



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança
Mestrado Acadêmico



Análise citotóxica e caracterização química de frações do extrato hidroalcoólico da semente de *Euterpe oleracea* Mart.

Dayanne da Silva Freitas

São Luís
2016

DAYANNE DA SILVA FREITAS

**ANÁLISE CITOTÓXICA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE
FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA SEMENTE
DE *Euterpe oleracea* MART.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

Área de concentração: Métodos de Avaliação e de Intervenção Oncológica.
Coordenadora: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

Co-orientadora: Profa. Dra. Flávia Castello Branco Vidal

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

São Luís
2016

Freitas, Dayanne da Silva

Avaliação citotóxica e caracterização química de frações do extrato hidroalcoólico da semente de *Euterpe Oleracea* Mart/ Dayanne da Silva Freitas. – São Luís, 2016.

66 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto e da Criança, 2016.

1. Câncer de mama 2. *Euterpe Oleracea* MART 3. Polifenóis 4. Atividade antineoplásica 5. Quimiopreventivo 6. Necroptose

CDU 618.19-006.6

DAYANNE DA SILVA FREITAS

**ANÁLISE CITOTÓXICA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE
FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE SEMENTE
DE *Euterpe oleracea* MART.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública considerou o candidato aprovado em: ___ / ___ / ___.

Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento (Orientadora)
Doutora em Medicina
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva (Examinadora)
Doutora em Biologia Parasitária
Universidade Estadual do Maranhão

Profa. Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra (Examinadora)
Doutora em Biotecnologia
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes (Examinadora)
Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Nair Portela Silva Coutinho (Suplente)
Doutora em Ciências da Saúde
Universidade Federal do Maranhão

São Luís
2016

À Deus, por está sempre presente em meus planos. E toda a minha família por ter contribuído com apoio e incentivo em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por tudo que sou e pelo que eu tenho!

Aos meus pais, Ana Goretti e Wiraquitan, pelo amor incondicional, apoio e pela tranquilidade!

Aos meus tios e tias, em especial Ana Mary, Cristina e Roberto pelo auxílio nesta etapa tão importante da minha vida!

À minha orientadora, Maria do Desterro pela confiança e ensinamentos.

Agradeço à Família Bioest pela recepção e acolhimento. Sinto-me parte dessa Família! Muito obrigada Lili, Dri, Pri (minha fluor), Wal, Wallace, Júlio, Andrêa, Léo, Annie, Érika, Amélia, Pedro, Jennifer, Jéssica, Letícia, Hallan, Obina, Nat, Murilo, Fernanda e Priscila. Em especial a Dri e Pri pelos ensinamentos, que contribuíram para meu aperfeiçoamento técnico e desenvolvimento dos experimentos da pesquisa.

Especialmente, Flávia Vidal e Raquel Trindade, por todos os ensinamentos que vão muito além dos científicos e técnicos! Pela paciência, dedicação, apoio de todo tipo e principalmente pela amizade que vou carregar pra sempre!

À Karina Lani, por estar sempre disponível, pelo carinho e apoio técnico e científico!

Ao Dr Jose Morgado pela oportunidade de aperfeiçoamento e desenvolvimento da pesquisa no laboratório Biologia Estrutural, o qual é coordenador.

Ao Dr Wanderson Romão pela colaboração na identificação dos compostos do extrato!

Às minhas amigas Alice, Ellen, Luana, Geisa, Kath, Guta pela amizade e pelos bons momentos compartilhados. Alicinha obrigada pela atenção e sugestões!

Ao meu amigo Isrrael Higino, que não sei como mas ele sempre aparece quando preciso!

Aos alunos de iniciação científica Fabiola, Thiago, Marcos, Rebeca, Gelson, Josiel, Helaine, Camila, Bianca, Lailson, Elaine e Junior pelo auxílio prestado durante a pesquisa.

Ao Seu Domingos pelo auxílio na formatação da dissertação.

E finalmente, agradeço a todos aqueles que cruzaram meu caminho nesta etapa de vida e que contribuíram direta ou indiretamente com a execução deste trabalho.

RESUMO

FREITAS, Dayanne da Silva. Análise citotóxica e caracterização química de frações do extrato hidroalcoólico da semente de *Euterpe oleracea* Mart. 2016, 66 folhas.
Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Maranhão.

A semente de *Euterpe oleracea* Mart. (açai) tem demonstrado diferentes atividades biológicas, tais como: antioxidante, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, antinociceptiva e antineoplásica. Neste estudo, o objetivo foi analisar a atividade antineoplásica de frações do extrato hidroalcoólico da semente de *Euterpe oleracea* Mart. na linhagem celular MCF-7, assim como identificar os compostos responsáveis pela ação antineoplásica por espectrometria de massas utilizando fonte de ionização por *electrospray* e um analisador ciclôtrônico acoplado a uma transformada de Fourier (ESI- FT-ICR MS). A linhagem MCF-7 foi tratada com 10, 20, 40 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ com as frações hexânica (FH), clorofórmica (FC) e de acetato de etila (FAE) do extrato hidroalcoólico da semente do açai por 24, 48 e 72 horas. Após o tratamento a viabilidade celular foi mensurada usando o ensaio com 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) e o tipo de morte celular foi avaliado com o ensaio Anexina - Iodeto de propídeo (PI). Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) ou por teste T student, quando apropriado. Foi observado que todas as frações causaram redução significativa da viabilidade celular da MCF-7, porém a FAE foi a mais citotóxica ($p < 0,001$). No ensaio de anexina-pi, não foi observado marcação significativa para anexina porém o aumento da marcação de PI foi significativo ($p < 0,001$). O presente estudo demonstrou que a FAE foi a mais eficaz na redução da viabilidade celular, seguindo mecanismo de necroptose na célula MCF-7. A FAE é composta por epicatequina, proantocianidina A₂ e procianidinas trimérica e tetramérica.

Palavras-Chave: Câncer de mama. *Euterpe oleracea* Mart. Polifenóis. Atividade antineoplásica. Quimiopreventivo. Necroptose.

ABSTRACT

FREITAS, Dayanne da Silva. Cytotoxic analysis and chemical characterization of fractions derived hydroalcoholic *Euterpe oleracea* Mart seed. 2016, 66 leaves. Thesis (Masters) Federal University of Maranhão

The *Euterpe oleracea* Mart seed. (Acai) has demonstrated different biological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory, antihypertensive, antinociceptive and antineoplastic. In this new study, the aim was to analyze the antineoplastic activity of fractions derived from hydroalcoholic extract of *Euterpe oleracea* Mart. seed in cell line MCF-7, and to identify the compounds responsible for the antineoplastic action by mass spectrometry using electrospray ionization source, and a ciclotrônico analyzer coupled to a Fourier transform (ESI-FT-ICR MS). The MCF-7 cell line was treated with 10, 20, 40 and 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ with fractions hexane (FH), chloroform (FC) and ethyl acetate (FAE) of the hydroalcoholic extract acai seed for 24, 48 and 72 hours. After treatment the cell viability was measured using the assay with 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and the cell type of death was assessed using annexin - Iodide propidium (PI) assay. Data were analyzed statistically by analysis of variance (ANOVA) or Student's t test, us appropriate. It was observed that all the fractions caused significant reduction of cell viability of MCF-7, but the FAE was the most cytotoxic ($p < 0.001$). In the test Annexin-PI, there was no significant labeling annexin but increased PI staining was significant ($p < 0.001$). This study showed that the FAE was more effective in reducing cell viability, following necroptose mechanism in MCF-7 cell. The FAE is composed of epicatechin, proanthocyanidin A₂ and trimeric and tetrameric procyanidins.

Keywords: Breast neoplasms. *Euterpe oleracea* Mart. Polyphenols. Antineoplastic activity. Chemopreventive. Necroptosis.

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

3MA -	3-metiladenina
CK -	Do inglês, <i>cytokeratin</i>
DAPI -	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBE -	Do inglês, double bond equivalent
DMEM -	Do inglês, Dulbeco's Modified Eagle's Medium
DMSO -	Dimetil sulfóxido
EGFR -	Do inglês, <i>epidermal growth factor receptor</i>
ESI -	Do inglês, electrospray ionization
ESI - FT-ICR MS -	Do inglês, <i>mass spectrometry using electrospray ionization, and a ciclôtrônico analyzer coupled to a Fourier transform</i>
FAE -	Fração acetato de etila
FC -	Fração Clorofômica
FH -	Fração Hexânica
FT-ICR -	Ressonância Ciclôtrônica de Íons por Transformada de Fourier
HER -	Do inglês, <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
IC -	Do inglês, inhibitory concentration
LC3B -	Do inglês, <i>Light Chain 3</i>
MTT -	3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
PBS -	Do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
PI -	Iodeto de Propídeo
PI3K -	Do inglês, <i>Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphate3-Kinase</i>
RE -	Receptor de estrogênio
RP -	Receptpr de progesterona
SFB -	Soro fetal bovino
MS -	Do inglês, <i>Mass Spectrometry</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxas brutas de incidência de câncer	13
Figura 2. Semente do açaí.....	22
Figura 3. Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas.	26
Figura 4. Fruto da <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	29
Figura 5. Preparação do extrato.....	30
Figura 6. Algoritmo de Preparação do extrato.....	31
Figura 7. Ensaio MTT	38
Figura 8. Ensaio de MTT para análise da viabilidade da linhagem	39
Figura 9. Ensaio com Cristal Violeta.....	40
Figura 10. Análise comparativa da viabilidade celular	41
Figura 11. Ensaio de Imunofluorescência.....	42
Figura 12. Análise da morfologia por microscopia confocal	43
Figura 13. Ensaio FITC Anexina V- Apoptosis por citometria	45
Figura 14. Ensaio FITC Anexina V- Apoptosis por citometria	46
Figura 15. Espectro da fração acetato de etila	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades Farmacológicas da semente do açai.....	23
---	----

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Câncer de mama	13
1.1.1. Epidemiologia e Fatores de Risco	13
1.1.2. Classificação molecular	15
1.1.3. Medidas de controle do câncer de mama.....	17
1.2. Produtos naturais	19
1.2.1. Açai	20
1.2.2. Atividades biológicas da semente do Açai	22
1.2.3. Espectrometria de massas.....	25
3. JUSTIFICATIVA	27
4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo Geral	28
4.2. Objetivos Específicos	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1. Obtenção do Fruto	29
5.2. Preparação do extrato	29
5.3. Linhagem Celular, tratamento e manipulação Farmacológica de vias de sinalização	31
5.4. Ensaio de citotoxicidade (MTT)	32
5.5. Ensaio de Proliferação Celular com Cristal Violeta	33
5.6. Análise da expressão de LC3B por Imunofluorescência	34

5.7. Ensaio de apoptose pelo método Anexina / PI por Citometria de fluxo	34
5.8. Elucidação dos compostos químicos por espectrometria de massas	35
5.9. Análise estatística	36
6. RESULTADOS	36
6.1. Efeito na viabilidade celular das frações do extrato hidroalcoólico da semente do açaí	36
6.2. Efeito na proliferação celular da fração acetato de etila da semente do açaí	40
6.3. Fração acetato de etila do extrato da semente do açaí causa autofagia e alterações morfológicas na linhagem celular MCF-7 ..	41
6.4. A fração acetato de etila do extrato da semente do açaí não causa apoptose na linhagem celular MCF-7	44
6.5. Caracterização do perfil químico da fração acetato de etila do extrato da semente do açaí	47
7. DISCUSSÃO	48
8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	52
9. REFERÊNCIAS	53
10. ANEXOS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de mama

1.1.1. Epidemiologia e Fatores de Risco

O câncer de mama segundo as estimativas de incidência e mortalidade no mundo é a neoplasia mais frequente entre as mulheres, com 1,79 milhões de casos novos diagnosticados em 2015. E também, a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres em regiões menos desenvolvidas e a segunda causa nas regiões mais desenvolvidas (WHO, 2010).

No Brasil, as estimativas apontam que ocorrerão 57.960 casos novos de câncer de mama. Este representa a causa mais relevante de morte por câncer, constituindo-se como um dos maiores problemas de saúde pública associado ao câncer em mulheres no Brasil (BRASIL, 2015) (Figura 1). Para Lu *et al.* (2009), cerca de 4,4 milhões de mulheres estão vivendo com câncer de mama diagnosticados nos últimos cinco anos, fazendo deste o mais prevalente entre as mulheres. No entanto, é um tipo de câncer que possui uma significativa possibilidade de sobrevida quando detectado precocemente (LU *et al.*, 2009; WHO, 2010; BRASIL, 2013).

	Localização primária	casos novos	%
Mulheres 	Mama Feminina	57.960	28,1%
	Cólon e Reto	17.620	8,6%
	Colo do Útero	16.340	7,9%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
	Estômago	7.600	3,7%
	Corpo do Útero	6.950	3,4%
	Ovário	6.150	3,0%
	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 1. Taxas brutas de incidência de câncer, segundo localização primária estimadas para 2016 no Brasil por sexo, exceto pele não melanoma. O câncer de

mama configura-se como o primeiro tipo de câncer mais incidente nas mulheres. Adaptado de (BRASIL, 2015).

O desenvolvimento do câncer de mama, assim como de vários outros tipos de câncer, é resultado da interação entre fatores genéticos e ambientais. O câncer de mama está associado a diversos fatores de risco, muitos deles relacionados aos hábitos de vida do indivíduo, mas principalmente a idade, aspectos endócrinos, alterações genéticas e epigenéticas. Este último corresponde a alterações na expressão do gene independente de modificações da sequência do DNA, que podem levar ao silenciamento do gene supressor de tumor e/ou ativação de oncogene (ADAMI, 2008; BASSE e AROCK, 2015).

De acordo com o Ministério da Saúde, a idade representa o principal fator de risco, uma vez que, mais de 70 % dos casos de câncer são diagnosticados em mulheres após os 50 anos de idade. Considerados como fatores de risco bem estabelecidos, a relação entre câncer de mama e a vida reprodutiva da mulher, destacam-se a nuliparidade, menarca precoce, idade da primeira gestação a termo acima de 30 anos, uso de anticoncepcionais orais em curso ou até dez anos antes da suspensão, menopausa tardia instalada após os 50 anos de idade, utilização de terapia hormonal prolongada por mais de cinco anos, excesso de peso após a menopausa e ingestão regular de bebida alcoólica (BRASIL, 2011b).

Outros fatores de risco incluem a exposição a radiações ionizantes em idade inferior a 40 anos, história familiar de câncer de mama em parente de primeiro grau antes dos 50 anos ou de câncer bilateral ou de ovário em qualquer idade; história familiar de câncer de mama masculino; e diagnóstico histopatológico de lesão mamária proliferativa com atipia ou neoplasia lobular in situ (BRASIL, 2004).

Amorim *et al.* (2008) apontam a educação deficiente das mulheres em relação aos fatores de risco, tais como: menarca antes dos 12 anos, menopausa tardia, hereditariedade, ambiente, tabagismo, nuliparidade, diagnóstico tardio, seja por falta de acesso ou por negação da doença. Assim como, a vida estressante dos centros urbanos associados a falta de atividade física e má alimentação. Em relação aos fatores de proteção podemos destacar a prática de atividade física e o aleitamento materno exclusivo (BRASIL, 2007; AMORIM *et al.*, 2008).

1.1.2. Classificação molecular

As neoplasias mamárias são classificadas de acordo com a clínica, patologia e histopatologia do tumor. De acordo com a WHO (2012) deve-se analisar também o comportamento molecular e genômico, incluindo o perfil de expressão gênica, assim como a avaliação imunoistoquímica de receptores hormonais e o fator de crescimento epidérmico humano receptor do tipo 2 (Her2) para a predição da evolução clínica e resposta terapêutica (WHO, 2010; YANG e ZHU, 2013).

Portanto, o comportamento clínico de câncer não é dependente apenas da morfologia e taxonomia molecular, mas também em base em perfis de 'assinatura' que podem facilitar a predição precisa da resposta à terapia e prognóstico (CHUNG *et al.*, 2002).

As classificações moleculares atuais do câncer de mama são geralmente baseados na expressão do perfil gênico como: marcadores relacionados com células luminais, receptores hormonais e de fatores de crescimento, tais como o receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER); marcadores anti-apoptose, tais como Bcl-2 e p53; indicadores de proliferação celular, tais como Ki-67; fatores relacionados com a invasão e migração celular; elementos do controle do ciclo celular; fatores reguladores da transição epitélio mesênquima; fatores de controle da metástase; e fatores da angiogênese (PAIK *et al.*, 2004; PEINADO *et al.*, 2007).

Os subtipos de acordo com a classificação molecular do câncer de mama são: luminal A e B, HER2 positivo, câncer de mama triplo negativo basalóide e não basalóide, "mama-normal símile" e claudina-low. (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007).

Os subtipos luminais têm esta denominação advinda da similaridade que as células neoplásicas possuem com as células luminais. O tipo luminal tende a ser morfológicamente bem diferenciado e exibe melhor prognóstico quando comparado aos tumores receptores hormonais negativos (SORLIE *et al.*, 2001).

