higher than that extracted at 26°C (P26), but did not result in a qualitative difference of the anthocyanin components identified, whose major anthocyanin was cyanidin-3-O-glycoside. Seed extracts had a higher total phenol content in relation to the respective pulp extracts, with an increase of 15x for S26 vs P26 and 4x for S50 vs P50, in addition to a higher antioxidant activity by FRAP. Only the S50 extract had a higher total flavonoid content (67x higher than P50 and 4x higher than S26 and P26) and exerted cytotoxicity (CC₅₀ 712 µg.mL⁻¹) in a pancreatic cancer tumor strain (PANC-1), inducing oxidative stress and cell death by apoptosis and necrosis. In relation to the extracts of the fruits of *Rubus* spp., it was observed that the acidification resulted in different anthocyanin profiles, maintaining cyanidin-3-O-glycoside as the majority. The acidified extracts showed an increase in the concentration of anthocyanins for Xavante (1.7x), Black 145 (1.8x) and Black 178 (1.7x) and greater sequestering activity of the DPPH radical for Xavante, Black 178, Tupy and Xingu in relation to the respective non-acidified extracts. Regardless of the acidification, the cultivar Xavante showed higher content of phenolic compounds and anthocyanins, and higher antioxidant potential (FRAP) in relation to the other genotypes. None of the genotypes of *Rubus* spp. presented anti-tumor activity in PANC-1 tumoral lineage. The data indicate that the genetic improvement of *Rubus* spp. (*Black 145* and *Black 178*) in relation to the cultivars (*Xavante*, *Xingu*, *Tupy*), did not alter the bioactive compounds content and the biological activity of the advanced selections. In addition, they evidence for the first time, the antitumor potential of *E. involucrata* seeds, whose mechanisms and compounds involved need to be better elucidated.

Keywords: Antioxidant. Antitumoral. *Blackberry*. *Cherry-of-rio-grande*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema antioxidante enzimático.	26
Figura 2 - Estrutura básica dos flavonóis.	31
Figura 3 - Estrutura e nome das principais antocianinas encontradas em alimentos.	32
Figura 4 - Morfologia da <i>Eugenia involucrata</i> DC.	35
Figura 5 - Frutos da <i>Eugenia involucrata</i> DC (A). Parte interna dos frutos (B).	36
Figura 6 - Morfologia da <i>Rubus</i> spp. (Amoreira- preta).	39
Figura 7 - Cultivar Tupy (na esquerda), fruto da cultivar Tupy (na direita).	40
Figura 8 - Cultivar Xingu (na esquerda), fruto do cultivar Xingu (na direita).	41
Figura 9 - Cultivar Xavante (na esquerda), fruto da cultivar Xavante (na direita).	41
Figura 10 - Seleção avançada <i>Black</i> 145 (superior à esquerda e à direita) e <i>Black</i> 178 (inferior à esquerda e à direita).	42
Figura 11 - Esquema do desenho experimental.	47
Figura 12 - Quantificação de Compostos Bioativos. (A) Fenólicos totais, (B) Flavonoides e em (C) Antocianinas Monoméricas Totais (AMT) nos extratos de <i>E. involucrata</i>	66
Figura 13 - Atividade antioxidante redutora de ferro (FRAP) nos extratos de fruto e de semente de <i>E. involucrata</i>	73
Figura 14 - Atividade sequestrante do radical DPPH dos extratos do fruto e semente de <i>E. involucrata</i>	74
Figura 15 - CE50 dos extratos de <i>E. involucrata</i> determinada para o método de sequestro do radical DPPH.	75
Figura 16 - Determinação de atividade tipo SOD para os extratos da polpa de <i>E. involucrata</i>	77
Figura 17 - Citotoxicidade dos extratos da polpa e semente de <i>E. involucrata</i> em linhagem tumoral PANC-1 após 72 h de exposição. ...	78
Figura 18 - Curva sigmóide de concentração-resposta (Plot de Hill) para o extrato S50.	79
Figura 19 - Comparação da citotoxicidade do extrato de semente (S50) em linhagem tumoral (PANC-1) e não tumoral (HUVEC) após 72h de incubação.	80
Figura 20 - Avaliação do tipo de morte celular em células tumorais pancreáticas nos dois grupos avaliados Controle e exposto ao S50 (A).	81

Figura 21 – Efeito do extrato S50 sobre o potencial de membrana mitocondrial através de sonda catiônica lipofílica fluorocromo JC-1...	82
Figura 22 – Avaliação de espécies reativas de oxigênio (EROS), tióis totais, peroxidação lipídica (TBARS) e atividade de enzimas antioxidantes em células PANC-1 após 24 h de exposição ao extrato S50.	85
Figura 23 - Efeito da acidificação do extrato sobre o teor de fenólicos totais (A) e de antocianinas monoméricas totais (B) para cada genótipo de <i>Rubus</i> spp.....	88
Figura 24 – Efeito do genótipo sobre o teor de fenólicos totais entre os extratos acidificados (A) e não acidificados (B) e de antocianinas monoméricas totais entre os extratos acidificados (C) e não acidificados (D) de <i>Rubus</i> spp.....	91
Figura 25 - Atividade antioxidante redutora de ferro (FRAP). Efeito da acidificação dos extratos sobre a atividade antioxidante de cada genótipo de <i>Rubus</i> spp.....	103
Figura 26 - Efeito da acidificação do extrato sobre a atividade sequestrante do radical DPPH para os genótipos (A) Tupy, (B) Xavante e (C) Xingu e seleções (D) <i>Black</i> 145 e (E) <i>Black</i> 178.....	104
Figura 27 - Atividade sequestrante do radical DPPH entre os extratos acidificados (A) e os extratos não acidificados (B) dos cinco diferentes genótipos.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG - Ácido Gálico
AMT - Antocianinas Monoméricas Totais
BE - Brometo de Etídio
CAT - Catalase
CBA (s) – Composto (s) Bioativo (s)
CC50 - Concentração Citotóxica para 50% das Células
CDNB - 2,4-dinitroclorobenzeno
CE50 - Quantidade mínima do extrato capaz de reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH
cv (s). - Cultivar (es)
CLUE/DAD – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Detector de arranjo de diodos
DAD - Detector de arranjo de diodos
DCNT - Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DCF - Diclorofluoresceína
DCFH-DA - 2',7'-diclorofluoresceína
DMEM/F12 - Meio de cultura *Dulbecco Modified Eagles's Medium* F12
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
DPPH - Difenil-picril-hidrazila
DPTA - Ácido dietilenotriaminopentaacético
DTNB - Ácido 5,5'-ditio-bis-2- nitrobenzóico ou Reagente de Ellman
EAG - Equivalente de Ácido Gálico
EC3G - Equivalente de Cianidina-3-O-glicosídeo
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERs - Espécies Reativas
EQ - Equivalente de Quercetina
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
ET - Equivalente de Trolox
FRAP - Atividade Redutora de Ferro
GPx - Glutaciona Peroxidase
GR - Glutaciona Redutase
GSH - Glutaciona reduzida
GSSH - Glutaciona oxidada ou dissulfeto da glutaciona
GST (s) – Glutaciona (s) S Transferase (s)
HUVEC - Linhagem celular endotelial de veia umbilical humana
IS - Índice de Seletividade
JC-1 - Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

LA - Laranja de acridina
LAFRA - Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal da
Universidade Federal de Santa Catarina (Campus de Curitibanos)
m/z [M]⁺ - Relação massa/carga
NADP⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidado
NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reduzido
NI - Não identificado
PANC-1 - Linhagem celular tumoral de adenocarcinoma de pâncreas
humana
PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RFC - Reagente Folin-Ciocalteu
RL - Radicais Livres
SBF - Soro Bovino Fetal
SOD - Superóxido Dismutase
TBA - Ácido Tiobarbitúrico
TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA - Ácido Tricloroacético
TPTZ - 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
TR - Tempo de Retenção
UV - Ultra Violeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO BILIOGRÁFICA	23
2.1	ESPÉCIES REATIVAS.....	23
2.2	ANTIOXIDANTES	23
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO E O CÂNCER.....	27
2.4	COMPOSTOS BIOATIVOS: Estruturas e propriedades químicas e biológicas.....	30
2.5	<i>Eugenia involucrata</i> DC.....	34
2.5.1	Composição Fitoquímica.....	36
2.6	<i>Rubus</i> spp.....	37
2.6.1	Melhoramento genético de plantas frutíferas.....	39
2.6.2	Cultivar Tupy.....	40
2.6.3	Cultivar Xingu.....	40
2.6.4	Cultivar Xavante.....	41
2.6.5	Cultivar <i>Black 145</i> e <i>Black 178</i>	42
2.6.6	Composição Fitoquímica.....	42
3	OBJETIVOS	45
3.1	Objetivo geral	45
3.2	Objetivos específicos	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	DESENHO EXPERIMENTAL	47
4.2	REAGENTES	48
4.3	MATERIAL VEGETAL	49
4.4	PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS	49
4.4.1	Extratos de <i>E. involucrata</i>	49
4.4.2	Extratos de <i>Rubus</i> spp.	50
4.5	DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS	51
4.5.1	Fenólicos Totais.....	51
4.5.2	Flavonoides	51
4.5.3	Antocianinas Totais Monoméricas	52
4.5.4	Identificação das antocianinas por LC-MS	52
4.6	INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE....	53
4.6.1	Atividade redutora de ferro	53
4.6.2	Atividade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila	54
4.6.3	Atividade sequestrante do radical hidroxil.....	54
4.6.4	Atividade de remoção do radical superóxido	55
4.6.5	Atividade de remoção do peróxido de hidrogênio.....	55
4.6.6	Atividade protetora contra a oxidação da glutatona	56

4.7	INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL	56
4.7.1	Cultura Celular	56
4.7.2	Viabilidade Celular	57
4.7.3	Avaliação do tipo de Morte Celular por Microscopia de Fluorescência	58
4.7.4	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	58
4.7.5	Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio.....	59
4.7.6	Preparo dos extratos celulares para avaliação dos mecanismos de citotoxicidade	59
4.7.7	Dosagem de proteínas	60
4.7.8	Tióis totais (T-SH).....	60
4.7.9	Catalase intracelular (CAT).....	60
4.7.10	Superóxido dismutase intracelular (SOD)	61
4.7.11	Glutaciona peroxidase intracelular (GPx).....	61
4.7.12	Glutaciona redutase intracelular (GR).....	62
4.7.13	Glutaciona S transferase intracelular (GST)	62
4.7.14	Avaliação da peroxidação lipídica	63
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	<i>Eugenia involucrata</i>	65
5.1.1	Compostos Bioativos	65
5.1.2	Identificação das antocianinas	69
5.1.3	Atividade antioxidante.....	72
5.1.4	Avaliação da citotoxicidade e morte celular dos extratos	78
5.1.5	Avaliação dos efeitos celulares relacionados à exposição	84
5.2	<i>Rubus</i> spp.	87
5.2.1	Compostos Bioativos	88
5.2.2	Identificação das antocianinas	94
5.2.3	Atividade antioxidante: Potencial redutor de ferro (FRAP) e sequestrante (DPPH).....	101
5.2.4	Avaliação da citotoxicidade do extrato.....	107
6	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	111
	APÊNDICE A – Perfil de compostos antociânicos de <i>E. involucrata</i> . Detecção – PDA (520 nm)	142
	APÊNDICE B – Espectro UV/Vis da antocianina majoritária dos frutos de <i>E. involucrata</i> - Cianidina-3-O-glicosídeo.....	143
	APÊNDICE C – Espectro demonstrando a fragmentação da cianidina-3-O-glicosídeo, ou seja, perdendo 162 daltons	

resultante da perda de glicose com a consequente detecção da aglicona livre (m/z 287).....	144
APÊNDICE D – Detecção por espectrometria de massas - Cromatograma dos íons extraídos dos extratos dos frutos de <i>E. involucrata</i> (P26 e P50).....	145

1 INTRODUÇÃO

O Brasil detém a maior flora do mundo e consequentemente, inúmeras oportunidades para a descoberta de espécies vegetais ricas em nutrientes e em compostos bioativos, os quais podem ser utilizados para a prevenção e tratamento de doenças (INFANTE et al., 2016). Entretanto, apesar da vasta biodiversidade e de ocupar a terceira posição mundial no consumo de frutas, o país ainda abriga inúmeras espécies não catalogadas ou desconhecidas, ou ainda, plantas nativas cujas propriedades biológicas e composição não foram totalmente determinadas (JACQUES, 2012).

Paralelamente, as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são o problema de saúde de maior dimensão no Brasil e correspondem a cerca de 70% das causas de mortes (BRASIL, 2011). Entre essas doenças, o câncer é a principal causa de morte em muitos países, especialmente naqueles em desenvolvimento. Embora esses países tenham acesso limitado a novas terapias, eles têm acesso a alimentos que contêm compostos bioativos, os quais poderiam ser incentivados a fim de que o seu consumo pudesse prevenir e/ou combater o câncer (CHAREPALLI et al., 2016). Além do acesso limitado as terapias convencionais (sintéticas), há o agravamento destes apresentarem diversos efeitos colaterais, o que dificulta muitas vezes, a adesão dos pacientes (EPSTEIN et al., 2012). Adicionalmente, os antioxidantes de ocorrência natural são escolhidos em detrimento aos sintéticos, por não possuírem efeitos carcinogênicos e serem menos tóxicos as células normais (SECA; PINTO, 2018; KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Neste sentido, os produtos naturais tem sido a fonte mais promissora para o desenvolvimento de drogas, havendo interesse particular no desenvolvimento de novos antineoplásicos (HARVEY et al., 2008). Portanto, a investigação do potencial biológico de espécies frutíferas nativas e de seus metabólitos secundários pode representar uma excelente oportunidade para o desenvolvimento de alternativas dietéticas e farmacológicas na prevenção e tratamento das doenças tumorais e de outras DCNT.

Entre os principais fatores envolvidos nos efeitos benéficos dos compostos bioativos de plantas, estão as suas propriedades antioxidantes. Esses compostos (polifenóis, flavonoides e antocianinas), reagem com espécies reativas (ERs) produzidas pelo metabolismo celular, prevenindo assim, o estresse oxidativo, e consequentemente, o desenvolvimento e/ou a progressão de doenças relacionadas a esse processo, entre elas, o câncer (JACQUES, 2012). Nesse sentido, esses compostos têm sido investigados como potenciais alternativas de prevenção e/ou tratamento dessas

patologias, com menos efeitos colaterais em relação aos tratamentos convencionais atualmente utilizados (KRIS-ETHERTON et al., 2002; GORRINI; HARRIS; MAK, 2013; GUPTA et al., 2014).

Assim, o presente estudo selecionou duas espécies frutíferas para fins de elucidação do perfil fitoquímico e de avaliação de seu potencial biológico: a *Eugenia involucrata* DC (Myrtaceae), nativa do Sul do Brasil e conhecida popularmente como cerejeira-do-rio-grande; e a *Rubus* spp. (família Rosaceae), conhecida como amoreira-preta, uma espécie exótica inserida em programas de melhoramento genético no Brasil pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) desde a década de 70.

A *E. involucrata* é a espécie do gênero *Eugenia* L. menos conhecida e cujo potencial biológico de seus frutos tem sido pouco investigado por estudos científicos até o momento. Apenas recentemente, as atividades antioxidante e anti-inflamatória de seus frutos, sementes e folhas foram demonstradas *in vitro* (INFANTE et al., 2016). Além disso, os frutos da *E. involucrata* ainda são pouco conhecidos popularmente e por isso, pouco comercializados e consumidos. Por outro lado, a *Rubus* spp. encontra maior conhecimento e consumo popular, além de apresentar grande potencial econômico para a agricultura familiar, devido aos baixos custos de implantação e manutenção e à sua alta produtividade (FERREIRA; ROSSO; MERCADANTE, 2010). Apresenta propriedades nutracêuticas e as práticas de melhoramento genético para fins de sua melhor adaptação ao cultivo e consumo no Brasil podem também impactar em incrementos no teor de compostos bioativos de seus frutos e possivelmente, de seu potencial biológico (SOUZA et al, 2014a, EMBRAPA, 2002).

Assim, considerando fatores como a escassez de estudos sobre a *E. involucrata*, o possível impacto das estratégias de melhoramento genético sobre o teor e as atividades de compostos bioativos, bem como a necessidade de alternativas para as doenças tumorais sem os efeitos colaterais das terapias convencionais, esse estudo avaliará o potencial antioxidante e antitumoral da *E. involucrata* e de cinco diferentes genótipos de *Rubus* spp. *in vitro*.

2 REVISÃO BILIOGRÁFICA

2.1 ESPÉCIES REATIVAS

Espécies reativas (ERs) são designadas como moléculas muito reativas e altamente instáveis produzidas durante o metabolismo celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Quando essas espécies são derivadas do oxigênio, são denominadas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), dividindo-se em dois grupos: as radicalares (contendo elétron desemparelhado na última camada) - hidroxil (HO^{\bullet}), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxil (ROO^{\bullet}) e alcoxil (RO^{\bullet}) e as não-radicalares - oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO) (BIRBEN et al., 2012).

As ERs são continuamente geradas (IVANOV et al., 2017) na mitocôndria, a cadeia de transporte de elétrons, responsável por reduzir continuamente oxigênio e formar o potencial eletroquímico transmembrana de prótons para a síntese de ATP, tem uma importante consequência para as células: a constante produção de EROs (RONCHI, 2010). As ERs também são determinantes na sinalização intracelular, na regulação redox, no crescimento celular, na morte celular programada e na senescência, bem como, na produção de energia, fagocitose e síntese de substâncias biológicas importantes (NORDBERG; ARNÉR, 2001; BIRBEN et al., 2012; THANNICKAL; FANBURG, 2000). Por outro lado, as EROs também estão envolvidas em numerosas doenças, não por necessariamente desempenharem um papel na etiologia dos estados patológicos, mas por participarem diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e/ou as complicações presentes nesses processos (BIRBEN et al., 2012).

Portanto, a produção natural das EROs no metabolismo celular aeróbico deve ser controlada de forma a prevenir um aumento excessivo de suas concentrações intracelulares, bem como a ocorrência de lesões decorrentes do acúmulo de EROS (KEHRER; KLOTZ, 2015). Assim, as células desenvolveram mecanismos de proteção contra a produção excessiva das EROs e seus efeitos oxidativos sobre as biomoléculas, os quais em conjunto, compõem o sistema antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2.2 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável,

atrasa ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz (SIES; STAHL, 1995). Entretanto, um antioxidante pode atuar como protetor em determinado sistema, mas falhar na proteção, ou mesmo aumentar as lesões induzidas em outros sistemas (HALLIWELL et al., 1995; BIRBEN et al., 2012), uma vez que suas propriedades antioxidantes e pró-oxidantes dependem entre outros fatores, da concentração e da forma química com que se encontram no meio (CHAKRABORTHY et al., 2014; PÉREZ-TORRES; GUARNER-LANS; RUBIO-RUIZ, 2017).

Os diversos antioxidantes são classificados de acordo com o tipo de ação sobre as EROs, em **enzimáticos** e **não enzimáticos** (NORDBERG; ARNÉR, 2001). As moléculas antioxidantes também podem ser classificadas de acordo com o nível de atuação. Esses níveis abrangem a prevenção da formação dos radicais, a eliminação de radicais e reparo de danos induzidos por radicais. Com base na linha de defesa, os antioxidantes podem ser classificados como antioxidantes de defesa de primeira, segunda, terceira e quarta linha de defesa antioxidante (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

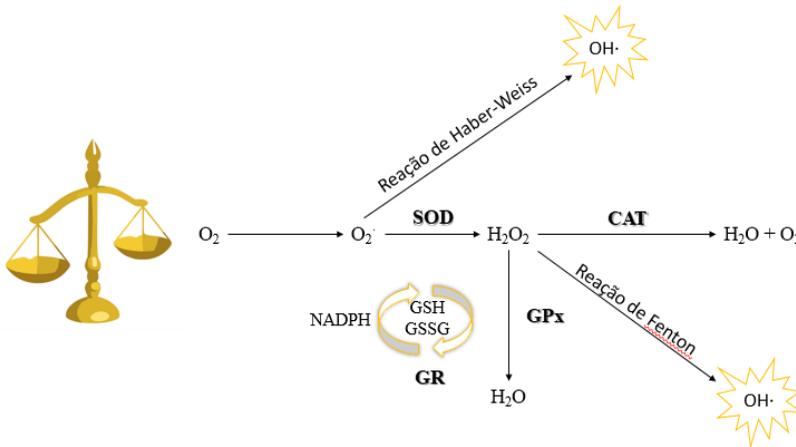
O sistema **enzimático** de defesa é considerado a primeira linha de defesa antioxidante e é formado por três enzimas chaves: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), as quais promovem reações que transformam espécies reativas em moléculas inofensivas (HALLIWELL; CROSS, 1994; IGHODARO; AKINLOYE, 2018) (Figura 1). A SOD é responsável pela conversão do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto que a CAT e a GPx estão envolvidas na conversão do H_2O_2 em H_2O , com a diferença de que a GPx requer a glutathione reduzida (GSH) nessa reação, a qual é convertida em sua forma oxidada (GSSG) (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Embora a função de CAT e GPx seja remover H_2O_2 , as duas enzimas diferem em sua afinidade por esse substrato. A GPx tem uma afinidade muito maior com o H_2O_2 em baixas concentrações ($K_m = 1 \mu M$) em comparação com a CAT ($K_m = 1,1 \text{ mM}$) (POWERS; LENON, 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Assim, quando os níveis celulares de H_2O_2 são baixos, a GPx é mais ativa do que a CAT na remoção de H_2O_2 da célula (POWERS; LENON, 1999). Ainda, a GPx é uma peroxidase, assim ela reduz H_2O_2 e outros substratos, sendo altamente específica quanto ao doador de elétron (GSH), mas pouco específica quanto a substratos, podendo reduzir desde H_2O_2 até complexos hidroperóxidos orgânicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; POWERS; LENON, 1999).

Independente do mecanismo envolvido, o objetivo de remoção de EROs é basicamente evitar o acúmulo de espécies reativas para que não

ocorra a produção de radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), o mais reativo de todas as EROS (YU, 1994; HALLIWELL; CROSS, 1994). Ainda, é importante lembrar que de forma isolada, o H_2O_2 é praticamente inócuo, no entanto, ele tem a capacidade de se difundir através das membranas celulares, como a membrana do núcleo, o que junto com a presença de metais de transição como o manganês, cobre e ferro pode gerar o radical $\cdot\text{OH}$ (BIRBEN et al., 2012). No entanto, acredita-se que exista uma relação direta entre o aumento da concentração de H_2O_2 e distúrbios celulares em diferentes tecidos animais (SHIMURA et al., 2017; MAHASETH; KUZMINOV, 2017). Portanto, as atividades das enzimas SOD, CAT e GPx constituem o sistema antioxidante de primeira linha, possuindo papel fundamental nos mecanismos e estratégias de defesa em sistemas biológicos (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Além dessas enzimas envolvidas na remoção direta das EROs, existem ainda, importantes enzimas envolvidas no metabolismo da GSH. Após a conversão da GSH à GSSG na remoção do H_2O_2 catalisada pela enzima GPx, a GSSG retorna à sua forma reduzida (GSH) através da reação catalisada pela enzima glutathiona redutase (GR). A GR é uma oxidoreductase que possui três substratos, NADPH, H^+ e GSSG e apenas um produto, a GSH, com isso, ajuda a manter um meio intracelular redutor devido aos altos níveis de GSH e baixos níveis de GSSG (DEPONTE, 2013) (Figura 1). Por fim, a GSH poderá ser usada pelas enzimas da família das glutathiona S transferases (GSTs), responsáveis pela excreção de substâncias endógenas e xenobióticas e, portanto, é considerada uma ferramenta fundamental para a sobrevivência biológica (SHEEHAN et al., 2001).

Figura 1 - Sistema antioxidante enzimático. Superóxido Dismutase (SOD); Catalase (CAT); Glutaciona Reduzida (GSH); Glutaciona Oxidada (GSSG); Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reduzido (NADPH); Glutaciona Redutase (GR); GPx (Glutaciona Peroxidase).



Fonte: Elaborado pelo autor.

O sistema antioxidante **não enzimático**, faz parte da segunda linha de defesa, conhecido também como antioxidantes tipo *scavengers*, isto é, neutralizam ou eliminam as espécies reativas doando seus elétrons e durante esse processo, tornam-se ERs, no entanto, com efeitos nocivos menores (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Os antioxidantes não enzimáticos podem ser produzidos pelo próprio organismo humano (endógenos) ou obtidos através da ingestão (exógenos). Os principais antioxidantes endógenos não enzimáticos são proteínas de ligação a metais, GSH, ácido úrico, melatonina, bilirrubina e poliaminas (MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018). Por outro lado, as vitaminas, juntamente com os chamados compostos bioativos (CBAs), são antioxidantes não enzimáticos exógenos, os quais estão largamente distribuídos na natureza, seja em plantas medicinais ou em alimentos e apresentam inúmeros efeitos biológicos (XU et al., 2017).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E O CÂNCER

O estresse oxidativo pode ser definido como o aumento excessivo das espécies reativas em relação aos antioxidantes disponíveis (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Nessa condição, ocorre um importante impacto sobre as células, podendo desencadear a ativação de vias relacionadas à morte celular (CHRESTENSEN; STARKE; MIEYAL, 2004; GUPTA et al, 2014). Isso ocorre porque, em excesso, as EROs interagem com proteínas, açúcares, ácidos nucleicos e lipídeos, promovendo lesões oxidativas nessas biomoléculas, o que pode resultar em inúmeras doenças, envolvendo inibição enzimática, peroxidação lipídica, mutações genéticas e morte celular (HALLIWELL; CROSS, 1994; KALININA; CHERNOV; NOVICHKOVA, 2014; IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Ainda, estudos recentes apontam uma relação fisiopatológica entre nutrição, estresse oxidativo e a carcinogênese (SAHA et al., 2017).

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e estima-se que seja responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018, sendo que uma em cada seis mortes mundiais são ocasionadas pelo câncer (WHO, 2018). Infelizmente, os dados retrospectivos são menores do que as estimativas, pois só para o Brasil, foram estimados para 2018 cerca de 600 mil novos casos de câncer (INCA, 2018a). A incidência apresenta diferença entre os gêneros, enquanto que o câncer de pulmão, de próstata, colorretal, de estômago e de fígado são os tipos mais comuns em homens. Por sua vez, os cânceres de mama, colorretal, pulmão, colo do útero e de tireoide são os mais comuns entre as mulheres (WHO, 2018).

Embora o câncer de pâncreas não esteja incluído entre os de maior incidência, é um dos tipos mais letais de tumores, e sua incidência está aumentando (ILIC; ILIC, 2016; MARTINEZ-USEROS et al., 2017). O prognóstico para pacientes diagnosticados com câncer de pâncreas é alarmante, com menos de 3% de sobrevida em 5 anos (CIESLAK; CULLEN, 2015). A letalidade deve-se principalmente ao fato que este tipo de câncer é assintomático e agressivo, fazendo com que normalmente o diagnóstico seja tardio, muitas vezes após a metástase, devido a sua alta agressividade (MARTINEZ-USEROS et al., 2017; WHO, 2018; INCA, 2018b).

Vários fatores de risco estão associados a esta doença, tais como: pancreatite crônica, diabetes, tabagismo, alto consumo de álcool e obesidade; sendo essa última caracterizada por um aumento do tecido adiposo, que é um órgão endócrino dinâmico secretor de diferentes citocinas pró-inflamatórias, enzimas e fatores que ativam o estresse

oxidativo (MARTINEZ-USEROS et al., 2017). Ainda, a maioria dos pacientes com câncer de pâncreas tem uma mutação no oncogene K-ras o que ocasiona uma mudança no estado redox da célula, favorecendo o processo tumoral, através da superexpressão da enzima SOD (WILKES; ALEXANDRER; CULLEN, 2017).

Em vias gerais, o câncer é um processo evolutivo somático caracterizado pelo acúmulo de mutações, que contribui para o crescimento do tumor, progressão clínica, escape imunológico e desenvolvimento de resistência a drogas (BEERENWINKEL et al., 2015). Assim, em geral, as doenças tumorais são de difícil tratamento porque além do estresse oxidativo, muitos outros mecanismos estão envolvidos na iniciação e progressão dos tumores, entre eles, a evasão da apoptose. Enquanto o estresse oxidativo pode estar envolvido na indução de mutações genéticas ou alterações na transdução de sinais e fatores de transcrição, a evasão da apoptose está relacionada à resistência das células cancerígenas frente a apoptose, isto é, à perda da capacidade natural do organismo para remover essas células (SHI et al., 2014; MOHAMMAD et al., 2015; SHIMURA et al., 2016). Dessa forma, a evasão da apoptose pode contribuir para o desenvolvimento e progressão do tumor, bem como, para a resistência ao tratamento, uma vez que a maioria dos tratamentos atualmente disponíveis (quimioterapia e radioterapia) ativam vias de morte celular, numa tentativa de promover a morte dessas células (MOHAMMAD et al., 2015). No entanto, isso afeta células normais, que por sua vez, são bem mais sensíveis, e o indivíduo acaba sofrendo inúmeros efeitos colaterais, tornando-se mais debilitado e conseqüentemente, mais suscetível às outras complicações, alheias ao próprio câncer.

