

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
ESCOLA DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

LARISSA GABRIELLY BARBOSA LIMA

Influência de extratos de abricó (*Mammea americana*), camapu (*Physalis angulata*) e uxi (*Endopleura uchi*) em linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro

RIO DE JANEIRO – RJ

2019

LARISSA GABRIELLY BARBOSA LIMA

Influência de extratos de abricó (*Mammea americana*), camapu (*Physalis angulata*) e uxi (*Endopleura uchi*) em linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata.

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, com requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientador: Dr. Anderson Junger Teodoro

B732 Barbosa Lima, Larissa Gabrielly
Influência de extratos de abricó (Mammea americana), camapu (Physalis angulata) e uxi (Endopleura uchi) em linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata. / Larissa Gabrielly Barbosa Lima. -- Rio de Janeiro, 2019.
86 f.

Orientador: Anderson Junger Teodoro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, 2019.

1. Câncer de próstata. 2. Futos. 3. Amazônia. 4. Compostos bioativos. 5. PC-3. I. Junger Teodoro, Anderson, orient. II. Título.

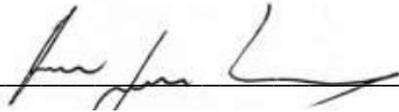
Larissa Gabrielly Barbosa Lima

Influência de extratos de abricó (*Mammea americana*), camapu (*Physalis angulata*) e uxi (*Endopleura uchi*) em linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito de obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Aprovado em: 28/06/2019

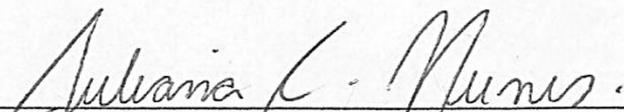
BANCA EXAMINADORA



Dr. Anderson Junger Teodoro
Orientador
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro



Dr. Leandro Miranda Alves
Membro titular externo
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Dra. Juliana Côrtes Nunes da Fonseca
Membro titular interno
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Primeiramente à Deus, que sempre me direciona e sempre está comigo. E à todos os meus familiares, em especial aos meus pais que sempre me incentivam em todos os momentos de minhas escolhas, e aos meus irmãos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que eu fizesse e concluísse esse mestrado, me dando forças para ser persistente.

À toda minha família, especialmente aos meus pais, Marluce Barbosa e Fred Lima, e aos meus irmãos Fred Junior, Diego e Laura, que sempre estão me apoiando, ajudando e me deram suporte para eu estar aqui.

À minha professora Mestre Lana Rosa que me ensinou todas as análises da cultura de células e me recebeu na Unirio com muito carinho, sendo sempre muito solícita, antes mesmo de eu mudar para o Rio de Janeiro.

Ao Joel que ajudou nas análises de antioxidantes, a Thuane, que foi minha parceira de curso, e a todos os colegas da pós-graduação.

Aos companheiros do laboratório de Ocnología Celular y Molecular da Universidade de Chile, em especial ao professor Héctor Contreras, por ser um professor maravilhoso, capaz de transmitir alegria a todos, e ao professor Enrique Castellon. À Gaciela que tanto me ajudou durante minha estadia em Santiago. À Cote, que teve paciência de me ensinar as análises, e a todos os companheiros de Santiago que me receberam de uma forma encantadora, serei eternamente grata!

Ao professores Ricardo e Cristina do Instituto biomédico da Unirio, por compartilharem de momentos descontraídos.

As minhas amigas, Gabi, Susi, Camila e Géssica que foram minha família no Rio de Janeiro.

Ao meu amigo Antônio Castagnino por sempre me dar um help nesta cidade.

Ao Manoel Nascimento por doar os frutos de camapu.

Ao professor Dr. Anderson Teodoro, por aceitar me orientar, e a Unirio.

À todos que de alguma forma me ajudaram ou me apoiaram durante o desenvolvimento deste trabalho.

Gratidão!

EPÍGRAFE

E para abrir diante as portas, que não se fecharam Eu irei diante de ti, endireitarei os caminhos tortuosos, Quebrarei as portas de bronze e despedaçarei as trancas de ferro. Se Deus é por nós, quem será contra nós.