O tipo luminal foi subdividido em subtipos A e B. O subtipo molecular luminal A, que representa cerca de 60% dos casos dos carcinomas de mama. Na sua maioria, são neoplasias que apresentam receptor de estrogênio positivo e baixo grau

histológico. Classificam-se como luminais A os tumores positivos para receptor de estrogênio (RE) e / ou receptor de progesterona (RP), negativos para amplificação e / ou superexpressão de HER2 e devem apresentar um índice de Ki-67 inferior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas (ZHANG *et al.*, 2013).

Os tumores do subtipo luminal B são caracterizados pela positividade de pelo menos um dos receptores hormonais, ser HER2 positivo, e quando o HER2 é negativo, por ter um índice de Ki-67 igual ou superior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas. A utilização do índice de Ki-67 tem alterado significativamente os valores de prevalência até então encontrados para os subtipos luminais, uma vez que tumores com alto índice proliferativo, até então classificados como luminais A, segundo os novos parâmetros, são classificados como luminais B (KENNECKE *et al.*, 2010; IRIGOYEN *et al.*, 2011).

O subtipo superexpressão de HER2 possui elevada expressão da oncoproteína HER2, porém apresenta ausência dos receptores hormonais. Pacientes com diagnóstico primário de carcinoma de mama e com superexpressão de HER2 possuem um pior prognóstico em relação aos pacientes que não apresentam essa amplificação gênica (CIANFROCCA e GOLDSTEIN, 2004; CHEANG *et al.*, 2009).

O subtipo basaloide triplo negativo, é caracterizado pela negatividade dos receptores hormonais e da superexpressão de HER2, porém apresenta-se positivo para citoceratina 5 (CK5) e / ou fator de crescimento EGFR. Os tumores basaloide têm baixa expressão do gene BRCA1, causada por metilação de seu gene promotor, inativação da transcrição de BRCA1, ou por ambos (RIBEIRO-SILVA *et al.*, 2005; IRIGOYEN *et al.*, 2011).

Os tumores triplo-negativos não basaloide são caracterizados pela ausência de imunomarcagem de RE, RP, HER2, CK5 e EGFR (KENNECKE *et al.*, 2010).

O subtipo “mama-normal símile” ou “normal-like” demonstra elevação na expressão de genes comuns às células epiteliais normais da mama, adiposas e do estroma. Este apresenta-se negativo para os marcadores tumorais usuais e possivelmente representam apenas uma contaminação com o tecido mamário normal durante a realização das análises de perfil de expressão gênica (WEIGELT *et al.*, 2010).

O subtipo claudin-low é caracterizado por uma baixa expressão de genes envolvidos com junções ocludentes ou junções “tight” e glicoproteínas de adesão célula-célula, incluindo as claudinas, ocludinas e E-caderina. Este subtipo

apresenta aumento na expressão de marcadores de transição epitélio-mesênquima, de marcadores endoteliais, linfocíticos e de marcadores relacionados às células tronco tumorais com alta frequência de diferenciação metaplásica e medular. Não possui ainda marcadores imunoistoquímicos protocolados para a sua caracterização e nem terapêutica específica (DOLLED-FILHART *et al.*, 2006).

1.1.3. Medidas de controle do câncer de mama

Para o controle do câncer de mama, necessita-se atuar em nível de: promoção da saúde, prevenção (diminuir a exposição a fatores de risco relacionados ao câncer de mama), detecção precoce, tratamento do câncer, reabilitação e cuidados paliativos (BRASIL, 2011b). Entretanto as medidas de maior impacto no controle de câncer de mama estão centradas no diagnóstico precoce, que é a consciência dos sinais e sintomas precoce em populações sintomáticas, a fim de facilitar o diagnóstico e tratamento precoce, e o rastreamento, que é a aplicação sistemática de teste em população, presumivelmente assintomática, que se destina a identificar indivíduos com uma anormalidade sugestiva de câncer (WHO, 2007; SOCIETY, 2015a).

A detecção precoce do câncer de mama de acordo com o consenso, o rastreamento deve ser realizado por meio do exame clínico das mamas, direcionado para todas as mulheres entre 40 e 49 anos de idade, realizado anualmente e também é indicada a mamografia na presença de alteração clínica; a mamografia deve ser realizada em mulheres com idade entre 50 e 69 anos, com o máximo de dois anos entre os exames; sendo que, para as mulheres pertencentes a grupos populacionais com risco elevado de desenvolver câncer de mama, a partir de 35 anos, o exame clínico e mamografia devem ter periodicidade anual; em casos de lesões palpáveis em

mulheres com menos de 35 anos, o diagnóstico de escolha é a ultrassonografia (BRASIL, 2004; 2011b).

As modalidades terapêuticas disponíveis para o tratamento do câncer de mama são a cirúrgica e a radioterápica para o tratamento loco-regional e a hormonioterapia, quimioterapia, terapia alvo e terapia dirigida – Bone para o tratamento sistêmico, sendo estabelecidas de acordo características do tumor e o estágio incluindo a saúde geral e preferências pessoais (BANGE *et al.*, 2001; BRASIL, 2004; HISHAM e YIP, 2004; SOCIETY, 2015b)

A abordagem cirúrgica pode ser do tipo conservadora e não conservadora. As cirurgias conservadoras são a tumorectomia e a ressecção segmentar ou setorectomia. E as não- conservadoras são a adenomastectomia subcutânea ou mastectomia subcutânea (retirada da glândula mamária, preservando-se pele e complexo aréolo-papilar); Mastectomia simples ou total (retirada mama com pele e complexo aréolo-papilar); Mastectomia com preservação de um ou dois músculos peitorais com linfadenectomia axilar (radical modificada); Mastectomia com retirada do(s) músculo(s) peitoral(is) com linfadenectomia axilar (radical) (BODIAN *et al.*, 1996).

A maioria das mulheres com neoplasias da mama terá algum tipo de cirurgia para remover o tumor, porém dependendo do tipo de câncer de mama e o estágio em que se encontra pode-se precisar de outros tipos de tratamento, bem como, antes ou após a cirurgia, ou às vezes ambos. Os planos de tratamento típicos baseiam-se no tipo e fase do câncer de mama, e quaisquer situações especiais, como o câncer de mama durante a gravidez, não invasivo cancro da mama e cancro da mama invasivo (SOCIETY, 2015b).

O câncer de mama receptor hormonal positivo, modelo celular utilizado neste trabalho, representa 60 a 70% dos cânceres de mama (CAREY *et al.*, 2006), cujo tratamento é baseado no bloqueio da via de estrogênio através de moduladores do receptor de estrogênio como tamoxifeno, inibidores da aromatase e raloxifene (SWABY *et al.*, 2007). No entanto, a resistência à terapia hormonal foi relatada em 30% de neoplasias da mama RE positivo, enquanto que a capacidade de resposta hormonal foi observada em 15% de neoplasias de mama RE negativo (JORDAN *et al.*, 1988) indicando a necessidade de novas

estratégias terapêuticas em virtude da heterogeneidade do câncer de mama e suas alterações de sensibilidade ao tratamento.

O manejo de pacientes com câncer de mama hormônio-dependente enfrenta além das limitações práticas como retardamento do diagnóstico e da terapêutica adequada, a resistência ao tratamento. Ressaltando assim, a necessidade da investigação de novos compostos químicos terapêuticos para o tratamento das neoplasias malignas de mama (GOLDHIRSCH *et al.*, 2013).

1.2. Produtos naturais

Os produtos naturais são um recurso alternativo, devido à diversidade em termos de estrutura e mecanismo de ação biológica, os compostos derivados de plantas são utilizados na terapia do câncer (KINGHORN *et al.*, 2009). Esta variedade e complexidade de micromoléculas são atribuídas aos seus metabólitos secundários decorrente do desenvolvimento da resistência e formas de proteção às intempéries do clima, poluição e predadores (MONTANARI e BOLZANI, 2001; NEWMAN e CRAGG, 2012).

Newman e Cragg (2012) demonstraram que 74,9 % de novas drogas antineoplásicas comercializadas entre 1981 e 2010 são derivadas de produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2012). Ressalta-se também que das espécies catalogadas apenas 10 % em todo o mundo têm sido rastreadas para quaisquer bioatividade. Os produtos naturais produzem uma grande variedade de compostos biologicamente ativos que exibem um conjunto de propriedades a serem definidas. A descoberta de produtos naturais bioativos de plantas contribui, portanto, para a descoberta de novos fármacos (NEWMAN e CRAGG, 2007).

A transformação de uma planta em medicamento deve ser feita de maneira que se preservem as características químicas e farmacológicas do vegetal, garantindo a sua ação biológica, a segurança de utilização e a valorização de seu potencial terapêutico (SANTOS e MELLO, 2007).

As plantas são fontes de compostos quimiopreventivos, os quais são amplamente investigados devido à sua baixa toxicidade. Os compostos dietéticos

naturais podem modular potencialmente os alvos moleculares, envolvidos na prevenção, em especial da iniciação, promoção e progressão do câncer devido sua capacidade em reduzir e reparar os danos celulares que promovem o stress e inflamação (KEUM *et al.*, 2005).

O Brasil possui um bioma vegetal com 55.000 espécies de plantas superiores distribuídos em cinco biomas principais: Mata Atlântica, Cerrado, Amazônia, Pantanal e Pampa (FIASCHI e PIRANI, 2009). Apesar do potencial, o conhecimento sobre o perfil químico e biológico de espécies nativas ainda é limitado. Das quatro espécies mais citadas como medicinais, três delas (cipó-tuíra, açaí e carapanaúba) são usadas principalmente para o tratamento de malária e males associados (VEIGA, 2011).

Dentre estas, o açaí destaca-se no setor da agroindustrial como a principal fonte de extração de palmito e pela utilização de seus frutos por expressivo contingente populacional da Amazônia brasileira, particularmente nos Estados do Pará, Amapá e Maranhão (VILLACHICA *et al.*, 1996).

O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador de açaí. Em 2010 foi registrado uma coleta no total de 215.381 toneladas, tendo o Pará uma produção de 106.562 (85,6%), seguindo-se o Maranhão com 10.930 (8,8%). Na região Nordeste, o Maranhão ocupa o 1º lugar na colheita do açaí (BRASIL, 2011a).

O Maranhão apresenta um grande potencial extrativista vegetal e o açaí ocupa o terceiro lugar em quantidade de coleta extrativista no Estado, perdendo apenas para o carvão vegetal e a amêndoa de babaçu (BRASIL, 2010).

1.2.1. Açaí

A palmeira *Euterpe oleracea* Mart., conhecida com açazeiro é espécie nativa da Amazônia, encontrada nos Estados do Amapá, Pará, Maranhão, Tocantins e Mato Grosso (CALZAVARA, 1972; BALICK, 1986; CAVALCANTE, 1991). Externamente às fronteiras do Brasil, é encontrado na Guiana, Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia e no Suriname (CALZAVARA, 1972; CAVALCANTE, 1991). Esta pode ser considerada a palmeira de maior importância econômica, social e

cultural da região Norte do Brasil, onde o Estado do Pará se destaca como o maior produtor e consumidor (COSTA *et al.*, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2008).

A *Euterpe oleracea* pertence à família Arecaceae que, engloba aproximadamente 200 gêneros e cerca de 2.600 espécies, com distribuição tropical e subtropical (JONES, 1995). Na Amazônia, a família está representada por 39 gêneros e um número de espécies estimado entre 150 a 180, dentre elas, *Euterpe oleracea*, *Euterpe edulis* e *Euterpe precatória* são as de maior importância na produção de palmito e frutos (KAHN, 1997).

O açaí contém numerosos tipos de compostos, particularmente, antocianinas, proantocianidinas e outros flavonoides (SCHAUSS *et al.*, 2006; PACHECO-PALENCIA *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2015). Estudos recentes identificaram atividade antioxidante, antiinflamatória e antineoplásica do extrato do açaí, assim como também demonstraram que suas frações polifenólicas provocam a redução da proliferação de células leucêmicas HL-60 e de tumores esofágicos (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2006; STONER, 2009; MOURA *et al.*, 2012; LASLO *et al.*, 2013). Experimentos *in vivo* revelaram que os polissacarídeos do açaí induziram o recrutamento de células mielóides e a produção de IL-12 (HOLDERNESS *et al.*, 2011).

Ainda em relação ao extrato do açaí, estudos afirmam o efeito anti-hipertensivo e de prevenção da disfunção endotelial e alterações estruturais vasculares na hipertensão através de mecanismos envolvendo atividades antioxidantes, ativação e inibição da síntese de óxido nítrico (SON) e ativação de metaloproteinase de matriz tipo 2 (MMP-2) (DA COSTA *et al.*, 2012). O consumo de suco contendo predominantemente o açaí reduz significativamente a dor e diminuiu a peroxidação lipídica em 12 semanas (JENSEN *et al.*, 2011).

O fruto do açazeiro, é globoso, tem 1 a 2 cm de diâmetro, peso médio de 1,2g, epicarpo roxo ou verde na maturação; o mesocarpo, com cerca de 1mm de espessura, é fibroso envolvendo o endocarpo, volumoso e duro, com forma similar à do fruto, contendo uma semente, com embrião diminuto e endosperma ruminado e abundante (HANDERSON e GALEANO, 1996).

A semente do açaí preenche a maior parte do fruto, representando 73 % da sua massa. A semente é a estrutura de propagação sexuada e inclui o endocarpo e o mesocarpo, apresenta forma globosa, coloração marrom escuro e diâmetro médio de 11,5 mm. Apresenta uma depressão, a rafe, onde em uma de suas extremidades localiza-se o poro germinativo e, na outra, o hilo. Feixes de fibras partem da região

do hilo, formando um tufo de tecido fibroso sobre o poro germinativo, que é facilmente observado quando a polpa é retirada (AGUIAR e DE MENDONÇA, 2003; MARTINS *et al.*, 2009) (Figura 2).

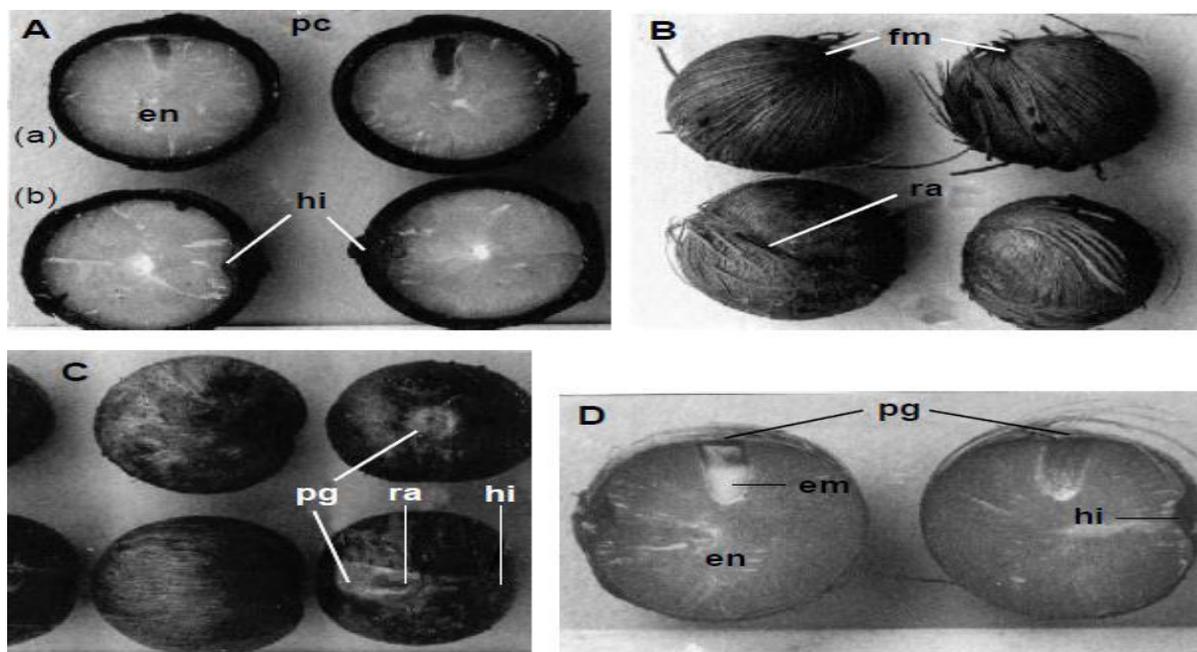


Figura 2. Semente do açai. (A) Semente em secção longitudinal (a) e secção transversal (b). (B) Semente com fibras. (C) Semente sem fibras. (D) Posição do embrião na semente. Legenda: Em- embrião; En- endosperma; Fm- fibras mesocárpicas; hi- hilo; Pc- pericarpo; pg- poro germinativo; ra- rafe. Adaptado de (AGUIAR e DE MENDONÇA, 2003).