Nesse contexto, antioxidantes são indicados como importantes fatores na prevenção do estresse oxidativo e conseqüentemente, das doenças tumorais (MUT-SALUD et al., 2016). A suplementação com fenólicos, mais especificamente, estilbenos, como o resveratrol, associada a uma dieta rica em frutas e vegetais contendo antioxidantes, parece contribuir para a redução da incidência dos cânceres de pâncreas, próstata, mama, rins, entre outros (BENETT; ROJAS; SEEFELDT, 2012). De fato, El-Husseiny et al. (2018) apontam que os antioxidantes possuem capacidade de reduzir o risco de certos tipos de cânceres porque conseguem diminuir o estresse oxidativo e/ou retardar o processo de divisão celular anormal. Especificamente com relação ao câncer de pâncreas, uma dieta rica em antioxidantes é inversamente associada ao risco deste tipo de neoplasia (LUCAS, et al. 2016).

Por outro lado, a indução do estresse oxidativo em células tumorais também é uma das estratégias terapêuticas estudadas atualmente, uma vez que a indução desse evento em células tumorais poderia funcionar como uma forma efetiva contra os tumores. Se por um lado as células normais podem se adaptar frente a uma condição de estresse oxidativo por induzir suas defesas antioxidantes (SCHAFER; BUETTNER, 2001), por outro, as células tumorais podem apresentar uma capacidade de adaptação limitada. Portanto, agentes antitumorais que induzam a produção de ERs podem ter implicações terapêuticas benéficas (PELICANO; CARNEY; HUANGA, 2004; ROSOLEN et al., 2015). Nesse contexto, há evidências de que compostos fenólicos, incluindo os flavonoides, podem apresentar efeitos pró-oxidantes em certas condições, inclusive em células tumorais (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011).

Estudos têm abordado esse aspecto pró-oxidante de alguns antioxidantes, como alternativas para ao tratamento do câncer pancreático. Estudos indicam que a auto oxidação do ascorbato gera quantidades significativas de H_2O_2 quando presente em concentrações na ordem de mM, no entanto, com a presença de metais, essa oxidação é mais promissora, de forma que o ascorbato pode atuar como pró-oxidante e induzir o estresse oxidativo (BUETTNER; JURKIEWICZ, 1996; HALLIWEL, 1999; FREI; LAWSON, 2008; CIESLAK; CULLEN, 2015). O ascorbato farmacológico, assim chamado devido a ser administrado de forma dosada e não obtido via dieta, também inibiu o crescimento de xenoinxertos de tumor pancreático e exibiu efeitos citotóxicos sinérgicos quando combinado com gencitabina que é atualmente o fármaco de escolha para o câncer pancreatico (CIESLAK; CULLEN, 2015), além disso, ensaios de Fase I com o ascorbato farmacológico em pacientes portadores de câncer pancreático demonstraram segurança e eficácia potencial. Espey e colaboradores (2011) sugeriram que as ações oxidativas do H_2O_2 derivadas do ascorbato farmacológico podem culminar em sinergismo independente em células cancerígenas resistentes à monoterapia com gencitabina. Assim, terapias combinadas, tais como quimioterapia mais ascorbato farmacológico, e radioterapia mais ascorbato farmacológico podem agir sinergicamente para potencializar a citotoxicidade induzida por ascorbato (CIESLAK; CULLEN, 2015).

Adicionalmente, Gorrini; Harris e Mak (2013) indicam o uso de terapias anticâncer que bloqueiem os mecanismos antioxidantes, resultando em acúmulo de EROs e consequente morte celular. Dessa forma, agindo como pró-oxidantes nas células tumorais, os flavonoides contribuem para desencadear eventos intracelulares que levam à

apoptose, o que sugere, portanto, que podem agir como potenciais agentes antitumorais (MATEUS et al., 2018).

Nesse sentido, no século XX houve um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais voltados a área da oncologia, o que possibilitou o descobrimento de diversas substâncias que hoje são utilizadas na terapia contra neoplasias (HARVEY; ZHANG; THOMAS, 2013). Cerca de 60% dos fármacos aprovados entre 1989-1995 como antimicrobianos e quimioterápicos são de origem natural (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; CRAGG; NEWMAN, 2013). Conforme estimativas da Convenção da Diversidade Biológica, o Brasil detém entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial. Este patrimônio tem um valor inestimável para vários setores industriais, inclusive para a indústria farmacêutica que pode encontrar nas espécies vegetais nativas, grandes possibilidades para o desenvolvimento de agentes antitumorais (DUTRA et al., 2016).

2.4 COMPOSTOS BIOATIVOS: Estruturas e propriedades químicas e biológicas

Os CBAs são sintetizados pelas plantas como metabólitos especializados ou secundários, em resposta às condições ambientais que a planta está exposta (YANG et al., 2016).

São conhecidos como constituintes extra nutricionais que ocorrem em diferentes quantidades nos alimentos. Extra nutricionais porque não são nutrientes essenciais como carboidratos, proteínas ou lipídeos e sua ausência não causa deficiências nutricionais (KRIS-ETHERTON et al., 2002; WALLACE; GIUSTI, 2015).

Os CBAs têm uma enorme diversidade estrutural e conseqüentemente, potencial atividade biológica diversa (YANG et al., 2016). Dessa forma, esses compostos podem desempenhar um papel significativo sobre a saúde humana, tanto por meios diretos (alimentação), quanto indiretos (isolados para medicamentos) (KARASAWAL; MOHAN, 2018).

As potenciais propriedades benéficas dos polifenóis têm sido atribuídas à sua capacidade redutora, sequestrante de ERs, quelante de metais ou desativadora do oxigênio singlete (D'ARCHIVIO et al., 2010; SKROVANKOVA et al., 2015; LI et al., 2017; PAREDES et al., 2018). Além disso, podem estar envolvidos com a modulação de vias de sinalização responsáveis pela ativação de genes envolvidos na proteção contra o estresse oxidativo (SHI et al., 2017). No entanto, a eficiência dessas substâncias quanto a atividade a ser exercida, depende de muitos

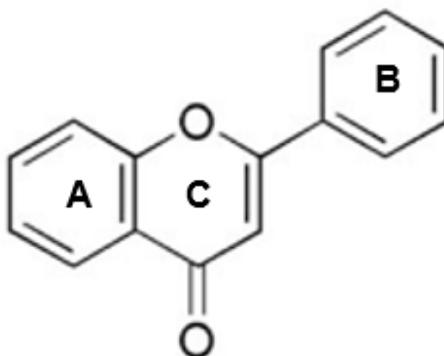
fatores, entre eles, destacam-se os fatores ambientais, o processamento, a matriz do alimento, a estrutura química e genética (por exemplo, variedades) (D'ARCHIVIO et al., 2010).

Os compostos fenólicos ou polifenóis, se caracterizam por ser um grupo de CBAs amplo e heterogêneo que pode ser segmentado de acordo com sua estrutura química, em flavonoides e não flavonoides (SKROVANKOVA et al, 2015; BARBIERI et al., 2017).

Os flavonoides são encontrados majoritariamente em frutas e vegetais, com mais de 4.000 moléculas identificadas, sendo que a organização da estrutura química dos flavonoides permite outras muitas subclassificações, tornando assim, uma classe bioativa muito importante (ARORA; ITANKAR, 2018).

A estrutura química básica dos flavonoides é composta por três anéis aromáticos (A, B e C), os quais totalizam 15 carbonos em seu esqueleto conhecido como C6-C3-C6. O anel A é um benzeno, este é fundido com um anel de 6 carbonos (anel C), o qual possui uma ligação com um substituinte fenilbenzeno (anel B) na posição 2 (WANG; LI; BI, 2018).

Figura 2 - Estrutura básica dos flavonoides.

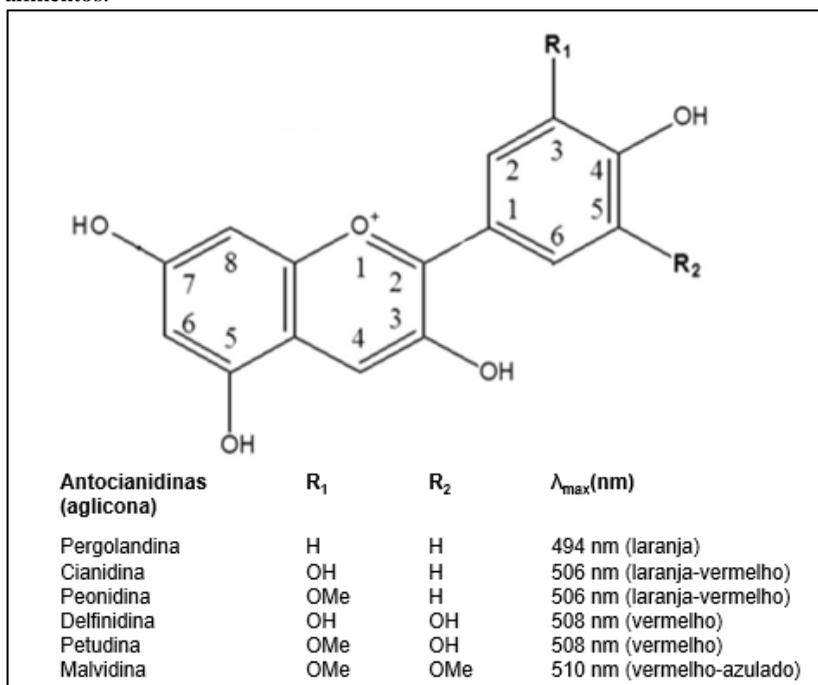


Fonte: Adaptado de Wang; Li; Bi (2018).

Considerando a estrutura química, os flavonoides podem ser subclassificados em seis grupos principais: **flavonóis** (principalmente quercetina, kaempferol, miricetina e isorannetina), **flavonas** (apigenina e luteolina), **flavanonas** (hesperetina e naringenina), **flavan-3-ol** (catequina, epicatequina, epigallocatequina, epicatequina-3-galato, epigallocatequina-3-galato), **isoflavonas** (genisteína e daidzeína) e as **antocianinas** (cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, petunidina, peonidina) (CHANG et al., 2018).

Até o momento, mais de 700 antocianinas, estruturalmente distintas de 27 agliconas conhecidas como antocianidinas foram identificadas na natureza, sendo raramente encontradas como agliconas (WALLACE; GIUSTI, 2015). Essa diversidade de compostos se dá em grande parte porque possibilita a ligação de diferentes substituintes. Na Figura 3 podem ser observados os principais substituintes e nomes das antocianinas mais encontradas em alimentos.

Figura 3 - Estrutura e nome das principais antocianinas encontradas em alimentos.



Fonte: Adaptado de Wallace e Giusti (2015).

Assim, a diferença entre as moléculas antocianinas é baseada no número de grupos hidroxila; grau de metilação; natureza, número e posição da glicosilação; natureza e número de grupos aromáticos ou ácidos alifáticos vinculados ao resíduo glicosil, de forma que, geralmente, a maior hidroxilação diminui a estabilidade e maior grau de metilação favorece para a estabilidade da molécula (ARTHEY; ASHURST, 2001; CAMLOFSKI, 2008).

No entanto, existem alguns fatores que alteram a estrutura química das antocianinas e conseqüentemente, a coloração que o pigmento apresentará.

O pH tem sido relatado como o fator mais impactante com relação às modificações na estrutura química das antocianinas, sendo que em meio aquoso, são encontradas quatro formas em equilíbrio: o cátion flavilium (vermelho), a base quinoidal (roxo-violeta), chalcona (amarelo claro) e a forma hemiacetal incolor (MARSZALEK et al., 2017). Assim, em condições ácidas, as antocianinas apresentam-se vermelhas, enquanto que ficam roxas/púrpura em pH neutro e tornam-se mais azuladas, conforme o aumento do pH (KHOO et al., 2017).

Em virtude de o pH ser um fator crucial para a forma das antocianinas, desenvolveu-se o método de pH diferencial para a quantificação espectrofotométrica dessas moléculas. Através da diferença de pH e o uso de diferentes comprimentos de onda, a concentração de antocianinas totais pode ser lida no método de espectrofotometria, no entanto, o conteúdo individual, isto é, as antocianinas isoladas não podem ser identificadas (WANG, 2014). Por isso, apesar da técnica de pH diferencial ser bastante simples, econômica e rápida, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a mais utilizada, uma vez que sua sensibilidade é maior, podendo ainda ser vinculada a outras técnicas como Espectrometria de Massas (MS), a qual possibilita detectar e identificar individualmente cada composto presente na amostra (CHAVES, 2014).

A ampla variedade e distribuição das antocianinas em conjunto com a sua capacidade antioxidante, fez com que esses compostos passassem a ter interesse na saúde, e não apenas como pigmentos, sendo considerados atualmente como potenciais agentes dietéticos na prevenção de doenças neuronais, cardiovasculares, câncer, diabetes, inflamação, trombose, aterosclerose, entre outras (UTTARA, 2009, YOUSUF et al., 2016; YANG et al., 2017).

Os mecanismos moleculares envolvendo os benefícios à saúde descritos para as antocianinas parecem envolver várias vias de sinalização, incluindo a proteína cinase ativada por mitógeno, fator nuclear κ B, proteína cinase ativada por AMP, bem como alguns processos celulares cruciais como ciclo celular, apoptose, autofagia e metabolismo bioquímico, os quais também podem ser potenciais alvos terapêuticos para a melhoria de muitas doenças; Li et al (2017) revisaram esses mecanismos e disponibilizaram uma atualização para a última década.

No entanto, não são apenas as antocianinas, seus precursores também são investigados com relação a benefícios para a saúde. Estudos recentes demonstram que extratos vegetais contendo flavonoides

possuem atividades benéficas na prevenção e/ou tratamento de patologias relacionadas à participação dos RL, como o diabetes, hipertensão, função renal e venosa, lesão hepática causada por medicamentos, atenuação de Alzheimer e Parkinson e ainda, em doenças tumorais, apresentando atividade inibitória de tumores da tireoide (ALKHALIDY; WANG; LIU, 2018; HUSSAIN et al., 2018, PAREDES et al., 2018, GONZÁLES-PONCE, et al., 2018).

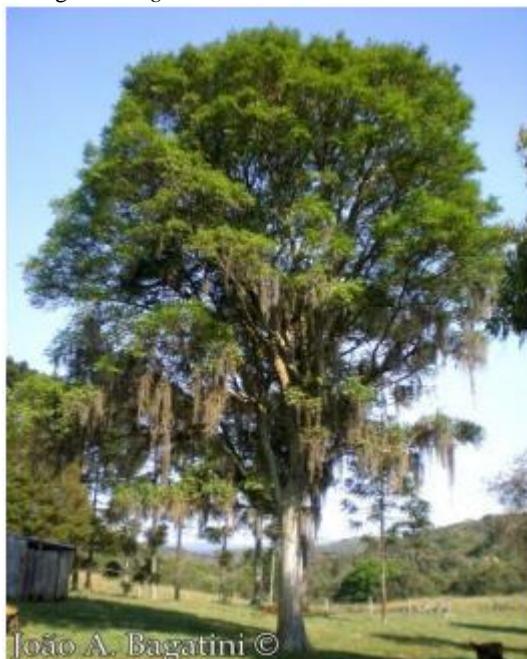
2.5 *Eugenia involucrata* DC

A espécie pertence à família Myrtaceae que por sua vez, compreende vários gêneros de frutíferas, dentre os quais, destaca-se o gênero *Eugenia* L., como sendo um dos quatro gêneros com maior importância econômica (EMBRAPA, 2009a). É conhecida popularmente por cerejeira-do-rio-grande, cerejeira-do-mato, cerejeira-da-terra, cerejeira-preta, ibaiba e ivaí (LORENZI, 2002).

A *E. involucrata* DC é uma espécie arbórea, nativa da região Sul do Brasil, que ocorre desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, assim como em alguns países da América do Sul (DONADIO; MÔRO; SERVIDONE, 2002).

A árvore tem folhas simples, verde-escuras e brilhantes no lado superior, medindo de 5 a 9 cm de comprimento, 2 a 3 cm de largura e pode crescer de 5 a 20 m de altura, a partir das suas flores são gerados os frutos que são comestíveis e tem um tamanho médio de 2,5 x 2 cm (Figura 4) (BARZOTTO et al., 2019). As folhas da espécie são popularmente empregadas na forma de chás, com ação antidiarreica e digestiva (SAUSEN et al., 2009; EMBRAPA, 2007).

Figura 4 - Morfologia da *Eugenia involucrata* DC.



Fonte: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2014).

O fruto (Figura 5) é frágil, de coloração avermelhada, com epicarpo fino e brilhante, conteúdo succulento e de sabor ácido-adocicado, possui de um a cinco caroços branco-esverdeados e formato arredondado com cerca de 1,0 cm de diâmetro (LORENZI, 2002; CAMLOFSKI, 2008). São consumidos *in natura* e também empregado na culinária através de doces, geleias e licores, vendidos em feiras e mercados regionais através de produtos minimamente processados (LORENZI, 2002; KÖHLER, 2014).

Figura 5 - Frutos da *Eugenia involucrata* DC (A). Parte interna dos frutos (B).



Fonte: Adaptado de Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2013) (A); Adaptado de Camlofski (2008) (B).

Dentro dos frutos, estão contidas as sementes, para as quais não foram encontradas aplicações para uso popular ou para a produção de algum produto na literatura. Existem estudos relacionados à secagem e armazenamento das mesmas, uma vez que tais fatores influenciam a germinação. Alguns autores apontam que pesquisas que tratam de sementes da família Myrtaceae são importantes, principalmente para programas de recuperação de áreas degradadas, pois existem espécies frutíferas, como a própria cerejeira-do-Rio-Grande que restauram não apenas a flora, mas também a fauna, atraindo pássaros e outros animais (LORENZI, 2002; MALUF; BILIA; BARBEDO, 2003; FRANZON; RASEIRA, 2006).

2.5.1 Composição Fitoquímica

São poucos os estudos que demonstraram a composição química da espécie estudada. Infante et al. (2016) demonstraram a presença de importantes compostos bioativos, entre eles o ácido gálico nos frutos e sementes da *E. involucrata*, que representaram juntos, quase 70% de todos os compostos fenólicos. O mesmo estudo também demonstrou a presença de epicatequina nas sementes e de ácido cumárico nos frutos.

Dametto (2014) avaliou a composição química de um extrato metanólico acidificado e liofilizado dos frutos e encontrou 19 antocianinas.

A atividade antioxidante e a determinação de compostos fenólicos dos frutos da espécie foram avaliadas por Nicácio et al. (2017), que encontraram mais compostos fenólicos, nos frutos do que nas sementes, e embora as sementes tenham apresentado maior atividade antioxidante, concluíram que os frutos podem ser considerados uma importante fonte de CBAs do gênero *Eugenia* L.

Ainda, recentemente Toledo e Pinto (2018) avaliaram o perfil químico e atividade antioxidante de diferentes extratos das folhas de *E. involucrata* DC, e detectaram a presença de saponinas, esteroides, flavonoides (flavonas, flavanóis e flavanonóis) e taninos, e de acordo com Infante et al. (2016), as folhas são as partes da planta com maior concentração de compostos fenólicos.

2.6 *Rubus* spp.

A amoreira-preta é um arbusto pertencente à família Rosaceae, cujo espécies pertencem ao gênero *Rubus*, este que possui em torno de 740 espécies (JACQUES, 2012; ANTUNES et al. 2014). A planta produz como fruto, a amora-preta que é mais conhecida e consumida *in natura* do que a espécie da cerejeira. No entanto, o fruto amora preta, não é produzido unicamente por esse gênero, podendo ser originada também do gênero *Morus*.

Okamoto, Furnaleto e Martins (2013), citam que as amoras do gênero *Morus* têm sabor mais suave e agradável para o consumo *in natura* e em polpas, enquanto que os frutos do gênero *Rubus*, com tamanho maior que os anteriores, apresentam sabor mais acidificado, por isso, são mais utilizados para formas processadas, como geleias e outros doces.

Do gênero *Morus*, destaca-se a espécie *Morus nigra* originaria da Ásia e aclimatizada no Brasil, sendo de interesse farmacológico os frutos e as folhas; já foram conduzidos estudos *in vitro* relacionadas as atividades anti-inflamatória, antioxidante, citotóxica, antibacteriana e inibitória da enzima α -amilase e também estudos *in vivo* tais como: avaliação do potencial estrogênico, atividade hipoglicemiante, adipogênese, anti-inflamatória, antinociceptiva, hepatoprotetora e cardiovascular (BRASIL, 2015). Além da espécie *Morus nigra*, no Brasil há o cultivo da *Morus alba* a qual é utilizada na medicina popular como remédio com ação antipirética, hepatoprotetora, hipotensor e agente redutor do colesterol (ZENI; DALL’MOLIN, 2010). Estudos mais

recentes têm avaliado a fitoquímica, farmacologia e realizado estudos clínicos com esta outra espécie de amoreira (*Morus alba*) (CHAN; LIE; WONG, 2016).

Ainda sobre a amoreira, mas do gênero *Rubus*, Reitz (1996) afirma existem cinco as espécies nativas do gênero *Rubus*, sendo: *R. urticaefolius*, *R. erythroclados*, *R. brasiliensis*, *R. sellowii* e *R. imperialis*, o que pode estar envolvido com diferentes atividades biológicas desempenhadas, dada a variedade de espécies e compostos que podem estar envolvidos.

Outro aspecto é que no Brasil, existem também suplementos alimentares a base de amora-preta, sendo comercializadas com propriedades nutricionais do alimento em formas não convencionais, como por exemplo, cápsulas (ANVISA, 2018). Esses suplementos muitas vezes não trazem qual a espécie científica dos frutos utilizados na produção, assim, as propriedades nutracêuticas atribuídas à popular “amora-preta” podem estar sendo relacionadas ao gênero *Rubus* spp. ou ao gênero *Morus* mais especificamente a espécie *nigra*, da família Moraceae. Portanto, é preciso esclarecer, que neste trabalho, utilizamos apenas o gênero *Rubus* spp.

No Brasil, o cultivo da amora-preta (*Rubus* spp.) é considerado promissor, com abertura do mercado de comercialização particularmente nos Estados do Sul, São Paulo e Sul de Minas Gerais, sendo o estado do Rio Grande do Sul o principal produtor (ANTUNES, 2002).

Embora existam as espécies nativas de amoras do Brasil (*R. urtieaefolius*, *R. erythroclados*, *R. brasiliensis*, *R. sellowii* e *R. imperialis*), a maior parte da produção de amoras pretas utiliza cultivares derivadas de cruzamento de espécies nativas dos Estados Unidos (ANTUNES et al., 2014).

A árvore que origina os frutos conhecidos como amoras-pretas tem porte rasteiro (arbusto) e os frutos são gerados agregados em forma de minidrupas (JACQUES, 2012).

Figura 6 - Morfologia da *Rubus* spp. (Amoreira- preta).



Fonte: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2018).

A partir das flores da planta, são originados os frutos de amora preta, os quais são bagas piriformes, lisas, glabras, de coloração verde quando não maduros, tornando-se vermelhos e cor-de-vinho tinto quando maduros (EMBRAPA, 2009b). Os frutos pesam em torno de 4 a 7 gramas e tem sabor ácido a doce-ácido, sendo *in natura* altamente nutritivo, contendo cerca de 85% de água, 10% de carboidratos, elevado conteúdo de minerais, vitaminas B e A e cálcio (EMBRAPA, 2004). São utilizados para compor geleias, sucos, sorvetes e iogurtes (VIZZOTTO et al., 2012).

2.6.1 Melhoramento genético de plantas frutíferas

O melhoramento genético é realizado em espécies vegetais visando, entre outros objetivos, o desenvolvimento de cultivares sem espinho a fim de facilitar a colheita, possibilitar a alta produtividade e também o maior peso de frutos, entre outros fatores benéficos ao cultivo e industrialização (ANTUNES, 2002; VIZZOTTO et al., 2012).

O melhoramento genético também pode resultar na produção de cultivares com maior teor de compostos bioativos, bem como com maior potencial antioxidante das frutas, podendo também impactar na melhora

de suas propriedades funcionais para o organismo humano (MAZZONI et al., 2016). Sendo assim, através dessa prática, tem-se a combinação dos recursos genéticos nativos ou exóticos e o desenvolvimento de novos produtos com diferentes propriedades funcionais (EMBRAPA, 2002).

O programa de melhoramento genético das amoras no Brasil iniciou na década de 70, com a introdução das cultivares Brazo, Cherokee e Comanche e de um clone de identidade desconhecida proveniente do Uruguai. Foram implementadas inicialmente na estação Experimental de Pelotas e subsequentemente, na Embrapa – Clima Temperado (RAZEIRA; FRANZON, 2012).

2.6.2 Cultivar Tupy

A cultivar Tupy (Figura 7) é a de maior importância no Brasil e no mundo em decorrência da sua elevada produtividade e qualidade dos frutos, representando 90% dos plantios existentes (FERREIRA et al., 2016). A cultivar se destaca devido à alta produtividade em diferentes condições edafoclimáticas, além de boa aceitação no mercado *in natura* devido ao seu tamanho, uniformidade, firmeza e sabor e cor intensa (ANTUNES et al, 2014; FERREIRA et al., 2016).

A cultivar Tupy foi lançada em 1988 como resultado do cruzamento entre as cultivares Uruguai e Comanche realizado na EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil (SANTOS; RASEIRA, 1988; HUSSAIN, et al., 2016). Uma das limitações do cultivar é a presença de espinhos, a qual torna muitas vezes o manejo mais oneroso que as demais cultivares (SOUZA et al., 2014b).

Figura 7 - Cultivar Tupy (na esquerda), fruto da cultivar Tupy (na direita).



Fonte: Adaptado de SANTOS (2018).

2.6.3 Cultivar Xingu

Em 2003, foi lançada a cultivar Xingu (Figura 8), oriunda do cruzamento entre a cultivar Tupy e a cultivar americana Arapanho

apresentando boa conservação pós-colheita, sendo ótima opção para mesa (EMBRAPA, 2015a).

A cultivar apresenta espinhos, tem porte ereto ou semiereto, requer mais de 200 horas de temperatura abaixo de 7,2°C e seus frutos pesam em média 9 gramas com sabor agridoce. A firmeza dos mesmos, faz com que a cultivar tenha boa conservação pós colheita (SANTOS, 2018).

Figura 8 - Cultivar Xingu (na esquerda), fruto do cultivar Xingu (na direita).



Fonte: Adaptado de Santos (2018).

2.6.4 Cultivar Xavante

A cultivar Xavante (Figura 9) é a primeira cultivar brasileira de porte ereto, hastes vigorosas, sem espinhos e pouco exigente ao frio, lançada pela Embrapa Clima Temperado em conjunto com a Universidade de Arkansas, Estados Unidos, em 2004 (RASEIRA; FRANZON, 2012; HUSSAIN et al., 2016).

É oriunda do cruzamento entre as seleções A-1620 e A-1507 e seus frutos, tem forma alongada, medianamente firmes, sabor doce-ácido com predomínio do ácido e peso médio de 6 g (BOTELHO et al, 2009; EMBRAPA, 2004). A floração dessa cultivar começa em setembro e finaliza em outubro, sendo a maturação precoce e a colheita em novembro (EMBRAPA, 2004).

Figura 9 - Cultivar Xavante (na esquerda), fruto da cultivar Xavante (na direita).



Fonte: Adaptado de Santos (2018).

2.6.5 Cultivar *Black 145* e *Black 178*

A seleção *Black 145* é produto do cruzamento entre a seleção 6/96 e a cv. Caigangue em 2003, enquanto que a seleção *Black 178*, é resultante do cruzamento entre a cv. Caigangue e a seleção 5/96. As duas seleções têm início de floração em setembro e colheita no início do mês de outubro (SOUZA, 2018; SANTOS, 2018).

Os frutos da seleção *Black 178* possuem peso médio de 6,3g enquanto que os frutos da seleção *Black 145* têm, em média, 7,8g. A primeira produz frutos com melhores características para o consumo *in natura*, enquanto que a segunda, apresenta frutos com maior acidez, sendo mais adequadas para o processamento em indústrias, uma vez que o risco de contaminação microbiológica é menor (RASEIRA et al., 2012; SOUZA, 2018).