Isaías 45:1-2; Romanos 8: 31

Resumo

O câncer de próstata é a neoplasia mais prevalente no homem, e a segunda causa de óbito. A região Amazônica contém uma gama de variedades de frutas com diversos aromas e sabores exóticos, que apresentam potencialidade econômica, social e nutricional, dentre elas encontra-se o abricó (*Mammea americana*), o camapu (*Physalis angulata*), e o uxi (*Endopleura uchi*). O consumo de frutas tem sido associado com a prevenção e baixa incidência de doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer, devido à elevada presença e ação de compostos bioativos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e elucidar o efeito dos extratos aquoso e etanólico de abricó, camapu e uxi, sobre a proliferação, ciclo celular e apoptose em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (PC-3). No presente estudo houve a avaliação dos compostos fenólicos totais e identificação do perfil metabólico por HPLC-MS^E dos extratos aquosos e etanólicos de abricó, camapu e uxi. Os extratos etanólicos extraíram maior quantidade de compostos fenólicos totais. O total de 293 compostos foram identificados no perfil fitoquímico dos extratos. Os extratos etanólicos apresentaram maior atividade antioxidante quando comparados aos extratos aquosos, mensurada pelos ensaios de ABTS, DPPH, FRAP e ORAC. As análises de viabilidade celular, ciclo celular e apoptose foram realizadas por meio dos métodos MTT e por citometria de fluxo. Os resultados de MTT evidenciaram que todos os extratos apresentam citotoxicidade em relação as células PC-3, nas concentrações de 20 e 40 mg/mL, no qual o extrato aquoso de camapu apresentou a maior redução da viabilidade celular com redução máxima de 85,62% quando incubado na concentração de 40 mg/mL, e o extrato etanólico de uxi com redução máxima de 77,69%, nesta mesma concentração, após 24 horas de tratamento. A análise do ciclo celular revelou que os extratos etanólicos de abricó, camapu e uxi (20mg/mL) diminuíram a porcentagem de células na fase G₀/G₁ e aumentou na fase G₂/M, sendo capaz de induzir apoptose nas células prostáticas. Todos os extratos foram capazes de induzir apoptose, com incremento máximo de 80,47% na taxa de células apoptóticas para o extrato aquoso de camapu (40mg/mL). Neste sentido, os extratos destes frutos apresentaram elevado potencial bioativo, assim como se mostraram como potentes inibidores do crescimento celular, promotores de modulação de ciclo celular e capazes de aumentar a morte em células de câncer de próstata (PC-3), sugerindo um efeito regulador nessa linhagem, dependente do tipo de extrato e dose utilizada. Neste sentido, os resultados obtidos abrem uma série de perspectivas sobre a utilização dos extratos dos frutos de abricó, camapu e uxi na prevenção e tratamento do câncer de próstata.

Palavras-chaves: frutas, compostos bioativos, câncer de próstata.

Abstract

Prostate cancer is the most prevalent neoplasm in man, and the second leading cause of death. The Amazon region contains a range of fruit varieties with diverse exotic flavors and aromas, which present economic, social and nutritional potential, among which are apricot (*Mammea americana*), camapu (*Physalis angulata*), and uxi (*Endopleura uchi*). Fruit consumption has been associated with the prevention and low incidence of chronic noncommunicable diseases, such as cancer, due to the high presence and action of bioactive compounds. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antioxidant activity and to elucidate the effect of the aqueous and ethanolic extracts of apricot, camapu and uxi on the proliferation, cell cycle and apoptosis in human prostate adenocarcinoma (PC-3) cell line. In the present study, the evaluation of the total phenolic compounds and the identification of bioactive compounds by HPLC-MSE of the aqueous and ethanolic extracts of apricot, camapu and uxi were performed. Ethanolic extracts extracted more total phenolic compounds. The total of 293 compounds were identified in the phytochemical profile of the extracts. Ethanolic extracts presented higher antioxidant activity when compared to aqueous extracts, measured by the ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays. Cell viability, cell cycle and apoptosis analyze were performed using MTT methods and flow cytometry. The MTT results showed that all extracts presented cytotoxicity in relation to PC-3 cells, at concentrations of 20 and 40 mg/mL, in which the aqueous extract of camapu showed the greatest reduction in cell viability with a maximum reduction of 85.62% when incubated at the concentration of 40 mg/mL, and the ethanolic extract of uxi with a maximum reduction of 77.69%, at this same concentration, after 24 hours of treatment. Cell cycle analysis revealed that the ethanol extracts of apricot, camapu and uxi (20 mg/mL) decreased the percentage of cells in the G₀/G₁ phase and increased in the G₂/M phase, being able to induce apoptosis in the prostatic cells. All extracts were able to induce apoptosis, with a maximum increase of 80.47% in the apoptotic cell rate for the aqueous extract of camapu (40 mg/mL). In this sense, the extracts of these fruits, present bioactive potential, as well as potent inhibitors of cell growth, promoters of cell cycle modulation and capable of increasing death in prostate cancer cells (PC-3), suggesting a regulatory effect in this cell line, depending on the type of extract and dose used. In this sense, the results obtained open a series of perspectives on the use of extracts of fruits of apricot, camapu and uxi in the prevention and treatment of prostate cancer.