1.2.2. Atividades biológicas da semente do Açai

As sementes do açai são utilizadas como matéria-prima para a confecção de biojóias tais como colares, pulseiras e brincos (SANTOS, 2011). Assim como, é amplamente utilizada na prática popular no tratamento de diversas patologias, o que influenciou na diversidade de ensaios farmacológicos visando validação do uso popular. A maioria dos estudos avalia as atividades antiinflamatórias e antioxidantes (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades Farmacológicas da semente do açaí

Ação Farmacológica	Referências
Antinociceptivo	(SUDO <i>et al.</i> , 2015)
Antioxidante	(CHOI, 1998; RODRIGUES <i>et al.</i> , 2006; ROCHA, 2008; PACHECO-PALENCIA <i>et al.</i> , 2009; OKADA <i>et al.</i> , 2011; DA COSTA <i>et al.</i> , 2012; MOURA <i>et al.</i> , 2012; DE BEM <i>et al.</i> , 2014; ZAPATA-SUDO <i>et al.</i> , 2014)
Antiinflamatório	(MOURA <i>et al.</i> , 2012; ZAPATA-SUDO <i>et al.</i> , 2014; SUDO <i>et al.</i> , 2015)
Antimicrobiano	(MELHORANÇA FILHO e PEREIRA, 2012)
Vasodilatador	(ROCHA <i>et al.</i> , 2007; DE BEM <i>et al.</i> , 2014; ZAPATA-SUDO <i>et al.</i> , 2014)
Antineoplásico	(SILVA <i>et al.</i> , 2014; BARROS, 2015)
Antihipertensivo	(CORDEIRO <i>et al.</i> , 2008; ROCHA, 2008; DA COSTA <i>et al.</i> , 2012; DE BEM <i>et al.</i> , 2014)
Prevenção da Síndrome metabólica	(DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2010)
Efeito protetivo da função renal	(DE BEM <i>et al.</i> , 2014)
Produção de Oxido nitrico (ON)	(ROCHA <i>et al.</i> , 2007; CORDEIRO <i>et al.</i> , 2008; DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2010)

Choi *et al.* (1998) demonstrou que o extrato da semente do açaí apresentou uma alta capacidade antioxidante em relação a inibição da oxidação lipídica (CHOI, 1998). Além disso, foi relatado que o extrato hidroalcoólico da semente do açaí tem um potente vasodilatador endotélio-dependente e induz o efeito de óxido nítrico (NO) a partir de células endoteliais em cultura (ROCHA *et al.*, 2007). Também se observou que o tratamento crônico com o extrato da semente do açaí previne o desenvolvimento de hipertensão, disfunção endotelial, alterações estruturais vasculares e dano oxidativo em hipertensão renovascular experimental (ROCHA, 2008; DA COSTA *et al.*, 2012).

Dentre outras atividades farmacológicas citadas na tabela 1, destacamos o potencial antineoplásico da semente do açaí. Este demonstrou efeito inibidor sobre as linhagens celulares neoplásicas humanas (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2), sendo mais eficaz para na linhagem de carcinoma do colo do útero (HeLa). Importante ressaltar que o extrato não demonstrou toxicidade para células normais

(BARROS, 2015). Silva *et al.* (2014) relataram que o extrato da semente do açaí foi significativamente mais eficaz na linha celular MCF-7 (SILVA *et al.*, 2014).

Desta forma, a semente do açaí apresenta um atraente perfil farmacológico, antineoplásico e antioxidante com propriedades sem efeitos secundários, o que sugere a sua utilização em terapia de prevenção e / ou tratamento de neoplasias. A capacidade antioxidante e citotóxica do extrato da semente parece ser fortemente dependente do seu perfil fenólico (RODRIGUES *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2014; BARROS, 2015).

Na composição fenólica da semente do açaí está presente os ácidos fenólicos, flavonas, flavonóis, antocianidinas, ácido protocatecuico, catequinas, epicatequina e procianidinas oligoméricas (diméricas a pentaméricas) (RODRIGUES *et al.*, 2006; BARROS, 2015).

Os polifenóis apresentam uma estrutura química derivada do benzeno, ligada a um grupo hidrofílico. Com base em sua estrutura e na maneira pela qual os anéis polifenólicos ligam-se uns aos outros, eles são classificados em quatro famílias: flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos. Entre as principais classes de flavonoides incluem-se os flavonóis, as flavonas, as flavanonas, os flavanóis (ou catequinas), as antocianidinas e as isoflavonas (MANACH *et al.*, 2004).

Os polifenóis são metabólitos secundários das plantas, frutas e vegetais que as protegem contra os danos causados pela radiação eletromagnética e também podem exibir propriedades defensivas, tais como antibacteriana e antifúngica (MONTANARI e BOLZANI, 2001; LANDETE, 2012).

Os grupos hidroxila dos compostos fenólicos podem neutralizar os radicais livres e doar átomos de hidrogénio ou elétrons (LEOPOLDINI *et al.*, 2006). Foi demonstrado que a atividade antioxidante dos compostos fenólicos reduz os danos oxidativos ao limitar a quantidade de radicais gerados pela atividade metabólica celular (KAGAN e TYURINA, 1998).

Os compostos fenólicos constituem um grupo heterogêneo incluindo flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, lignanas, cumarina e análogos de feniletanol (GARRIDO e BORGES, 2013). O interesse em compostos fenólicos tem sido renovado devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, antiestrogênicas, antimutagênicas, antiaterosclerótica, antihepatóxica, antiulcerogênica, antimicrobiana, antiviral, vasodilatadora e efeitos antineoplásicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, destacando a

importância da sua identificação e quantificação (HLADOVEC, 1986; LIN *et al.*, 1997; KIRK *et al.*, 1998; GONZALEZ-VALLINAS *et al.*, 2013).

1.2.3. Espectrometria de massas

A síntese de novos fármacos só foi possível através do desenvolvimento de técnicas analíticas, como a espectrometria de massas para elucidação estrutural dos compostos. A espectrometria de massas (do inglês: Mass Spectrometry - MS) é uma técnica analítica utilizada para obter informações da massa molar e de características estruturais de amostras. Apresenta-se como uma ferramenta analítica capaz de fornecer informações como: exatidão em massas e conseqüentemente a composição elementar; estrutura molecular; quantificação; e o perfil isotópico que é único para cada composição química.

Em vista das suas potencialidades, tais como: sensibilidade inigualável, velocidade, limite de detecção e diversidade de aplicação, a MS, vivenciou uma acentuada difusão em várias áreas distintas ganhando uma posição de destaque entre as técnicas analíticas (HOFFMAN e STROOBANT, 2007; FIGUEIREDO, 2010).

A espectrometria de massas é uma técnica analítica em que átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados e separados de acordo com suas relações massa-sobre-carga (m/z). Além de discriminar íons, a MS é capaz de detalhar a quantidade de íons gerados em uma determinada relação m/z (NETO, 2010).

Em um espectro de MS, a maioria dos sinais formados possui carga 1+, por isso, a relação m/z é igual à massa do íon. Todavia, ocorrem situações em que metade da massa do íon é registrada, isso é devido ao fato de que em alguns casos a carga dos fragmentos produzidos é 2+, ou seja, para íons multicarregados os valores de m/z são partes fracionadas de suas massas reais (HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

Para as análises por MS é importante ressaltar que átomos ou moléculas neutras não são analisados e sim, as espécies iônicas. Antes de discriminar os íons é necessário, primeiramente, gerá-los utilizando um sistema de ionização ou uma fonte de íons. As diferentes formas de ionização juntamente com

analisadores de massas são o que determinam a aplicabilidade da MS (ROMÃO, 2010).

Os espectrômetros de massas são constituídos pelos seguintes componentes básicos: um sistema de introdução de amostra; uma fonte de ionização; um analisador de massas; um detector, que realiza a “contagem” dos íons e transforma o sinal em corrente elétrica, que posteriormente, de acordo com a magnitude do mesmo, será processado e convertido em função da razão m/z , proporcionando um espectro de massas correspondente (ROMÃO, 2010).

Um diagrama esquemático do funcionamento de um espectrômetro de massas é mostrado na Figura 3.

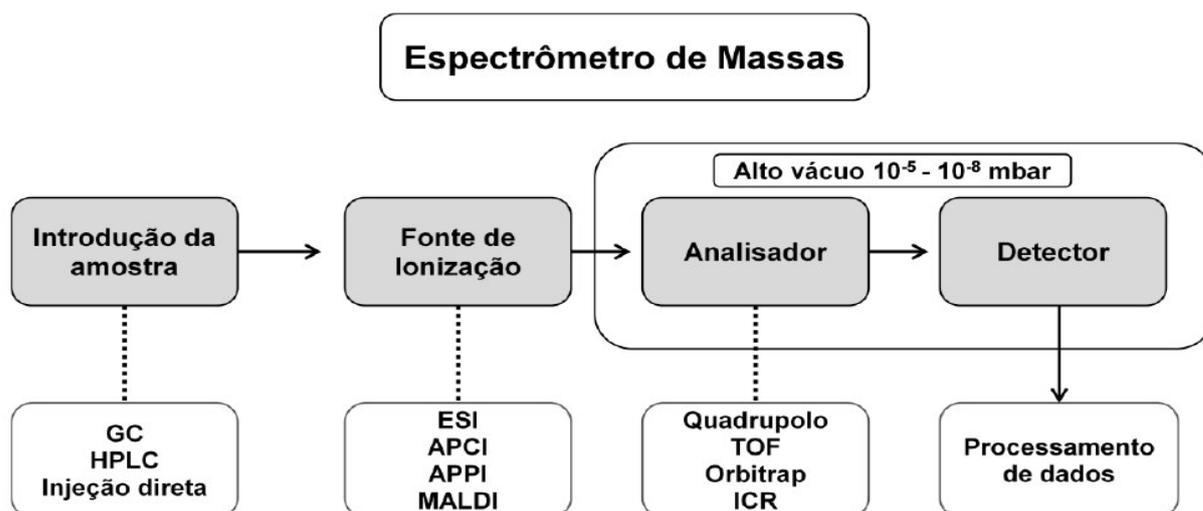


Figura 3. Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas. Adaptado de (DALMASCHIO, 2012).

3. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama tem alta frequência de recorrências locais e regionais mais agressivas e formação de metástases após tratamento tradicional, desta forma há a necessidade de investigar agentes terapêuticos alternativos para prevenção e tratamento do câncer. O açaí é uma importante planta medicinal da Amazônia por seus efeitos benéficos no tratamento de febre, dor, inflamação e anemia (SCUDELLER VV, 2009). Mais recentemente, a semente do açaí tem demonstrado efeito antineoplásico em células de câncer de mama com uma importante atividade antioxidante (SILVA *et al.*, 2014; BARROS, 2015). O efeito citotóxico sugere a possibilidade do uso da semente do açaí como medicamento natural ou alimento funcional no tratamento e / ou prevenção do câncer de mama.

Deste modo, a elucidação dos compostos responsáveis por esta atividade, torna-se de suma importância para a exploração racional e segura do potencial farmacológico do açaí para viabilização de medicamento fitoterápico ou como fonte de um novo fármaco que possam agir em conjunto com a terapêutica tradicional e / ou para a prevenção do câncer de mama a fim de diminuir as altas taxas de falha terapêutica e resistência durante o tratamento deste tipo de câncer.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Identificar os compostos presentes na fração do extrato hidroalcoólico da semente da *Euterpe oleracea* Mart., responsáveis pela ação antineoplásica na célula MCF-7.

4.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar quimicamente a fração do extrato da semente do açaí com maior potencial citotóxico;
- Avaliar o potencial citotóxico e morfologia celular das frações do extrato hidroalcoólico da semente do açaí na linhagem de adenoma carcinoma mamário receptor hormonal positivo MCF-7;
- Identificar o mecanismo de morte celular por apoptose após tratamento com a fração do extrato hidroalcoólico da semente da *Euterpe Oleracea* Mart. que evidencia potencial citotóxico na linhagem MCF-7.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Obtenção do Fruto

Os frutos do açáí (*Euterpe oleracea* Mart.) utilizados neste estudo foram oriundos do Parque da Juçara localizado na região Nordeste na cidade de São Luís, Maranhão, Brasil (latitude: 02° 31' 47" S, longitude: 44° 18' 10" W, altitude: 24m).

A exsicata foi realizada e está armazenada sob número 30 no Herbário Rosa Mochel do Núcleo de Estudos Biológicos da Universidade Estadual do Maranhão e depositado no World International Property Organization sob o registro nº PI0418614-1 (SILVA *et al.*, 2014).

Logo após a coleta, os frutos maduros foram submetidos à seleção manual para descarte daqueles mal formados ou danificados e à lavagem para eliminação dos resíduos (Figura 4).



Figura 4. Fruto da *Euterpe oleracea* Mart. após a coleta (esquerda). Processo de seleção manual para descarte dos frutos danificados (direito).

5.2. Preparação do extrato

O fruto maduro foi submetido ao processo de extração do epicarpo e mesocarpo por despoldamento manual. Posteriormente, o processo de extração seguiu de acordo com a metodologia adaptada por Silva *et al.* (2014). As sementes foram submetidas a secagem natural, sendo posteriormente pesadas e trituradas.

Extraiu-se a adição de etanol a 70% (proporção 1:8) com agitação durante 30 min (durante três dias) e armazenado em garrafas escuras dentro de um refrigerador (4 ° C) durante 13 dias. Após este período de maceração, extratos hidroalcoólicos de açaí foram filtrados com papel de filtro Whatman. O etanol foi evaporado por meio de um evaporador rotativo (Fisatom Equipamentos Científicos Ltda São Paulo, Brasil) sob baixa pressão a 55 ° C (SILVA *et al.*, 2014) (Figura 5, 6).

O extrato (13,6 g) foi dissolvido em 135 mL de metanol/água (70:30, v/v) por meio de agitação, e a solução foi submetida à partição líquido-líquido por ordem crescente de polaridade de solventes (hexano, clorofórmio e acetato de etila). Após evaporação do solvente de todas as fases em rotaevaporador, obtiveram-se as frações hexânica (FH), clorofórmica (FC) e acetato de etila (FAE), e estas foram liofilizadas (modelo LIOTOP 202, Fisatom Equipamentos Científicos Ltda São Paulo, Brasil) a temperaturas a partir de - 30 a - 40°C e sob um vácuo de 200 mmHg, e congelado a -20 °C, até utilização.

Para o uso no tratamento das células, as frações hexânica e clorofórmica foram diluídas em Dimetil sulfóxido (DMSO) (Synth) e a fração de acetato de etila diluída em água Milli-Q. As soluções foram filtradas em filtro de seringa com poro de 0.2 um e armazenadas a -20 °C até o momento do uso.



Figura 5. Preparação do extrato. (A) Armazenamento do extrato protegido da luz. (B) extrato bruto após evaporação do solvente. (C, D e E) Frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila do extrato da semente do açaí após evaporação dos solventes, respectivamente. (F) Frações armazenadas e identificadas.

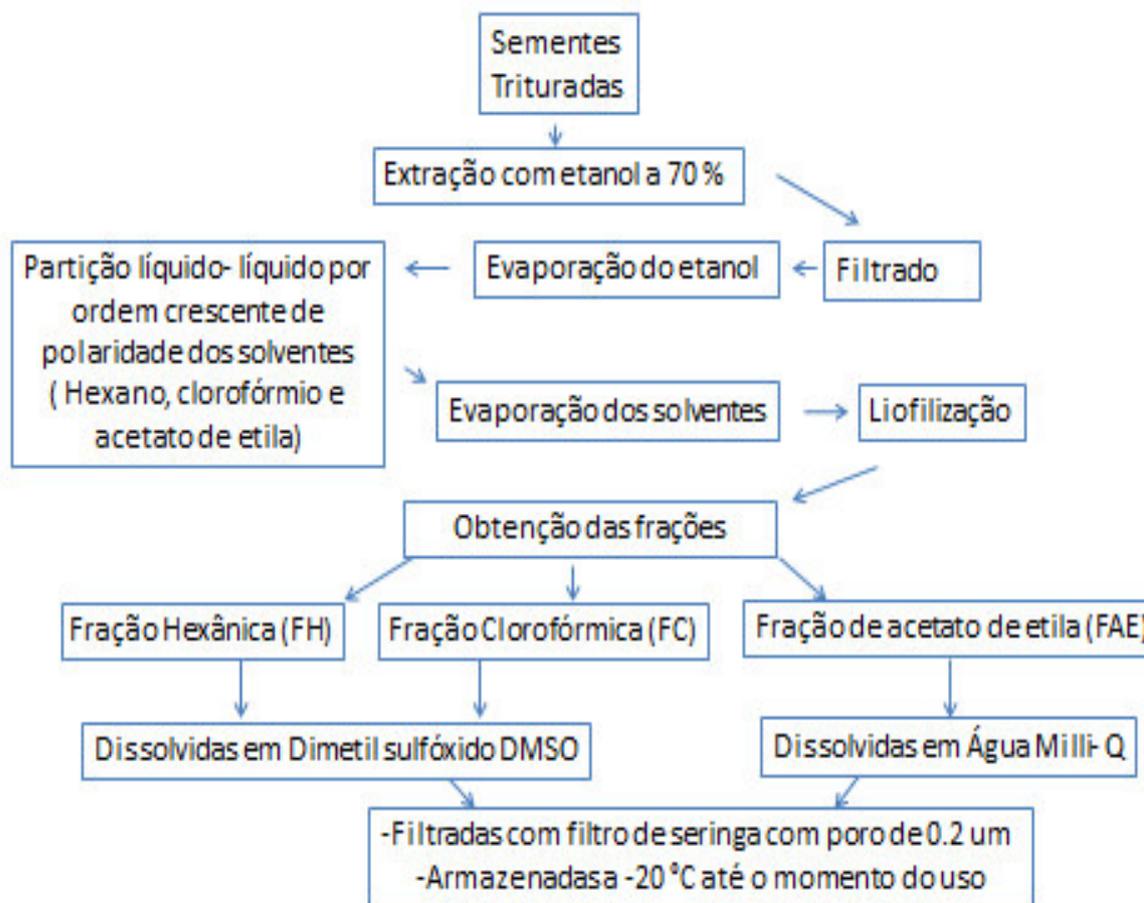


Figura 6. Algoritmo de Preparação do extrato.