Figura 10 - Seleção avançada *Black 145* (superior à esquerda e à direita) e *Black 178* (inferior à esquerda e à direita).



Fonte: Adaptado de Santos (2018).

2.6.6 Composição Fitoquímica

Segundo Skrovankova e colaboradores (2015) a composição química das amoras é variável dependendo da cultivar e variedade, localização e condições ambientais, nutrição das plantas, fase de

maturação e época da colheita, bem como condições subsequentes de armazenamento.

Existem diversos estudos envolvendo as amoras, dado o amplo número de variedade e locais onde a planta pode ser encontrada. No entanto, é sabido que além dos componentes nutricionais citados anteriormente, os frutos também apresentam outras substâncias importantes para a saúde.

As principais classes de substâncias químicas encontradas nos frutos de amora-preta são compostos fenólicos simples, flavonoides e antocianinas, ocorrendo em menor quantidade, os taninos, carotenoides e tocoferóis (CHAVES, 2017).

Quadro 1 - Principais compostos fenólicos presentes nos frutos de *Rubus* spp.

Compostos fenólicos simples	Ácido gálico	
	Ácido elágico	
	Ácido hidroxibenzóico	
	Ácido Cafeico	
	Ácido Cumárico	
Flavonoides	Ácido ferúlico	
	Quercetina	
	Canferol	
	Quercetina-xilosídeo	
	Quercetina-rutinosídeo	
	Quercetina-glicosídeo	
	Quercetina-glicuronídeo	
	Quercetina-HMG-glicosídeo	
	Antocianinas	Cianidina-O-glicosídeo
		Cianidina-O-xilosídeo
Cianidina-O-galactosídeo		
Cianidina- O-arabinosídeo		
Pelargonidina-O-glicosídeo		
Peonidina-O-glicosídeo		
Cianidina-O-malonilglicosídeo		
Cianidina-O-dioxilglicosídeo		
Cianidina-O-rutinosídeo		
Malvidina-O-glicosídeo		
Malvidina-O-acetilglicosídeo		

Fonte: Adaptado de Chaves (2017).

Essa variada composição bioativa dos frutos de *Rubus* spp. indica um potencial antioxidante de fonte natural que pode ter efeito significativo na profilaxia e progressão de várias doenças associadas ao estresse oxidativo (OLAS, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antioxidante e antitumoral dos frutos e sementes de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-rio-grande) e dos frutos de diferentes genótipos de *Rubus* spp. (Amoreira preta) *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar os compostos bioativos (fenólicos totais, antocianinas e flavonoides) de extratos dos frutos e sementes de *E. involucrata*, bem como dos frutos de *Rubus* spp;

- Identificar o perfil de antocianinas nos extratos dos frutos de *E. involucrata* e *Rubus* spp;

- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de *Rubus* spp. e de *E. involucrata*;

- Investigar o potencial antitumoral dos extratos de *Rubus* spp. e de *E. involucrata* em uma linhagem celular tumoral de adenocarcinoma de pâncreas humano (PANC-1).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos relativos ao preparo dos extratos, quantificação dos compostos bioativos, atividade antioxidante e antitumoral *in vitro* foram realizados no Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal (LAFRA) da Universidade Federal de Santa Catarina (Campus de Curitibanos). A caracterização das antocianinas nos extratos de *Rubus spp.* e de *E. involucrata* foram realizados por LC-MS na Central de Cromatografia (CentralCrom) da Universidade Federal de Santa Catarina, campus de Florianópolis.

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Para facilitar a compreensão da organização do trabalho, abaixo apresenta-se um esquema do desenho experimental realizado (Figura 11).

Figura 11 - Esquema do desenho experimental.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE <i>Eugenia involucrata</i> DC. e <i>Rubus spp.</i>			
EXTRATOS	COMPOSTOS BIOATIVOS	POTENCIAL ANTIOXIDANTE	POTENCIAL ANTITUMORAL
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Eugenia involucrata</i> DC. • 4 extratos: <ul style="list-style-type: none"> • 2 tecidos (fruto e semente); • 2 temperaturas de extração (26°C e 50°C). • <i>Rubus spp.</i> • 10 extratos: <ul style="list-style-type: none"> • 5 genótipos; • 1 tecido (fruto); • 2 preparações (acidificado e não acidificado). 	<ul style="list-style-type: none"> • Fenólicos totais; • Flavonóides; • Antocianinas monoméricas totais; • Identificação química antocianina. 	<ul style="list-style-type: none"> • Atividade redutora de ferro (FRAP); • Atividade de captura de radical DPPH; • Atividade de captura de radical hidroxil; • Atividade remoção do radical superóxido; • Atividade de remoção do peróxido de hidrogênio; • Atividade protetora contra oxidação da glutatona. 	<ul style="list-style-type: none"> • Citotoxicidade dos extratos: viabilidade celular e determinação da CC50; • Avaliação do tipo de morte celular por microscopia de fluorescência; • Avaliação do potencial de membrana mitocondrial; • Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio; • Efeitos relacionados a exposição: tióis totais e enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPX, GR e GST) • Peroxidação lipídica.

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

4.2 REAGENTES

Os principais reagentes utilizados no estudo estão listados no Quadro 2.

Quadro 2 – Lista de reagentes

Nome
2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina ¹
2,4-dinitroclorobenzeno (C ₆ H ₃ ClN ₂ O ₄) ¹
Ácido dietilenotriaminopentaacético (C ₁₄ H ₂₃ N ₅ O ₁₀) ¹
Ácido gálico (C ₇ H ₆ O ₅) ¹
Ácido tiobarbitúrico (C ₄ H ₄ N ₂ O ₂ S) ¹
Ácido tricloroacético (C ₂ HCl ₃ O ₂) ¹
Reagente resazurin ¹
Albumina de soro bovino ¹
Brometo de etídio (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃) ¹
Difenil-picril-hidrazila (C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆) ¹
Dimetilsufóxido (C ₂ H ₆ OS) ¹
Epinefrina (C ₉ H ₁₃ NO ₃) ¹
Etanol (C ₂ H ₅ OH) ²
Fluoreto de fenilmetilsulfonil (C ₇ H ₇ FO ₂ S) ¹
Glutationa Oxidada ¹
Glutationa Peroxidase ¹
Glutationa Redutase ¹
Glutationa reduzida ¹
Glutationa S- Transferase ¹
Laranja de acridina (C ₁₇ H ₁₉ N ₃) ¹
Leucopeptina ¹
Meio de cultura <i>Dulbecco Modified Eagles's Medium</i> F12 ³
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (C ₂₁ H ₂₉ N ₇ O ₁₇ P ₃) ¹
Penicilina ³
Pepstatina ¹
Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) ²
Quercetina (C ₁₅ H ₁₀ O ₇) ¹

Nome
Reagente de Ellman / Ácido 5,5'-ditio-bis-2- nitrobenzóico (C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₈ S ₂) ¹
Reagente Folin-Ciocalteu (C ₆ H ₆ O) ¹
Soro bovino fetal ³
Terc-Butil (t-BuOOH) ¹
Tripsina ⁴
Trolox (C ₁₄ H ₁₈ O ₄) ¹

Legenda: ¹ Sigma – Aldrich; ² Synth; ³ Gibco®.

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

4.3 MATERIAL VEGETAL

Exemplares com frutos da *E. involucrata* foram coletados em novembro de 2017 junto a dois produtores rurais na região do município de Curitiba (SC), Brasil, após contato prévio para o agendamento da coleta.

Uma exsicata foi identificada e depositada no Herbário da UFSC – Campus de Curitiba sob o registro de CTBS: 3943. Por se tratar de espécie nativa, o registro do projeto foi efetuado na plataforma SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional associado), sob o cadastro de n. A967541.

As mudas dos cinco diferentes genótipos de *Rubus* spp. (amoreira-preta) foram fornecidas pela EMBRAPA – Clima Temperado (Pelotas, RS, Brasil) e posteriormente plantadas na Fazenda Experimental da UFSC - Campus de Curitiba. Foram fornecidas três cultivares (Tupy, Xavante e Xingu) e duas seleções (*Black 145* e *Black 178*). Os frutos foram coletados no período de dezembro de 2016 a fevereiro de 2017.

Os frutos maduros, frescos e livres de injúrias de ambas as espécies foram acondicionados em caixas de isopor com gelo e imediatamente transportados ao LAFRA e congeladas a - 80°C até o preparo dos extratos.

4.4 PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS

4.4.1 Extratos de *E. involucrata*

Os extratos de frutos e sementes de *E. involucrata* foram preparados de acordo com Denardin et al. (2015), com modificações.

Inicialmente, foi realizada a separação manual da semente contida no interior dos frutos, através de um corte transversal para a retirada das sementes. Em seguida, os frutos frescos (15g) foram macerados com gral e pistilo, enquanto que as sementes frescas (15g) foram previamente trituradas em um triturador de sementes e a farinha resultante foi macerada com gral e pistilo. Durante a maceração (5 minutos), os frutos ou sementes foram extraídos por adição de 45 mL de etanol absoluto (99,5 GL) como solvente extrator seguindo, portanto, uma proporção de 1:3 (m/v). Em seguida, os macerados foram transferidos para um Erlenmeyer com tampa, e levados a um agitador (shaker) por 30 minutos a 26°C ou 50°C. O uso de diferentes temperaturas foi uma adaptação realizada ao método descrito por Denardin et al. (2015).

Após a agitação, a porção líquida do macerado foi separada, centrifugada (1.500g por 5 minutos) e o sobrenadante obtido foi armazenado ao abrigo da luz.

Uma segunda extração foi realizada pela adição de mais 45 mL de etanol absoluto (99,5 GL) ao resíduo sólido do macerado, seguida pela agitação, centrifugação e obtenção de novo sobrenadante nas condições já citadas.

Os sobrenadantes obtidos das duas extrações foram misturados e evaporados em rotaevaporador até a evaporação completa do etanol à temperatura de 40°C.

Posteriormente, os quatro extratos obtidos (dos frutos e das sementes a 26 e 50°C) foram armazenados em ultrafreezer (-80°C) até a utilização para avaliação da atividade antioxidante e antitumoral.

4.4.2 Extratos de *Rubus* spp.

Os extratos de *Rubus* spp. foram preparados de acordo com a metodologia descrita em Kuskoski et al. (2005) e modificada por Sacchet et al. (2015). Durante o preparo, 25 g de amoras-pretas inteiras (fruto e sementes) foram maceradas durante 5 minutos com a adição de 50 mL de etanol 96°GL. Em seguida, o extrato foi armazenado refrigerado (1°C) durante 24 h. Posteriormente, o extrato foi centrifugado duas vezes (1500G durante 5 minutos) e o sobrenadante coletado e evaporado em rotaevaporador à temperatura de 40°C. Para o preparo do extrato acidificado de cada genótipo, o mesmo procedimento foi conduzido, com a diferença de que após a maceração com etanol 96°GL, foi adicionado em torno de 0,5 mL (gota a gota) de ácido clorídrico (HCl) concentrado para atingir o pH = 1,5. Após a evaporação completa do etanol, os

extratos foram armazenados a -80°C até a avaliação da atividade antioxidante e antitumoral que ocorreu em até 15 dias.

4.5 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

A determinação dos compostos bioativos dos extratos foi realizada através de métodos espectrofotométricos. Previamente a todos os ensaios, foi preparada uma solução concentrada de cada extrato ($50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), a partir da qual foram obtidas as diluições adequadas em solução hidroalcoólica 70% antes de proceder cada metodologia. Os resultados de todas as análises de teor de compostos bioativos foram, ao final, expressos por 100g de extrato (obtido como massa úmida).

4.5.1 Fenólicos Totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais para os extratos de *E. involucrata* e *Rubus* spp. foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu. O princípio do método se baseia no fato de que em meio alcalino, os fenóis presentes no extrato reduzem a mistura de ácido fosfotúngstico e fosfomolibdico a óxidos de tungstênio e molibdênio, respectivamente, ambos de cor azul que pode ser lida em 765 nm (SINGLETON; ROSSI, 1965).

O procedimento consistiu em adicionar 100 μl de extrato diluído a 1 mL de Folin-Ciocalteu. A mistura foi agitada em vórtex e posteriormente deixada em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente, para na sequência, adicionar 1 mL de solução de Na_2CO_3 10%. Os tubos ficaram novamente em repouso por mais 90 minutos a temperatura ambiente.

A concentração foi determinada em relação a curva padrão de ácido gálico. Cada experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como a média de três repetições independentes em mg de equivalente de ácido gálico (EAG). 100g^{-1} de extrato.

4.5.2 Flavonoides

A quantificação espectrofotométrica dos flavonoides totais foi realizada para os extratos por um método baseado na formação de um complexo estável entre os flavonoides e o íon Al^{+3} (CHRIST; MÜLLER, 1960; PEKAL; PYRZYNSKA, 2014).

O ensaio consistiu em adicionar 1 mL de extrato a 0,5 mL da solução contendo cloreto de alumínio (AlCl_3) 10mM e acetato de sódio 50mM e após 30 minutos, procedeu-se a leitura em 425 nm.

A concentração foi determinada em relação a curva padrão de quercetina. Cada experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como a média de três repetições independentes em mg equivalente de quercetina (EQ) $\cdot 100\text{g}^{-1}$ de extrato.

4.5.3 Antocianinas Totais Monoméricas

A determinação das antocianinas monoméricas totais (AMT) para os extratos das duas espécies foi realizada utilizando o método do pH diferencial (GIUSTI; WROLSTED, 2001).

Os extratos foram diluídos em tampão de cloreto de potássio (KCl 0,025M, pH 1,0) ou acetato de sódio (CH_3COONa 0,4 M, pH 4,5) com um fator de diluição pré-determinado. A absorbância dos extratos diluídos foi medida em 520 e 700 nm contra um branco de etanol 70%. O cálculo da concentração das AMT foi realizado utilizando como referência a cianidina 3-O-glicosídeo, que consiste na antocianina majoritária da *Rubus* spp e da *Eugenia involucrata*. A seguinte equação foi utilizada:

$$\text{AMT} = (A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000) \div \epsilon \times 1 \quad (1)$$

Onde: A = ($A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}$) pH1,0 - ($A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}$) pH4,5, PM = Peso molecular da cianidina 3-O-glicosídeo (449.2 g.mol⁻¹), FD = fator de diluição e ϵ = absorvidade molar da cianidina 3-O-glicosídeo (26.900 L.cm⁻¹.mol⁻¹). O resultado obtido pela equação acima é expresso em mg cianidina-3-O-glicosídeo.L⁻¹ extrato. Cada experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como a média de três repetições independentes em mg EC3G.100g⁻¹ de extrato.

4.5.4 Identificação das antocianinas por LC-MS

A identificação dos compostos foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLUE/DAD) com detecção em 520 nm e detector por espectrometria de massas (MS) de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (*QTof*) modelo Xevo G2-XS® (Waters®). A fonte de ionização utilizada foi electrospray (ESI), e os parâmetros de detecção e interface foram os seguintes: modo positivo de aquisição dos espectros, faixa de aquisição

de 50 – 1200 Da, voltagem do capilar 3 kV, voltagem do cone 40 V, fluxo de nitrogênio no cone e de dessolvatação foram 100 e 800 L.h⁻¹ respectivamente. Temperatura de dessolvatação e da fonte foram de 500 e 100°C, respectivamente.

O cromatógrafo da marca Waters® modelo Acquity®, equipado com desgaseificador *on line* e amostrador automático foi utilizado para a realização das análises. A fase móvel empregada foi acetonitrila acidificada com 1% ácido fórmico (A) e água ultrapurificada com 3 % de ácido fórmico (B). O gradiente linear utilizado variou de 2 a 20% de A durante 40 minutos. As análises foram realizadas em coluna cromatográfica Phenomenex Polar Synergi™ (150 x 2 mm – 4,0 µm), com volume de injeção de 5 µL e fluxo de 0,5 mL.minuto⁻¹. Os dados foram processados utilizando o *software* MassLynx V4.1. As análises foram realizadas em triplicata.

4.6 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos extratos foi analisada através de métodos espectrofotométricos. Previamente a todos os ensaios, foi preparada uma solução concentrada de cada extrato (50 mg.mL⁻¹), a partir da qual foram obtidas as diluições adequadas em solução hidroalcoólica 70% antes de proceder cada metodologia.

4.6.1 Atividade redutora de ferro

A determinação do potencial antioxidante redutor de ferro (FRAP) nos extratos seguiu a metodologia de Benzie e Strain (1996). Foram preparadas seis diluições de cada extrato (10 a 160 µg.mL⁻¹) e as mesmas adicionadas a um meio de reação contendo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) 10 mM (preparado em HCl 40 mM), FeCl₃.6H₂O 20 mM, tampão acetato 0,3 M (pH 3,6).

Após a incubação por 15 minutos a 37°C, a absorbância do complexo azul escuro formado entre Fe²⁺ e TPTZ foi registrada em 593 nm, em leitor de microplaca (Spectramax 190, Molecular Devices). Tubos controles contendo extrato sem TPTZ foram também preparados a fim de descontar possíveis absorções diretas dos compostos presentes no extrato no comprimento de onda utilizado (593 nm).

Em seguida, a absorbância dos extratos na presença de TPTZ em 593 nm foi subtraída daquela obtida na ausência do TPTZ. Uma curva de Trolox (1,25 – 10 µg.mL⁻¹), um análogo hidrossolúvel da vitamina E, também foi preparada.

Cada experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos, ao final, como a média de três experimentos independentes em μg de equivalente de Trolox. g^{-1} de extrato.

4.6.2 Atividade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

A atividade sequestrante do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) dos extratos de *E. involucrata* e de *Rubus* spp. seguiu o método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995).

Nesse método, avalia-se a capacidade do extrato em reduzir o radical DPPH, formando o composto difenil-picril-hidrazina. Essa redução é percebida pela conversão da coloração púrpura do DPPH em coloração amarela, cuja diminuição da absorbância é medida em 517 nm.

Para a realização do ensaio, seis diferentes diluições dos extratos (10 a 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram preparadas em solução hidroalcoólica 70% e misturadas com uma solução metanólica de DPPH.

O potencial antioxidante dos extratos foi determinado após 24 h de repouso dos extratos com a solução metanólica de DPPH ao abrigo da luz e o resultado foi expresso em percentual da atividade sequestradora do DPPH, a qual foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição} = [(\text{Abs controle} - \text{Abs extrato}) \div (\text{Abs controle})] * 100 \quad (2)$$

Posteriormente, a concentração efetiva 50 (CE50) de cada extrato, a qual expressa a quantidade mínima do extrato capaz de reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH foi calculada por regressão não linear usando GraphPad Prisma versão 6.0. Cada experimento foi realizado em triplicata e os resultados da % de inibição do radical DPPH, bem como da CE50 foram expressos, ao final, como a média de três experimentos independentes.

4.6.3 Atividade sequestrante do radical hidroxil

A capacidade sequestrante do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) dos extratos de *E. involucrata* e de *Rubus* spp. cv. Xavante e *Black* 178, foi determinada pelo método de Halliwell, Gutteridge e Aruoma (1987).

Neste método, após a exposição ao radical $\cdot\text{OH}$ gerado via reação de Fenton (em que o íon ferroso (Fe^{2+}) reage com o H_2O_2), o açúcar desoxirribose é degradado em malondialdeído, o qual, sob aquecimento com o ácido tiobarbitúrico (TBA), produz um complexo de coloração rósea.

A habilidade dos extratos (10 a 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em remover o radical $\bullet\text{OH}$ foi determinada por registrar em leitor de microplaca (Spectramax 190, Molecular Devices), a queda na absorbância da cor rósea em 532 nm e calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ geração de hidroxil} = 100 - [A0 - (A1 - A2)] \times 100 \div A0 \quad (3)$$

Sendo, A0 é a absorbância do controle sem o extrato, A1 é absorbância após adicionar desoxirribose mais o extrato e A2 é a absorbância do extrato na ausência da desoxirribose. Cada experimento foi realizado em triplicatas e os resultados foram expressos, ao final, como a média de três experimentos independentes, em % de geração do radical hidroxil.

4.6.4 Atividade de remoção do radical superóxido

A atividade de remoção do radical superóxido (atividade tipo SOD) foi determinada pela habilidade dos extratos em inibir a auto-oxidação da epinefrina a adrenocromo, de coloração rósea, mediada pela formação do ânion radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) em meio básico. Essa diminuição na formação do adrenocromo na presença dos extratos foi monitorada em 480 nm por 10 min em leitor de microplaca (Spectramax 190, Molecular Devices).

Nesse ensaio, diferentes volumes dos extratos de *E. involucrata* foram adicionados a um meio contendo 50 mM de tampão glicina pH 10,2 e epinefrina 1 mM a 30°C, de modo a obter o volume de extrato que inibe 50% da oxidação da epinefrina (MISRA; FRIDOVICH, 1972). Os experimentos foram realizados em triplicatas e expressos como a média de três experimentos independentes em U SOD/mL de extrato.

4.6.5 Atividade de remoção do peróxido de hidrogênio

Avaliou-se a capacidade antioxidante dos extratos em atuar de forma semelhante a enzima antioxidante catalase (CAT) (atividade tipo CAT), isto é, se são capazes de converter o H_2O_2 em água e oxigênio através do método descrito por Aebi (1984). No meio de reação, os diferentes extratos de *E. involucrata* foram adicionados a um meio contendo tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e solução de H_2O_2 10mM. O desaparecimento do H_2O_2 foi monitorado pela diminuição da sua absorbância em 240nm, durante 5 minutos, em leitor de microplaca

(Spectramax 190, Molecular Devices). Cada experimento foi realizado em triplicatas e os resultados foram expressos, ao final, como a média de três experimentos independentes, em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{mL}^{-1}$ de extrato.

4.6.6 Atividade protetora contra a oxidação da glutationa

A capacidade dos extratos em inibir a oxidação da GSH foi avaliada na presença e na ausência do H_2O_2 . Para este ensaio, foi utilizado o método descrito por Ellman (1959), baseado no princípio de que o grupamento sulfidrílica da GSH liga-se com o reagente de Ellman (DTNB ou ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico). A reação produz um ânion tiolato (TNB ou ácido 5-tio-2-nitrobenzóico) que possui coloração amarela e pode ser medida espectrofotometricamente em 412 nm, sendo a formação de TNB é diretamente proporcional à concentração de GSH na amostra (Ellman, 1959).

Inicialmente foram preparadas 6 diluições de cada extrato de *E. involucrata* ou de *Rubus* spp. (10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 48 μL de cada diluição foi adicionada a um meio reacional contendo de tampão fosfato (TFK) 1M, (pH 6,8), H_2O_2 10mM, GSH 6mM e água ultrapura em um volume total de 1200 μL . Foi preparado um branco para cada tubo sem GSH para verificar uma possível absorbância dos extratos em 412 nm.

Após 30 minutos em repouso no escuro, 100 μL de cada meio reacional foi adicionado a novos tubos contendo 1 mL de DTNB 10mM. Os novos tubos foram agitados e deixados em repouso por 5 minutos. Posteriormente, 200 μL dessa solução foi lida em 412nm, em leitor de microplaca (Spectramax 190, Molecular Devices), utilizando um branco sem DTNB. Ao final, os resultados foram expressos como a média de três experimentos independentes como % de grupos sulfidrílicos reduzidos de GSH remanescentes.

4.7 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL

4.7.1 Cultura Celular

Para o ensaio de citotoxicidade, foram utilizadas duas linhagens celulares, sendo uma tumoral e outra não tumoral. Como modelo de linhagem tumoral, foi utilizada uma linhagem celular tumoral humana de adenocarcinoma de pâncreas (PANC-1), enquanto que como modelo de linhagem não tumoral, foi utilizada uma linhagem celular endotelial de veia umbilical humana (HUVEC). As duas linhagens foram cedidas pelo

Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas (GEIMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (Campus Florianópolis).

As células foram mantidas em garrafas plásticas específicas para cultura celular, contendo meio de cultura DMEM F12 (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico (penicilina 1%), pH 7.4, em estufa umidificada, a 37°C e com 5% CO₂.

4.7.2 Viabilidade Celular

Para o ensaio de viabilidade celular, os extratos foram inicialmente dissolvidos em DMSO em uma solução estoque com concentração de 400 mg.mL⁻¹. A partir desta solução, os compostos foram diluídos em soluções de uso em meio de cultura, a fim de alcançar as concentrações finais nos poços que variaram entre 1 e 1000 µg.mL⁻¹.

Após verificação da viabilidade celular e contagem de células com Azul de Tripán, as células foram plaqueadas na densidade de 7x10³ células por poço em placa de cultura de 96 poços e mantidas durante um período de 24 horas em meio, a fim de aderirem à placa. Posteriormente, foram submetidas às concentrações crescentes dos extratos e incubadas por 72 horas. Alguns poços receberam uma solução obtida a partir da diluição de DMSO em meio de cultura, na mesma proporção utilizada para dissolver os compostos, servindo como grupo controle. A máxima concentração de DMSO adicionada às células foi de 1%.

A viabilidade celular foi então avaliada pelo ensaio de redução do reagente resazurina e a absorbância final avaliada em leitor de placas, utilizando filtros de 570 nm e 600 nm, após 2 horas de incubação. O reagente resazurina é um indicador colorimétrico com a propriedade redox, assim a forma oxidada é azul (célula não viável) e a forma reduzida é rósea (célula viável), o corante se torna oxidado a partir do metabolismo decorrente da morte celular (O'BRIEN et al., 2000).

A partir dos valores de absorbância foi calculada a CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% das células) com base na curva sigmoide de concentração-resposta (Plot de Hill) através do programa GraphPad Prisma versão 6.1. O mesmo procedimento foi realizado para as células de linhagem não-tumoral (HUVEC).

O Índice de Seletividade (IS) foi calculado através da divisão da CC₅₀ encontrada para a linhagem celular não tumoral (HUVEC) pela CC₅₀ encontrada para a linhagem celular tumoral (PANC-1).

$$IS = CC_{50 \text{ HUVEC}} \div CC_{50 \text{ PANC-1}} \quad (4)$$

4.7.3 Avaliação do tipo de Morte Celular por Microscopia de Fluorescência

Para a realização deste ensaio, as células foram adicionadas em placas de 12 poços (1×10^5 células/poço) e mantidas por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 .

Após esse período, as células foram submetidas aos tratamentos com a CC50 sendo novamente incubadas por 24 horas. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e coradas com $0,3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de laranja de acridina (LA) e $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de brometo de etídio (BE) e avaliadas em microscópio de fluorescência com aumento de 400x, conforme descrito por Nunes et al. (2018).

O método de coloração BE/LA possibilita diferenciar através da visualização, as células viáveis daquelas que estão em processo de morte, seja por necrose ou apoptose. O corante LA tem capacidade de atravessar a membrana celular intacta, como ocorre nos casos de apoptose, e cora de verde o núcleo que se apresenta condensado e fragmentado. A coloração por BE, tem característica de marcar células necróticas com membrana danificada e pigmentar o núcleo de laranja e/ou vermelho, conforme descrito por Kosmider et al. (2004).

4.7.4 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A perda do potencial mitocondrial é uma característica da apoptose, sendo que este evento ocorre antes da externalização da fosfatidilserina e coincide com a ativação das caspases (PEREIRA, 2014).

Desse modo, para explorar o efeito do extrato S50 no potencial de membrana mitocondrial, foi utilizada a sonda catiônica lipofílica fluorocromo JC-1.

Em mitocôndrias funcionais, o corante JC-1 adentra a célula e acumula-se na organela emitindo a coloração vermelha, enquanto que em mitocôndrias com baixo a médio potencial de atividade de membrana a fluorescência emitida é verde (CHAZOTTE, 2011).

As células foram plaqueadas numa densidade de 2×10^5 células/poço e incubadas com o dobro da CC50 do extrato S50 durante 4 h. Em seguida, uma solução da JC-1 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi adicionada e as células foram incubadas por 20 min a 37°C e 5% CO_2 . Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em $200 \mu\text{L}$ de PBS, o qual foi usado para medir a fluorescência vermelha e verde em espectrofluorímetro (Perkin Elmer LS55). As duas fluorescências foram

excitadas em 488nm, a fluorescência vermelha foi detectada em 590 nm e a verde em 527 nm de emissão. O potencial mitocondrial foi calculado como uma taxa (vermelha/verde) e expresso em porcentagem, sendo as células sem tratamento consideradas como 100% de $\Delta\Psi$.

4.7.5 Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio

A formação intracelular de EROS foi determinada usando diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), que é oxidado a diclorofluoresceína (DCF) na presença de EROS. As células foram plaqueadas numa densidade de 2×10^5 com o dobro da CC50 por 4 h a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados 10 μ M de DCFH-DA as células e as mesmas forma mantidas em incubação por mais 30 minutos, nas mesmas condições anteriormente citadas. Depois da incubação, foi realizada a lavagem com PBS e a fluorescência da DCF foi medida, a qual é proporcional à quantidade de EROs formada intracelularmente. Os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína e a medida espectrofluorimetricamente em 280 nm para excitação e 340 nm para emissão.