Keywords: fruits, bioactive compounds, prostate cancer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Representação da localização anatômica da próstata
- Figura 1 Modelo hipotético de progressão de câncer de próstata
- Figura 3 Esquema de graduação do escore de Gleason
- Figura 4 Sistema TNM
- Figura 5 Linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (PC-3)
- Figura 6 Possíveis efeitos quimiopreventivos de compostos bioativos presente em alimentos
- Figura 7 Abricó (*Mammea Americana*)
- Figura 8 Camapu (*Physalis angulata*)
- Figura 9 Uxi (*Endopleura Uchi*)
- Figura 10 Compostos fenólicos totais em extrato aquoso de abricó (AA, camapu (CA) e uxi (UA)) e etanólico (E) de abricó (AE), camapu (CE), e uxi (UE).
- Figura 11 Projeção variável dos compostos fenólicos tentativamente identificáveis em extratos aquosos e etanólicos de abricó, camapu e uxi (CAP).
- Figura 12 Heat map gerado a partir de análise hierárquica de agrupamentos (HCA) baseada na intensidade de 30 compostos fenólicos em extratos aquoso e etanólico de abricó, camapu e uxi.
- Figura 13 Coeficiente de correlação entre os diferentes métodos de antioxidante (ABTS, DPPH, FRAP e ORAC) e compostos fenólicos totais (CF) em extratos aquoso (A) e etanólico (B) de abricó (A), camapu (C) e uxi (U).
- Figura 14 Efeito do extrato aquoso (AA) e etanólico (AE) de abricó (A), do extrato de camapu aquoso (CA) e etanólico (CE) (B) e do extrato de uxi aquoso (UA) e etanólico (EU) (C) sobre a viabilidade celular da linhagem PC-3 após 24 horas de tratamento.
- Figura 15 Efeito do extrato aquoso (AA) e etanólico (AE) de abricó sobre a progressão do ciclo celular em células PC-3, 24 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em controle, abricó água 20mg/mL (AA20), abricó água 40mg/mL (AA40), abricó etanol 20 mg/mL (AE 20) e abricó etanol 40 mg/mL (AE40). Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas (20mg/mL e 40mg/mL) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (*p <0,05).

- Figura 16 Efeito do extrato aquoso (CA) e etanólico (CE) de camapu sobre a progressão do ciclo celular em células PC-3, 24 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em controle, camapu água 20mg/mL (CA20), camapu água 40mg/mL (CA40), camapu etanol 20 mg/mL (CE 20) e camapu etanol 40 mg/mL (CE40). Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas (20mg/mL e 40mg/mL) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (*p <0,05).
- Figura 17 Efeito do extrato aquoso (UA) e etanólico (UE) de uxi sobre a progressão do ciclo celular em células PC-3, 24 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em controle, uxi água 20mg/mL (UA20), uxi água 40mg/mL (UA40), uxi etanol 20 mg/mL (UE 20) e uxi etanol 40 mg/mL (UE40). Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas (20mg/mL e 40mg/mL) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (*p <0,05).
- Figura 18 Efeitos dos AA, CA, e UA sobre o processo de morte programada em células PC-3 24h após a incubação. As análises por citometria de fluxo das células não tratadas (CT) estão ilustradas em A e das células tratadas em B (20mg/mL) e C (40mg/mL).
- Figura 19 Efeitos dos AE, CE, e UE sobre o processo de morte programada em células PC-3 24h após a incubação. As análises por citometria de fluxo das células não tratadas (CT) estão ilustradas em A e das células tratadas em B (20mg/mL) e C (40mg/mL).