5.3. Linhagem Celular, tratamento e manipulação Farmacológica de vias de sinalização

A linhagem celular MCF-7 derivada de adenocarcinoma mamário humano foi obtida na ATCC (American tissue collection - cat # HTB-22). As células foram cultivadas e mantidas em meio DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium, GIBCO -Invitrogen) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), penicilina G (100 mg L⁻¹/L) e estreptomicina (60 mg L⁻¹), a 37 °C em estufa com 5 % CO₂ / 95 % de O₂.

Para o desenvolvimento dos experimentos, as células foram destacadas das garrafas de cultivo através da exposição à tripsina (GIBCO) por 5 minutos, coletadas em tubos de 15 mL, centrifugadas a 1500 rpm por 2 minutos, ressuspensas em meio

DMEM, contadas em Câmara de Neubauer e plaqueadas conforme a necessidade do protocolo experimental realizado. Todos os tratamentos com os extratos foram adicionados 24 horas após o plaqueamento das células.

As células foram tratadas com a FH, FC e FAE nas concentrações de 10, 20, 40 e 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e submetidas ao teste de citotoxicidade com 3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT) (Sigma). Posteriormente, os ensaios foram realizados apenas com a concentração inibitória de 50 % (IC_{50}) da fração mais citotóxica.

Para os ensaios farmacológicos de interferência, as células foram incubadas durante 60 minutos com 2 mM de 3-metiladenina (3MA), um inibidor de autofagia (DE ALBUQUERQUE-XAVIER *et al.*, 2012). As células foram lavadas com tampão fosfato-salina (PBS), tratadas, como descrito acima, e processadas para análise posterior.

5.4. Ensaio de citotoxicidade (MTT)

O teste de citotoxicidade tem como objetivo detectar o potencial de um material ou dispositivo em produzir efeitos letais ou subletais em sistemas biológicos a nível celular. O ensaio citotoxicidade MTT é um ensaio quantitativo e baseia-se na dosagem da atividade metabólica de células viáveis. O MTT é reduzido através de uma reação enzimática que envolve a oxidação do NADH/NADPH catalisada pelo complexo succinato-tetrazolium redutase presente somente em células viáveis. Quando reduzidos os sais tetrazolium formam o sal formazan que é hidrofóbico e colorido (solubilizado pela adição de DMSO), podendo ser quantificado por espectrofotometria. A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase fornecendo então uma medida da atividade mitocondrial (MOSMANN, 1983).

Após a cultura celular, 3×10^3 células por poço foram plaqueadas em placas de 96 poços. Depois de 24 horas, as células foram tratadas com os extratos da FH, FC e FAE, nas concentrações de 10, 20, 40 e 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. O sobrenadante foi removido e em seguida, os poços lavados duas vezes

com PBS, e adicionado 200 μL de DMEM com SFB contendo 5 mg L^{-1} de MTT, numa concentração final de 0,5 mg mL^{-1} de MTT - formazan. As amostras foram incubadas por um período de 2 h em estufa protegidas da luz. Após esta etapa, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C e realizado o descarte do sobrenadante.

Em seguida foi adicionado 100 μL de DMSO por poço para eluição dos cristais de formazan. Posteriormente a placa foi mantida em agitação por 5 minutos para a solubilização dos cristais de formazan e incubadas por 10 minutos em estufa a 37°C. A leitura da absorbância dos cristais de formazan, diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis, foi realizada utilizando um leitor de ELISA Spectra Max190 spectrophometer (Molecular Devic e sw, Sunnyvale, CA, EUA) com comprimento de onda de 538 nm. Os testes foram realizados em triplicata e em seguida normalizados conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \text{Absorbância das células das amostras} / \text{Absorbância de células controle} * 100$$

5.5. Ensaio de Proliferação Celular com Cristal Violeta

Após os procedimentos de cultivo celular, citados no item 3.4, 3 x 10³ células por poço foram plaqueadas em placas de 96 poços. Depois de 24 horas, as células foram tratadas com o extrato da FAE, na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Posteriormente, o sobrenadante foi removido e realizada a lavagem com tampão PBS (Ph 7,0), posteriormente fixadas com etanol 100% e coradas com cristal violeta 0,05% por 10 minutos. Em seguida foi realizada lavagem com água Mili-Q por 3 vezes e adicionado metanol por 5 min. A Absorbância de 595 nm foi mensurada com Spectra Max190 Spectrophometer (Molecular Devic e sw, Sunnyvale, CA, EUA).

5.6. Análise da expressão de LC3B por Imunofluorescência

As células MCF-7 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro, lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% durante 10 minutos. Em seguida, foram rehidratadas com PBS/CM (PBS contendo CaCl_2 100 mM e MgCl_2 100 mM, pH 8,0) e bloqueada com NH_4Cl em PBS (pH 8,0) por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram bloqueadas com 3% de BSA e permeabilizadas com 0.1% Triton X- 100 (60 min). Logo após, foram incubadas overnight com os anticorpos primários anti LC3B (Cell signaling technology) (diluição 1:300), seguidas de 1h de incubação com seu respectivo anticorpo secundário Alexa flúor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (diluição 1:500), depois, quando indicado, as lamínulas foram incubadas com DAPI (1:1000; 1 min), lavadas e montadas utilizando Prolong Gold antifade (Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). As lamínulas foram visualizadas em Microscópio Confocal à Laser, FV10 i-O ou com o Microscópio Confocal de Varredura à Laser Nikon, modelo C2 (Nikon Instruments, Inc, New York) e as imagens foram analisadas através do software FV10-ASW (Olympus, Tokyo, Japan).

5.7. Ensaio de apoptose pelo método Anexina / PI por Citometria de fluxo

Para o ensaio de morte celular foi utilizado o kit BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, San Diego, CA). As células foram ressuspensas em solução de tripsina a 37°C e a tripsina foi inativada com a adição DMEM com SFB. Em seguida as células foram centrifugadas por 2 minutos a 1500 rpm e ressuspensas em PBS. Após contagem, as células foram colocadas em tubos de 1,5 ml em uma concentração 10^5 células mL^{-1} e centrifugadas por 2 minutos a 1500 rpm. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 95 μl de tampão anexina V, e incubado no escuro por 15 minutos. Posteriormente foram adicionados 400 μl de tampão anexina V e 2,5 μl de iodeto de propídeo (PI) foi adicionado no momento da leitura no citômetro. No controle não corado foi acrescido apenas o tampão. A aquisição dos dados foi realizada pelo citômetro de fluxo FACS

Calibur (BD Biosciences) e os resultados analisados utilizando software FACSDIVA (BD Biosciences) e FLOWJO (Tree Star, Ashland, OR). Os resultados obtidos demonstravam a porcentagem da população de células viáveis, em necrose e em apoptose.

A morte celular programada ou apoptose inicial tem como marco a exposição da fosfatidil serina (FS) na membrana plasmática, a qual se liga por afinidade com anexina V. Na morte celular programada tardia ou apoptose tardia além da exposição da FS na membrana celular ocorre o aparecimento de poros na mesma tornando-a permeável ao iodeto de propídeo o que faz com que a célula possua dupla marcação (anexina-PI). Em caso de necrose celular ocorre a permeabilização da membrana plasmática com a consequente marcação pelo iodeto de propídeo, não havendo externalização da FS, porém devido à formação de poros na membrana pode ocorrer também a internalização da anexina V, neste caso não conseguimos diferenciar o processo de apoptose tardia do processo de necrose.

5.8. Elucidação dos compostos químicos por espectrometria de massas

As amostras analisadas por espectrometria de massas foram diluídas com 0,1 % de hidróxido de amônio para as análises no modo negativo ou 0,1 % de ácido acético para análises no modo positivo. A solução resultante foi infundida diretamente no espectrômetro de massas SOLARIX 9,4 T (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) operando em uma faixa de m/z de 100 – 1000. As condições gerais de análises por ESI foram: pressão do gás de 0,3 psi, voltagem do capilar de 4,5 kV, e 220 °C para a temperatura do capilar de transferência de íons. Os espectros ESI(+) -FT-ICR MS foram adquiridos e processados utilizando o software Compass Data Analysis® (Bruker Daltonics - Bremen, Alemanha).

5.9. Análise estatística

Todos os dados quantitativos apresentados são médias desvio padrão, pelo menos, três experimentos independentes. A análise estatística e os gráficos de barras foram realizados no programa GraphPad™ Prism, versão 5.0 (GraphPad™ Software, San Diego, CA, EUA) através do teste-t de Student e ANOVA (teste Bonferroni), quando adequado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

6. RESULTADOS

6.1. Efeito na viabilidade celular das frações do extrato hidroalcoólico da semente do açaí

As frações FH, FC e FAE, promoveram redução da viabilidade celular (Figura 7 A, B e C, respectivamente) de forma significativa ($p < 0.001$). Comparando o potencial citotóxico das três frações do extrato da semente do açaí, foi observado que a FAE do extrato foi a mais eficaz, a FC do extrato teve efeito intermediário e a FH foi a menos eficaz. O IC 50 da FAE em 24 horas foi de $37 \mu\text{g mL}^{-1}$. Não foi possível calcular o IC50 da fração hexânica e clorofórmica pois não houve redução da viabilidade até este limiar, tornando os dados insuficientes para o cálculo.

A Figura 7 D representa a comparação dos tratamentos com as frações do extrato na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 24 e 48 horas. Nesta concentração, após 24 e 48 horas de tratamento a FAE apresentou uma eficácia muito maior quando comparada as frações hexânica e clorofórmica ($p < 0,001$). Houve diferença

estatisticamente significativa entre eles no que se refere ao potencial citotóxico ($p < 0,001$).

Na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, a FAE mostrou-se superior as outras duas frações ($p < 0,001$). Após 24 horas de tratamento, a FAE apontou ser a mais eficaz em reduzir a viabilidade da linhagem MCF-7 ($p < 0,01$) quando comparado a FH do extrato da semente do açaí, e ainda, após 48 horas a FAE obteve um efeito citotóxico significativo frente as frações hexânica e clorofórmica ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 7D).

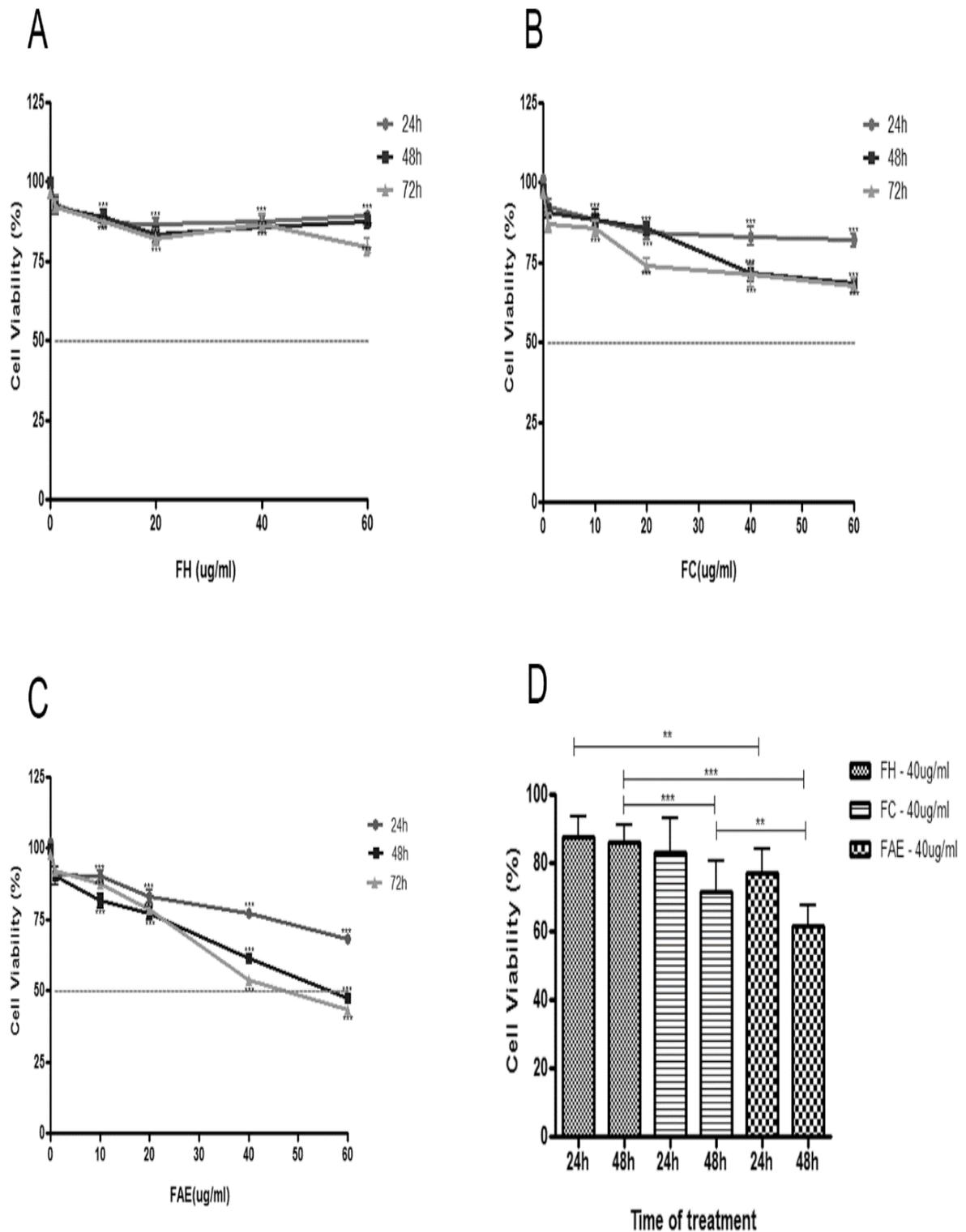


Figura 7. Ensaio MTT realizado para analisar a viabilidade das células MCF-7 após tratamento com as frações hexânica (FH), clorofórmica (C) e acetato de etila (FAE) do extrato da semente do açai em 24, 48 e 72 h, respectivamente (A, B e C). A FAE possui maior potencial citotóxico e reduz significativamente a viabilidade celular em todos os tempos de tratamento quando comparado as outras frações na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ (D).

A FAE do extrato derivado da semente do açaí mostrou-se citotóxico em concentrações de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, reduzindo significativamente a viabilidade das células MCF-7 após 24 horas de tratamento ($p < 0,001$) quando comparado às células controle. A concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou efeito citotóxico a partir de 24 horas de incubação ($p < 0,001$) aumentando sua citotoxicidade após 48 horas de tratamento ($p < 0,001$) (Figura 8 A e B). A redução significativa de 50% da viabilidade celular foi alcançada no tempo de 72 horas ($p < 0,001$) (Figura 8 D). O IC_{50} foi determinado, porém decidimos adotar a concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os demais ensaios.

A partir destes resultados resolvemos prosseguir os ensaios com FAE e caracterizá-la quimicamente por demonstrar maior potencial citotóxico comparada as demais.