4.7.6 Preparo dos extratos celulares para avaliação dos mecanismos de citotoxicidade

Os extratos de *E. involucrata* foram previamente dissolvidos em água, a fim de obter a concentração de 50mg.mL⁻¹. As células foram tratadas com os extratos usando volume suficiente para a obtenção da CC50 e o dobro da concentração de CC50 foi administrado por um tempo de incubação de 24h. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o conteúdo foi transferido para tubos falcons de 15 mL. Após nova lavagem, as células foram ressuspensas e mantidas por 30 minutos em tampão homogenato (20 mM tampão fosfato, 1% de Triton x-100 e 150 mM de Cloreto de Sódio) gelado pH 7,4 adicionado de inibidores de protease (Pepstatina 2 μ g.mL⁻¹, Leuceoptina 2 μ g.mL⁻¹, Aprotinina 5 μ g.mL⁻¹ e PMSF 1mM).

Posteriormente, o conteúdo dos tubos foi transferido para microtubos, que foram centrifugados (10000g, 30 minutos) e o sobrenadante armazenado em ultrafreezer (-80° C) até o momento da utilização.

4.7.7 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando a albumina de soro bovino como padrão. O ensaio foi realizado antes de cada dosagem enzimática ou de tióis totais, a fim de ajustar a concentração de proteína a ser utilizada para cada amostra.

4.7.8 Tióis totais (T-SH)

Para a sua determinação, foi utilizada uma solução de GSH 6mM recentemente preparada, tampão fosfato 0,2M pH 8,0 e DTNB 10mM. Uma curva padrão de GSH foi realizada, conforme descrito por Tietze (1969). Foram adicionados aos poços da placa, 5 μ L de amostra (lisados celulares) e completou-se o volume para 200 μ L com o tampão fosfato adicionado da GSH. Posteriormente, foi adicionado 5 μ L de DTNB 10mM e após 5 minutos, realizou-se a leitura em 412nm. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores finais, foram corrigidos pela quantidade de proteína e expressos em porcentagem em relação ao controle, que foi considerado como 100% de tióis.

4.7.9 Catalase intracelular (CAT)

Utilizou-se o método descrito por Aebi (1984), que quantifica a velocidade de decomposição do H₂O₂ pela enzima presente na amostra, em 240 nm. Para a reação, foi preparada no dia da análise, uma solução de H₂O₂ 10mM em tampão fosfato 50mM pH 7,0.

Para o ensaio, foram colocados 4 μ L de lisado celular e 96 μ L da solução contendo H₂O₂. Após a adição dessa solução, foi realizada a leitura da reação cinética durante 10 minutos, sendo as absorbâncias lidas a cada 5 segundos. Para o cálculo da atividade da CAT foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{CAT (mmol.minuto}^{-1}.\mu\text{g}^{-1}) = \frac{[(K) \times 60 \times \text{diluição}]}{\text{PTN}} \times 1000 \quad (5)$$

Sendo, K = coeficiente angular da equação de reta obtida de cada amostra; $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Diluição = 1x; PTN = proteína em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores finais, foram corrigidos pela quantidade de proteína e expressos em porcentagem em relação ao controle que foi considerado como 100% de atividade.

4.7.10 Superóxido dismutase intracelular (SOD)

A atividade da enzima SOD nos lisados celulares foi medida através da capacidade das amostras em inibirem a auto-oxidação da epinefrina a adrenocromo (coloração rósea) mediada pela formação do ânion radical superóxido (O_2^-) em meio básico. O aumento a absorbância do adrenocromo foi monitorado em 480 nm durante 10 minutos.

Nesse ensaio, diferentes volumes dos lisados (controle e tratamento) foram adicionados a um meio contendo 50 mM de tampão glicina pH 10,2 e epinefrina 1 mM a 30°C, de modo a obter o volume de extrato celular que inibe 50% da oxidação da epinefrina, o que corresponde a 1 unidade (U) de SOD (MISRA; FRIDOVICH, 1972). Os experimentos foram realizados em triplicatas e expressos como a média de três experimentos independentes.

4.7.11 Glutathiona peroxidase intracelular (GPx)

O princípio desse método é baseado na dismutação do Terc-Butil (t-BuOOH) inserido no ensaio pela Gpx, formando uma ponte dissulfeto entre duas GSH (GS-SG), que posteriormente volta ao estado reduzido como 2 moléculas de GSH, pela ação da GR. A GR reage mediante a oxidação de NADPH, assim, o ensaio é uma medida indireta que consiste em registrar a redução de NADPH em 340 nm. (FLOHÉ; GUNZLER, 1984).

Para este ensaio utilizou-se 10 μ L de lisado celular e 10 μ L de t-BuOOH 0,04% colocados em 180 μ L de um meio de reação (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, NADPH 0,2mM, DPTA 0,5 mM pH 7,0, GSH 1,6mM e 15U de GR colocada imediatamente antes do ensaio).

Após a adição do meio de reação, foi realizada a leitura da reação cinética num tempo total de 10 minutos. Para o cálculo de GPx contida nas amostras foi utilizada a seguinte equação:

$$GPx \text{ (mmol.minuto}^{-1}.\mu\text{g}^{-1}) = [(K) \times \text{diluição} \times 1000 \times 60] \div \text{PTN} \quad (6)$$

Sendo, K= coeficiente angular da equação de reta obtida de cada amostra; $\varepsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Diluição: 1x; PTN: proteína em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores finais, foram expressos corrigidos pela quantidade de proteína e expressos em porcentagem de atividade enzimática em relação ao controle que foi considerado como 100% de atividade.

4.7.12 Glutathione redutase intracelular (GR)

Para a análise da atividade desta enzima, foi utilizado o método descrito por Carlberg e Mannervik (1985), onde avalia-se a taxa de oxidação do NADPH causada pela redução da GSSG à GSH, catalisada pela GR presente na amostra, em 340 nm.

Foi utilizado 10 µL de lisado celular em 190 µL do meio de reação (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; NADPH 0,2mM, GSSG 1mM e DPTA 0,5mM). Após a adição do meio de reação, foi realizada a leitura da reação cinética da oxidação do NADPH, num tempo total de 10 minutos.

Para o cálculo de GR contida na amostra foi utilizada a seguinte equação:

$$GR \text{ (mmol.minuto}^{-1}.\mu\text{g}^{-1}) = [(K) \times \text{diluição} \times 1000 \times 60] \div \text{PTN} \quad (7)$$

Sendo, K= coeficiente angular da equação de reta obtida de cada amostra; Diluição: 20x; PTN: ($\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$)

O ensaio foi realizado em triplicata e os valores finais, foram corrigidos pela quantidade de proteína e expressos em porcentagem de atividade enzimática em relação ao controle que foi considerado como 100% de atividade.

4.7.13 Glutathione S transferase intracelular (GST)

A atividade de GST dos extratos obtidos a partir das células foi determinada segundo o método de Habig, Pabst e Jakoby (1974), usando 1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno (CDNB) e GSH como substratos. Ao meio de reação, foram adicionados 20 µL do lisado celular ao poço da placa contendo um meio com 10 µL CDNB 0,1 M, 10 µL de GSH 0,1 M e 260 µL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

O aumento da absorbância causado pela formação do conjugado GS-DNB foi monitorado durante 5 minutos. Para o cálculo de GST presente nas amostras foi utilizada a seguinte equação:

$$GST \text{ (}\mu\text{mol.minuto}^{-1}.\mu\text{g}^{-1}) = [(K) \times \text{diluição} \times 1000 \times 60] \div \text{PTN} \quad (8)$$

Sendo, K= coeficiente angular da equação de reta obtida de cada amostra, PTN: ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). O ensaio foi realizado em triplicata e os valores finais foram corrigidos pela concentração de proteína e expressos em

porcentagem de atividade enzimática em relação ao controle que foi considerado como 100% de atividade.

4.7.14 Avaliação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é uma das metodologias utilizadas na avaliação do estresse oxidativo. Dessa forma, os produtos deste tipo de reação têm sido usados para determinar o dano oxidativo aos lipídios (RANI et al, 2016).

O método utilizado foi o descrito por Bird e Draper (1984), que mede a geração do complexo formado entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malondialdeído, um dos principais produtos da peroxidação lipídica, de coloração rósea.

Assim, o teste de TBARS foi realizado em microtubos a partir da adição de 160 μ L de lisado celular, 340 μ L de tampão tris-HCl (60 mM, pH 7,4, 0,1 mM DPTA, 500 μ L de TCA 12% e 500 μ L de TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,73%. Os microtubos foram agitados e mantidos em água fervente por 1 h. Posteriormente, o material foi resfriado e centrifugado (10 minutos a 10000g). Por fim, a absorbância do sobrenadante foi medida em 535 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores finais, foram expressos em porcentagem de TBARS em relação ao controle que foi considerado como 100%.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão. As diferenças entre os grupos foram analisadas por Teste t Student ou ANOVA seguida pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

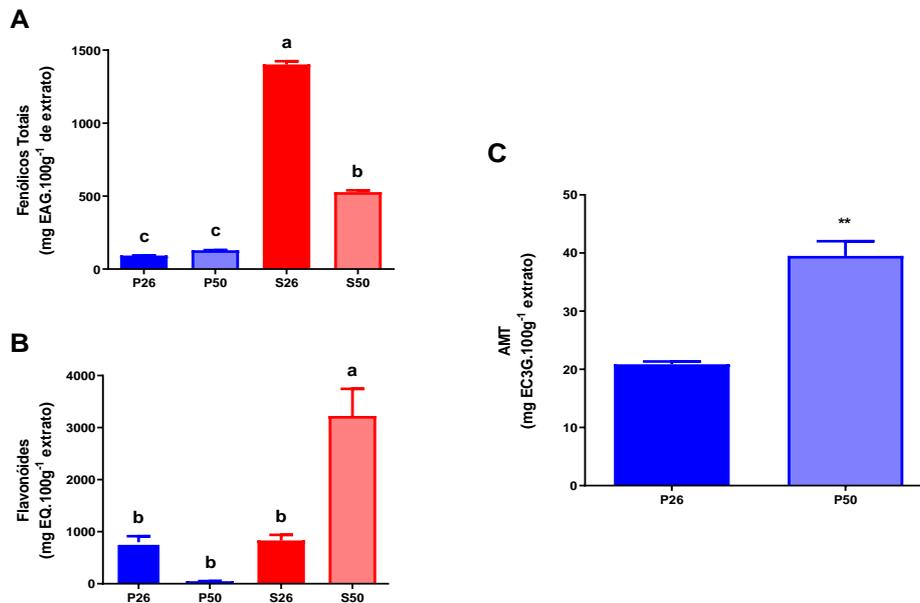
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Eugenia involucrata*

5.1.1 Compostos Bioativos

A quantificação espectrofotométrica dos compostos bioativos foi realizada a partir de extratos que utilizaram duas temperaturas diferentes com o objetivo verificar qual dos dois métodos seria o mais adequado quanto à extração de compostos bioativos e atividade antioxidante. A influência da temperatura foi avaliada pois alguns estudos sugerem que em torno de 50°C a enzima polifenol oxidase (PFO), envolvida na degradação de compostos bioativos é inativada, exercendo um efeito positivo na retenção das antocianinas (SKREDE; WROLSTAD; DURST, 2000; PATRAS et al., 2010). Os extratos foram identificados como P26, P50, S26 e S50 para a polpa dos frutos extraída a 26°C e 50°C, e para as sementes extraídas a 26 e 50°C, respectivamente. Os resultados da quantificação espectrofotométrica dos compostos bioativos são demonstrados na Figura 12.

Figura 12 - Quantificação de Compostos Bioativos. (A) Fenólicos totais, (B) Flavonoides e em (C) Antocianinas Monoméricas Totais (AMT) nos extratos de *E. involucrata*. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Em (A) e (B) barras com letras diferentes indicam resultados significativamente diferentes entre si. Em (A) $p < 0,0001$, (B) $p < 0,005$ (ANOVA/Tukey) e em (C), $**p < 0,01$, Test t. EAG: Equivalentes de Ácido Gálico; EQ: Equivalentes de Quercetina; EC3G: Equivalentes de Cianidina 3-O-Glicosídeo)



O conteúdo de compostos fenólicos totais diferiu significativamente entre os tecidos da planta (fruto e semente) e entre as temperaturas de extração. Quanto aos tecidos, existe maior conteúdo de fenólicos totais nas sementes ($1.402,00 \pm 22,62$ e $527,70 \pm 6,58$ mg EAG.g⁻¹ de extrato para S26 e S50, respectivamente) independente da temperatura de extração utilizada, quando comparada aos frutos ($92,71 \pm 0,90$ e $129,30 \pm 0,40$ mg EAG.g⁻¹ de extrato para P26 e P50, respectivamente) (Figura 12A). De forma semelhante, Infante et al. (2016) encontraram maior conteúdo de compostos fenólicos nos extratos etanólicos de semente ($22,75 \pm 0,50$ mg EAG.g⁻¹ de extrato seco) em relação aos da polpa ($18,36 \pm 0,66$ mg EAG.g⁻¹ de extrato seco). Ainda, no mesmo estudo, avaliando em conjunto outras espécies do mesmo gênero, os autores sinalizaram a seguinte tendência para o conteúdo de fenólicos na *E. involucrata*: folha > semente > polpa. Embora o conhecimento sobre a identidade dos compostos fenólicos das sementes de *E. involucrata* seja escasso, Infante et al. (2016) demonstraram que o ácido gálico e a quercetina foram os polifenóis majoritários nas sementes de *E. involucrata*, enquanto nos frutos, somente o ácido gálico foi encontrado como majoritário. Além do ácido gálico, Nicacio et al (2010) encontraram o ácido p-cumárico e o ácido clorogênico, entre os principais compostos fenólicos das sementes de *E. involucrata*.

Quanto às diferentes temperaturas de extração, observou-se uma diminuição de 37,64% no conteúdo de fenólicos do extrato de semente S50 em comparação ao extrato S26, o que pode indicar uma possível degradação de alguma (s) classe (s) de compostos fenólicos quando a extração ocorre em temperaturas mais elevadas. Estudos evidenciam a redução no teor de polifenóis totais em extratos de plantas, porém a temperatura mínima para essa redução ocorrer varia entre os estudos, além de ser um fator também dependente do tempo de extração (TSAO, 2010; AKOWUAH; MARIAM; CHIM; 2009). Vergara-Salinas et al. (2012) observaram que as condições de 100°C por 5min foram as melhores em recuperar o maior teor de fenólicos totais, ácidos hidroxicinâmicos, flavonas e flavonóis/flavanonas de *Thymus vulgaris* (tomilho). Sharma et al. (2015) demonstraram que o aquecimento dos extratos de seis variedades de cebola a temperaturas entre 80-150°C durante 30 minutos, resultou em maior teor de polifenóis totais e maior atividade antioxidante em todas as variedades estudadas, apenas com redução do teor de quercetina e de seu glicosídeo a partir da temperatura de 150°C. Portanto, esses dados indicam que há necessidade de se realizar mais estudos visando investigar como fatores combinados de temperatura

e tempo de extração podem afetar a recuperação e a decomposição dos polifenóis de *E. involucrata*.

Pode-se citar ainda, o fato de que outros compostos redutores diferentes dos polifenóis, podem estar presentes nas sementes e também reagem com o reagente Folin-Ciocalteu utilizado no método (agentes redutores como proteínas, tióis, ácido ascórbico, Fe (II), ácidos orgânicos, etc.), e podem ser sensíveis ao aumento de temperatura (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Nesse caso, a diminuição específica da concentração desses interferentes sob extração à 50°C pode ter dado a falsa impressão de uma diminuição dos compostos fenólicos no extrato S50.

Diferente dos compostos fenólicos totais, a concentração de flavonoides totais foi maior para as sementes em relação aos frutos somente quando o extrato das sementes foi obtido à maior temperatura (50°C), obtendo-se o valor médio de flavonoides para S50 de $3.224,00 \pm 520,00$ em comparação aos valores de $832,00 \pm 106,90$, $798,20 \pm 117,10$ e $48,28 \pm 3,07$ mg QE.100 g⁻¹ de extrato dos extratos S26, P26 e P50, respectivamente (Figura 12B). Semelhante a esses resultados, Mokrani e Madani (2016) também demonstraram que a concentração de flavonoides dos frutos de pessegueiro (*Prunus persica* L.) aumentou em torno de 160% quando a temperatura de extração aumentou de 25 para 60°C, com todas as extrações realizadas durante 180 min. Outro possível fenômeno que pode explicar o aumento do conteúdo de flavonoides no extrato S50 é que em alguns casos, temperaturas mais altas de extração promovem um amaciamento no tecido vegetal resultando em maior difusão dos compostos bioativos, e possibilitando a obtenção de uma maior concentração desses compostos no extrato obtido (GOMES et al., 2013). Esses dados podem explicar, portanto, porque o extrato de semente obtido à maior temperatura (50°C) demonstrou maior concentração de flavonoides totais em relação ao extrato obtido à menor temperatura (26°C). Por outro lado, a diminuição das concentrações de flavonoides nos frutos, quando submetidos a 50°C pode estar relacionado ao fato de que esse tecido é mais sensível, quando comparado a semente, em relação à estrutura celular vegetal de cada um. Dessa forma, sugere-se que a diferença na matriz vegetal de cada tecido da planta pode ter ocasionado essa diferença no impacto da temperatura e quantificação de flavonoides observada. Ao passo que na semente, o aumento da temperatura favoreceu a extração, nos frutos, onde os flavonoides já estavam mais disponíveis, o contato com a maior temperatura pode ter degradado os mesmos.

Não foram encontrados até o momento, estudos avaliando o teor de antocianinas em extratos dos frutos da *E. involucrata*. Nossos dados

demonstram que além de prover maior concentração de flavonoides no extrato de semente (S50), a maior temperatura de extração dos frutos (50°C) também promoveu um aumento de 89% na concentração de antocianinas monoméricas totais (AMT), cujo valor médio para P26 e P50 foi de $20,86 \pm 0,48$ e $39,51 \pm 1,46$ mg EC3G.100g⁻¹ de extrato, respectivamente (Figura 12C). Em concordância com os nossos resultados, Teles et al. (2017) também observaram que na maior temperatura testada para secagem de bagaço de uva (na faixa de 40 a 60°C), a retenção de compostos fenólicos foi maior possivelmente devido à inativação da enzima polifenol oxidase (responsável pela degradação das antocianinas), bem como à menor atividade de água devido ao processo de aquecimento (Teles et al., 2017). Além disso, a inclusão de uma etapa de branqueamento (aquecimento em torno de 50°C) tem demonstrado exercer um efeito positivo na retenção de antocianinas em frutos de diferentes espécies devido à inativação da enzima polifenol oxidase (SKREDE; WROLSTAD; DURST, 2000; PATRAS et al., 2010). Outro fator que contribui para uma extração mais efetiva de antocianinas, é a proporção amostra/solvente que propicia maior taxa de difusão dos bioativos (Oncea; Stoia e Coman, 2012). Entretanto, esse fator parece não ter contribuído para a diferença no conteúdo de AMT entre os extratos P26 e P50, pois ambos foram obtidos utilizando a mesma proporção amostra/solvente, sendo a temperatura o único fator variável entre esses extratos.

5.1.2 Identificação das antocianinas

A caracterização antociânica nos extratos de polpa da espécie *E. involucrata* é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização química antociânica dos frutos de *E. involucrata*.

Item	TR (minutos)	m/z [M]⁺	Principais fragmentos	Fórmula molecular	Erro (ppm)	Sugestão de identificação
1	7,64	747,1894				NI
2	9,01	579,1497	409,0916; 287,0558			Derivado de cianidina
3	10,23	465,1032	303,0479	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	-0,2	Delfinidina-O-hexosídeo
4	13,63	449,1079	287,0557	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	-1,1	Cianidina-3-O-glicosídeo
5	15,07	563,1544	287,0558	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₁	-1,6	Cianidina-O-cinamil-ramnosídeo
6	16,66	433,1130	271,0606	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	-1,2	Pelargonidina-3-O-glicosídeo
7	18,52	419,0982	287,0558	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	1,0	Cianidina-O-pentosídeo

Legenda: NI - Não identificado.

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

O preparo em diferentes temperaturas (26 ou 50°C) não interferiu no perfil qualitativo, que foi o mesmo para ambos os extratos conforme dados obtidos por CLUE/DAD (Apêndice A). A antocianina majoritária foi a cianidina-3-*O*-glicosídeo, cujos espectro UV-Vis e espectro de massas são apresentados nos Apêndices B e C, respectivamente).

Dados obtidos por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* em modo positivo demonstraram a presença de seis antocianinas nos frutos de *E. involucrata* (Tabela 1 e Apêndice D): derivado da pelargonidina (m/z 271), da delphinidina (m/z 303) e quatro derivados da cianidina (m/z 287).

Dados sobre a caracterização antociânica dos frutos de *E. involucrata* são pouco disponíveis. Infante et al. (2016) realizaram a identificação de alguns compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides e seus derivados) nos frutos dessa espécie vegetal, mas a identificação dos compostos fenólicos antociânicos só foi descrita em outro estudo (DAMETTO, 2014). No presente estudo, os resultados obtidos demonstraram que das seis antocianinas encontradas, uma é descrita pela primeira vez nos frutos de *E. involucrata*: **cianidina-*O*-cinamil-ramnosídeo**. Dois derivados da cianidina (cianidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-*O*-pentosídeo), bem como a pelargonidina-3-*O*-glicosídeo foram previamente descritas para a *E. involucrata* no trabalho de Dametto (2014), que identificou as antocianinas por CLAE-DAD-EM/EM em fração metanólica liofilizada do extrato dos frutos de *E. involucrata*. Dametto (2014) também demonstrou que a cianidina-3-*O*-glicosídeo é a antocianina majoritária dessa fruta, o que está de acordo com os dados obtidos pelo nosso estudo. Além disso, assim como naquele estudo (DAMETTO, 2014), não foram encontradas no presente trabalho, as antocianinas derivadas das agliconas malvidina, petunidina ou peonidina.

Porém, diferente dos nossos resultados, além das cianidinas mencionadas e da pelargonidina-3-*O*-glicosídeo, Dametto (2014) identificou mais dez antocianinas nos frutos de *E. involucrata*, as quais são citadas a seguir: cianidina-3-*O*-soforosídeo, delphinidina-3-*O*-laminaribiosídeo, delphinidina-3-*O*-galactosídeo, cianidina-3-*O*-laminaribiosídeo, cianidina-3-*O*-sambubiosídeo, cianidina-3-*O*-cafeoil-diglicosídeo, cianidina-3-*O*-cafeoil-glicosídeo, delphinidina-3-*O*-cumaroil-glicosídeo, cianidina-3-*O*-maloil-glicosídeo, cianidina-3-*O*-acetoil-glicosídeo.

Embora se trate da mesma espécie *E. involucrata* em ambos os estudos e as antocianinas tenham sido identificadas por cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas, as diferenças observadas

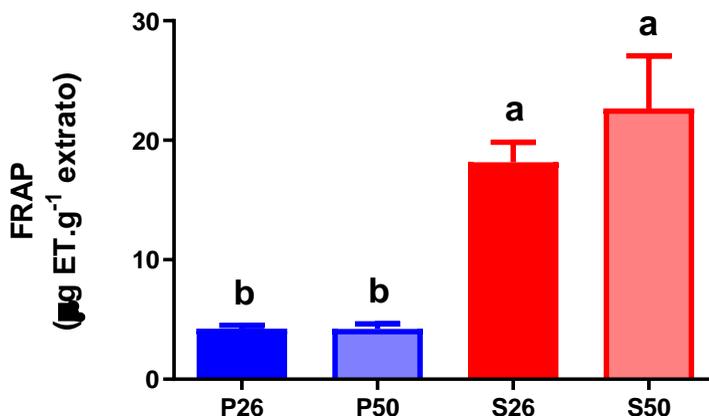
quanto aos dados de identificação das antocianinas podem estar relacionadas a diferenças nos fatores ambientais entre as regiões de coleta, como a umidade, variações de altitude, temperatura e intensidade da radiação solar (YANG et al., 2016). De fato, a produção de antocianinas e flavonoides parece estar positivamente correlacionada com a temperatura e a intensidade da radiação luminosa, uma vez que esses compostos têm importante papel protetor contra a fotodestruição em tecidos superficiais das plantas (COHEN, KENNEDY, 2010). Outros fatores como o tipo de cultivar, a idade, o desenvolvimento da planta, bem como o ataque de insetos também podem influenciar no conteúdo de fenólicos em vegetais (FRANCISCO et al., 2012). Não se pode descartar as características dos solos das diferentes regiões, uma vez que essas podem influenciar na taxa de crescimento dos vegetais e na disponibilidade de nutrientes e água para a planta. Em solos com disponibilidade mais escassa de nutrientes, os mesmos seriam mais direcionados à produção de compostos de defesa, entre esses, os compostos fenólicos, o que pode levar a um aumento tanto na concentração quanto na diversidade de compostos fenólicos antociânicos e não antociânicos (ALBUQUERQUE; RAMOS; MELO, 2012).

5.1.3 Atividade antioxidante

A fim de melhor caracterizar o potencial antioxidante de um extrato ou composto antioxidante, são utilizadas diferentes metodologias de avaliação dessa atividade, pois nenhum método isolado é capaz de refletir de forma acurada todos os mecanismos envolvidos na ação antioxidante de um sistema complexo (MENG et al., 2012). No presente estudo, foram utilizados os ensaios de atividade antioxidante redutora de ferro (FRAP), removedora do radical DPPH e do radical superóxido.

O método de FRAP avalia a habilidade dos compostos antioxidantes em transferir elétron e promover a redução do íon férrico (Fe^{3+}) a íon ferroso (Fe^{2+}) *in vitro*. Consequentemente, essa habilidade redutora pode refletir a capacidade do antioxidante em doar elétrons para ERs, estabilizando-os às formas não reativas (BENZIE; STRAIN, 1996). Os dados obtidos frente a análise de FRAP dos quatro extratos da cereja são demonstrados a seguir (Figura 13).

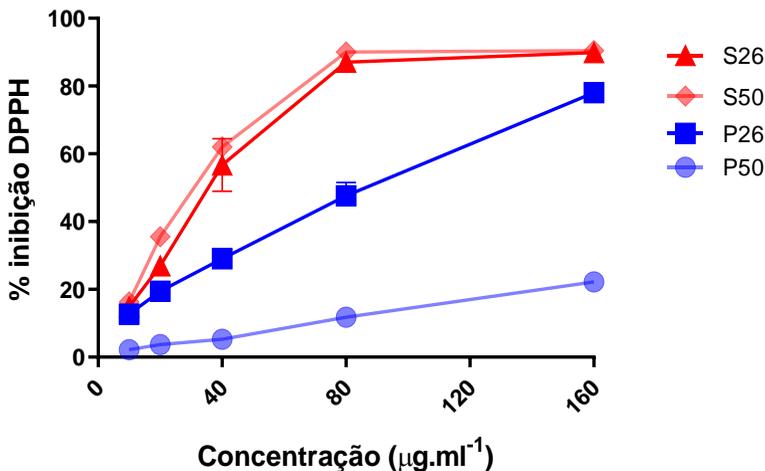
Figura 13 - Atividade antioxidante redutora de ferro (FRAP) nos extratos de fruto e de semente de *E. involucrata*. Os dados são expressos como média \pm E.P. de três experimentos independentes. FRAP foi avaliado utilizando a concentração de $20\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada extrato. Barras com letras diferentes indicam resultados significativamente diferentes entre si ($p < 0,001$, ANOVA). ET: Equivalente de Trolox.



Nossos resultados demonstraram que os extratos das sementes S26 e S50 apresentaram maior atividade redutora ($18,17 \pm 1,67$ e $22,65 \pm 4,41 \mu\text{g ET.g}^{-1}$ de extrato, respectivamente) do que os extratos dos frutos P26 e P50 ($4,24 \pm 0,28$ e $4,22 \pm 0,41 \mu\text{g ET.g}^{-1}$ de extrato, respectivamente), independente da temperatura de extração (Figura 13).