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Classes de compostos fenólicos dos extratos de água (A) etanólico (E) de extratos de abricó, camapu e uxi
- Tabela 2 Atividade antioxidante dos extratos de abricó, camapu e uxi pelos métodos de ABTS, DPPH, FRAP e ORAC.
- Tabela 3 Efeito dos extratos aquoso e etanólico de abricó, camapu e uxi em diferentes concentrações (20mg/mL e 40mg/mL) sobre o processo de morte celular por apoptose nas células de adenocarcinoma de próstata humana (PC-3) 24h após a incubação.

LISTA DE SIGLAS

CaP – Câncer de próstata

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPPH – (1,1-difenil-2picrilidrazil)

ABTS – (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico)

FRAP – Capacidade ferro-redutora

AGE – Ácido gálico equivalente

G₀ – Estado de quiescência das células durante o ciclo celular

G₁ – Primeira fase do ciclo celular

G₂ – Segunda fase do ciclo celular

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IC₅₀ – Concentração necessária para inibir 50% da atividade de um composto

M – Mitose

AA – Extrato aquoso de abricó

AE – Extrato etanólico de abricó

CA – Extrato aquoso de camapu

CE – Extrato etanólico de camapu

UA – Extrato aquoso de uxi

UE – Extrato etanólico de uxi

MTT – (brometo de 3-[4,5dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio)

ORAC – Capacidade de absorção de radical de oxigênio

PBS – Solução salina tamponada (do inglês, phosphate buffered saline)

PC-3 – Linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano

PSA – antígeno prostático específico

S – Fase de replicação do DNA durante o ciclo celular

MMP-9 - Metaloproteinases da matriz extracelular

TEM - Transição epitelial-mesenquimal

Sumário

1.	Introdução.....	16
2.	Revisão Bibliográfica.....	18
2.1.	Câncer de Próstata (CaP)	18
2.1.2.	Sinais, sintomas e fatores de risco.....	20
2.1.3.	Diagnóstico	22
2.1.4.	Estadiamento da Doença	23
2.1.5.	Terapêutica	25
2.2.	Modelo de estudo em câncer de próstata- linhagem celular PC-3	26
2.3.	Compostos bioativos e câncer de próstata.....	27
2.4.	Frutos da região amazônica – fontes de compostos bioativos	33
2.4.1.	Abricó	33
2.4.2.	Camapu.....	34
2.4.3.	Uxi	36
3.	Justificativa	38
4.	Objetivos.....	39
4.1.	Objetivo geral	39
4.2.	Objetivos específicos.....	39
5.	Material e Métodos.....	40
5.1.	Matéria-prima e obtenção dos extratos	40
5.2.	Elaboração dos extratos	40
5.3.	Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH.....	41
5.4.	Análise determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do Ferro (FRAP)	41
5.5.	Análise de atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS ^{•+} ..	42
5.6.	Determinação de compostos fenólicos totais	42
5.7.	Ensaio ORAC	42
5.8.	Caracterização do perfil fitoquímico por UPLC-MS ^E	43
5.9.	Cultura de células e protocolo de tratamento	45
5.10.	Incubação dos compostos na linhagem celular de próstata.....	45
5.11.	Ensaio de viabilidade e proliferação celular (MTT)	45
5.12.	Análise de ciclo celular.....	46
5.13.	Avaliação da indução da apoptose	46
6.	Análises estatísticas	47

7.	Resultados	48
7.1.	Compostos fenólicos totais.....	48
7.2.	Caracterização do perfil de compostos bioativos por UPLC-MS ^E	49
7.3.	Atividade antioxidante	54
7.4.	Correlação entre compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante	55
7.5.	Efeitos dos extratos de abricó, camapu e uxi em linhagem de célula de câncer de próstata.....	56
7.5.1.	Viabilidade celular - MTT.....	56
7.5.2.	Ciclo Celular	58
7.5.3.	Apoptose	61
8.	Discussão	65
9.	Conclusão	74
10.	Referências	76

1. Introdução

O câncer de próstata (CaP) é a neoplasia mais prevalente no homem, e a segunda causa de óbito, precedido apenas pelo câncer de pulmão. Sua incidência vem aumentando de forma contínua nas últimas décadas, devido, principalmente, ao aumento da perspectiva de vida e ao estilo de vida ocidental (FERMOZELLI, 2015).

Alguns fatores aumentam a probabilidade do desenvolvimento do câncer de próstata, como: idade, etnia, histórico familiar, dieta, além da influência dos componentes genéticos e de fatores epigenéticos (MARON *et al.*, 2010).