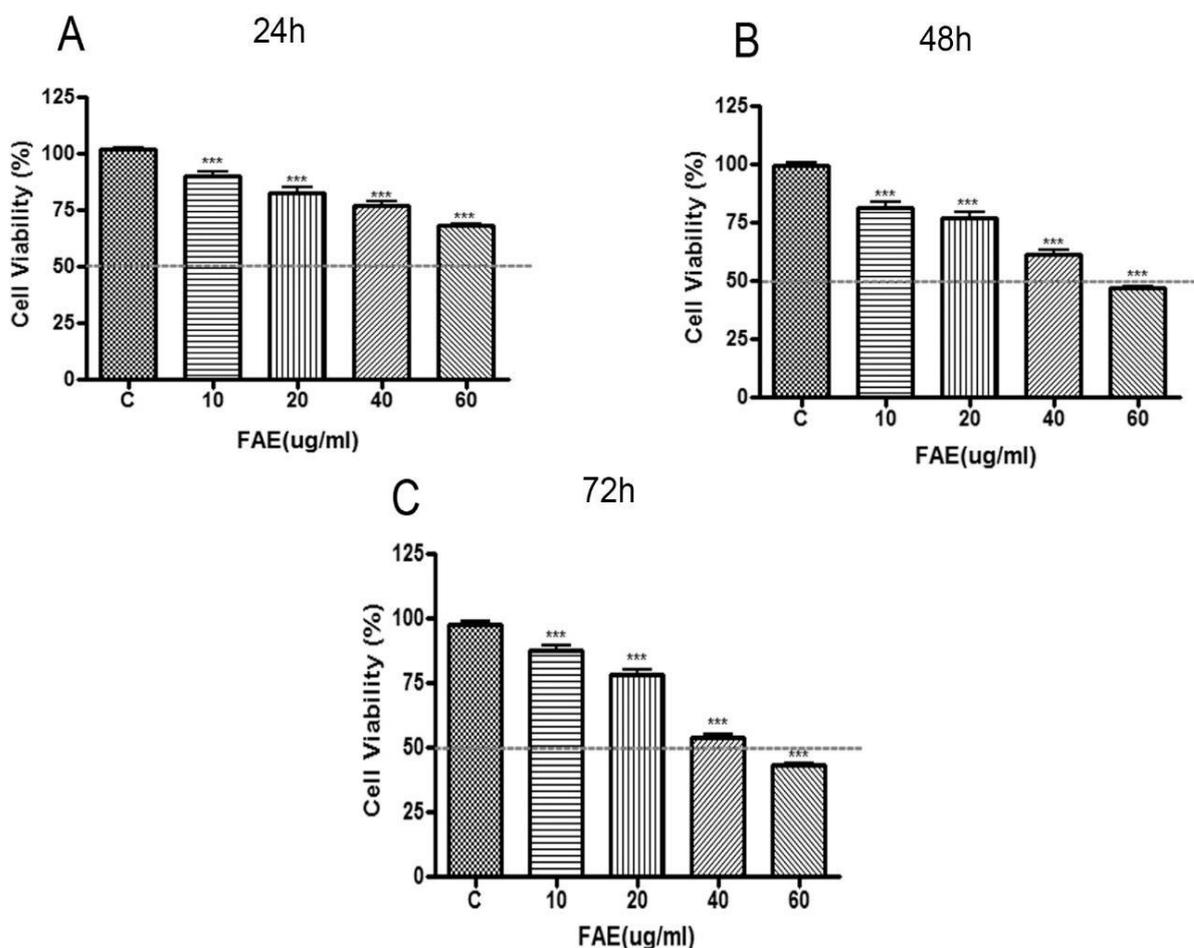


Figura 8. Ensaio de MTT para análise da viabilidade da linhagem celular MCF-7 após tratamento com a FAE do extrato de semente de açaí. (A) A FAE do extrato do açaí causou redução significativa da viabilidade celular da linhagem celular MCF-7 após 24, 48 e 72 h de tratamento. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Uma análise de variância (ANOVA), seguido do teste Bonferroni.

6.2. Efeito na proliferação celular da fração acetato de etila da semente do açaí

Estudos demonstram que os polifenóis, em especial a epicatequina possui a capacidade de estimular a respiração mitocondrial em células neoplásicas e aumentar a massa mitocondrial em ratos (HUTTEMANN *et al.*, 2012; YAMAMORI *et al.*, 2012; ELBAZ *et al.*, 2014). Deste modo, decidimos investigar a viabilidade celular das células tratadas com a FAE ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) com o ensaio com cristal violeta, que também é utilizado para determinar a viabilidade celular devido a habilidade de ligação do cristal violeta ao DNA.

O ensaio de proliferação celular com cristal violeta reduz significativamente a proliferação celular para menos de 50% ($p < 0,001$) em 48 h após tratamento com FAE (Figura 9). Foi possível observar a redução mais acentuada da proliferação celular em 24, 48 e 72 horas em comparação com o ensaio de viabilidade celular com cristal violeta (Figura 10). Este dado sugere que a FAE induz o aumento do metabolismo mitocondrial.

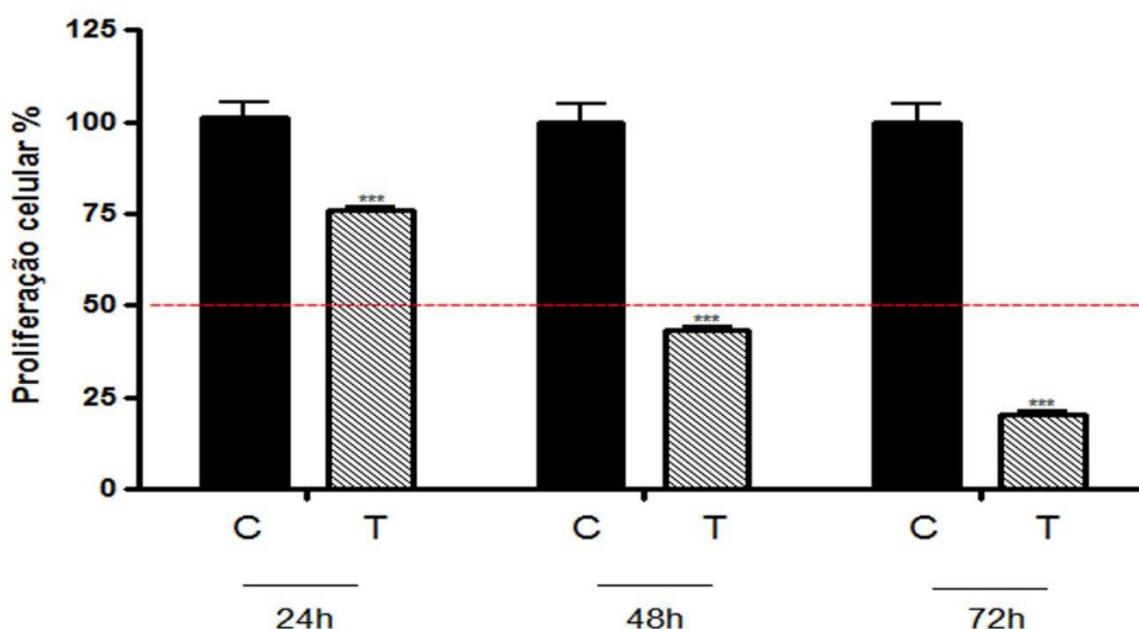


Figura 9. Ensaio com Cristal Violeta realizado para avaliar a proliferação da célula MCF-7 depois do tratamento com FAE do extrato da semente do açaí na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ após 24, 48 e 72 h de tratamento. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Análise de variação one-way (ANOVA), teste T não paramétrico.

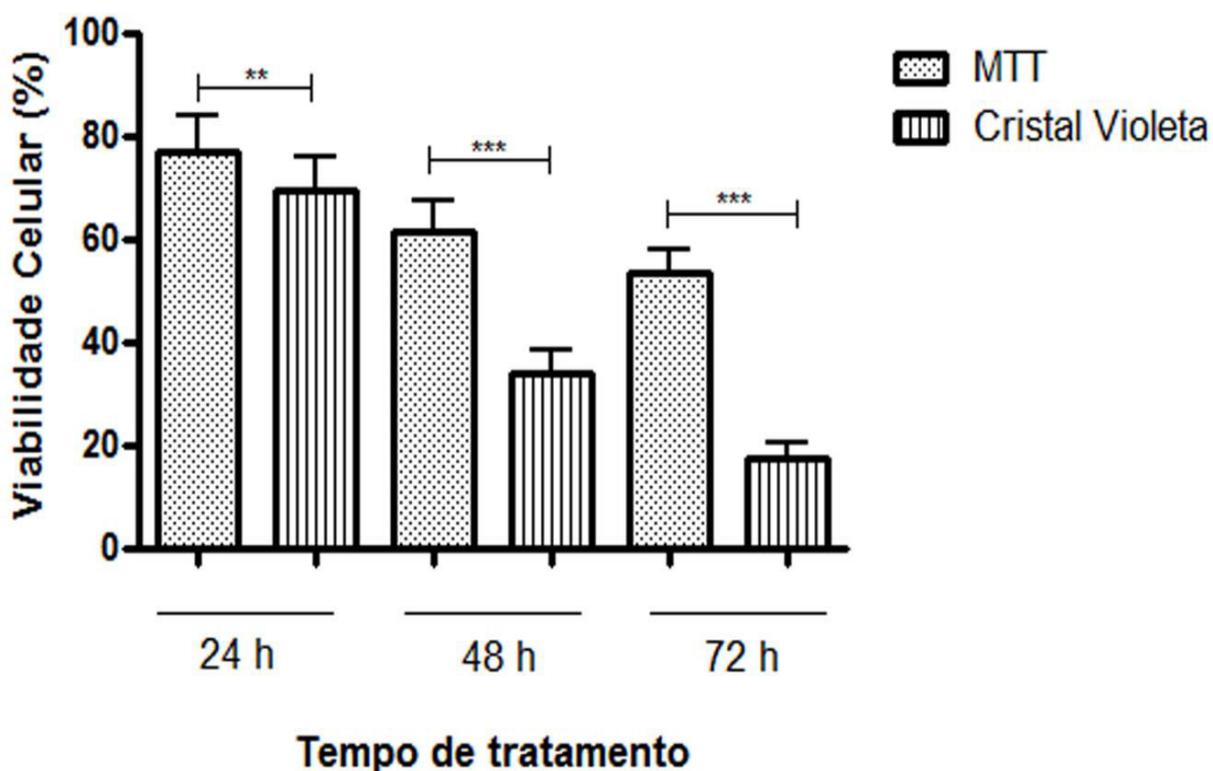


Figura 10. Análise comparativa da viabilidade celular com MTT e proliferação celular com cristal violeta da linhagem celular MCF-7 após tratamento com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ da FAE do extrato da semente de açaí. A redução da viabilidade celular no ensaio com cristal violeta é significativa quando comparada ao ensaio com MTT em 24, 48 e 72 horas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Análise de variância (ANOVA), seguido do teste Bonferroni.

6.3. Fração acetato de etila do extrato da semente do açaí causa autofagia e alterações morfológicas na linhagem celular MCF-7

O extrato da semente do açaí induziu autofagia na célula MCF-7 (SILVA *et al.*, 2014). Portanto, com o objetivo de avaliar se ocorreria o mesmo em células tratadas com a FAE do extrato em estudo, foi realizada a técnica de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-LC3B total. As imagens de imunofluorescência obtidas por microscopia confocal mostram um perfil de marcação de LC3B citoplasmática apenas em células tratadas com a FAE (Figura 11). A FAE induz autofagia na célula MCF-7 semelhante ao extrato da semente do açaí.

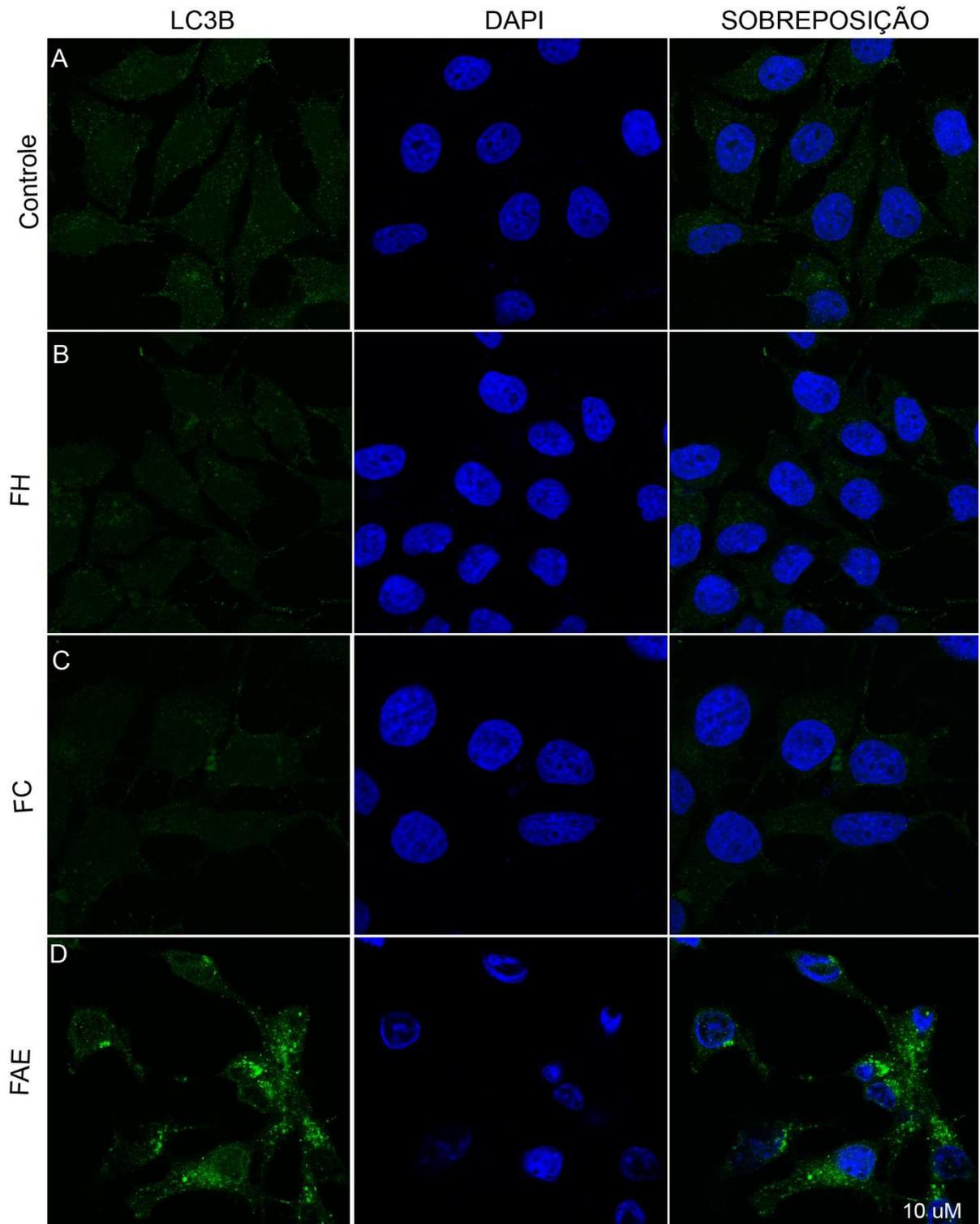


Figura 11. Ensaio de Imunofluorescência. (A, B, C e D) Marcação de LC3B para identificação da autofagia. (A) Controle 24 h. (B) Marcação de LC3B em células tratadas com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ da FH após 24 h. (C) Marcação de LC3B em células tratadas com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ da FC após 24 h. (D) Marcação de LC3B em células tratadas com $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ da FAE após 24 h. Apenas a FAE induziu autofagia na linhagem celular MCF-7. Barra 10 μM .

Os efeitos da FH, FC e FAE ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) nas características morfológicas da célula MCF-7 foram investigados por microscopia confocal. O tratamento por 24 horas com a FH não causou modificações morfológicas evidentes (Figura 12 B). Após 24 h de tratamento com FC, as células evidenciaram projeções citoplasmáticas característico de migração e invasão celular (Figura 12 C). O tratamento com FAE $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ modificou drasticamente a morfologia das células MCF-7 causando vacuolizações, diminuição da densidade, encolhimento, agrupamento e arredondamento celular (Figura 12 D).

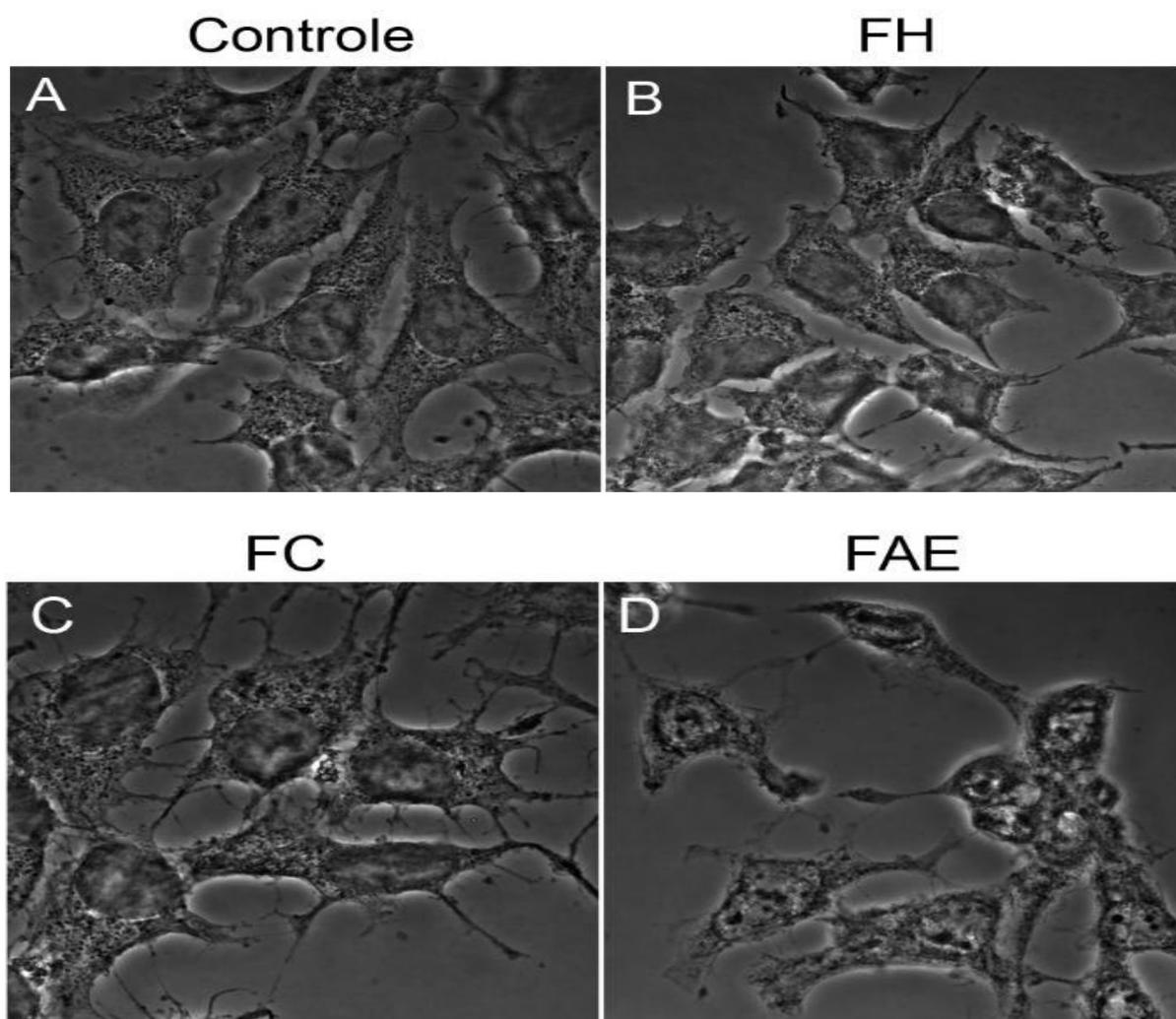


Figura 12. Análise da morfologia por microscopia confocal das células após tratamento com as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila após 24 horas (B, C e D, respectivamente). A fração acetato de atila causa alterações morfológicas mais evidentes na célula MCF-7, como arredondamento celular, aglomeramento e diminuição da densidade celular. Imagens de experimento único. Barra: $10 \mu\text{m}$.