Quanto ao método baseado no sequestro do radical DPPH, o mesmo pode refletir a capacidade antioxidante de um composto ou de extratos com base em dois mecanismos possíveis, ou seja, pela transferência de elétron e/ou pela transferência de hidrogênio (HUANG; OU; PRIOR; WU, 2005; SCHAICH, 2005). Assim, tanto FRAP quanto DPPH avaliam mecanismos de atividade antioxidante similares, o que explica as frequentes correlações encontradas por diferentes estudos entre os resultados desses dois métodos (THAIPONG et al., 2006; MÜLLER; FRÖHLICH; BÖHM, 2011; WOOTTON-BEARD; MORAN; RYAN, 2011). Na Figura 14, são demonstrados os resultados da atividade expressa em % de inibição do DPPH para todas as concentrações testadas.

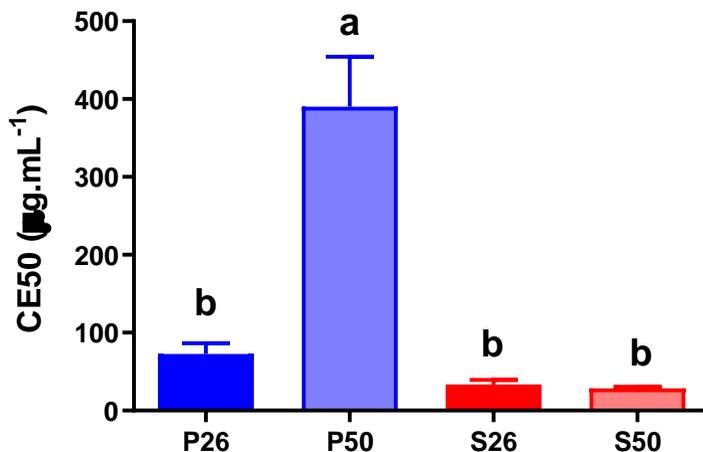
Figura 14 - Atividade sequestrante do radical DPPH dos extratos do fruto e semente de *E. involucrata*. Os dados são expressos como média \pm E.P. de três experimentos independentes.



De maneira semelhante aos dados obtidos pelo método de FRAP, a atividade sequestrante do radical DPPH também foi maior para os extratos de sementes S26 e S50 em relação aos extratos da polpa P26 e P50 na faixa de concentração avaliada (de 20 a 160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Porém, em relação aos frutos, o extrato obtido à maior temperatura (P50) apresentou a menor atividade sequestrante de DPPH (Figura 14).

A partir da curva de dose resposta, foi possível determinar a CE50 para cada um dos extratos (Figura 15), a qual expressa a concentração mínima de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH. Esse dado confirma a menor capacidade sequestrante do radical DPPH para o P50, uma vez que esse valor foi significativamente maior ($390,20 \pm 37 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em relação a todos os demais extratos ($72,76 \pm 7,99$; $33,68 \pm 3,27$ e $28,45 \pm 1,37 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para P26, S26 e S50, respectivamente). No entanto, apesar da % de inibição do DPPH ter sido maior para os dois extratos das sementes S26 e S50 (Figura 14), o valor de CE50 não diferiu estatisticamente entre esses extratos e o extrato da fruta P26 (Figura 15).

Figura 15 - CE50 dos extratos de *E. involucrata* determinada para o método de sequestro do radical DPPH. Os dados são expressos como média \pm E.P. de três experimentos independentes. Barras com letras diferentes indicam resultados significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$, ANOVA).



A maior atividade antioxidante *in vitro* dos extratos das sementes, obtida pelos métodos de FRAP e DPPH, pode estar relacionada ao maior conteúdo de compostos fenólicos totais nas sementes em comparação aos frutos (Figura 12A). Adicionalmente, não se pode descartar a contribuição dos flavonoides para a maior atividade antioxidante dos extratos de sementes em relação aos dos frutos, cuja concentração foi especialmente elevada no extrato S50 (Figura 12B). Mesmo que o conteúdo de flavonoides totais tenha sido diferente entre os dois extratos das sementes, a presença de uma maior variedade de flavonoides nas sementes em relação à polpa dos frutos de *E. involucrata* (INFANTE et al., 2016) pode ter contribuído para uma maior atividade antioxidante nos extratos de sementes observada no presente estudo. Por outro lado, a menor atividade antioxidante do extrato dos frutos P50 em relação ao P26, observada pelo método de remoção do DPPH, pode estar relacionada à degradação específica de compostos responsáveis por essa atividade, não se descartando a possibilidade de ser atribuída à redução do conteúdo de flavonoides no extrato P50 (Figura 12B).

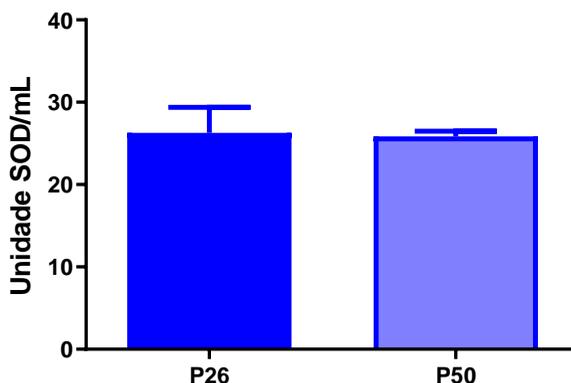
Os nossos resultados corroboram com os resultados encontrados por Infante et al (2016), que além de menor conteúdo de fenólicos totais,

também demonstraram que a atividade antioxidante das polpas de *E. involucrata* foi inferior a das sementes, sendo que para o DPPH, a EC50 obtida foi de $346,70 \pm 14,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato das sementes e $988,52 \pm 22,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as polpas. A diferença entre os valores de EC50 obtidos por esse grupo e o nosso trabalho pode ser atribuída a fatores como as formas diferentes de preparações dos extratos entre os dois estudos, diferentes locais de produção das frutas, os quais podem sofrer interferências de diferentes variações climáticas, características do solo, altitude, entre outros fatores e que podem interferir no teor final de compostos bioativos, bem como de sua atividade antioxidante (COHEN, KENNEDY, 2010; FRANCISCO et al., 2012).

Ainda em concordância com os nossos resultados, a atividade antioxidante maior para a semente em relação aos frutos, também é semelhante aos dados obtidos por Nicácio et al. (2017), em que as sementes de *E. involucrata* apresentaram maior atividade antioxidante independentemente do método utilizado (DPPH, ABTS e ORAC), o que segundo os autores foi em decorrência dos diferentes tipos de compostos extraídos, bem como dos diferentes radicais envolvidos nos métodos de avaliação (NICÁCIO et al., 2017). Ainda, os autores observaram que valores mais altos de atividade foram obtidos quanto maior era a polaridade dos solventes utilizados, o que foi atribuída à melhor capacidade de solvatação (capacidade de aceitar e doar elétrons) desses solventes, uma vez que possuíam mais próton aceptores do que solventes apolares (BOEING et al., 2014; NICÁCIO et al., 2017).

Diferente dos resultados de FRAP e DPPH, a atividade removedora do ânion radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ foi detectada apenas para os dois extratos da polpa, P26 e P50 (Figura 16), não sendo possível detectar essa atividade nos extratos das sementes. Essa atividade foi avaliada como atividade tipo SOD, em que uma unidade (U) de SOD é expressa como o volume de extrato que inibe 50% da oxidação da epinefrina. Os resultados expressos em U SOD/mL de extrato não foram diferentes entre o P26 e o P50, sendo encontrado os valores de $20,28 \pm 3,11$ e $25,84 \pm 0,65$ U SOD/mL de extrato para a P26 e P50, respectivamente.

Figura 16 – Determinação de atividade tipo SOD para os extratos da polpa de *E. involucrata*. Os dados obtidos são expressos como média \pm E.P. de três experimentos independentes (Test t, $p > 0,05$).



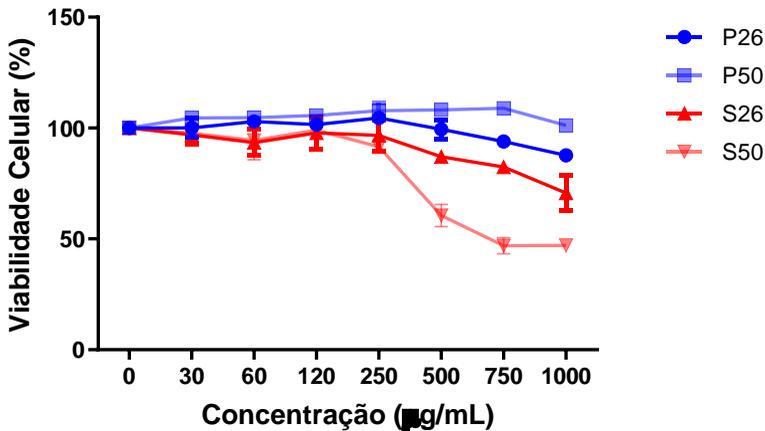
Esses resultados discordam daqueles encontrados por Infante et al. (2016) que encontrou atividade removedora do ânion radical $O_2^{\bullet-}$ apenas para o extrato da semente de *E. involucrata*, não tendo detectado essa atividade para a polpa e casca. Essa diferença entre os dois estudos pode estar relacionada ao uso de diferentes metodologias para a avaliação dessa atividade (MELO et al., 2015; MISRA; FRIDOVICH, 1972). De qualquer forma, a presença dessa atividade nos frutos de *E. involucrata* no nosso estudo pode estar relacionada às antocianinas, uma vez que as antocianinas nas formas agliconas ou nas formas ligadas ao seu resíduo de açúcar, foram aptas a remover o ânion radical $O_2^{\bullet-}$ (RAHMANN et al., 2006).

Nosso estudo também avaliou a atividade removedora do radical $^{\bullet}OH$, mas nenhum dos quatro extratos de *E. involucrata* apresentaram-se ativos nesses ensaios (dados não mostrados). Da mesma forma, nenhum dos extratos apresentou habilidade em prevenir a oxidação da GSH induzida pelo H_2O_2 *in vitro* (dados não mostrados), o que sugere que os extratos embora tenham apresentado capacidade redutora e habilidade em remover radical (DPPH e/ou $O_2^{\bullet-}$), não são aptos a prevenir alterações características de danos oxidativos, como a oxidação da GSH.

5.1.4 Avaliação da citotoxicidade e morte celular dos extratos

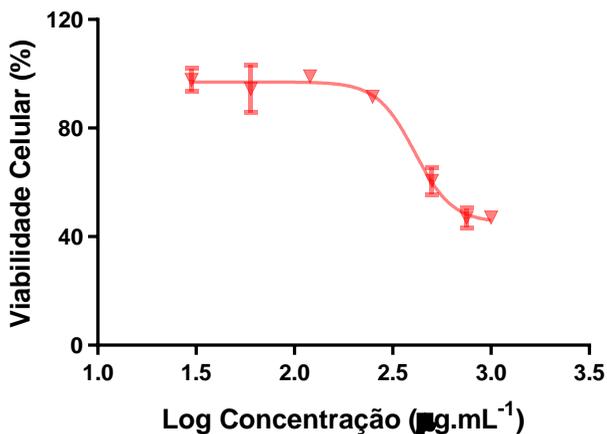
Neste trabalho, buscamos avaliar a citotoxicidade dos extratos etanólicos de *E. involucrata* em células tumorais de pâncreas (PANC-1) e posteriormente, a sua seletividade, por avaliar sua citotoxicidade em uma linhagem não tumoral (HUVEC). Os resultados desse ensaio na linhagem tumoral PANC-1 após 72 horas de incubação demonstram que o extrato S50 induziu maior efeito nas células tumorais e atingiu 50% de citotoxicidade (Figura 17).

Figura 17 - Citotoxicidade dos extratos da polpa e semente de *E. involucrata* em linhagem tumoral PANC-1 após 72 h de exposição. Os dados são expressos como média \pm E.P. de três experimentos independentes.



Os dados de viabilidade celular desse extrato foram utilizados para o cálculo da CC50 (concentração citotóxica para 50% das células) e são apresentados na Figura 18.

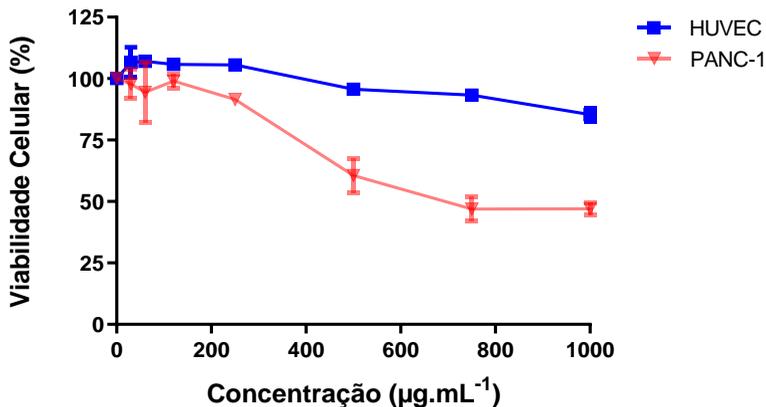
Figura 18 - Curva sigmóide de concentração-resposta (Plot de Hill) para o extrato S50. Os dados são expressos como média \pm E.P. de três experimentos independentes.



A CC50 do extrato S50 foi de $712 \pm 85,26 \mu\text{g.mL}^{-1}$, calculada através da curva sigmoidal (valor interpolado).

Posteriormente, este extrato foi avaliado na linhagem não-tumoral HUVEC, a fim de identificar qual o índice de seletividade (IS). Esse índice serve para determinar quão seletivo é o extrato em relação à citotoxicidade de células não tumorais (HUVEC) e tumorais (PANC-1) e o objetivo é que o mesmo seja superior a 1, uma vez que se deseja que mais células tumorais sejam afetadas, em relação as células não tumorais (Figura 19).

Figura 19 - Comparação da citotoxicidade do extrato de semente (S50) em linhagem tumoral (PANC-1) e não tumoral (HUVEC) após 72h de incubação. Os dados são expressos como média \pm E.P. de três experimentos independentes.

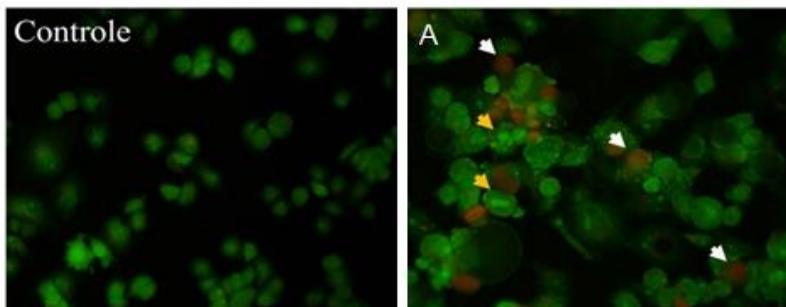


Como pode ser observado na Figura 19, o extrato S50 não induziu toxicidade considerável em células HUVEC até a máxima concentração testada ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Assim, o índice de seletividade (IS) em relação às células não tumorais (HUVEC) foi superior a 1,55, indicando que o extrato é mais tóxico para as células tumorais do que para as não tumorais. Optou-se por não aumentar a concentração acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por questões de solubilidade do extrato.

O índice de seletividade é o parâmetro mais importante de uma substância eficaz para o tratamento do câncer, e embora não exista um valor absoluto, melhor ou pior isoladamente, ele deve ser comparado com os índices de seletividade dos medicamentos padrões usados no câncer em questão (LÓPEZ-LÁZARO, 2015).

A caracterização da morte celular é demonstrada na Figura 20 (Controle, A) através da coloração dupla LA/BE.

Figura 20 - Avaliação do tipo de morte celular em células tumorais pancreáticas nos dois grupos avaliados Controle e exposto ao S50 (A). As setas brancas indicam células em necrose e as setas amarelas indicam células em apoptose. Aumento de 400x.



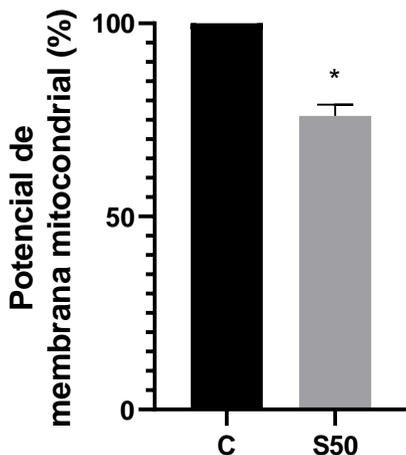
A Figura 20 demonstra que o S50 induziu principalmente a fragmentação do DNA (A), a qual foi caracterizada pela formação de corpos apoptóticos, além de induzir a ruptura das células, o que indica alguma necrose.

A gencitabina, que é o fármaco padrão-ouro para o câncer de pâncreas, também induz a apoptose. Embora a apoptose seja o principal tipo de morte celular desejado na quimioterapia, recentemente, a necrose foi considerada interessante para o tratamento de células tumorais que desenvolvem mecanismos distintos para escapar da maquinaria da apoptose (MOHAMMAD et al., 2015).

Estudos sugerem que a necrose e a apoptose compartilham redes bioquímicas e a indução da necrose pode ser uma estratégia mais eficiente no tratamento do câncer, uma vez que esta promove uma poderosa resposta inflamatória que pode inclusive, participar na regressão do tumor durante a terapia antineoplásica, favorecendo esse processo (PROSKURYAKOV; GABAI, 2010; ZHANG et al., 2016).

Considerando a ocorrência de apoptose causada pelo extrato S50 utilizamos a sonda catiônica lipofílica fluorocromo JC-1, um tipo especial de carbocianina, apropriado para identificar a diferença de potencial mitocondrial (AGRIMANI et al. 2015).

Figura 21 – Efeito do extrato S50 sobre o potencial de membrana mitocondrial através de sonda catiônica lipofílica fluorocromo JC-1. Os dados são expressos como média \pm E.P. de três experimentos independentes. (Test t, $*p < 0,05$).



Na Figura 21 observa-se que houve redução do potencial mitocondrial. Isso demonstra que a eficiência do transporte de elétrons pode ter ficado comprometida frente a exposição ao extrato S50, devido a alteração dos complexos enzimáticos ou outras características da membrana, como por exemplo, poros (TERADA, 1990; AGRIMANI et al., 2015). A perda do potencial mitocondrial foi observada em conjunto com a fragmentação do núcleo por Cordova (2011), onde também foi observado ativação da caspase-3, aumento da expressão da Bax e inibição da expressão da Bcl-2, indicando que a apoptose seria por via intrínseca. Desse modo, sugerimos que essa seja a via apoptótica ocasionada pela exposição ao extrato S50, no entanto, novos estudos são necessários para que essa sugestão possa ser comprovada ou descartada.

Não há relatos prévios sobre ensaios antitumorais envolvendo a espécie *E. involucrata*, sendo este trabalho, portanto, inédito. No entanto, outras espécies da mesma família foram avaliadas para este tipo de atividade. No estudo de Charepalli (2016), o extrato da fruta da espécie *E. jambolana*, rica em antocianinas, suprimiu a proliferação das células de câncer de colón e induziu a apoptose tanto nas células tumorais quanto nas células troncos desse mesmo câncer (CHAREPALLI et al., 2016).

No entanto, as antocianinas não são os únicos compostos testados para a atividade antineoplásica do gênero *Eugenia*. Os metabólitos de

polifenóis foram avaliados por Teixeira et al. (2017) na espécie *E. brasiliensis*, popular grumixama ou ainda, cereja nativa brasileira, contra células de câncer de mama humano. Nesse estudo, foi administrado uma dose de suco da fruta e os metabólitos foram analisados em amostras de plasma e urina, sendo na sua grande maioria ácidos fenólicos e conjugados de urolitina e catabólitos da microbiota intestinal de ambas as classes de polifenóis, respectivamente (TEIXEIRA et al., 2017). Ainda, esse conjunto de metabólitos encontrados em amostras de urina apresentaram inibição significativa da proliferação celular nas células de câncer de mama avaliadas (TEIXEIRA et al., 2017). Recentemente, Núñez et. al. (2018) avaliaram outra espécie do mesmo gênero, o extrato bruto das folhas de *E. uniflora* em células de HPV, um tipo invasivo de câncer cervical. Esse tipo celular foi comparado com células de linfócitos humanos (grupo controle), não tumoral; nessa investigação foi observado que o extrato bruto da espécie testada causou morte via apoptose nas células tumorais através de ensaio MTT. Outra espécie estudada do gênero é a *E. umbelliflora*, conhecida popularmente como “baguaçu”. Dos frutos desta espécie, pesquisadores isolaram e caracterizaram um novo composto sesquiterpenil-floroglucinol que exibiu alta citotoxicidade em células humanas de leucemia e melanoma (FARIAS et al., 2018). A atividade citotóxica do gênero parece estar relacionada com característica apolares dos compostos, pois o possível alvo identificado era uma região lipídica da célula cancerígena, não sendo possível ainda determinar se isso acontece na membrana ou em outra parte da célula, também com características lipofílicas (FARIAS et al., 2018).

Diversos estudos indicam que os flavonoides podem prevenir e reduzir os riscos de certos tipos de câncer (LE MARCHAND, 2002; NEUHOUSER, 2004; ROMAGNOLO; SELMIN, 2012). Ainda em 2002, Le Marchand (2002) abordou os efeitos biológicos dos principais flavonoides com a prevenção de diversos tipos de neoplasias. Neuhouser (2004) concluiu que o consumo na dieta de flavonoides, particularmente a quercetina, tem uma relação inversamente proporcional com o risco de câncer. Mais recentemente, Romagnolo e Selmin (2012) sinalizam que apesar de haver evidências relacionando os flavonoides à prevenção de diversos tipos de câncer, a dose e o tempo de ingestão possivelmente afetam a resposta antineoplásica frente as dietas ricas em flavonoides. Os autores ainda propõem que os mecanismos anticancerígenos exercidos pelos flavonoides são a inibição da proliferação, inflamação, invasão, metástase e ativação da apoptose (ROMAGNOLO; SELMIN, 2012).

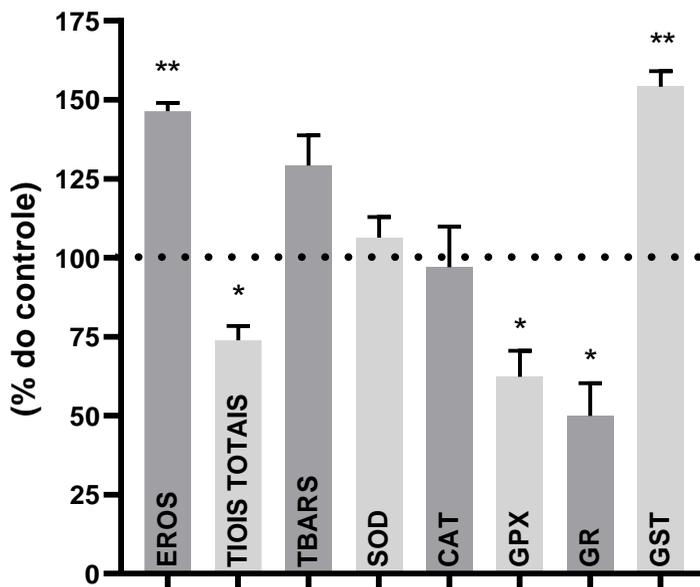
Baseado nos dados obtidos em nosso estudo, a extração das sementes de *E. involucrata* a 50°C (S50) demonstrou ter um efeito

positivo na extração de flavonoides. Portanto, possivelmente a citotoxicidade desse extrato em células tumorais esteja associada à maior presença desses compostos em relação aos demais extratos que não apresentaram atividade antitumoral. Porém, considerando todos os dados apresentados e disponíveis na literatura, entendemos a necessidade de uma avaliação cromatográfica das diferentes classes de bioativos e com extratos de diferentes polaridades (frações). Isso permitiria a identificação de compostos majoritários no tecido e novos compostos, que podem inclusive, estar atuando de maneira sinérgica para a obtenção desse efeito citotóxico.

5.1.5 Avaliação dos efeitos celulares relacionados à exposição

Uma vez que o extrato S50 foi o único que apresentou atividade citotóxica significativa, foi realizada a avaliação dos efeitos celulares relacionados ao metabolismo oxidativo celular. Assim, para determinar se o estresse oxidativo está envolvido na morte celular induzida pelo extrato S50, indicadores do *status* oxidativo (tióis totais, atividade de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica), além da produção de EROs pelo ensaio da DCF, foram avaliados.

Figura 22 – Avaliação de espécies reativas de oxigênio (EROS), tióis totais, peroxidação lipídica (TBARS) e atividade de enzimas antioxidantes em células PANC-1 após 24 h de exposição ao extrato S50. Os dados são expressos como média \pm E.P. de três experimentos independentes. (Test t, ** $p < 0.005$, * $p < 0,05$).



Observa-se que houve diminuição da quantidade de tióis totais para o grupo exposto ao extrato da semente (S50) em relação ao grupo controle. Os tióis totais representam os grupos sulfidrídricos (-SH) ligados a compostos proteicos e não proteicos. Nesse último caso, a GSH é o antioxidante não enzimático mais importante e representa a maioria dos tióis totais intracelulares (TIETZE, 1969; YANG; GUAN, 2015). Portanto, uma redução nos níveis de tióis totais indica um decréscimo no *status* antioxidante das células tumorais, o qual é induzido em condições oxidativas, devido à produção de EROs (TOYOKUNI, 2014).

No entanto, paralelamente ao decréscimo dos tióis totais, S50 também reduziu a atividade da enzima GR, que por atuar na redução da GSH, pode ter contribuído para o decréscimo dos níveis de tióis totais observado e possivelmente, para o aumento na produção de EROs. Outro fator que pode ter contribuído para a diminuição dos tióis totais, é o aumento da atividade da enzima GST. Embora não remova diretamente as EROs, a GST age como importante integrante das reações de fase 2

que protegem as macromoléculas da ação dos xenobióticos, uma vez que utiliza GSH nas reações de conjugação com os compostos eletrofilicos, a fim de realizar a detoxificação desses compostos do organismo (ALLOCATI et al., 2018). Dessa forma, o aumento na atividade dessa enzima, indica que a célula requereu mais GSH através da atividade exercida por GST para metabolizar compostos do extrato e excretá-los. Esse aumento da atividade da GST pode estar associado ao aumento da expressão gênica dessa enzima (TOWNSEND; TEW, 2003) e pode ter resultado da tentativa das células tumorais em detoxificar os compostos presentes no extrato S50. Esse recurso de biotransformação parece ser explorado pelas células cancerígenas para adquirir resistência a medicamentos, onde as células se tornariam “resistentes” a esses compostos, e em alguns casos, esse mecanismo funcionaria através da superexpressão da enzima (ALLOCATI et al., 2018).

Um terceiro fator também pode estar envolvido na redução dos níveis de tióis totais. A toxicidade induzida por alguns agentes citotóxicos ocasiona a oxidação da GSH, diminuindo sua biodisponibilidade e desencadeando a apoptose. Nesse sentido, considera-se que a perda de GSH é um dos eventos característicos da morte celular por apoptose, pois causa a intolerância da célula à presença de agentes tóxicos (KANNAN; JAIN, 2000; LOCATELLI et al., 2009; PANG et al., 2012). Desse modo, não se pode descartar a possível contribuição da redução dos níveis de GSH para a apoptose observada em células tumorais PANC-1 (Figura 20 A).

Não houve alteração da atividade das enzimas removedoras de EROs (SOD e CAT), mas um decréscimo na atividade da GPx ocorreu em células expostas ao S50. Este decréscimo pode ser resultado da inibição direta do extrato S50 sobre a enzima. De acordo com Miyamoto et al. (2003), a GPx pode ser inativada por diversas substâncias *in vitro*. Além disso, esse decréscimo da GPx tem sido relatado em tecidos sob estresse oxidativo, e o aumento dos níveis de H₂O₂ resultante dessa queda, pode agir como segundo mensageiro e regular a expressão de genes antiapoptóticos (SCHAFER; BUETTNER, 2001). Além disso, o H₂O₂ é conhecido como um potente indutor da apoptose (XIANG et al., 2016; XING et al., 2017) e portanto, a redução da atividade da GPx associada ao aumento da produção de EROs (Figura 22) possivelmente estejam envolvidos na apoptose de células PANC-1 expostas ao extrato S50 (Figura 20 A).

A lipoperoxidação é um dos efeitos deletérios causados pelo excesso de EROs, cujo aumento pode induzir ao estresse oxidativo. Nossos resultados demonstram que a exposição ao extrato S50 não causou

mudança na lipoperoxidação avaliada pelos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) quando comparado ao grupo controle (Figura 22). No entanto, há uma tendência ($p= 0,0566$), do aumento dos níveis de TBARS nas células tumorais expostas ao extrato S50. Portanto, não se pode descartar que as EROs ou mesmo os compostos presentes no extrato S50, tenham contribuído para a indução da peroxidação lipídica em células PANC-1.