A suspeita do câncer de próstata pode ser confirmada por meio de realização de exames de toque retal, elevação dos valores do antígeno prostático específico (PSA), ou ambos. Caso a suspeita de câncer de próstata permanecer após a avaliação do PSA e toque retal faz-se necessário realizar a biópsia da próstata (SOUZA, G., 2015).

Dentre os fatores que aumentam o risco de desenvolvimento de câncer de próstata, a alimentação é provavelmente a de maior impacto no desenvolvimento e progressão deste carcinoma. Dietas ricas em alimentos vegetais e fibras, e pobres em gorduras e produtos de origem animal, diminuem o índice de mortalidade em consequência desta doença (ADJAKLY *et al.*, 2015). Sendo assim, a obesidade é um importante fator de risco na progressão do câncer de próstata, e tem sido associada à agressividade, progressão e mortalidade específica por câncer, uma vez que 77% homens diagnosticados com CaP podem ser classificados como com sobrepeso ou obesos (ALGOTAR *et al.*, 2019).

Os alimentos são responsáveis pelo fornecimento de nutrientes essenciais ao funcionamento do organismo humano, além destes também são responsáveis pelo provimento de compostos bioativos, substâncias que promovem benefícios à saúde e diminuem o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DAVIS *et al.*, 2015).

O efeito protetor dos compostos bioativos tem sido atribuído as suas propriedades biológicas fomentadoras de saúde, tais como atividade

antioxidante, anti-inflamatória, e hipocolesterolêmica de nutrientes como as vitaminas (C, A e E), compostos fenólicos e carotenoides. O consumo de frutas têm sido associado com a prevenção e baixa incidência de doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer, devido à elevada presença e ação desses compostos (SOARES *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, muitos compostos bioativos têm sido isolados de plantas e frutos, e testados sua eficácia citotóxica em diversos tipos de câncer. Muitos destes compostos são capazes de inibir o crescimento de câncer de próstata, uma vez que tais substâncias demonstraram *in vitro* e *in vivo*, sua capacidade de modular os processos celulares, induzir a apoptose e autofagia, apresentando efeitos quimiopreventivos e/ou quimioterápico, e antiproliferativo (GIOTI; TENTA, 2015).

A Amazônia abriga inúmeros frutos nativos que podem preencher tais características anticâncer e ter potencial para serem explorados como alimentos com alto teor de compostos bioativos (SANTOS *et al.*, 2015). Uma vez que é constituída por frutas com características sensoriais inigualáveis e com elevada presença de nutrientes. Espécies frutíferas como o abricó (*Mammea americana*), o camapu (*Physalis angulata*), e o uxi (*Endopleura uchi*), de sabor característico e bastante consumido pelos habitantes locais, apresentam importante relevância social, econômica e nutricional.

No entanto, há pouca informação científica sobre o potencial bioativo desses frutos, portanto, estudos relacionados à sua capacidade antioxidante, podem incentivar seu consumo, além de gerar novas alternativas de uso, agregando valor a eles. Assim como a descoberta de um possível efeito desses compostos sobre o surgimento e/ou proliferação das células causadoras do câncer de próstata pode oferecer um potencial significativo para a prevenção desta doença.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Câncer de Próstata (CaP)

A próstata é um órgão do sistema reprodutor masculino que auxilia na produção e armazenamento do fluido seminal, sendo uma secreção viscosa e alcalina e tendo por função neutralizar a acidez residual acumulada na uretra, assim como a acidez natural da vagina, melhorando a mobilidade do espermatozoide e atribuindo o aspecto leitoso e odor característico do sêmen. Nos adultos, a próstata em um homem saudável apresenta cerca de três centímetros de comprimento e pesa em torno de vinte gramas, sendo localizada na pelve, abaixo da bexiga urinária e na frente do reto, envolvendo a parte inicial da uretra (Figura 1) (SARRIS *et al.*, 2018).