6.4. A fração acetato de etila do extrato da semente do açaí não causa apoptose na linhagem celular MCF-7.

Visto que o tratamento com FAE causa redução na viabilidade e proliferação celular e alterações morfológicas, analisamos o tipo de morte celular por meio do ensaio FITC Anexina V- Apoptosis e leitura utilizando o citômetro de fluxo FACS Calibur da BD® em células MCF-7 tratadas com concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 13).

A FAE não induz apoptose na célula MCF-7, porém observa-se redução significativa de células viáveis e aumento da marcação de PI nos tempos de 12 e 24 horas indicando necrose celular (Figura 13).

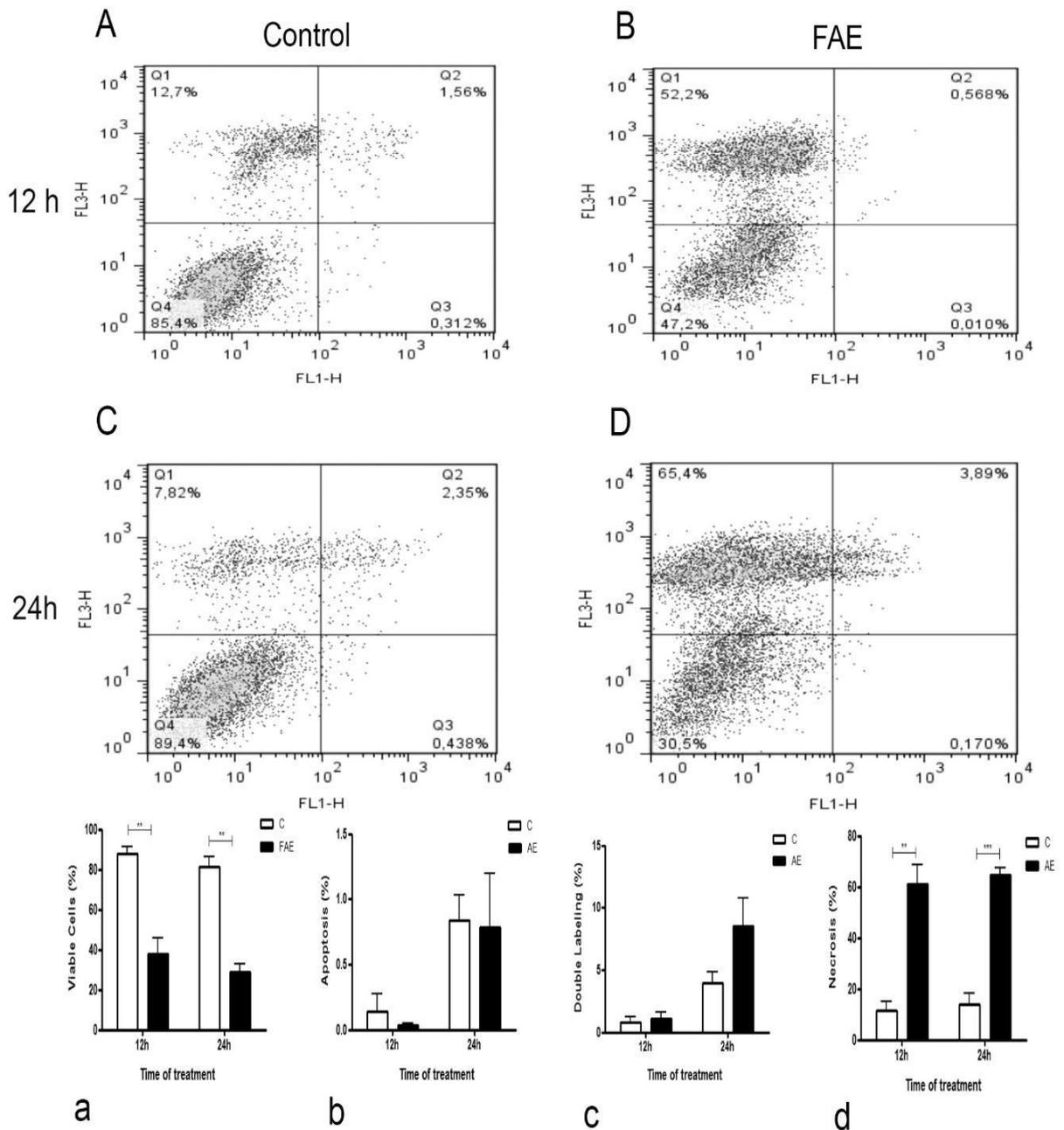


Figura 13. Ensaio FITC Anexina V- Apoptosis por citometria de fluxo após tratamento com acetato fração do extrato da semente de açaí. (A) Controle 12 h. (B) O extrato não causa a apoptose em células MCF-7 após 12h de tratamento. (C) Controle 24 h. (D) O extrato induz necroptose em células MCF-7 após 12 h e 24 h de tratamento. (a) quantificação de células viáveis, após 24 e 48 h após o tratamento. (b) Quantificação com anexina. (c) Quantificação da dupla marcação. (d) Quantificação com PI. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Uma análise de variância (ANOVA), teste de Bonferroni.

Visando identificar se a inibição da autofagia induziria a apoptose, foi realizado o ensaio com FITC Anexina V- Apoptosis, inibindo a autofagia com 3MA. A inibição da autofagia reduziu a marcação de PI das células tratadas com FAE e não induziu a morte celular por apoptose (Figura 14).

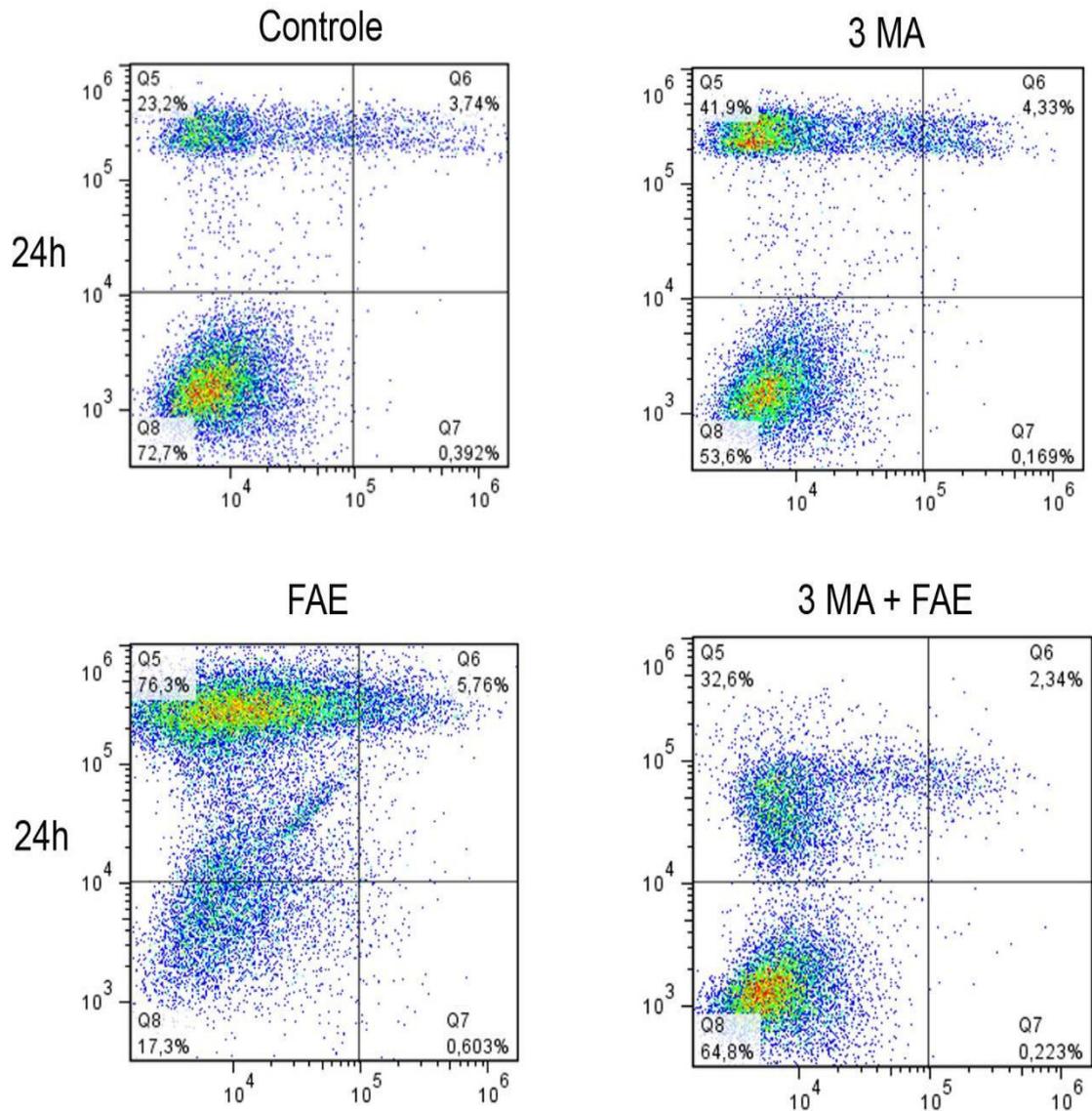


Figura 14. Ensaio FITC Anexina V- Apoptosis por citometria de fluxo após tratamento com acetato fração do extrato da semente de açaí e inibição farmacológica da autofagia com 3 MA. A inibição da autofagia não induz a apoptose após 24 h de tratamento com a FAE e reduz a marcação de PI. Experimento único.

6.5. Caracterização do perfil químico da fração acetato de etila do extrato da semente do açaí

A análise da FAE do extrato da semente do açaí demonstrou que a fração é rica em polifenóis. Os compostos presentes na amostra da FAE do extrato da semente do açaí, utilizando o modo positivo, através do espectro de massas são epicatequina, proantocianidina A₂, procianidinas trimérica e tetramérica (Figura 15 a, b, c e d, respectivamente).

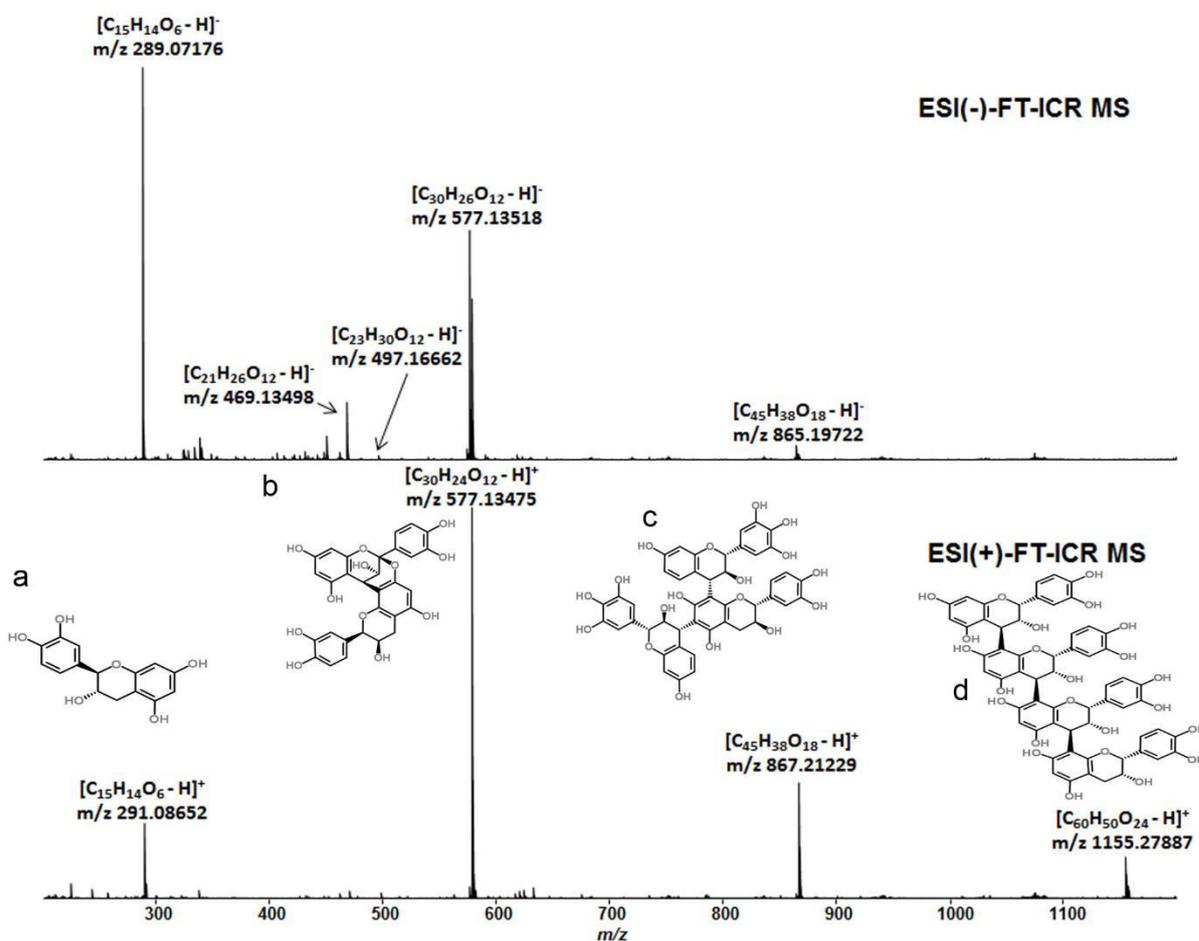


Figura 15. Espectro da fração acetato de etila do extrato da semente do açaí analisada por ESI- FT- ICR MS. ESI (-) - FT- ICR MS (superior) e ESI (+) - FT- ICR MS (inferior). (a) epicatequina, proantocianidina A₂, (c) procianidina trimérica e (d) procianidina tetramérica.

7. DISCUSSÃO

O câncer de mama é a segunda neoplasia mais frequente em mulheres, e apresenta alta taxa de incidência e mortalidade, ressaltando a necessidade de melhores estratégias de prevenção e terapia (WHO, 2010). A pesquisa de medicamentos antineoplásicos através de extratos e princípios ativos obtidos de produtos naturais é uma estratégia para a descoberta de novos compostos terapêuticos (NEWMAN e CRAGG, 2012).

Demonstrou-se em trabalho anterior que o extrato da semente do açaí foi eficaz na diminuição da viabilidade de células MCF-7, induzindo-as ao fenômeno da autofagia. Neste trabalho, com o intuito de identificar os compostos responsáveis por estes efeitos, testamos diferentes frações derivadas do extrato hidroalcoólico da semente de *Euterpe oleracea* Mart. na viabilidade de células MCF-7 e caracterizamos quimicamente a fração mais eficaz através de espectrometria de massa por ionização por eletrospray com um analisador FT-ICR.

Os dados aqui apresentados indicam o potencial antineoplásico efeito dose-tempo-dependente da FAE derivada do extrato da semente do açaí em células de adenocarcinoma mamário (MCF-7), reduzindo a viabilidade celular significativamente após 24 h de tratamento mais forte do que as outras duas frações, sugerindo a existência de compostos citotóxicos promissores na FAE do extrato da semente do açaí. Por conseguinte, a fração de acetato de etila foi escolhida para posterior identificação dos compostos. Em outros estudos, fração acetato de etila de produtos naturais também foi a mais eficiente em reduzir a viabilidade de células tumorais (MCF-7, U87, CACO-2 e HepG2) (CHEN *et al.*, 2015; TRIPATHY *et al.*, 2015).