Baseado nos dados de citotoxicidade, apoptose e de estresse oxidativo de células tumorais PANC-1 expostas ao extrato S50, pode-se concluir que o mecanismo da atividade antitumoral do extrato S50 parece ter relação com o metabolismo oxidativo, que por sua vez, pode induzir a morte celular por apoptose e necrose (CHEN et al., 2016). Provavelmente outros mecanismos de ação do extrato estejam envolvidos, o que é uma característica comum encontrada em quimioterápicos usados convencionalmente na terapia do câncer (ROMAGNOLO; SELMIN, 2012; BEERENWINKEL et al., 2015; MOHAMMAD et al., 2015; UETAKI et al., 2015; LI et al., 2017; YOKOYAMA et al., 2017). Adicionalmente, o maior teor de polifenóis, especialmente de flavonoides no extrato S50 em relação aos demais extratos, pode estar relacionado à atividade antitumoral observada. Porém, mais estudos são necessários para melhor caracterizar o potencial biológico do extrato de sementes de *E. involucrata* e elucidar a base bioquímica e molecular da atividade antitumoral das sementes. Os compostos envolvidos em tal atividade também devem ser investigados.

5.2 *Rubus* spp.

A EMBRAPA – Clima Temperado tem realizado melhoramento genético da fruta amora-preta desde 1973, a fim de lançar no mercado variedades desejáveis para o consumidor e para a indústria. Além disso, o melhoramento genético de frutas pode impactar nos níveis de compostos bioativos, e conseqüentemente no seu potencial biológico (TORMA et al., 2017). Desde 1973, foram lançadas seis cultivares de amora-preta, entre elas, as cultivares *Tupy*, *Xavante* e *Xingu*, sendo a *Tupy*, a variedade mais comercializada mundialmente (EMBRAPA, 2015b). Além dessas cultivares, o presente estudo também avaliou duas seleções mais recentes *Black 145* e *Black 178*.

A fim de determinar o melhor método para a extração de compostos bioativos e atividade antioxidante, foram preparados dez diferentes extratos, sendo dois extratos para cada genótipo de *Rubus* spp. (um acidificado e outro não acidificado). A acidificação dos extratos foi

realizada devido ao fato de a literatura indicar que a extração de antocianinas é favorecida em meio ácido (TORMA et al., 2017).

5.2.1 Compostos Bioativos

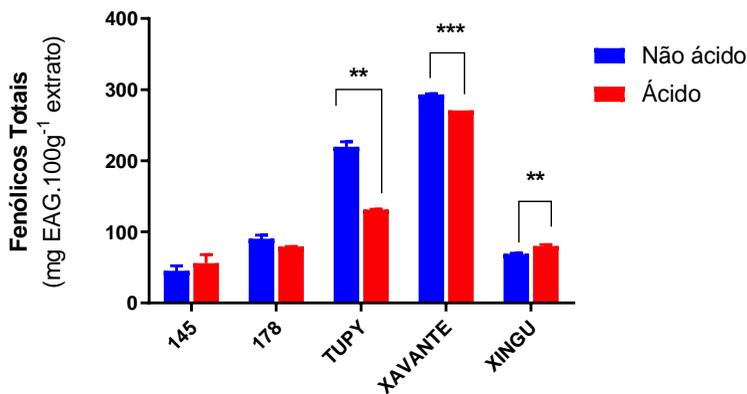
Inicialmente, buscou-se avaliar se a concentração de compostos bioativos (fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais), e se as atividades antioxidantes seriam mais representativas em extratos acidificados ou não acidificados. Foram encontradas diferentes formas de preparo de extratos de frutas contendo antocianinas na literatura, muitas vezes utilizando diferentes proporções de solventes (alguns com certo grau de toxicidade) (FERREIRA; ROSSO; MERCADANTE, 2010, ONCEA; STOIA; COMAN, 2012), e nem sempre utilizando condições de meio ácido para a extração (YAMASHITA et al., 2017).

No entanto, dados indicam que a extração de antocianinas é favorecida em meio ácido (ONCEA; STOIA; COMAN, 2012; TORMA et al., 2017). Embora o método usualmente utilizado seja com metanol acidificado com HCl, quando a extração é realizada com fim alimentício, é recomendada a substituição do metanol por etanol em decorrência da menor toxicidade deste (LONGO et al., 2007; ONCEA; STOIA; COMAN, 2012).

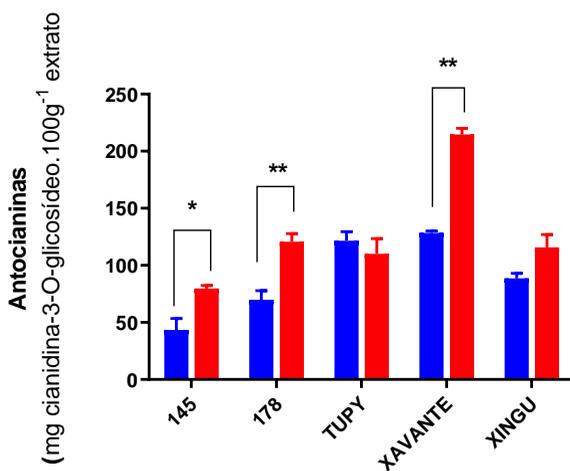
A maioria das extrações de polifenóis requerem condições ácidas, a fim de manter a estabilidade e a condição neutra desses compostos, facilitando assim, suas extrações por solventes orgânicos (STALIKAS, 2010; TSAO, 2010). Embora tenha ocorrido um discreto aumento no teor de fenólicos totais no extrato acidificado em relação ao não acidificado na cv. Xingu, por outro lado, houve uma redução no teor desses compostos nas cvs. Tupy e Xavante no extrato acidificado em comparação com seus respectivos extratos não acidificados (Figura 23A).

Figura 23 - Efeito da acidificação do extrato sobre o teor de fenólicos totais (A) e de antocianinas monoméricas totais (B) para cada genótipo de *Rubus* spp. Os dados são expressos como média \pm E.P. de três experimentos independentes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Test t Student). EAG: Equivalentes de Ácido Gálico.

A



B

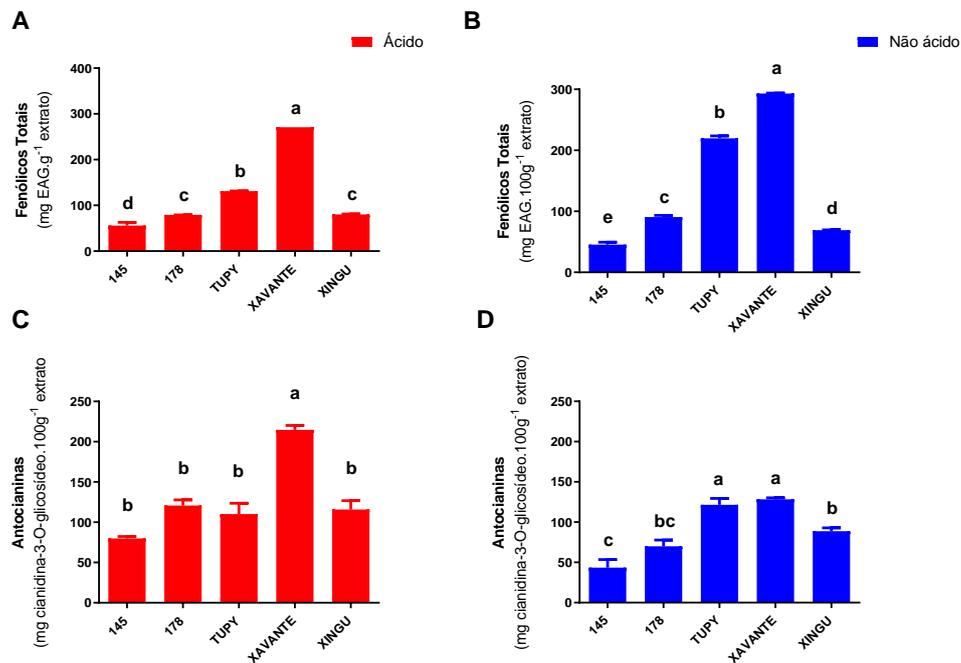


Esses resultados (relacionados às cv. Tupy e Xavante) podem ser uma consequência de uma eventual degradação de alguns polifenóis, pois concentrações de ácidos maiores do que as requeridas para a extração ótima de polifenóis, pode ocasionar reações de hidrólise dos glicosídeos e de acilglicosídeos, e portanto, impactar na medida da concentração desses compostos no extrato (STALIKAS, 2010; TSAO, 2010). Assim, apesar da concentração de HCl utilizada nos extratos acidificados estar bem abaixo da concentração de HCl (1 - 2 N) requerida para a hidrólise

de polifenóis (STALIKAS, 2007), não se pode descartar essa hipótese. Além disso, conforme mencionado anteriormente, não se pode descartar a degradação de outros compostos redutores presentes em frutos que também reagem com o reagente Folin-Ciocalteu, e que podem ter contribuído para uma falsa redução do teor dos fenólicos totais (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Em relação ao efeito dos diferentes genótipos sobre o teor de fenólicos totais, observou-se que independentemente da acidificação do extrato, as cvs. Xavante, Tupy e seleção *Black* 178 apresentaram, em ordem decrescente, os maiores teores desses compostos, com menores teores para a cv. Xingu e seleção *Black* 145 (Figura 24 A e B).

Figura 24 – Efeito do genótipo sobre o teor de fenólicos totais entre os extratos acidificados (A) e não acidificados (B) e de antocianinas monoméricas totais entre os extratos acidificados (C) e não acidificados (D) de *Rubus* spp. Os dados são expressos como média \pm E.P. de três experimentos independentes. As barras com letras diferentes indicam resultados significativamente diferentes entre si ($p < 0,0001$ ANOVA/Tukey). EAG: Equivalentes de Ácido Gálico.



Nossos resultados mostram a Xavante como a cv. de *Rubus* spp. com maior teor de fenólicos está de acordo com Denardin e colaboradores (2015), que avaliaram a capacidade antioxidante e os compostos bioativos de frutas nativas brasileiras. Nesse estudo, a cv. Xavante, junto com a pitanga roxa apresentaram o maior teor de fenólicos totais, seguido pela amora cv. Cherokee, araçá, pitanga laranja e vermelha e butiá (DENARDIN et al., 2015).

Em relação às antocianinas, o teor de AMT nos extratos acidificados aumentou nas seleções *Black* 178 (~83%) e *Black* 145 (83%), bem como na cv. Xavante (67%) em relação aos seus respectivos extratos não acidificados (Figura 23B). Embora não tenha sido significativo, também houve uma tendência ($p=0,0585$) ao aumento (~30%) do teor de AMT na cv. Xingu (Figura 23B). Portanto, assim como é descrito na literatura, a acidificação é um fator importante para a maior recuperação de antocianinas (KHOO et al., 2017; MARSZALEK et al., 2017), ao menos para a maioria dos genótipos avaliados neste estudo.

O efeito do genótipo sobre o conteúdo de AMT demonstrou que independentemente da acidificação dos extratos, a cv. Xavante apresentou o maior teor de antocianinas (Figura 24 C e D), sendo igualado ao teor presente na cv. Tupy no extrato não acidificado, seguido pela cv. Xingu, e seleções *Black* 178 e *Black* 145 (Figura 24D).

É importante mencionar que o teor de antocianinas e compostos fenólicos totais muda de acordo com o estágio de maturação do fruto. Wang; Lin (2000) avaliaram três estágios de maturação de cultivares de amora-preta sem espinhos (cv. Chester Thornless, Hull Thornless e Triple Crown Thornless), baseando-se na coloração dos frutos (verdes, rosas e maduros). Encontraram para antocianinas, os resultados de 6,70 mg.100g⁻¹ de suco base seca para os frutos verdes, e 57,50 mg.100g⁻¹ e 909,30 mg.100g⁻¹ para os frutos rosas e maduros, respectivamente. Os resultados também variaram quando os compostos avaliados foram os fenólicos totais, sendo obtidos os valores de 2166, 1550 e 1347mg.100g⁻¹ de suco (base seca). Em nossos resultados, utilizamos os frutos no estágio de maturação completo, pois todos os frutos apresentavam coloração negro-violácea. Portanto, sugere-se que os frutos dos cinco genótipos utilizados se encontravam no mesmo estágio de maturação.

Com relação à caracterização fitoquímica dos frutos de *Rubus* spp., foram identificadas 7 antocianinas derivadas da cianidina (m/z 287 e/ou 449) nos 5 genótipos estudados: cianidina-3-*O*-glicosídeo, cianidina-3,5-di-*O*-hexosídeo, cianidina-*O*-oxoil-dipentosídeo, cianidina-*O*-rutinosídeo, cianidina-*O*-maloil-glicosídeo, cianidina-*O*-maloil-pentosídeo e cianidina-*O*-acetil-dipentosídeo, além de derivados da

cianidina em todos os genótipos que não puderam ser completamente identificados. Para 2 compostos, não foi possível realizar a identificação (n. 22 e 30, Tabela 2).

5.2.2 Identificação das antocianinas

A caracterização química antociânica para os extratos dos cinco genótipos de *Rubus* spp é apresentada a seguir (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização química antociânica dos frutos de *Rubus* spp.

Item	TR (minutos)	m/z [M]⁺	Principais fragmentos	Fórmula molecular	Erro (ppm)	Sugestão de identificação	Genótipo
1	9,50	611,16 22	449,1118; 287,0578	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	1,6	Cianidina-3,5-di- O-hexosídeo	Black 145 A e NA; Black 178 NA; Tupy NA; Xavante NA; Xingu A e NA.
2	10,77	611,15 93	449,1118; 287,0578	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	-3,1	Cianidina-3,5-di- O-hexosídeo	Black 145 A; Xavante A; Xingu A.
3	11,46	611,16 17 611,16 22	449,1075; 287,0578	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	0,8	Cianidina-3,5-di- O-hexosídeo	Black 145 A e NA; Black 178 NA; Tupy NA;

Item	TR (minutos)	m/z [M]⁺	Principais fragmentos	Fórmula molecular	Erro (ppm)	Sugestão de identificação	Genótipo
							Xavante A e NA; Xingu A e NA.
4	12,26	611,16 00 611,16 22	449,1075; 287,0578	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	-2,0	Cianidina-3,5-di- O-hexosídeo	Black 145 A e NA; Black 178 NA; Xavante NA; Xingu A e NA.
5	13,63	449,10 85	287,0544	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	0,2	Cianidina-3-O- glicosídeo	Black 145 A e NA; Black 178 NA; Tupy A e NA; Xavante A e NA; Xingu A e NA.

Item	TR (minutos)	m/z [M]⁺	Principais fragmentos	Fórmula molecular	Erro (ppm)	Sugestão de identificação	Genótipo
6	15,65	623,12 48	287,0544	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₇	0,0	Cianidina- <i>O</i> - oxoil-dipentosídeo	Xingu A.
7	15,81	595,16 66	449,1075; 287,0544	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	0,3	Cianidina- <i>O</i> - rutinosídeo	Black 145 A e NA; Black 178 NA; Tupy A e NA; Xavante A e NA; Xingu A e NA.
8	17,90	565,11 92	287,0544	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₅	-0,2	Cianidina- <i>O</i> - maloil-glicosídeo	Xingu A
9	18,15	565,11 92	287,0544	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₅	-0,2	Cianidina- <i>O</i> - maloil-glicosídeo	Black 145 NA; Black 178 NA; Tupy NA; Xingu NA.
10	19,88	623,12 48	287,0544	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₇	0,0	Cianidina- <i>O</i> - oxoil-dipentosídeo	Xingu A

Item	TR (minutos)	m/z [M]⁺	Principais fragmentos	Fórmula molecular	Erro (ppm)	Sugestão de identificação	Genótipo
11	19,92	623,12 48	287,0544	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₇	0,0	Cianidina- <i>O</i> -oxoil-dipentosídeo	Black 145 NA; Black 178 NA; Xavante NA; Xingu NA.
12	20,02	565,11 92	287,0544	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₅	-0,2	Cianidina- <i>O</i> -maloil-glicosídeo	Tupy A; Xavante A; Xingu A.
13	20,12	535,10 87	287,0557	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₄	-0,2	Cianidina- <i>O</i> -maloil-pentosídeo	Black 145 NA; Black 178 NA; Xavante NA.
14	20,12	623,12 48	287,0544	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₇	0,0	Cianidina- <i>O</i> -oxoil-dipentosídeo	Tupy NA.
15	20,34	557,12 92	287,0573			Derivado cianidina	Xingu A.
16	21,51	535,10 87	287,0557	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₄	-0,2	Cianidina- <i>O</i> -maloil-pentosídeo	Xingu NA.

Ite m	TR (minut os)	m/z [M]⁺	Principais fragmentos	Fórmula molecular	Erro (ppm)	Sugestão de identificação	Genótipo
17	22,02	637,14 09	287,0573	C ₂₈ H ₂₉ O ₁₇	0,6	Derivado cianidina	<i>Black 145 A;</i> <i>Xavante A;</i> <i>Xingu A.</i>
18	22,67	593,15 12	287,0544	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	1,0	Cianidina- <i>O</i> - acetil-dipentosídeo	<i>Black 145</i> <i>NA;</i> <i>Xingu NA.</i>
19	23,24	593,15 12	287,0544	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	1,0	Cianidina- <i>O</i> - acetil-dipentosídeo	<i>Black 145 A;</i> <i>Black 178</i> <i>NA;</i> <i>Tupy NA;</i> <i>Xavante NA;</i> <i>Xingu A.</i>
20	23,88	579,13 43	287,0544			Derivado cianidina	<i>Black 145 A;</i> <i>Xingu A.</i>
21	25,05	637,14 09	287,0573			Derivado cianidina	<i>Black 145 A;</i> <i>Xavante A;</i> <i>Xingu A.</i>
22	25,52	765,20 25				NI	<i>Black 145</i> <i>NA;</i> <i>Black 178</i> <i>NA;</i> <i>Tupy NA;</i>

Item	TR (minutos)	m/z [M]⁺	Principais fragmentos	Fórmula molecular	Erro (ppm)	Sugestão de identificação	Genótipo
							Xavante NA; Xingu NA.
23	25,68	579,13 43	287,0544			Derivado cianidina	Black 145 A; Xavante A; Xingu A.
24	26,59	651,15 51	287,0573			Derivado cianidina	Black 145 A; Xavante A; Xingu A.
25	28,34	557,12 92	287,0573			Derivado cianidina	Black 145 A; Tupy A; Xavante A.
26	29,08	607,16 69	287,0573			Derivado cianidina	Black 145 A; Xingu A.
27	29,08	607,16 62	287,0544			Derivado cianidina	Black 145 NA; Black 178 NA; Tupy NA.
28	29,20	557,12 92	287,0573			Derivado cianidina	Xingu A.

Item	TR (minutos)	m/z [M]⁺	Principais fragmentos	Fórmula molecular	Erro (ppm)	Sugestão de identificação	Genótipo
29	29,82	651,15 51	287,0573			Derivado cianidina	<i>Black 145 A; Xavante A; Xingu A.</i>
30	30,12	765,20 25				NI	<i>Black 145 NA; Black 178 NA; Tupy NA; Xavante NA; Xingu NA.</i>
31	30,30	651,15 51	287,0573			Derivado cianidina	<i>Black 145 A; Xavante A; Xingu A.</i>

Legenda: NI - Não identificado; A - Acidificado; NA - Não acidificado.

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Assim como para os frutos da cereja (*E. involucrata*), a antocianina majoritária foi a cianidina-3-*O*-glicosídeo (Apêndices B e C) em todos os genótipos de *Rubus* spp., o que está de acordo com outros estudos sobre a caracterização antociânica em frutos de amoreira-preta do gênero *Rubus* (DAI et al., 2009; RYU et al., 2016). Além disso, conforme descrito em outros trabalhos com amora-preta, não foram identificadas antocianinas derivadas das outras cinco antocianidinas e que são geralmente encontradas em *berries*, tais como a delphinidina, malvidina e peonidina (WANG; LIN, 2000). Porém, no estudo de Chaves et al. (2018), além de três derivados de cianidina, foi encontrado um derivado de pelargonidina na cv. Tupy, que não foi identificado em nosso estudo.

Apesar das 7 antocianinas identificadas estarem presentes nos 5 genótipos, houve diferenças na caracterização antociânica de um mesmo genótipo frente à acidificação do extrato. Algumas antocianinas só foram identificadas em alguns genótipos quando o extrato não foi acidificado. É o caso da cianidina-3,5-di-*O*-hexosídeo (nas cvs. Tupy e seleção *Black* 178), cianidina-*O*-maloil-glicosídeo (seleções *Black* 145 e *Black* 178), cianidina-*O*-maloil-pentosídeo (cv. Xavante e Xingu e seleções *Black* 145 e *Black* 178), e da cianidina-*O*-acetil-dipentosídeo (cv. Tupy e Xavante e seleção *Black* 178). Apesar da extração em meio ácido ter recuperado maior teor de AMT em três genótipos (Figura 23B), não se pode descartar uma possível degradação de algumas das antocianinas identificadas em extratos ácidos, o que explicaria o fato de, nos casos acima citados, ter sido possível identificá-las somente em extratos não acidificados (GAO; MAZZA, 1994; STALIKAS, 2007). Por outro lado, no caso da cv. Xavante, foi possível identificar a antocianina cianidina-*O*-maloil-glicosídeo somente no extrato acidificado, sugerindo que a acidificação pode exercer efeitos diferenciados sobre a caracterização de antocianinas conforme o genótipo e a antocianina identificada.

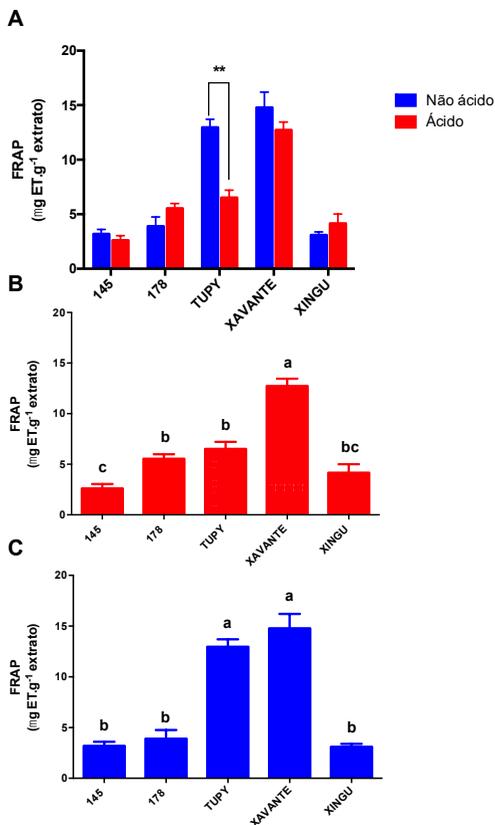
5.2.3 Atividade antioxidante: Potencial redutor de ferro (FRAP) e sequestrante (DPPH)

A atividade antioxidante *in vitro* avaliada pelo método do potencial antioxidante redutor do ferro (FRAP) é demonstrada na Figura 25. O FRAP foi avaliado utilizando a concentração de 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada extrato. Com relação ao efeito da acidificação dos extratos sobre a atividade avaliada por FRAP, observou-se que, com exceção da cv. Tupy que apresentou queda da atividade no extrato ácido, a acidificação não teve influência sobre a atividade antioxidante para a maioria dos genótipos. Provavelmente essa diminuição da atividade no extrato

acidificado da cv. Tupy esteja relacionada à diminuição do teor de fenólicos totais (Figura 23 A). Da mesma forma, nota-se que embora a diminuição da atividade medida por FRAP no extrato ácido da cv. Xavante não tenha sido significativa, a mesma também pode estar relacionada à redução do teor de fenólicos totais também observada nesta cultivar (Figura 23 A).

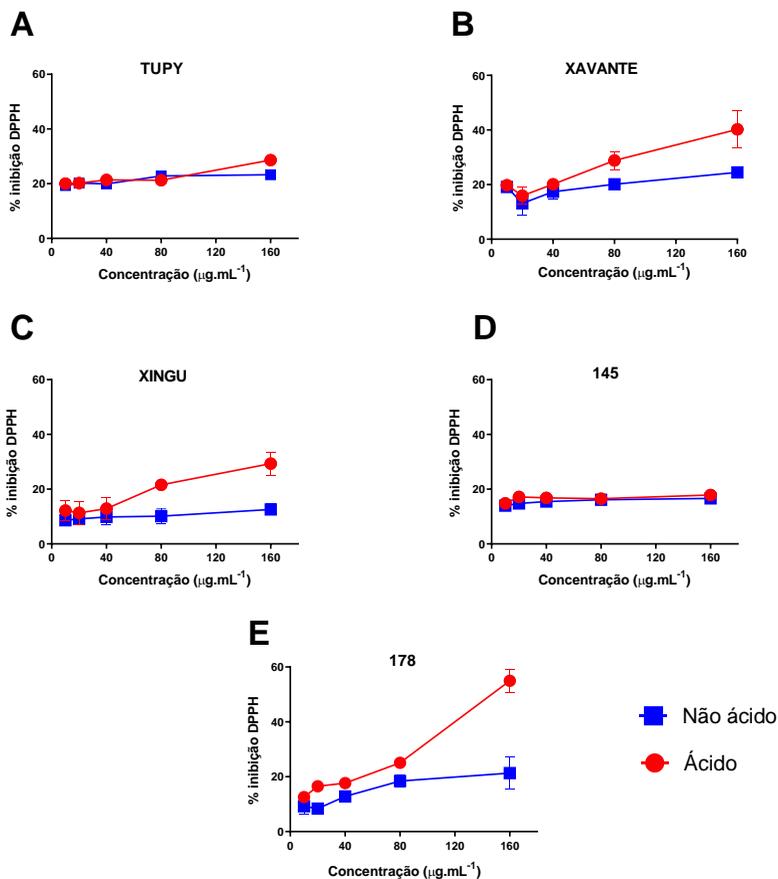
Independentemente da acidificação dos extratos, a cv. Xavante apresentou a maior atividade antioxidante por FRAP (Figura 25 A). Nos extratos acidificados, após a cv. Xavante, a maior atividade antioxidante foi demonstrada pelos genótipos Tupy, *Black 178*, Xingu e finalmente, *Black 145* (Figura 25 B). Já nos extratos não acidificados, a atividade foi predominantemente maior nas cvs. Xavantes e Tupy, seguido pelos demais genótipos (Figura 25 C).

Figura 25 - Atividade antioxidante redutora de ferro (FRAP). Efeito da acidificação dos extratos sobre a atividade antioxidante de cada genótipo de *Rubus* spp. (A). Efeito do genótipo sobre a atividade antioxidante de extratos acidificados (B) e de extratos não acidificados (C). Em (A), $**p < 0,01$. Em (B) e (C), as barras com letras diferentes indicam resultados significativamente diferentes entre si ($p < 0,0001$). ET: Equivalentes de Trolox.



Os resultados da atividade antioxidante para os diferentes extratos e genótipos de *Rubus* spp. avaliada através do sequestro do radical DPPH (Difenil-picril-hidrazila), são demonstrados a seguir (Figura 26).

Figura 26 - Efeito da acidificação do extrato sobre a atividade sequestrante do radical DPPH para os genótipos (A) Tupy, (B) Xavante e (C) Xingu e seleções (D) *Black 145* e (E) *Black 178*. Os dados são expressos como média \pm E.P. de três experimentos independentes.



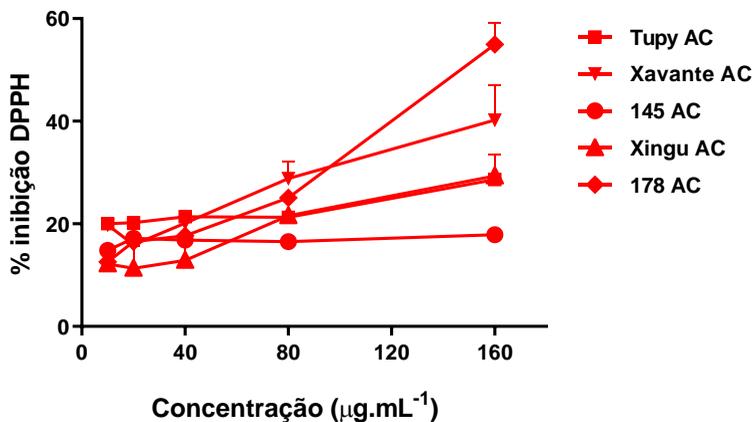
Observou-se que a acidificação dos extratos aumentou a atividade sequestrante do DPPH nas cvs. Tupy, Xavante, Xingu e seleção *Black 178*, em relação aos seus respectivos extratos não acidificados somente na maior concentração ($160 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 26 A, B, C e E). Embora observa-se na Figura 26 que há uma tendência dos genótipos Xavante, Xingu e seleção *Black 178* de apresentarem maior atividade

sequestrante de DPPH nos extratos acidificados em relação aos não acidificados também na concentração de $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$, essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$, ANOVA/Tukey). Não houve diferença entre os extratos da seleção *Black 145* (Figura 26D) em quaisquer concentrações testadas. Considerando que a maioria dos genótipos que apresentaram maior atividade de inibição por DPPH quando os extratos foram acidificados (*Xavante*, *Xingu*, *Black 178* e *Tupy*), também apresentaram maiores teores de AMT nessa condição (mesmo que tenha sido apenas uma forte tendência na *Xingu*, $p = 0,0585$, Figura 23 B), esses dados sugerem ao menos parte, que a contribuição para a atividade sequestrante de DPPH desses extratos pode ser atribuída às antocianinas presentes em maior concentração nesses extratos. No entanto, isso não se aplica para a seleção *Black 145*, a qual também apresentou teor de AMT mais elevado no extrato acidificado sem, no entanto, apresentar diferenças na atividade antioxidante sequestrante de DPPH entre os extratos acidificados e não acidificados (Figura 23 B). Assim, outros compostos fenólicos em conjunto podem estar contribuindo para esta atividade antioxidante.