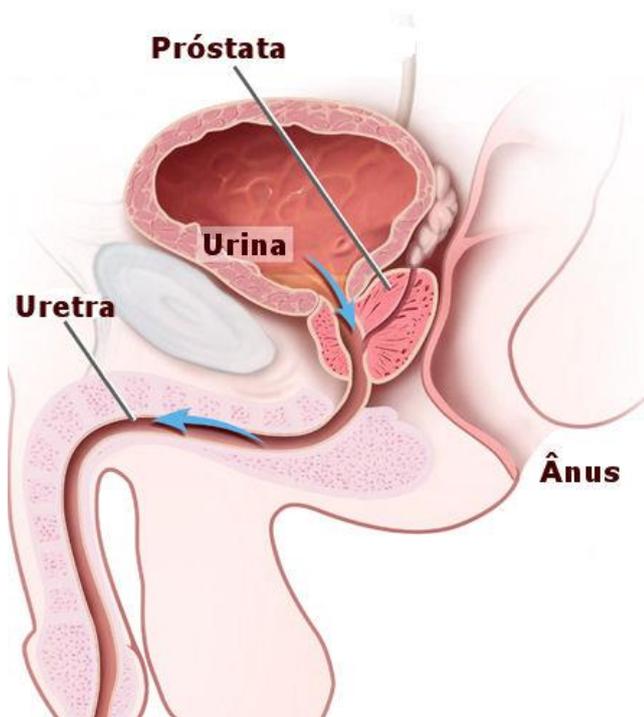


Figura 1. Representação da localização anatômica da próstata.
Fonte: Modificado de BRASIL, 2017.

O câncer pode ser identificado como uma patologia multicausal crônica, discriminado pelo crescimento desordenado de células. Seu desenvolvimento acontece quando há alterações do DNA celular, que se armazenam com o tempo. Quando essas células lesadas fogem dos mecanismos envolvidos na

proteção do organismo contra o crescimento e a disseminação das mesmas, é constituída uma neoplasia (OLIVEIRA, H. S. D. DE; BONETI; PIZZATO, 2010).

O câncer de próstata é considerado como um adenocarcinoma, ou câncer glandular, pois inicia quando as células glandulares secretoras de sêmen da próstata sofrem mutações e passam a ser células cancerosas. A região da próstata em que o adenocarcinoma é mais comum é a zona periférica. A princípio pequenos agrupamentos de células cancerosas se mantêm confinados às glândulas prostáticas normais (Figura 2 (estágio A)), uma condição conhecida como *in situ* ou neoplasia intraepitelial prostática. No decorrer do tempo essas células cancerosas começam a se multiplicar (Figura 2 (estágio B)) e se espalhar para o tecido prostático circundante (o estroma) formando um tumor (Figura 2 (estágio C)) (Dornas *et al.*, 2008).