A FAE induziu morte celular por necroptose. A morte celular programada *in vivo* envolve a interação entre a apoptose, autofagia e necroptose. Em alguns casos, um estímulo específico induz apenas um tipo de morte celular programada, mas em outras situações, o mesmo estímulo pode dar início a múltiplos processos de morte celular (AMARAVADI e THOMPSON, 2007).

Diferentes tipos de mecanismos podem coexistir e interagir, porém, um mecanismo domina os outros. O tipo de morte celular é regulada por vários fatores, incluindo os níveis de ATP, a extensão do dano ou stress, e a presença de inibidores

de vias específicas. A crise bioenergética que ocorre com NAD⁺ e depleção aguda de ATP em células glicolíticas esta associada a alta concentração de ROS (espécie reativa de oxigênio), podendo ativar autofagia, porém se autofagia falha para manter os níveis de energia, ocorre a necroptose (LIN *et al.*, 2004; AMARAVADI e THOMPSON, 2007). Compostos e agentes antineoplásicos induzem necroptose em células cancerosas, como exemplo o Shikonin induz a necroptose em células MCF-7 (HAN *et al.*, 2007).

A linhagem celular utilizada neste estudo não possui caspase-3, causando redução da susceptibilidade à apoptose e aumento dos efeitos pró-morte autofágica devido esta deficiência. Porém este é um modelo experimental muito utilizado para câncer de mama por ter sobre expressão de Bcl-2 e a resistência a apoptose desta mimetiza a propriedade de células tumorais (BEROUKHIM *et al.*, 2010).

Embora a apoptose muitas vezes ser o primeiro modo de morte celular e a necroptose uma forma de assegurar a ocorrência da morte celular, a evidência emergente demonstra que a via necrótica pode predominar sob certas condições patológicas (CARRASCO-GARCÍA *et al.*, 2012).

A via PI3K/AKT/mTOR é frequentemente alterada no câncer de mama, com mutações, ampliações, superexpressões ou deleções que afetam alguns dos componentes moleculares. Em células de câncer de mama, a inibição da via da mTOR é suficiente para desencadear a autofagia (PAGLIN *et al.*, 2005). Estudos demonstram que as antocianinas, pertencentes ao grupo dos flavonóides têm como alvo proteínas das vias de sinalização Notch, Wnt, MAPK e PI3K (KIM *et al.*, 2010; KAUSAR *et al.*, 2012).

Assim, estamos frente a uma possibilidade de extração do princípio ativo candidato a tratamento terapêutico e/ou a prevenção do câncer de mama, visto que há frequente resistência para múltiplas drogas quimioterápicas durante o tratamento (CHEN *et al.*, 1990; LEE *et al.*, 1997; LI e JIANG, 2007; VILQUIN *et al.*, 2015).

A FAE da semente do açaí é composta por epicatequina, proantocianidina A₂, procianidinas trimérica e tetramérica. A composição fenólica da semente do açaí já foi anteriormente descrita identificando as formas oligoméricas como os compostos mais abundantes. A presença de catequinas e epicatequina também foram reportadas na semente do açaí (RODRIGUES *et al.*, 2006; BARROS, 2015).

A atuação da FAE do extrato do açaí na redução da viabilidade celular e a indução da morte celular por autofagia pode ser atribuído a sua alta concentração de

polifenóis (RODRIGUES *et al.*, 2006; BARROS, 2015), o que atribui à semente do açaí uma alta capacidade antioxidante (FRANKEL *et al.*, 1993; CHOI, 1998). Antioxidantes são compostos com caráter protetor do câncer que atuam inibindo e / ou diminuindo os danos ao DNA e às macromoléculas (MCCORD, 2000). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos está ligada a uma combinação dos elementos estruturais e químicos, como por exemplo, a glicosilação, a presença de hidroxilas livres ou o número e posição de hidroxilas (DE MARTINO *et al.*, 2012).

A semente do açaí também demonstrou benefícios para o sistema cardiovascular (ZAPATA-SUDO *et al.*, 2014), renal (DE BEM *et al.*, 2014) e neurológico (SUDO *et al.*, 2015). Estudos afirmam que produtos naturais que possuem polifenóis em sua composição química demonstram atividade antioxidante e antiproliferativa em células neoplásicas *in vitro* (AKSOY-SAGIRLI, 2015; ASHRAF, 2015; VUONG *et al.*, 2015; YESSOUFOU, 2015).

A epicatequina está dentre os compostos mais ativos encontrados em plantas e apresenta atividade antioxidante e citotóxica nas células MCF-7 e HCT-15 (DEEPA *et al.*, 2013). A catequina e a epicatequina foram os metabólitos secundários mais abundantes do extrato de *Piper imperiale* e demonstraram elevada capacidade antioxidante, potente efeito antimicrobacteriano e efeito citotóxico na linhagem celular MCF-7 (DIAZ *et al.*, 2012).

A epicatequina exibe vários benefícios à saúde humana (JEW *et al.*, 2009) e sensibiliza várias células de câncer após a radiação (ELBAZ *et al.*, 2014). Estudos demonstram que os polifenóis, em especial a epicatequina, possuem a capacidade de estimular a respiração mitocondrial, aumentando a atividade do NADPH, citocromo c redutase em células neoplásicas e aumenta a massa mitocondrial em ratos (RODGERS e GRANT, 1998; HUTTEMANN *et al.*, 2012; YAMAMORI *et al.*, 2012; ELBAZ *et al.*, 2014). Os efeitos sobre atividades enzimáticas *in vitro* sugerem que não existe apenas o potencial de flavonoides alterarem a ativação metabólica de substâncias cancerígenas, mas também medicamentos administrados terapêuticamente *in vivo* (RODGERS e GRANT, 1998).

Li e Jiang (2007) demonstraram que as frações enriquecidas de procianidinas monoméricas e oligoméricas, onde as catequinas e epicatequinas foram as principais unidades monoméricas, apresentaram atividade antioxidante e inibitória na proliferação de células MCF-7 e de lactato desidrogenase A (LDH-A) (LI e JIANG, 2007). Assim como, epicatequinas oligoméricas por polimerização enzimática

exibiram amplificação da inibição do crescimento das células neoplásicas (NAGARAJAN *et al.*, 2008).

A epicatequina juntamente com ácido gálico e ursólico induziram a apoptose e depleção de GHS (glutathione simples) em células neoplásicas (MCF-7 e U87) (TRIPATHY *et al.*, 2015). A epicatequina demonstrou a mais elevada atividade antioxidante pelo método DPPH. No entanto, a procianidina B₄ demonstrou maior efeito inibitório da proliferação nas células HELF e MCF-7, enquanto epicatequina e procianidina B₂ obtiveram citotoxicidade inferior nas células MCF-7 e HELF quando comparado ao taxol. Além disso, a procianidina B₂ tem maiores atividades de eliminação contra os radicais hidroxila e ânion superóxido do que procianidina B₄ e epicatequina (LI e JIANG, 2007).

Outro estudo demonstra a citotoxicidade da epicatequina e proantocianidina B₂ em células de câncer de mama humano (MCF-7) e de fibroblastos de pulmão humano embrionário (HELF), porém foram inferiores ao do tratamento com paclitaxel (ZHAO *et al.*, 2007). As procianidinas A₂ exibiram alta atividade antineoplásica contra as linhagens tumorais (HepG2 e HeLa) e apresentaram reduzida atividade antineoplásica em células de câncer de pulmão (A549) e de mama (MCF-7). No mesmo estudo, também foi identificada atividade antimicrobiana da epicatequina e procianidina A₂ (WEN, 2014). É importante ressaltar que os flavonóides evidenciaram pouca ou nenhuma citotoxicidade em células normais (GHASEMZADEH e JAAFAR, 2013; TRIPATHY *et al.*, 2015).

No entanto, Rodgers e Grant (1998) investigaram os efeitos dos flavonoides quercetina, miricetina e epicatequina na linhagem celular MCF-7, e identificaram que apenas a quercetina causou diminuição do teor de proteína celular e da viabilidade celular, alterou a morfologia celular, aumentou o nível de glutathione reduzida (GSH) e também inibiu acentuadamente a síntese de proteínas, DNA e RNA (RODGERS e GRANT, 1998).

Extratos da folha de *Pandanus amaryllifolius* Roxb. mostraram potencial de compostos bioativos, como catequina, ácido gálico, kaempferol e naringina, podem funcionar sinergicamente na inibição da proliferação de células de câncer de mama (GHASEMZADEH e JAAFAR, 2013). Deste modo, é necessário investigar a ação destes compostos individualmente e simultaneamente na inibição de células de câncer de mama e em outras linhagens de câncer, pois estes podem funcionar sinergicamente.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- As frações do extrato da semente do açaí reduziram significativamente a viabilidade celular da célula MCF-7, porém a fração acetato de etila foi a mais eficaz demonstrando maior potencial citotóxico;
- A FAE parece induzir a estimulação da atividade mitocondrial;
- A FAE induz a autofagia e causa alterações morfológicas (vacuolizações, diminuição da densidade, encolhimento, agrupamento e arredondamento celular) na célula MCF-7;
- A FAE não induz apoptose celular mesmo após inibição da autofagia;
- Os resultados de (+) ESI-FT-ICR MS mostraram que a fração acetato de etila do extrato da semente do açaí é rico em polifenóis, constituído por catequina, procianidinas trimérica e tetramérica;
- A epicatequina, proantocianidina A₂, procianidinas trimérica e tetramérica são responsáveis pelo efeito citotóxico na célula MCF-7, porém deve ser investigado se esta ação deve-se à epicatequina ou às suas formas oligoméricas;
- A epicatequina, proantocianidina A₂, procianidinas trimérica e tetramérica podem ser candidatos a viabilização de medicamento fitoterápico ou fonte de um novo fármaco para a tratamento e/ou para a prevenção do câncer de mama.

Sugere-se que os flavonóides da semente do açaí podem ser potencialmente componentes úteis para alimentos funcionais e / ou drogas antineoplásicas (quimiopreventivo). Mais estudos são necessários para elucidar a atividade citotóxica isolada de cada composto. Assim como, identificar os alvos moleculares do mecanismo de morte celular a fim de proporcionar a aquisição de novas combinações terapêuticas e/ou preventivas no tratamento do câncer de mama.

9. REFERÊNCIAS

ADAMI, H. H., D.; TRICHOPOULOS, D. **Textbook of Cancer Epidemiology**. Oxford: Oxford University Press: 2008.

AGUIAR, M. O.; DE MENDONÇA, M. S. Morfo-anatomia da semente de *Euterpe precatoria* Mart. (*Palmae*). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 37-42, 2003.

AKSOY-SAGIRLI, P. O., N ; ECEVIT GENÇ, G; MELIKOĞLU, G. *In vitro* antioxidant activity, cyclooxygenase-2, thioredoxin reductase inhibition and DNA protection properties of *Teucrium sandrasicum* L. **Industrial Crops and Products** v. 74, p. 545–550, 2015.

AMARAVADI, R. K.; THOMPSON, C. B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 24, p. 7271-9, Dec 15 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18094407> >.

AMORIM, V. M. S. L. et al. Fatores associados a não realização da mamografia e do exame clínico das mamas: um estudo de base populacional em Campinas, São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. 11, p. 2623-2632, 2008.

ASHRAF, A. S., R. A; MAHMOOD, A ; DIN, M. U. Chemical composition and *in vitro* antioxidant and antitumor activities of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 241–248, 2015.

BALICK, M. J. **The palm- tree of life: biology, utilization and conservation**. New York: 1986. 42-49

BANGE, J.; ZWICK, E.; ULLRICH, A. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. **Nat Med**, v. 7, n. 5, p. 548-52, May 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11329054> >.

BARROS, L. C., R.C; QUEIROZ, M. J. R.P; SANTOS-BUELGA, C; SANTOS, E. A, REGIS,WILIAM C. B; W. C. B; FERREIRA, I. C.F.R. The powerful *in vitro* bioactivity of *Euterpe oleracea* Mart. seeds and related phenolic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 318–322, 2015.

BASSE, C.; AROCK, M. The increasing roles of epigenetics in breast cancer: Implications for pathogenicity, biomarkers, prevention and treatment. **Int J Cancer**, v. 137, n. 12, p. 2785-94, Dec 15 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25410431> >.

BEROUKHIM, R. et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. **Nature**, v. 463, n. 7283, p. 899-905, Feb 18 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164920> >.

BODIAN, C. A.; PERZIN, K. H.; LATTES, R. Lobular neoplasia. Long-term risk of breast câncer and relation to other factors. **Cancer**, v. 78, p. 1024-34, 1996.

BRASIL. **Controle do câncer de mama: Documento de consenso.** (CONPREV)., M. D. S. I. N. D. C. I. C. D. P. E. V. Rio de Janeiro 2004.

_____. **Alimentos, Nutrição, Atividade Física e Prevenção do Câncer. Uma perspectiva global.** (INCA)., I. N. D. C. J. A. G. D. S. Rio de Janeiro: 12 p. 2007.

_____. **Produção da extração vegetal da Silvicultura 2010.** ESTATÍSTICA, I. B. D. G. E. 2010.

_____. **Produção da extração vegetal da Silvicultura 2011.** ESTATÍSTICA., I. B. D. G. E. 2011a.

_____. **Ratreamento organizado de Cancer.** SAÚDE, M. D. e CÂNCER, I. N. D. Rio de Janeiro: INCA 2011b.

_____. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância.** INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, C. G. D. A. E., COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. Rio de Janeiro: 124 p. 2013.

_____. **Estimativa 2016 : incidência de câncer no Brasil.** SILVA, I. N. D. C. J. A. G. D. e VIGILÂNCIA, C. D. P. E. Rio de Janeiro: INCA: 122 p. 2015.

CALZAVARA, B. B. G. **As possibilidades do açazeiro no estuário amazônico.** Belém: FCAP: 103 p. 1972.

CAREY, L. A. et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA**, v. 295, n. 21, p. 2492-502, Jun 7 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16757721> >.

CARRASCO-GARCÍA, E. et al. Cell Death and Cancer, Novel Therapeutic Strategies. **Apoptosis and Medicine, InTech**, 2012.

CAVALCANTE, P. **Frutas comestíveis da Amazônia.** Belém: CEJUP: 271 p. 1991.

CHEANG, M. C. et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, n. 10, p. 736-50, May 20 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19436038> >.

CHEN, M. et al. Antioxidant and in vitro anticancer activities of phenolics isolated from sugar beet molasses. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, p. 313, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26347338> >.

CHEN, Y. N. et al. Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein. **J Biol Chem**, v. 265, n. 17, p. 10073-80, Jun 15 1990.

CHOI, W. S., LEE, S.E., LEE, H.S., LEE, Y.H., PARK, B.S. Antioxidative activities of methanol extracts of tropical and oriental medicinal plants. **Agricultural Chemistry Biotechnology**, v. 41, n. 7, p. 556–559, 1998.

CHUNG, C. H.; BERNARD, P. S.; PEROU, C. M. Molecular portraits and the family tree of cancer. **Nat Genet**, v. 32 Suppl, p. 533-40, Dec 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12454650> >.

CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L. J. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. **Oncologist**, v. 9, n. 6, p. 606-16, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561805> >.

CORDEIRO, V. S. C. et al. *Euterpe oleracea* Mart. extract prevents vascular remodeling and endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 8, n. 8, p. 6-16, 2008.

COSTA, M. R.; OLIVEIRA, M. S. P.; MOURA, E. F. Variabilidade genética em açazeiro (*Euterpe oleraceae* Mart.). **Biociência**, v. 4, n. 21, p. 46-50, 2001.

DA COSTA, C. A. et al. *Euterpe oleracea* Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 385, n. 12, p. 1199-209, Dec 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23052352> >.

DALMASCHIO, G. P. **Caracterização de Compostos Polares no Petróleo por Espectrometria de Massas de Altíssima Resolução e Exatidão – ESI(±)-FT-ICR MS**. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória: 87 p. 2012.

DE ALBUQUERQUE-XAVIER, A. C. et al. Blockade of irradiation-induced autophagosome formation impairs proliferation but does not enhance cell death in HCT-116 human colorectal carcinoma cells. **Int J Oncol**, v. 40, n. 4, p. 1267-76, 2012.

DE BEM, G. F. et al. Protective effect of *Euterpe oleracea* Mart (acai) extract on programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during pregnancy. **J Pharm Pharmacol**, v. 66, n. 9, p. 1328-38, Sep 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24725099> >.

DE MARTINO, L. et al. In Vitro Phytotoxicity and Antioxidant Activity of Selected Flavonoids. **Int. J. Mol. Sci**, v. 113, p. 5406-5419, 2012.

DE OLIVEIRA, P. R. et al. Effects of an extract obtained from fruits of *Euterpe oleracea* Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 56, n. 6, p. 619-26, 2010.

DEEPA, M. et al. Antioxidant rich *Morus alba* leaf extract induces apoptosis in human colon and breast cancer cells by the downregulation of nitric oxide produced

by inducible nitric oxide synthase. **Nutr Cancer**, v. 65, n. 2, p. 305-10, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23441618> >.

DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1222-1229, 2006.

DIAZ, L. E. et al. Antioxidant, antitubercular and cytotoxic activities of Piper imperiale. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 4142-57, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481537> >.