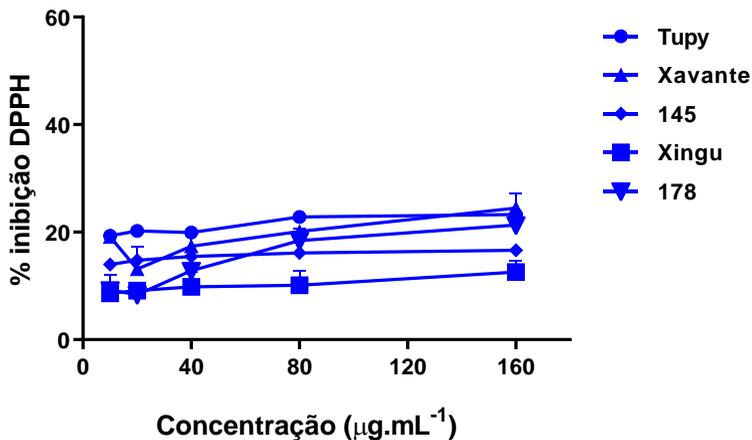
A acidificação dos extratos também resultou em diferenças na atividade antioxidante (notadamente na concentração de $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$) quando comparamos os diferentes genótipos entre si (Figura 27), com maior atividade para a seleção *Black 178* (54,99% de inibição), seguido da cv. *Xavante* (40,23 %), *Xingu* (29,31%) e *Tupy* (28,63%), e por fim, pela seleção *Black 145* (17,87%) (Figura 27 A). A maior atividade da seleção *Black 178* em relação aos demais genótipos não pode ser completamente atribuída às antocianinas, uma vez que esta seleção não foi a que obteve maior teor de antocianinas (Figura 23B). Portanto, sugere-se que outros compostos fenólicos não antocianínicos podem ter contribuído para esta maior atividade sequestrante de DPPH para esta seleção. Por outro lado, não foi possível perceber essas diferenças entre os genótipos quando preparados em extratos não acidificados, provavelmente pelo fato das antocianinas terem sido menos extraídas nessas condições.

Figura 27 - Atividade sequestrante do radical DPPH entre os extratos acidificados (A) e os extratos não acidificados (B) dos cinco diferentes genótipos. Os dados são expressos como média \pm E.P. de três experimentos independentes. AC: acidificados.

A



B



Os resultados obtidos demonstram que não foi possível observar um comportamento característico de aumento da atividade antioxidante

com o aumento da concentração de cada extrato. A diferença entre os extratos (acidificados e não acidificados) e entre os genótipos foram majoritariamente detectadas apenas na maior concentração ($160\mu\text{g.mL}^{-1}$, $p>0,05$, ANOVA/Tukey). Assim, não foi possível determinar a EC50 para este ensaio.

Com base nos dados obtidos, sugere-se que, no geral, a cultivar Xavante é o genótipo de *Rubus* spp. com maior potencial antioxidante. Nossos resultados estão de acordo com Silva et al. (2011) que demonstraram que a cv. Xavante apresentou a maior capacidade sequestrante de DPPH em relação às cvs. Guarani, Comanche, Caingangue, Brazos, Tupi, Chocktaw e Cherokee, o que corrobora o grande potencial antioxidante desta cultivar.

5.2.4 Avaliação da citotoxicidade do extrato

A citotoxicidade dos dez extratos de *Rubus* spp. foi avaliada na linhagem tumoral PANC-1 após 72 horas de exposição. Nenhum extrato induziu toxicidade nas células tumorais avaliadas até a máxima concentração testada ($1000\mu\text{g.mL}^{-1}$). Nesse caso, a CC50 não foi calculada (dados não mostrados).

Evidências do efeito antitumoral da cianidina-3-*O*-glicosídeo, a antocianina majoritária dos frutos de *Rubus* spp., foram demonstradas em estudos utilizando glioblastomas (HOSSEINE et al., 2017), células do câncer de próstata (SORRENTI et al., 2015) e células do câncer de mama (WANG et al., 2016). Contrariando esses estudos, nenhum dos extratos etanólicos de *Rubus* spp. foi ativo contra células tumorais PANC-1.

A recuperação das antocianinas e/ou de outros compostos com atividade antitumoral em concentrações abaixo das requeridas para o efeito antitumoral, pode ter influenciado na ausência dessa atividade, possivelmente porque o método extrativo (etanol acidificado ou não acidificado) não envolveu uma extração exaustiva dos frutos. Não se descarta também o fato de que extratos vegetais são misturas complexas de diversos compostos químicos que reagem e interagem entre si, resultando em maior, menor ou até na ausência de efeitos que poderiam exercer de forma isolada, desde que presentes na forma e nas concentrações ideais.

Além disso, a polaridade dos solventes de extração também pode influenciar nas características químicas e biológicas dos compostos extraídos. De fato, estudos demonstram que compostos com atividade antitumoral de outras espécies de amora-preta ou do gênero *Rubus* podem

estar presentes em extratos preparados com solventes mais apolares do que o etanol, utilizado em nosso estudo. O extrato metanólico das folhas de *R. ellipticus* foi ativo contra tumores de ratos induzidos com o modelo de tumor de ascite do linfoma de Dalton (GEORGE et al, 2015). A fração acetato de etila do extrato de framboesa (*Rubus idaeus*) apresentou atividade antitumoral em células metastáticas do câncer de pulmão humano (A549) (CHU et al. 2013). Além disso, outros compostos fenólicos com atividade antitumoral, cuja presença também foi encontrada em espécies do gênero *Rubus*, podem não ter sido recuperados em concentrações adequadas para exercer esta atividade (SUN et al., 2016; BENDER; ATALAI, 2018).

De qualquer forma, mesmo que os extratos dos genótipos de *Rubus* spp. aqui estudados não tenham apresentado atividade antitumoral, não se pode descartar a hipótese de que possam exercer esse efeito em outras linhagens de células tumorais. Por isso, estudos posteriores deverão ser realizados a fim de melhor caracterizar o potencial antitumoral de *Rubus* spp.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que as sementes da espécie *E. involucrata* (Cerejeira-do-rio-grande) apresentam maior potencial antioxidante do que os frutos, além de exercer potencial antitumoral na linhagem celular PANC-1 (células do câncer de pâncreas) quando o extrato é preparado a 50°C (S50). Os mecanismos estão relacionados ao desequilíbrio oxidativo, bem como à indução de apoptose e necrose nas células tumorais. Embora sugere-se que esses efeitos estejam relacionados ao maior teor de flavonoides encontrado nesse extrato (S50), há a necessidade de se identificar através de um estudo mais detalhado, os compostos responsáveis por essa atividade. Aliado a esses resultados, o conhecimento da composição antociânica dos frutos de *E. involucrata* realizada no presente estudo é importante para o incentivo a estudos futuros de avaliação de sua atividade biológica (incluindo a atividade antitumoral em outras linhagens celulares), bem como forma de estimular o consumo dessa espécie nativa pouco conhecida e subutilizada popularmente.

Quanto à espécie *Rubus* spp. (amoreira preta), conclui-se que o melhoramento genético, o qual é necessário para desenvolver características mais adequadas ao cultivo e industrialização dos frutos, não impacta necessariamente em uma melhora no conteúdo de compostos bioativos, na atividade antioxidante e nem resulta em atividade antitumoral dos genótipos estudados. Porém, de uma forma geral, a acidificação favorece a extração de antocianinas e a atividade antioxidante sequestrante de DPPH em diferentes genótipos de amoreira preta. Considerando que os frutos de *Rubus* spp. são ricos em antocianinas e em outros compostos com propriedades funcionais, há necessidade de mais estudos envolvidos na elucidação do potencial biológico desses genótipos comumente incluídos em programas de melhoramento genético.

Além disso, em conjunto, nossos dados indicam a importância de se avaliar diferentes condições de extração de compostos fenólicos em frutas vermelhas, a fim de otimizar a recuperação do teor desses compostos bioativos, bem como a atividade por eles desempenhadas.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AGRIMANI, D.S.R. et al. Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 39, n. 2, p. 277-283, 2015. Disponível em:
[http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n2/pag277-283%20\(RB581\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n2/pag277-283%20(RB581).pdf). Acesso em: 10 dez. 2018.

AKOWUAH, G.A.; MARIAM, A.; CHIN, J.H. The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of *Gynura procumbens* leaf. **Pharmacogn Mag**, v. 4, p. 81–85, 2009.

ALBUQUERQUE, U.P.; RAMOS, M.A.; MELO, J.G. New strategies for drug discovery in tropical forests based on ethnobotanical and chemical ecological studies. **J Ethnopharmacol**, v. 140, n. 1, p. 197-201, 2012. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111009202>. Acesso em: 12 nov. 2018.

ALKHALIDY, H.; WANG, Y.; LIU, D. Dietary Flavonoids in the Prevention of T2D: An Overview. **Nutr**, v. 10, n. 4, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5946223/>. Acesso em: 20 nov. 2018

ALLOCATI, N. et al. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. **Oncogenesis**, v. 7, n. 1, 2018. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5833873/>. Acesso em: 20 nov. 2018.

ANTUNES, L.E.C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Cienc Rural [online]**, v. 32, n. 1, p.151-158, 2002. Disponível em:
<http://www.scielo.br/pdf/cr/v32n1/a26v32n1.pdf>. Acesso em: 19 out. 2018.

ANTUNES, L.E.C. et al. Produção de amoreira-preta no Brasil. **Rev Bras Frutic**, v. 36, n. 1, p. 100-111, 2014. Disponível em:

<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v36n1/v36n1a12.pdf>. Acesso em 19 out. 2018.

ANVISA. **Consulta de Produtos**. Alimentos. Amora-preta. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/alimentos/q/?nomeProduto=amora-preta>. Acesso em: 01 mai. 2018.

ARORA, S.; ITANKAR, P. Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Chenopodium album* aerial parts. **JTCM**, v. 8, n. 4, p. 476-482, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2225411017301244>. Acesso em: 05 nov. 2018.

ARTHEY, D.; ASHURST, R.P. **Fruit Processing: Nutrition, Products, and Quality Management**. Ed.: Aspen Publishers. 2.ed., p.28-29, 2001.

BARBIERI, R. et al. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiol Res**, v. 196, p. 44-68, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131630619X?via%3Dihub>. Acesso em: 20 nov. 2018.

BARZOTTO, I.L.M. et al. Supercritical extraction of *Eugenia involucrata* leaves: Influence of operating conditions on yield and α -tocopherol content. **J Supercrit Fluids**, v. 143, p. 55-63, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844618303887>. Acesso em: 20 nov. 2018.

BEERENWINKEL, N. et al. Cancer Evolution: Mathematical Models and Computational Inference. **Syst Biol**, v. 64, n. 1, p. e1–e25, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4265145/>. Acesso em: 10 set. 2017.

BENDER, O.; ATALAY, A. Evaluation of anti-proliferative and cytotoxic effects of chlorogenic acid on breast cancer cell lines by real-time, label-free and high-throughput screening. **J Res Pharm**, v. 22, n. 2, p. 173-179, 2018.

BENETT, L.L.; ROJAS, S.; SEEFELDT, T. Role of Antioxidants in the Prevention of Cancer. **J Exp Clin Med**, v. 4, n. 4, p. 215-222, 2012.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878331712000848>. Acesso em: 25 nov. 2018.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Anal Biochem**, v. 239, n. 1, p. 70-6, 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8660627>. Acesso em: 20 abr. 2017.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organ J**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3488923/>. Acesso em: 23 nov. 2018.

BIRD, R.P.; DRAPER, H.H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 299-305, 1984.

BOEING, J.S. et al. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. **Chem Cent J**, v. 8, n. 48, p. 1–9, 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4158270/pdf/13065_2014_Article_48.pdf. Acesso em: 10 set. 2018.

BOTELHO, R.V. et al. Phenology and yield of thornless blackberry cv. Xavante in the region of Guarapuava-PR. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 3, p. 209-214, 2009. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/agraria/article/view/14506/9904>. Acesso em: 10 set. 2017.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Sci Technol**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>. Acesso em: 20 abr. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não**

transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022 / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 160 p. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_acoes_enfrent_dcnt_2011.pdf Acesso em: 19 nov. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monografia da espécie *Morus nigra* L. (amoreira)**. Brasília, 2015. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/11/Monografia-Morus-nigra.pdf>. Acesso em: 10 set. 2018.

BUETTNER, G.R.; JURKIEWICZ, B.A. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. **Radiat Res**, v. 145, n. 5, p. 532–541, 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8619018>. Acesso em: 23 nov. 2018.

CAMLOFSKI, A.M.O. **Caracterização do fruto de cerejeira (*Eugenia involucrata* DC) visando seu aproveitamento tecnológico**. 2008. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa/PR. Disponível em: <http://tede2.uepg.br/jspui/bitstream/prefix/670/3/Ana%20Mery.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2018.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, v.113, p.484-490, 1985. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687985130624> Acesso em: 19 nov. 2017.

CHAKRABORTHY, A. et al. Antioxidant and pro-oxidant activity of Vitamin C in oral environment. **Indian J Dent Res**, v. 25, n. 4, p. 499-504, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25307916>. Acesso em: 21 nov. 2018.

CHANG, H. et al. Dietary Flavonoids and the Risk of Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis of Epidemiological Studies. **Nutr**, v. 10, n. 950, 2018. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6073812/>. Acesso em: 10 nov. 2018.

CHAREPALLI, V. et al. *Eugenia jambolana* (Java Plum) Fruit Extract Exhibits Anti-Cancer Activity against Early Stage Human HCT-116 Colon Cancer Cells and Colon Cancer Stem Cells. **Cancers**, v. 8, n. 3, 2016. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/26927179/>. Acesso em: 14 nov. 2018.

CHAVES, V.C. **Teor de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade de captação de radicais livres de frutos de cultivares de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.)**. 2014. Dissertação (Mestre em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis/SC. Disponível em:
<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/123411/327156.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 nov. 2018.

CHAVES, V.C. **Caracterização química de frutos vermelhos cultivados no sul do Brasil e avaliação farmacológica de extrato de *Rubus* sp. em modelo animal de mania e neuroinflamação**. 2017. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis/SC. Disponível em:
<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/189719/PBTC0271-T.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 nov. 2018.

CHAVES, V.C. et al. Berries grown in Brazil: anthocyanin profiles and biological properties. *J Sci Food Agric*, v. 98, p. 4331-4338, 2018. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jsfa.8959>. Acesso em: 10 jan. 2019.

CHAZOTTE, B. Labeling Mitochondria with JC-1. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 9, 2011. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21880824>. Acesso em: 14 jan. 2019.

CHRESTENSEN, C. A.; STARKE, D. W.; MIEYAL, J. J. Acute Cadmium Exposure Inactivates Thioltransferase (Glutaredoxin), Inhibits

Intracellular Reduction of Protein-glutathionyl- mixed Disulfides, and Initiates Apoptosis. **J Biol Chem**, v. 275, n. 34, p. 26556–26565, 2000.

CHU, S.C. et al. *Rubus idaeus* L inhibits invasion potential of human A549 lung cancer cells by suppression epithelial-to-mesenchymal transition and Akt pathway in vitro and reduces tumor growth in vivo. **Integr Cancer Ther**, v. 13, n. 3, p. 259-273, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24335666>. Acesso em: 15 jan. 2019.

CIESLAK, J. A.; CULLEN, J. J. Treatment of Pancreatic Cancer with Pharmacological Ascorbate. **Curr Pharm Biotechnol**, v.16, n. 9, p. 759-770, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26201606>. Acesso em: 06 nov. 2018.

COHEN, S.D.; KENNEDY, J.A. Plant metabolism and the environment: implications for managing phenolics. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 50, n. 7, p. 620-643, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20694925>. Acesso em: 12 nov. 2018.

CORDOVA, C.A.S. **Avaliação da toxicidade e da atividade Antitumoral de derivados n-alquil ésteres do Ácido gálico, livres ou encapsulados em Nanopartículas lipídicas sólidas, para o Estudo do melanoma *in vitro* e *in vivo***. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis/SC. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/95614/298139.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 dez. 2018.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **J Nat Prod**, v. 60, n. 1, p. 52-60, 1997. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np9604893>. Acesso em: 25 nov. 2018.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3672862/pdf/nihms468935.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2018.

CHRIST, B.; MÜLLER, K.H. Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. **Arch Pharm**, v. 293, p. 1033-1042, 1960. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ardp.19602931202>. Acesso em: 24 nov. 2018.

D'ARCHIVIO, M. et al. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. **Int J Mol Sci**, v. 11, n. 4, p. 1321–1342, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871118/>. Acesso em: 21 nov. 2018.

DAI, J.; GUPTA, A.; GATES, L.; MUMPER, R.J. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. **Food Chem Toxicol**, v. 47, n. 4, p. 837-47, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19271318>. Acesso em: 10 jan. 2019.

DAMETTO, A.C. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* (Myrtaceae)**. 2014. Tese (Doutor em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/110857/000774869.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 set. 2017.

DENARDIN, C.C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **J Food Drug Anal**, v. 23, n. 3, p. 387-398, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949815000344>. Acesso em: 10 abr. 2017.

DEPONTE, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3217-3266, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416512002735?via%3Dihub>. Acesso em: 20 nov. 2018.

DONADIO, L.C.; MÔRO, F.V.; SERVIDONE, A.A. **Frutas brasileiras**. 2ª ed. Jaboticabal: Novos Talentos, 2002.

DUTRA, R.C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol Res**, v. 112, p. 4-29, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043661816000232?via%3Dihub>. Acesso em: 10 set. 2017.

EL-HUSSEINY, W.M. et al. Synthesis, antitumour and antioxidant activities of novel α,β -unsaturated ketones and related heterocyclic analogues: EGFR inhibition and molecular modelling study. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 33, n. 1, p. 507-518, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6010098/pdf/ienz-33-1434519.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2018.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v.82, n. 1, p. 70-77, 1959.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Alimentos Funcionais e Nutracêuticos**. Documentos 85. Encontro Franco Brasileiro de Biociência e Biotecnologia. Brasília, DF. Dezembro, 2002. 15p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/180287/1/doc085.pdf>. Acesso em: 15 set. 2017.

_____. **Aspectos Técnicos da Cultura da Amora-preta** / Luis Eduardo Corrêa Antunes, Maria do Carmo Bassols Raseira. Documentos, 122. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2004. 54p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/744812/1/documento122.pdf>. Acesso em: 20 set. 2017.

_____. **Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata*)** / Juliana Degenhardt, Rodrigo Cezar Franzon, Raquel Rosa da Costa. Documentos, 211. Pelotas,RS: Embrapa Clima Temperado, 2007. 22 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/746075/1/documento211.pdf>. Acesso em: 15 set. 2017.

_____. **Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrências, descrição e usos** / Rodrigo Cezar Franzone. [et al.]. Documentos 266. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009a. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/697560/1/doc266.pdf>. Acesso em: 15 set. 2018.

_____. **Cerejeira *Eugenia involucrata***. Paulo Ernani Ramalho Carvalho. Comunicado técnico 224. ISSN 1517-5030 Colombo, PR Técnico Julho, 2009b. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2010/46373/1/CT224.pdf>. Acesso em 24 set. 2018.

_____. **Amora-preta - BRS Xingu**. 2015a. Disponível em: <https://www.embrapa.br/clima-temperado/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/2938/amora-preta---brs-xingu>. Acesso em 17 out. 2018.

_____. **A amora-preta ocupa espaço no mercado da indústria e de mesa ao valorizar o seu potencial**. 2015b. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/7893485/a-amora-preta-ocupa-espaco-no-mercado-da-industria-e-de-mesa-ao-valorizar-o-seu-potencial>. Acesso em 19 de maio de 2018.

EPSTEIN, J.B. et al. Oral complications of cancer and cancer therapy: from cancer treatment to survivorship. **CA Cancer J Clin**, v.62, n.6, p.400-22, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22972543>. Acesso em: 21 nov. 2018.

ESPEY, M.G. et al. Pharmacologic ascorbate synergizes with gemcitabine in preclinical models of pancreatic cancer. **Free Radical Biol Med**, v. 50, n. 11, p. 1610–1619, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3482496/pdf/nihms-356176.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2018.

FARIAS, I.V. et al. Cytotoxic phloroglucinol meroterpenoid from *Eugenia umbelliflora* fruits. **Phytochemistry Letters**, v. 27, p. 187–192. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187439001830212X>. Acesso em: 26 nov. 2018.

FERREIRA, D.S.; ROSSO, V.V. de; MERCADANTE, A.Z. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.). **Rev Bras Frutic**, v. 32, n. 3, p. 664-674, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v32n3/aop11610>. Acesso em: 10 out. 2017.

FERREIRA, L.M. et al. Produção de amoreira-preta sob diferentes sistemas de condução. **Cienc Rural**, v. 46, n. 3, p. 421-427, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v46n3/1678-4596-cr-46-03-00421.pdf>. Acesso em: 25 set. 2017.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v.105, p.114-121, 1984.

FRANCISCO, M. et al. Environmental and genetic effects on yield and secondary metabolite production in Brassica rapa crops. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 22, p. 5507-14, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22587693>. Acesso em: 26 nov. 2018.

FRANZON, R. C.; RASEIRA, M. C. B. 2006. Germinação in vitro e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC. (*Mirtaceae*). **Rev Bras Frutic**, v. 28, n. 1, p. 18-20, 2006.

FREI, B.; LAWSON, S. Vitamin C and cancer revisited. **PNAS**, v. 105, n. 32, p. 11037–11038, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2516245/pdf/zpq11037.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2018.

GAO, L.; MAZZA, G. Rapid method for complete chemical characterization of simple and acylated anthocyanins by high-performance liquid chromatography and capillary gas-liquid chromatography. **J Agric Food Chem**, v. 42, n. 1, p 118–125, 1994. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00037a020>. Acesso em: 10 jan. 2019.

GEORGE, B.P. et al. Antitumor and wound healing properties of *Rubus ellipticus* Smith. *J Acupunct Meridian Stud*. v. 8, n. 3, p 134-141, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2005290113002148?via%3Dihub#!>. Acesso em 13 jan. 2019.

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. **Curr Protocol Food Anal Chem**, v. 00, n.1, p. F1.2.1-13, 2001. Disponível em: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/0471142913.faf0102s00>. Acesso em: 20 abr. 2017.

GOMES, T. et al. Application of response surface methodology for obtaining lettuce (*Lactuca sativa* L.) by-products extracts with high antioxidative properties. **Ind Crops Prod**, v.44, p.622–629, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669012005183>. Acesso em: 10 dez. 2018.

GONZÁLES-PONCE, H.A. et al. Natural Dietary Pigments: Potential Mediators against Hepatic Damage Induced by Over-The-Counter Non-Steroidal Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs. **Nutr**, v. 10 n. 117, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5852693/>. Acesso em: 20 nov. 2018.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 12, p. 931-947, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24287781>. Acesso em: 24 nov. 2018.

GUPTA, R.K. et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.15, n. 11, p. 4405-4409, 2014. Disponível em: <http://journal.waocp.org/?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:24969860&key=2014.15.11.4405>. Acesso em: 06 nov. 2018.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione Stransferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974. Disponível em: <http://www.jbc.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=4436300>. Acesso em: 20 jun. 2018.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.; ARUOMA, O.I. The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Anal Biochem**, v. 165, n. 1,

p. 215-219, 1987. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3120621>. Acesso em: 20 abr. 2017.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Iron toxicity and oxygen radicals. In **Free Radic Biol Med**, 2nd ed., pp. 86–123, 1989. Oxford: Clarendon Press.

HALLIWELL, B.; CROSS, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ Health Perspect**, v. 102, Sup 10, p. 5-12, 1994. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7705305>. Acesso em: 20 nov. 2017.

HALLIWELL, B. et al. The characterization on antioxidants. **Food Chem Toxicol**, v.33, n.7, p.601-617, 1995. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628797>. Acesso em: 10 set. 2017.

HALLIWELL, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? **Trends Biochem Sci**, v. 24, n. 7, p. 255-259, 1999. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10390611>. Acesso em: 23 nov. 2018.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radic Biol Med**. 5^aed. Oxford University Press. Oxford. 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radic Biol Med**. 5^aed. Oxford University Press. Oxford. 2015.

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 13, p. 894-901, 2008. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691670>. Acesso em: 10 out. 2017.

HARVEY, K.F.; ZHANG, X; THOMAS, D.M. The Hippo pathway and human cancer. Review Article. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 4, p. 246-257, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467301>.

Acesso em: 10 out. 2017.

HOSSEINI, M.M. et al. Cytotoxic and apoptogenic effects of cyanidin-3-glucoside on the glioblastoma cell line. **World Neurosurg**, v. 108, p. 94-100, 2017. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878875017314341?via%3Dihub>. Acesso em: 15 jan. 2019.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15769103>.

Acesso em: 10 out. 2018.

HUSSAIN, I. et al. Phenology of ‘Tupy’ and ‘Xavante’ blackberries grown in a subtropical area. **Scientia Horticulturae**, v. 201, p. 28-83, 2016. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423816300371>. Acesso em 10 set. 2017.

HUSSAIN, G. et al. Role of Plant-Derived Flavonoids and Their Mechanism in Attenuation of Alzheimer’s and Parkinson’s Diseases: An Update of Recent Data. **Molecules**, v. 23, n. 4, 2018. Acesso em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6017497/> Disponível em: 20 nov. 2018.

IGHODARO, OM; AKINLOYE, OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alex J Med**, v. 54, n. 4, p. 287 – 293, 2018. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090506817301550> Acesso em: 22 out. 2018.

ILIC, M.; ILIC, I. Epidemiology of pancreatic cancer. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 44, p. 9694–9705, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5124974/>. Acesso em: 06 nov. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA. **INCA estima cerca de 600 mil casos novos de câncer para 2018**. 2018a. Disponível em:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/n>

oticias/2018/inca-estima-cerca-600-mil-casos-novos-cancer-para-2018. Acesso em: 29 abr. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA. **Tipos de câncer: Pâncreas**. 2018b.

Disponível em:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pancreas> Acesso em: 27 out. 2018.

INFANTE, J. et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits. **PLoS One**, v.11, n.4, 2016.

Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0152974>. Acesso em: 11 set. 2018

IVANOV, A.V. et al. Oxidative stress, a trigger of hepatitis C and B virus-induced liver carcinogenesis. **Oncotarget**, v. 8, n.2, p. 3895–3932, 2017. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5354803/>. Acesso em: 22 out. 2018.

JACQUES, A.C. **Amora-preta (*Rubus fruticosus*):** Compostos bioativos e voláteis. 2012. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. Disponível em:

http://dctaufpel.com.br/ppgcta/manager/uploads/documentos/teses/tese_andressa_pdf.pdf. Acesso em: 10 set. 2017.

KALININA, E.V.; CHERNOV, N.N.; NOVICHKOVA, M.D. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. **Biochemistry (Mosc)**, v. 79, n. 13, p. 1562-1583, 2014. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25749165>. Acesso em: 20 nov. 2018.

KANNAN, K.; JAIN, S.K. Oxidative stress and apoptosis.

Pathophysiology, v. 7, n. 3, p. 153-163, 2000. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10996508>. Acesso em: 13 nov. 2018.

KARASAWAL, M.M.G.; MOHAN, C. Fruits as Prospective Reserves of bioactive Compounds: A Review. **Nat Prod Bioprospect**, v. 8, n. 5,

p. 335–346, 2018. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6109443/>. Acesso em: 22 out. 2018.

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L.O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Crit Rev Toxicol**, v. 45, n. 9, p. 765–798, 2015. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26610815>. Acesso em: 10 set. 2017.

KHOO, H.E. et al. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits.

Food Nutr Res, v. 61, n. 1, 2017. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5613902/pdf/zfnr-61-1361779.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2018.

KÖHLER, M. **Diagnóstico preliminar da cadeia das frutas nativas do estado do Rio Grande do Sul**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS.

KOSMIDER, B. et al. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. **Mutat Res**, v. 563, n. 1, p. 61-70, 2004. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15324749>. Acesso em: 19 nov. 2018.

KRIS-ETHERTON, P.M. et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **Am J Med**, v.113, n.9, Suplemento 2, p. 71-81, 2002. Disponível em:

[https://www.amjmed.com/article/S0002-9343\(01\)00995-0/fulltext](https://www.amjmed.com/article/S0002-9343(01)00995-0/fulltext). Acesso em: 21 nov. 2018.

KUSKOSKI, E.M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciênc Tecnol Aliment** Campinas, v. 25,n. 4, p. 726-732, Dec. 2005 .

LI, D. et al. Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 57, n. 8, p. 1729-1741, 2017. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2015.1030064>.
Acesso em: 06 nov. 2018.

LOCATELLI, C. et al. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. **Chem Biol Interact**, v. 181, p. 175-84, 2009.

LONGO, L. et al. Anthocyanins from *Eugenia myrtifolia* Sims. **Innov. Food Sci Emerg Technol**, v. 8, n. 3, p. 329–332, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612001380>. Acesso em: 23 nov. 2018.

LÓPEZ-LÁZARO, M. A simple and reliable approach for assessing anticancer activity *in vitro*. **Curr Med Chem**, v. 22, p. 1324-1334, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/272193167_A_Simple_and_Reliable_Approach_for_Assessing_Anticancer_Activity_In_Vitro. Acesso em: 14 nov. 2018.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: **Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4ª ed. Nova Odessa: Inst. Plant., v.1, 2002.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p; 265-276, 1951. Disponível em: <http://www.jbc.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=14907713>. Acesso em: 20 jun. 2018.

LUCAS, A.L. et al. Dietary total antioxidant capacity and pancreatic cancer risk: an Italian case-control study. **Br J Cancer**, v. 115, p. 102-107, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4931362/pdf/bjc2016114a.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2018.

MAHASETH, T.; KUZMINOV, A. Potentiation of hydrogen peroxide toxicity: From catalase inhibition to stable DNA-iron complexes. **Mutat Res**, v. 773, p. 274-281, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5607474/pdf/nihms815219.pdf>. Acesso em: 21 nov. 2018.

MALUF, AM; BILIA, DAC; BARBEDO, CJ. Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. **Sci agric**, Piracicaba, v. 60, n. 3, p. 471-475, 2003. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162003000300009&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 20 out. 2018.

LE MARCHAND, L. Cancer preventive effects of flavonoids--a review. **Biomed Pharmacother**, v. 56, n. 6, p. 296-301, 2002.

MARSZAŁEK, K. et al. The Effect of High Pressure Techniques on the Stability of Anthocyanins in Fruit and Vegetables. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 277, 2017. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5343813/>. Acesso em: 20 nov. 2018.

MARTINEZ-USEROS J. et al. Oxidative Stress: A New Target for Pancreatic Cancer Prognosis and Treatment. **J Clin Med.**; v. 6, n. 29, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28282928>. Acesso em: 06 nov. 2018.

MATEUS, P.G. et al. Chapter 9 - Quercetin: Prooxidant Effect and Apoptosis in Cancer. **Stud Nat Prod Chem.**, V. 58, p. 265-288, 2018.

MAZZONI, L. et al. The genetic aspects of berries: from field to health. **J Sci Food Agric**, v. 96, n. 2, p. 365-371, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25872898>. Acesso em: 10 abr. 2018.

MELO, A.D.B. et al. Antimicrobial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. **Can J Vet Res**, v. 79, p. 285–289, 2015.

MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A.M.; ZUJKO, M.E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Adv Med Sci.**, v. 63, n.1, p. 68-78, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1896112617300445>. Acesso em: 21 nov. 2018.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972. Disponível

em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4623845>. Acesso em: 15 nov. 2018.

MOHAMMAD, R.M. et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. **Semin Cancer Biol.**, v. 35, p. S78–S103, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4720504/pdf/nihms-747941.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2018.

MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. **Sep Purif Technol**, v. 162, p. 68–76, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586616300430>. Acesso em: 26 nov. 2018.

MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. **Food Chem**, v. 129, n.1, 139-148, 2011.

MUT-SALUD, N. et al. Antioxidant Intake and Antitumor Therapy: Toward Nutritional Recommendations for Optimal Results. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, 19 p., 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4670692/pdf/OMCL2016-6719534.pdf>. Acesso em: 21 nov. 2018.

MIYAMOTO, S.T.; LOMBARDI, I. JR.; BERG, K.O.; RAMOS, L.R.; NATOUR, J. Brazilian version of the Berg balance scale. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 19, p. 1411-1414, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15334208>. Acesso em: 10 jan. 2019.

NEUHOUSER, M.L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. **Nutr Cancer**, v. 50, n. 1, p. 1-7, 2004.

NICÁCIO, A.E. et al. Antioxidant Activity and Determination of Phenolic Compounds from *Eugenia involucrata* DC. Fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Anal Methods**, v.10, n. 8, p. 2718–2728, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs12161-017-0840-3.pdf>. Acesso em: 20 out 2018.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Rad Biol Med**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728801>. Acesso em: 10 set. 2017.

NÚÑEZ, J.G. et al. Antineoplastic potential of the aqueous crude extract of *Eugenia uniflora* L. in human cervical cancer. **Braz J Pharm Sci**, São Paulo, v. 54, n. 2, 2018. Disponível em:

<http://www.scielo.br/pdf/bjps/v54n2/2175-9790-bjps-54-02-e17267.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2018.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10951200>. Acesso em: 19 nov. 2018.

OKAMOTO, F.; FURLANETO, F.P.B.; MARTINS, A. **Amora preta: quem é quem**. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. Disponível em: <http://www.aptaregional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao-2013/julho-dezembro-1/1387-amora-preta-quem-e-quem/file.html>. Acesso em: 06 set. 2018.

OLAS, B. Berry Phenolic Antioxidants – Implications for Human Health? **Front Pharmacol**, v. 9, n. 78, 2018. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5890122/>. Acesso em: 31 out. 2018.

ONCEA, S.; STOIA, M.; COMAN, D. Effects of Extraction Conditions on Bioactive Anthocyanin Content of *Vaccinium Corymbosum* in the Perspective of Food Applications. **Procedia Eng**, v. 42, p. 489-495, 2012. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877705812028408>. Acesso em: 29 nov. 2018.

PANG, S. et al. Co-induction of a glutathione-S-transferase, a glutathione transporter and an ABC transporter in maize by xenobiotics. **PLoS One**, v. 7, n. 7, 2012. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22792398>. Acesso em: 20 nov. 2018.

PAREDES, M.D. et al. Beneficial Effects of Different Flavonoids on Vascular and Renal Function in L-NAME Hypertensive Rats. **Nutr**, v. 10, n.484, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5946269/>. Acesso em: 20 nov. 2018.

PATRAS, A. et al. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends Food Sci Technol**, v. 21, n. 1, p. 3-11, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224409002271>. Acesso em: 06 nov. 2018.

PEKAL, A.; PYRZYNSKA, K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. **Food Anal Methods**, v. 7, n. 9, p. 1776 – 1782, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-014-9814-x>. Acesso em: 10 abr. 2017.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANGA, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resist Updat**, v. 7, n. 2, p. 97–110, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136876460400007X?via%3Dihub>. Acesso em: 15 nov. 2018.

PÉREZ-TORRES, I.; GUARNER-LANS, V.; RUBIO-RUIZ, M.E. Reductive Stress in Inflammation-Associated Diseases and the Pro-Oxidant Effect of Antioxidant Agents. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 10, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5666780/>. Acesso em: 21 nov. 2018.

PEREIRA, F.C. **Mecanismo de morte celular induzida por complexos de rutênio em diferentes linhagens tumorais**. 2014. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Biologia, Goiania/GO. Disponível em: https://pos.icb.ufg.br/up/101/o/Tese_Fl%C3%A1via.pdf. Acesso em: 10 jan. 2019.

POWERS, S. K.; LENNON, S. L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. **Proc Nutr Soc**, v. 58, n. 4, p. 1025–1033, 1999. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10817171>. Acesso em: 10 set. 2018.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J Agric Food Chem**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15884874>. Acesso em: 08 jan. 2019.

PROCHÁZKOVÁ, D; BOUŠOVÁ, I; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513-523, 2011. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X11000396>. Acesso em: 22 out. 2018.

PROSKURYAKOV, S.Y.; GABAI, V.L. Mechanisms of tumor cell necrosis. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 1, p. 56-68, 2010. Disponível em:

<http://www.eurekaselect.com/70606/article>. Acesso em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20214618>. Acesso em: 21 dez. 2018.

RAHMANN, M.M.; ICHIYANAGI, T.; KOMIYAMA, T.; HATANO, Y.; KONISHI, T. Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. **Free Radic Res**, v. 40, n. 9, p.993-1002, 2006.

RAMALHO, R.R. et al. Variability of polyphenols and volatiles during fruit development of three pitanga (*Eugenia uniflora* L.) biotypes. **Food Res Int**, In press, corrected proof,

RANI, V. et al. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sci J**, v. 148, n. 1, p. 183–193, 2016.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320516300522?via%3Dihub>. Acesso em: 20 jun. 2017.

RASEIRA, M.C.B. et al. **Seleções avançadas de amora-preta em comparação com a cultivar padrão, ‘Tupy’**. 2012. XXII Congresso

Brasileiro de Fruticultura. Bento Gonçalves/RS. Disponível em:
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/70050/1/2.pdf>.
Acesso em: 10 nov. 2018.

RASEIRA, MCB; FRANZON, RC. Melhoramento genético e cultivares de amora-preta e mirtilo. Pequenas frutas: tecnologias de produção. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 33, n. 268, p.11-20, 2012. Disponível em:
<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/939262/1/MariadoCarroBassolsinfo.agrop.v.33.pdf>. Acesso em: 15 out. 2018.

REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**: Rosáceas. Herbário Barbosa Rodrigues: Itajaí, 1996.

RIGOLON, TCB. **Predição do conteúdo de antocianinas, fenólicos totais e capacidade antioxidante dos frutos de amora (*Rubus* sp.), mirtilo (*Vaccinium* sp.) e casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba*) usando parâmetros colorimétricos**. 2017. Dissertação (*Magister Scientiae*). Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa/MG. Disponível em:
<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/11724/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 13 nov. 2018.

ROMAGNOLO, D.F.; SELMIN, O.I. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. **J Nutr Gerontol Geriat**, v. 31, n. 3, p. 206-238, 2012.

RONCHI, J.P. **Transição de permeabilidade mitocondrial em mitoplastos de fígado de rato**. 2010. Dissertação (Mestre em Fisiopatologia Médica). Programa de Pós-Graduação Fisiopatologia Médica. Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP. Disponível em:
http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/311566/1/Ronchi_JulianaAparecida_M.pdf. Acesso em: 10 dez. 2018.

ROSOLEN, D. et al. Intracellular ROS Generation Mediates Maleimide-induced Cytotoxicity in Leukemia Cells. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 15, n. 9, p. 1164-1173, 2015. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26118709>. Acesso em: 11 nov. 2017.

RYU, J. et al. Comparison of Phytochemicals and Antioxidant Activity in Blackberry (*Rubus fruticosus* L.) Fruits of Mutant Lines at the Different Harvest Time. **Plant Breed Biotech**, v. 4, n. 2, 2016.

Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/303849481_Comparison_of_Phytochemicals_and_Antioxidant_Activity_in_Blackberry_Rubus_fruticosus_L_Fruits_of_Mutant_Lines_at_the_Different_Harvest_Time.

Acesso em: 10 jan. 2019.

SACCHET, C. et al. Antidepressant-Like and Antioxidant Effects of *Plinia trunciflora* in Mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2015, Article ID 601503, 9 p. Disponível em:

<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/601503/>. Acesso em: 10 abr. 2017.

SAHA, S.K. et al. Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 1544, 2017. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5536032/>. Acesso em: 22 out. 2018.

SANTOS, S.T. **Caracterização de genótipos de amoreira-preta (*Rubus spp*) na condição edafoclimática de Curitiba/SC**. 2018.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Agronomia).

Universidade Federal de Santa Catarina. Curitiba/SC.

SANTOS, A.M., RASEIRA, M.C.B.,. Lançamento de Cultivares de Amoreira-Preta. EMBRAPA-CNPFT, Informativo 23, p.7, 1988, Pelotas/RS.

SAUSEN, L. et al. Avaliação da atividade alelopática do extrato aquoso de folhas de *Eugenia involucrata* DC. e *Acca sellowiana* (O. Berg)

Burret. **Polibotânica**, n. 27, p. 145-158, 2009. Disponível em:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682009000100009. Acesso em: 10 set. 2018.

SCHAFFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic Biol Med**, v. 30, n. 11, p. 1191-212, 2001.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584901004804?via%3Dihub>. Acesso em: 15 nov. 2018.

SECA, A.M.L.; PINTO, D.C.G.A. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. **Int J Mol Sci.**, v.19, n.263, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/1/263>. Acesso em: 19 nov. 2018.

SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochem J.**, v. 360, p. 1–16, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1222196/pdf/11695986.pdf>. Acesso em: 21 nov. 2018.

SHI, Y. et al. A. ROS-dependent activation of JNK converts p53 into an efficient inhibitor of oncogenes leading to robust apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 21, n, 4, p. 612–623, 2014.

SHI, Y. et al. Combination of quercetin, cinnamaldehyde and hirudin protects rat dorsal root ganglion neurons against high glucose-induced injury through Nrf-2/HO-1 activation and NF- κ B inhibition. **Chin J Integr Med**, v. 23, n. 9, p. 663-671, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28861887>. Acesso em: 10 out. 2018.

SHIMURA, T. et al. Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in low dose irradiated human fibroblasts. **Oncotarget**, v. 7, v.3, p. 3559-3570, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4823127/pdf/oncotarget-07-3559.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2018.

SHIMURA, H. et al. Glycyl-alanyl-histidine protects PC12 cells against hydrogen peroxide toxicity. **BMC Biochem**, v. 18, n. 14, 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5700669/pdf/12858_2017_Article_89.pdf. Acesso em: 21. Nov. 2018

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am J Clin Nutr**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7495226>. Acesso em: 10 set. 2017.

SKREDE, G.; WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). **J Food Sci**, v. 65, p. 357-364, 2000.

SILVA, R.S.; VENDRUSCOLO, J.L.; TORALLES, R.P. Avaliação da capacidade antioxidante em frutas produzidas na região sul do RS. R. **Bras Agrociência**, v. 17, n. 3-4, p. 392-400, 2011. Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/download/2073/1911>. Acesso em:

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. **AJEV**, v. 13, n. 3, p. 144–158, 1965. Disponível em: <http://www.ajevonline.org/content/16/3/144>. Acesso em: 10 abr. 2017.

SKROVANKOVA, S. et al. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. **Int J Mol Sci**, v. 16, p. 24673-24706, 2015 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632771/pdf/ijms-16-24673.pdf>. Acesso em: 31 out. 2018.

SOORENTI, V. et al. Cyanidin induces apoptosis and differentiation in prostate cancer cells. **Int J Oncol**, v. 47, n. 4, p. 1302-1310, 2015. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/ijo/47/4/1303>. Acesso em: 15 ja. 2019.

SOUZA, V.R. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chem**, n. 156, p. 362–368, 2014a.

SOUZA, V.Q. et al. Analysis of the Subtropical Blackberry Cultivar Potential in Jelly Processing. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 9, 2014b.

SOUZA, RS. **Características de produção e qualidade de frutas de genótipos de amoreira –preta em sistema de produção orgânico**. 2018. Dissertação (Mestre em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas.

Pelotas/RS. Disponível em:

<http://repositorio.ufpel.edu.br:8080/bitstream/prefix/3960/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Vers%C3%A3o%20final%20-Rafaela%202018.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2018.

STALIKAS, C.D. Phenolic acids and flavonoids: occurrence and analytical methods. **Methods Mol Biol**, v. 610, p. 65-90, 2010.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20013173>. Acesso em: 10 jan. 2019.

SUN, G. et al. Gallic acid as a selective anticancer agent that induces apoptosis in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells. **Oncol Lett.**, v11, n.1, p.150-158, 2016.

TEIXEIRA, L.L. et al. Potential antiproliferative activity of polyphenol metabolites against human breast cancer cells and their urine excretion pattern in healthy subjects following acute intake of a polyphenol-rich juice of grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lam.). **Food Funct**, v. 8, n. 6, p. 2266-2274, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c7fo00076f>. Acesso em: 14 nov. 2018.

TELES, A. S. C. et al. Effect of temperature on the degradation of bioactive compounds of *Pinot Noir* grape pomace during drying. **Braz J Food Technol**, v. 21, 2017. Disponível em:

<http://www.scielo.br/pdf/bjft/v21/1981-6723-bjft-21-e2017059.pdf>. Acesso: 19 nov. 2018.

TERADA, H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ Health Perspect*. **Environ Health Perspect**, v. 87, p. 213–218, 1990.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1567840/>. Acesso em: 10 jan 2019.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **J Food Compost Anal**, v. 19, n. 6-7, p. 669-675, 2006.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, n. 6, p. 1005-1028, 2000. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076791>. Acesso em: 10 set. 2017.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal. Biochem**, v. 27, n. 3, p. 502–522, mar. 1969. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269769900645> Acesso em: 14 nov. 2018.

TOLEDO, AG; PINTO, FGS. **Prospecção fitoquímica, atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais de *Eugenia involucrata* DC.** 2018. Dissertação (Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais) – Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel/PR. Disponível em: http://tede.unioeste.br/bitstream/tede/3882/5/Adrieli_Toledo2018.pdf. Acesso em: 16 out. 2018.

TORMA, P.D. et al. Hydroethanolic extracts from different genotypes of açai (*Euterpe oleracea*) presented antioxidant potential and protected human neuron-like cells (SH-SY5Y). **Food Chem**, v. 222, p. 94-104, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28041564>. Acesso em: 15 set. 2018.

TOYOKUNI, S. Iron and thiols as two major players in carcinogenesis: friends or foes? **Front Pharmacol**, v. 5, n. 200, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4147246/> Acesso em: 01 jan. 2019.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231-46, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22254006>. Acesso em: 10 jan. 2019.

UETAKI, M. et al. Metabolomic alterations in human cancer cells by vitamin C-induced oxidative stress. **Sci Rep**, v. 5, n. 1, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep13896>. Acesso em: 25 nov. 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS.
Eugenia involucrata DC. Fotógrafo: João Augusto Bagatini. Data de inclusão: 07/09/2014. Disponível em:
http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=12366.
Acesso em: 20 out. 2018.

UTTARA, B. et al. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. **Curr Neuropharmacol**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2724665/pdf/CN-7-65.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2018.

VERGARA, J.R. et al. Effects of Temperature and Time on Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in the Pressurized Hot Water Extraction of Deodorized Thyme (*Thymus vulgaris*). **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 44, p. 10920-10929, 2012.

VIZZOTTO, M. et al. Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* sp.). **Rev Bras Frutic**, v. 34, n. 3, p. 853-858, 2012.

WALLACE, T.C.; GIUSTI, M.M. Anthocyanins. **Adv Nutr**, v. 6, n. 5, p. 620–622, 2015. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4561837/>. Acesso em: 21 nov. 2018.

WANG, S.Y.; LIN, H. Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. **J Agric Food Chem**, v. 48, p. 140-146, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10691606>. Acesso em: 12 nov. 2018.

WANG, H. Rapid quantitative analysis of individual anthocyanin content based on high-performance liquid chromatography with diode array detection with the pH differential method. **J Sep Sci**, v. 37, n. 18, p. 2535–2544, 2014. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24964353>. Acesso em: 20 nov. 2018.

WANG, L. et al. Cyanidin-3-o-glucoside directly binds to ER α 36 and inhibits EGFR-positive triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 7,

p. 68864-68882, 2016. Disponível em:
[http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=12025&path\[\]=38061](http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=12025&path[]=38061). Acesso em: 15 jan. 2019.

WANG, T.; LI, Q.; BI, K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **AJPS**, v. 13, n. 1, p. 12-23, 2018. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1818087617301940>. Acesso em: 10 nov. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Cancer**. World Health Organization. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 29 abr. de 2018.

WILKES, J.G.; ALEXANDRER, M.S.; CULLEN, J.J. Superoxide dismutases in pancreatic cancer. *Antioxidants*, v. 6, n. 66, 2017. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5618094/pdf/antioxidants-06-00066.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2018.

WOOTTON-BEARD, P.C.; MORAN, A.; RYAN, L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. **Food Res Int**, v. 44, n. 1, p. 217-224, 2011.

XIANG, J.; WAN, C.; GUO, R.; GUO, D. Is Hydrogen Peroxide a Suitable Apoptosis Inducer for All Cell Types? **BioMed Res Int**, v. 2016, 2016. Disponível em:
<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/7343965/>. Acesso em: 10 jan. 2019.

XING, Z.; NI, Y.; ZHAO, J.; MA, X. Hydrogen Peroxide-Induced Secreted Frizzled-Related Protein 1 Gene Demethylation Contributes to Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis in Human U251 Glioma Cells. **DNA Cell Biol**, v. 36, n. 5, p. 347-353, 2017. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28398872>. Acesso em: 10 jan. 2019.

XU, D. et al. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, assessment and Resources. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 1, 2017.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/28067795/>. Acesso em: 14 nov. 2018.

YAMASHITA, C. et al. Microencapsulation of an anthocyanin-rich blackberry (*Rubus* spp.) by-product extract by freeze-drying. **Food Sci Technol** v. 84, p.256-262, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381730378X>. Acesso em: 15 set. 2018.

YANG, Y.; GUAN, X. Rapid and thiol-specific high-throughput assay for simultaneous relative quantification of total thiols, protein thiols, and nonprotein thiols in cells. **Anal Chem**, v. 87, n. 1 , p. 649-655, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25423115> Acesso em: 20 nov. 2018.

YANG, L. et al. Recent advances in biosynthesis of bioactive compounds in traditional Chinese medicinal plants. **Sci Bull (Beijing)**, v. 61, p. 3–17, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4722072/>. Acesso em: 25 nov. 2018.

YANG, X. et al. Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis: Mechanisms and Therapies. **Front Physiol**, v. 8, n. 600, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/28878685/>. Acesso em: 23 nov. 2018.

YOKOYAMA, C. et al. Induction of oxidative stress by anticancer drugs in the presence and absence of cells. **Oncol Lett**, v. 14, p. 6066–6070, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5661396/pdf/ol-14-05-6066.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2018.

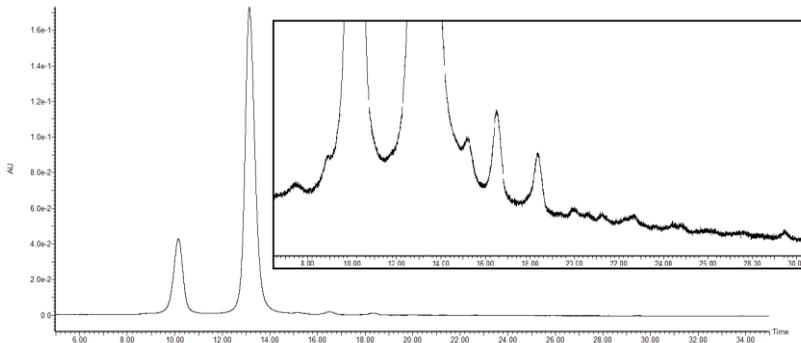
YOUSUF, B. et al. Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v.56, n.13, p. 2223-2230, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25745811>. Acesso em: 06 nov. 2018.

YU, BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev**, v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8295932>. Acesso em: 10 set. 2017.

ZENI, ALB; DALL'MOLIN, M. Hypotriglyceridemic effect of *Morus alba* L., Moraceae, leaves in hyperlipidemic rats. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 130-133, mar. 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000100025&lng=en&nrm=iso. Acesso em 14 mar. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100025>.

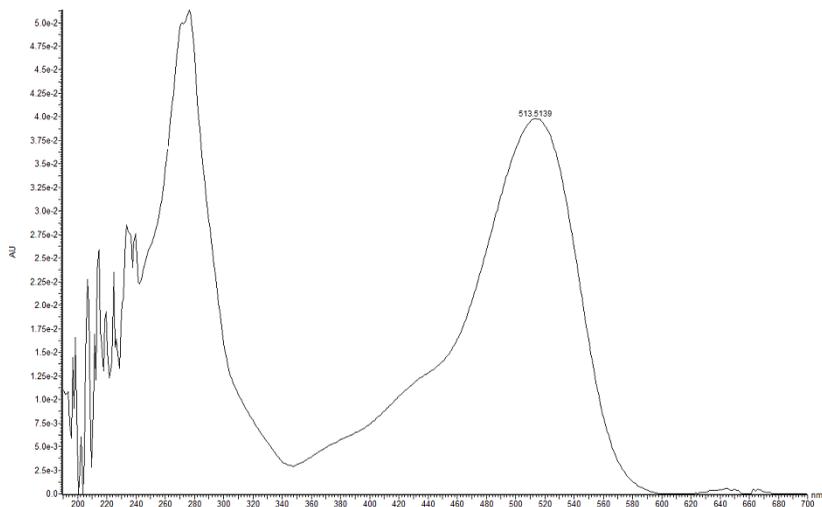
ZHANG, L. et al. Reactive Oxygen Species and Targeted Therapy for Pancreatic Cancer. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4735911/pdf/OMCL2016-1616781.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2018.

**APÊNDICE A – Perfil de compostos antociânicos de *E. involucrata*..
Detecção – PDA (520 nm)**



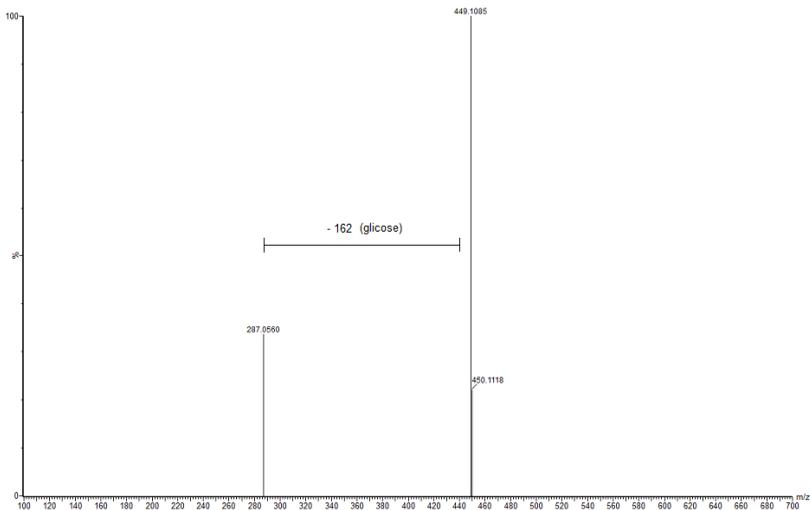
Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

APÊNDICE B – Espectro UV/Vis da antocianina majoritária dos frutos de *E. involucrata* - Cianidina-3-O-glicosídeo.



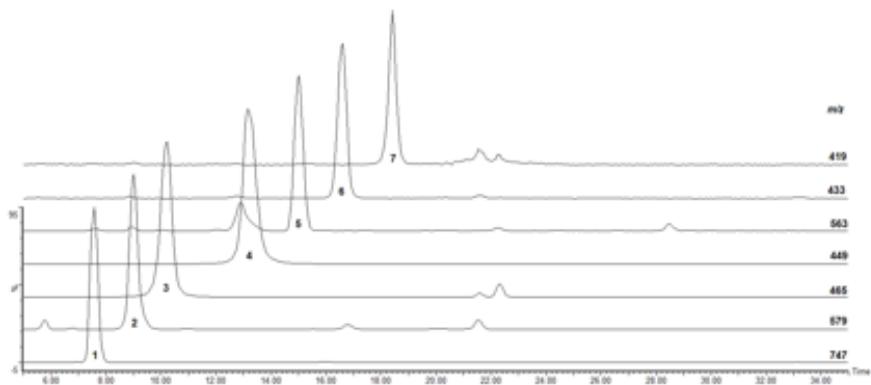
Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

APÊNDICE C – Espectro demonstrando a fragmentação da cianidina-3-*O*-glicosídeo, ou seja, perdendo 162 daltons resultante da perda de glicose com a consequente detecção da aglicona livre (m/z 287).



Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

**APÊNDICE D – Detecção por espectrometria de massas -
Cromatograma dos íons extraídos dos extratos dos frutos de *E.
involutrata* (P26 e P50).**



Fonte: Elaborada pelo autor (2018).