DOLLED-FILHART, M. et al. Classification of breast cancer using genetic algorithms and tissue microarrays. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 21, p. 6459-68, Nov 1 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17085660> >.

ELBAZ, H. A. et al. Epicatechin stimulates mitochondrial activity and selectively sensitizes cancer cells to radiation. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88322, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24516636> >.

FIASCHI, P.; PIRANI, J. R. Review of plant biogeographic studies in Brazil. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 47, n. 5, p. 477–496, 2009.

FIGUEIREDO, A. R. Estudo Teórico e Experimental de Proteômica Estrutural por Espectrometria de Massas Acoplada à Ligação Cruzada. **Dissertação de Mestrado**, p. 97, 2010.

FRANKEL, E. N. et al. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **Lancet**, v. 341, n. 8843, p. 454-7, Feb 20 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8094487> >.

GARRIDO, J.; BORGES, F. Wine and grape polyphenols – A chemical perspective. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1844–1858, 2013.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z. Profiling of phenolic compounds and their antioxidant and anticancer activities in pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) extracts from different locations of Malaysia. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, p. 341, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24289290> >.

GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Ann Oncol**, v. 24, n. 9, p. 2206-23, Sep 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23917950> >.

GONZALEZ-VALLINAS, M. et al. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives. **Nutr Rev**, v. 71, n. 9, p. 585-99, Sep 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24032363> >.

HAN, W. et al. Shikonin circumvents cancer drug resistance by induction of a necroptotic death. **Mol Cancer Ther**, v. 6, n. 5, p. 1641-9, May 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17513612> >.

HANDERSON, A.; GALEANO, G. **Euterpe, Prestoea, and Neonicholsonia (Palmae: Euterpeinae)**. (FLORA NEOTROPICA. New York: New York Botanical Garden: 90 p. 1996.

HERSCHKOWITZ, J. I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17493263> >.

HISHAM, A. N.; YIP, C. H. Overview of breast cancer in Malaysian women: a problem with late diagnosis. **Asian J Surg**, v. 27, n. 2, p. 130-3, Apr 2004.

HLADOVEC, J. The effect of antithrombotics in a new model of arterial thrombosis. **Thromb Res**, v. 41, n. 5, p. 665-70, Mar 1 1986. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3961741> >.

HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry: Principles and Applications. **West Sussex: John Wiley & Sons, Bruxellas, Bélgica**, n. 3, p. 1, 2, 85, 5-9, 15, 89, 161, 157, 158, 2007.

HOLDERNESS, J. et al. Polysaccharides isolated from Acai fruit induce innate immune responses. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17301, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21386979> >.

HUTTEMANN, M.; LEE, I.; MALEK, M. H. (-)-Epicatechin maintains endurance training adaptation in mice after 14 days of detraining. **FASEB J**, v. 26, n. 4, p. 1413-22, Apr 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22179525> >.

IRIGOYEN, M. A. et al. [Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics]. **An Sist Sanit Navar**, v. 34, n. 2, p. 219-33, May-Aug 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21904404> >.

JENSEN, G. S. et al. Pain reduction and improvement in range of motion after daily consumption of an acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp-fortified polyphenolic-rich fruit and berry juice blend. **J Med Food**, v. 14, n. 7-8, p. 702-11, Jul-Aug 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21470042> >.

JEW, S.; ABUMWEIS, S. S.; JONES, P. J. Evolution of the human diet: linking our ancestral diet to modern functional foods as a means of chronic disease prevention. **J Med Food**, v. 12, n. 5, p. 925-34, Oct 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19857053> >.

JONES, D. L. **Palms: throughout the world**. Washington: Smithsonian Institution, p.410. 1995

JORDAN, V. C. et al. Hormone receptor assays: clinical usefulness in the management of carcinoma of the breast. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 26, n. 2, p. 97-152, 1988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2852576> >.

KAGAN, V. E.; TYURINA, Y. Y. Recycling and redox cycling of phenolic antioxidants. **Ann N Y Acad Sci**, v. 854, p. 425-34, Nov 20 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9928449> >.

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

KAUSAR, H. et al. Berry anthocyanidins synergistically suppress growth and invasive potential of human non-small-cell lung cancer cells. **Cancer Lett**, v. 325, n. 1, p. 54-62, Dec 1 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22659736> >.

KENNECKE, H. et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 20, p. 3271-7, Jul 10 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498394> >.

KEUM, Y. S.; JEONG, W. S.; KONG, A. N. Chemopreventive functions of isothiocyanates. **Drug News Perspect**, v. 18, n. 7, p. 445-51, Sep 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16362084> >.

KIM, J. E. et al. Cyanidin suppresses ultraviolet B-induced COX-2 expression in epidermal cells by targeting MKK4, MEK1, and Raf-1. **Biochem Pharmacol**, v. 79, n. 10, p. 1473-82, May 15 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096264> >.

KINGHORN, A. D.; CHIN, Y. W.; SWANSON, S. M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. **Curr Opin Drug Discov Devel**, v. 12, n. 2, p. 189-96, Mar 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19333864> >.

KIRK, E. A. et al. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL-receptor-deficient Mice. **J Nutr** v. 128, n. 6, p. 954-9, 1998.

LANDETE, J. M. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 52, n. 10, p. 936-48, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22747081> >.

LASLO, M. et al. A botanical containing freeze dried acai pulp promotes healthy aging and reduces oxidative damage in sod1 knockdown flies. **Age (Dordr)**, v. 35, n. 4, p. 1117-32, Aug 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22639178> >.

LEE, J. S. et al. Reduced drug accumulation and multidrug resistance in human breast cancer cells without associated P-glycoprotein or MRP overexpression. **J Cell Biochem**, v. 65, n. 4, p. 513-26, Jun 15 1997.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. Gas and liquid phase acidity of natural antioxidants. **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 8, p. 3078-85, Apr 19 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16608234> >.

LI, J.; JIANG, Y. Litchi flavonoids: isolation, identification and biological activity. **Molecules**, v. 12, n. 4, p. 745-58, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17851427> >.

LIN, Y. et al. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. **J Biol Chem**, v. 279, n. 11, p. 10822-8, Mar 12 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14701813> >.

LIN, Y. M. et al. In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **J Nat Prod**, v. 60, n. 9, p. 884-8, Sep 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9322359> >.

LU, W. et al. Changes in quality of life among breast cancer patients three years post-diagnosis. **Breast Cancer Res Treat**, v. 144, n. 2, p. 357-69, 2009.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 5, p. 727-47, May 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113710> >.

MARTINS, M. A.; MATTOSO, L. H. C.; PESSOA, J. D. C. Comportamento térmico e caracterização morfológica das fibras de mesocarpo e caroço do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Rev. Bras. Frutic**, v. 31, n. 4, p. 1150-1157, 2009.

MCCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **Am J Med**, v. 108, n. 8, p. 652-9, Jun 1 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856414> >.

MELHORANÇA FILHO, A. L.; PEREIRA, M. R. R. Atividade antimicrobiana de óleos extraídos de açaí e de pupunha sobre o desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 4, p. 598-603, 2012.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. **Quim. Nova** v. 24, p. 105, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682> >.

MOURA, R. S. et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (ACAI) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. **Phytomedicine**, v. 19, n. 3-4, p. 262-9, Feb 15 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22138278> >.

NAGARAJAN, S. et al. Biocatalytically oligomerized epicatechin with potent and specific anti-proliferative activity for human breast cancer cells. **Molecules**, v. 13, n. 11, p. 2704-16, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18978700> >.

NASCIMENTO, R. J. S. et al. Fatty acids of the oil açai pulp extracted with enzymes and hexane. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 498-502, 2008.

NETO, M. B. **Método Absoluto e Geral para a Avaliação Estrutural Direta de Isômeros Constitucionais por Espectrometria de Massas Pentaquadrupolar**. Universidade Estadual de Campinas. Campinas: 199 p. 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod**, v. 70, n. 3, p. 461-77, Mar 2007.

_____. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**, v. 75, n. 3, p. 311-35, Mar 23 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22316239> >.

OKADA, Y. et al. A study on fatty acids in seeds of Euterpe oleracea Mart seeds. **J Oleo Sci**, v. 60, n. 9, p. 463-7, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21852745> >.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, Euterpe oleracea and Euterpe precatoria. **Food Chem Toxicol**, v. 115, n. 4, p. 1199–205, 2009.

PAGLIN, S. et al. Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells. **Cancer Res**, v. 65, n. 23, p. 11061-70, Dec 1 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322256> >.

PAIK, S. et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **N Engl J Med**, v. 351, n. 27, p. 2817-26, Dec 30 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591335> >.

PEINADO, H.; OLMEDA, D.; CANO, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 6, p. 415-28, Jun 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17508028> >.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-52, Aug 17 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963602> >.

RIBEIRO-SILVA, A. et al. p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. **Histopathology**, v. 47, n. 5, p. 458-66, Nov 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16241993> >.

ROCHA, A. P. et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascul Pharmacol**, v. 46, n. 2, p. 97-104, 2007.

ROCHA, A. P. M. R., A.C; SOUZA, M.A.V; CARVALHO, L.C.R.M; SOUSA, P.J.C; TANO, T; CRIDDLE, D.N; PORTO, L.C; VALENCA S.S; DE MOURA, R.S. Antihypertensive Effects and Antioxidant Action of a Hydro-Alcoholic Extract Obtained from Fruits of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 3, p. 435-448, 2008.

RODGERS, E. H.; GRANT, M. H. The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. **Chemico-Biological Interactions** v. 116, p. 213–228, 1998.

RODRIGUES, R. B. et al. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (acai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 12, p. 4162-7, Jun 14 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16756342> >.

ROMÃO, W. **Novas Aplicações da Espectrometria de Massas em Química Forense**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas: 201 p. 2010.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5^o. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: 2007.

SANTOS, V. G. **Novas Propostas para o Estudo de Mecanismos de Reações Orgânicas por Espectrometria de Massas**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas: 117 p. 2011.

SCHAUSS, A. G. et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 22, p. 8604-10, Nov 1 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17061840> >.

SCUDELLER VV, V. J., ARAÚJO JORGE LH. **Etnoconhecimento de plantas de uso medicinal nas comunidades São João do Tupé e Central (reserva de desenvolvimento sustentável do Tupé), in biotupé - meio físico, diversidade biológica e sociocultural do baixo Rio Negro, Amazônia Central**. SANTOS-SILVA, E. N. e SCUDELLER, V. V. UEA Edições: Nanaus: 1885-99 p. 2009.

SILVA, D. F. et al. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 175, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24886139> >.

SOCIETY, A. C. **Breast cancer prevention and early detection**. 2015 2015a.

_____. **Breast cancer treatment and support**. (ACS), A. C. S. 2015b.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p.

10869-74, Sep 11 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553815> >.

STONER, G. D. Foodstuffs for preventing cancer: the preclinical and clinical development of berries. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 2, n. 3, p. 187-94, Mar 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19258544> >.

SUDO, R. T. et al. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) in a rodent model of acute and neuropathic pain. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, p. 208, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26134625> >.

SWABY, R. F.; SHARMA, C. G.; JORDAN, V. C. SERMs for the treatment and prevention of breast cancer. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 8, n. 3, p. 229-39, Sep 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17440819> >.

TEIXEIRA, G. H. D. et al. Total Anthocyanin Content in Intact Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) and Jucara (*Euterpe edulis* Mart.) Fruit Predicted by Near Infrared Spectroscopy. **Hortscience**, v. 50, n. 8, p. 1218-1223, 2015.

TRIPATHY, D. et al. Induction of Apoptosis and Reduction of Endogenous Glutathione Level by the Ethyl-Acetate Soluble Fraction of the Methanol Extract of the Roots of *Potentilla fulgens* in Cancer Cells. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135890, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26284809> >.

VEIGA, J. B. Etnobotânica e etnomedicina na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé, baixo rio Negro: plantas antimaláricas, conhecimentos e percepções associadas ao uso e à doença. **Tese de Doutorado. Manaus: INPA/UFAM**, p. 174, 2011.

VILLACHICA, H. et al. **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia. Tratado de Cooperación Amazonica, Lima** 1996.

VILQUIN, P. et al. MicroRNA-125b upregulation confers aromatase inhibitor resistance and is a novel marker of poor prognosis in breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 15, n. 13, 2015.

VUONG, Q. V. et al. Botanical, Phytochemical, and Anticancer Properties of the Eucalyptus Species. **Chem Biodivers**, v. 12, n. 6, p. 907-24, Jun 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26080737> >.

WEIGELT, B. et al. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. **Lancet Oncol**, v. 11, n. 4, p. 339-49, Apr 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20181526> >.

WEN, L. W., D.; JIANG, Y.; PRASAD, K. N.; LIN, S.; JIANG, G.; HE, J.; ZHAO, M.; LUO, W.; YANG, B. Identification of flavonoids in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) leaf and evaluation of anticancer activities. **Jornal of Functional Foods** v. 6, p. 555 – 563, 2014.

WHO. **Early detection. Cancer control: knowledge into action: WHO guide for effective programmes.** ORGANIZATION, W. H. Geneva. module 3 2007.

_____. **World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base, Nº. 10 [Internet].** Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2010.

YAMAMORI, T. et al. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. **Free Radic Biol Med**, v. 53, n. 2, p. 260-70, Jul 15 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580337> >.

YANG, W. T.; ZHU, X. Z. [The introduction of 2012 WHO classification of tumours of the breast]. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**, v. 42, n. 2, p. 78-80, Feb 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23710911> >.

YESSOUFOU, K. E., H.O; MAHMOUD, E. A; SKALICKA-WOZNIAK, K. Antifungal, antibacterial and anticancer activities of *Ficus drupacea* L. stem bark extract and biologically active isolated compounds. **Industrial Crops and Products. Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 752–758, 2015.

ZAPATA-SUDO, G. et al. Oral treatment with *Euterpe oleracea* Mart. (acai) extract improves cardiac dysfunction and exercise intolerance in rats subjected to myocardial infarction. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 227, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25000822> >.

ZHANG, X. et al. Luminal breast cancer cell lines overexpressing ZNF703 are resistant to tamoxifen through activation of Akt/mTOR signaling. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72053, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23991038> >.

ZHAO, M. et al. Immunomodulatory and anticancer activities of flavonoids extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp. **Int Immunopharmacol**, v. 7, n. 2, p. 162-6, Feb 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17178382> >.

10. ANEXOS

Anexo 1. Depósito de pedido de patente

< Uso exclusivo do INPI >


INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 PROTOCOLO GERAL
 Data: 23/07/2015 013150000166
 VP16/07/2015

 QR 10 2015 017513 1

Espaço reservado para o protocolo
Espaço reservado para a etiqueta
Espaço reservado para o código QR




INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**
 - 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
 - 1.2 Qualificação: AUTARQUIA FERAL
 - 1.3 CNPJ/CPF: 062791030001-19
 - 1.4 Endereço Completo: AV. DOS PORTUGUESES, 1966, VILA BACANGA, SÃO LUÍS-MA
 - 1.5 CEP: 65080-805
 - 1.6 Telefone: (98) 32728710
 - 1.7 Fax:
 - 1.8 E-mail: nit-dapi@ufma.br

continua em folha anexa

2. **Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**
 "COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS ALCOÓLICOS OBTIDOS DOS CAROÇOS DE Euterpe oleracea MART. (AÇAÍ) E Euterpe edulis MART. (JUÇARA) E SUAS FORMAS FARMACÊUTICAS CONTENDO OS LIOFILIZADOS DOS DITOS EXTRATOS E USO TERAPÊUTICO DAS FORMULAÇÕES COMO TRATAMENTO DO CÂNCER".

continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão: do pedido N°** **Data de Depósito:**

5. **Prioridade:** Interna (66) Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

continua em folha anexa

Anexo 2. Lista de participantes da pesquisa

6.1 NOME: Dulcelena Ferreira Silva
6.2 QUALIFICAÇÃO: Doutora
6.3 CPF: 038 087 503 -91
6.4 ENDEREÇO COMPLETO: Rua Felipe Camarão, 40 , Vila Passos, São Luís-Ma
6.5 CEP:65000-000
6.6 TELEFONE: (98) 988871297
6.7 FAX:
6.8 E-MAIL: ddjonco@ig.com.br

6.1 NOME: Dayanne da Silva Freitas
6.2 QUALIFICAÇÃO: Mestranda
6.3 CPF: 02915771308
6.4 ENDEREÇO COMPLETO: Rua Alípio Moraes Filho, C 101, Cohab Anil – São Luís-MA.
6.5 CEP: 65050100
6.6 TELEFONE: (98) 982112792
6.7 FAX:
6.8 E-MAIL: daday.15@hotmail.com

6.1 NOME: Maria Célia Pires Costa
6.2 QUALIFICAÇÃO: Doutora
6.3 CPF: 012167163-15
6.4 ENDEREÇO COMPLETO: Rua das Figueiras, QD 01, C 5, Apto 502 – Edifício Rio do Vale – São Francisco – São Luís-MA.
6.5 CEP: 65076-150
6.6 TELEFONE: (98) 988380284
6.7 FAX:
6.8 E-MAIL: celiacosta@prof.elo.com.br