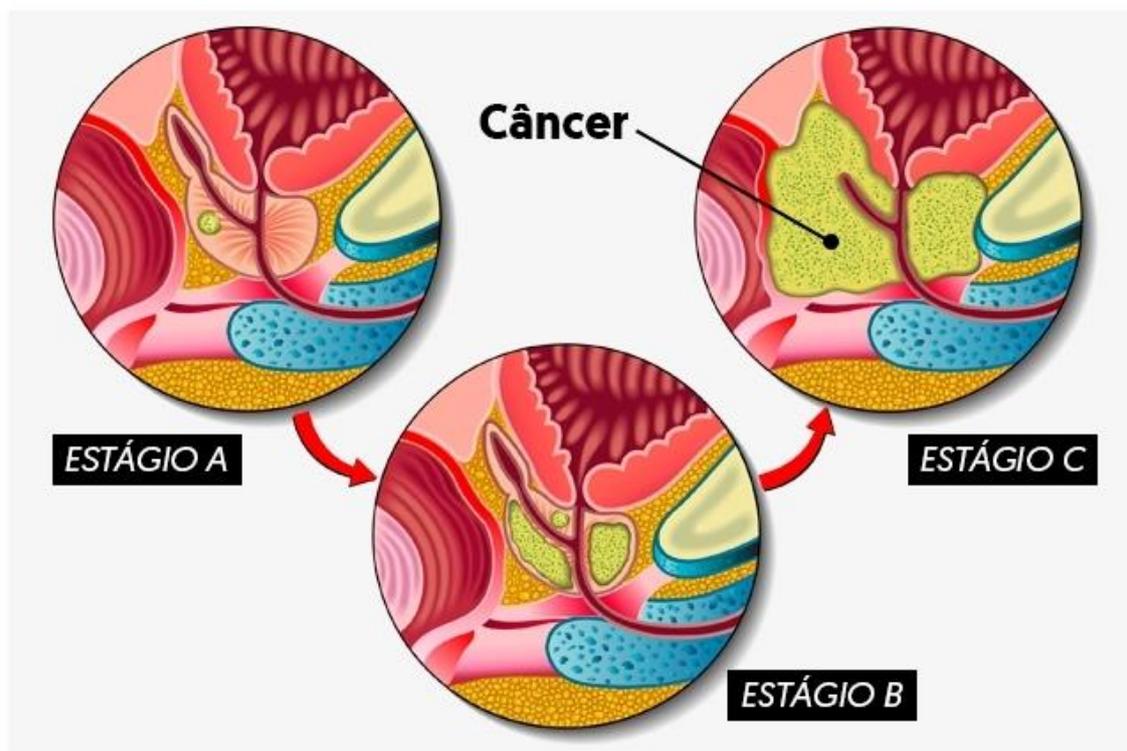


Figura 2. Modelo hipotético de progressão de câncer de próstata. Visão esquemática da progressão de um câncer, partindo do tecido normal (estágio A), progredindo para um carcinoma *in situ* (estágio B), invasivo e metastático (estágio C).

Fonte: Modificado de Ribeiro, 2018.

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2017), a estimativa para o Brasil, biênio 2018-2019 aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos

novos de câncer, estimando-se 68.220 novos casos de câncer de próstata, correspondendo a um risco estimado de 66,12 casos novos a cada 100 mil homens. O câncer de próstata é o mais presente entre os homens em todas as regiões do país, sendo 96,85/100 mil no Sul, 66,75/100 mil no Centro-Oeste, 69,83/100 mil no Sudeste, 56,17/100 mil no Nordeste e 29,41/100 mil na Norte, ocupando 15ª posição em mortes por câncer, no sexo masculino, representando cerca de 6% do total de mortes por câncer no mundo.

2.1.2. Sinais, sintomas e fatores de risco

A inflamação da próstata pode ser considerada como o primeiro sinal para o surgimento do câncer de próstata (CaP), uma vez que as células que causam inflamação têm capacidade de desestabilizar o genoma das células, danificar o DNA ou afetar os *checkpoints* e os sistemas de reparo, e uma vez a instabilidade genética implantada, pode resultar na neoplasia prostática (DUARTE, 2016).

Pacientes com câncer de próstata em sua fase inicial, suscetível a tratamento curativo, não apresentam qualquer sinal ou sintoma relacionado à neoplasia. Os sintomas só se apresentarão na doença localmente avançada ou na doença metastática, onde o osso é o lugar em que apresenta mais ocorrência de metástases, ocorrendo no esqueleto axial (bacia, vértebras e fêmur proximal), no entanto, casos de metástase viscerais (fígado, pulmões e cérebro) também podem ocorrer, principalmente quando acontecem casos de metastáticos resistentes à castração (MORI, 2016).

A partir disto, e com o aumento do tamanho prostático, podem-se ter como primeiros sinais e sintomas o aparecimento de polaciúria, redução do fluxo urinário e noctúria, dor para urinar, dor para ejacular, presença de sangue na urina ou no sêmen, e como sintoma mais grave, perda do controle da bexiga ou intestino, que estão relacionados a pressão que o tumor exerce sob a medula espinhal (OLIVEIRA, 2016).

O processo da carcinogênese se origina por condições multifatoriais, e esses fatores podem agir em conjunto ou em conjunto, e na promoção do câncer de próstata. A idade do paciente é um fator de destaque, uma vez que esta neoplasia é considerada o câncer da terceira idade, dado que cerca de três

quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos, e que tanto a incidência, como a mortalidade, aumentam exponencialmente após a idade de 50 anos (GOMES *et al.*, 2008).

A origem étnica, histórico familiar e predisposição genética, também são fatores de risco para o desenvolvimento desta patologia, assim como fatores de riscos exógenos, como dieta, obesidade, padrão de comportamento sexual, consumo de álcool, exposição à radiação ultravioleta e exposição ocupacional também podem causar o aumento da probabilidade de mutações acumularem-se no material genético de cada indivíduo, permitindo o aparecimento de células cancerosas (HEIDENREICH *et al.*, 2012; MACHADO, 2007).

A etnia negra apresenta maior incidência de casos de câncer de próstata, e casos de história com parente de primeiro grau, particularmente avós, pais e irmãos, pode levar ao aumento em até duas a três vezes o desenvolvimento desta doença, e aumentando para até cinco vezes mais se mais um mais de um parente for afetado (CASTILLEJOS-MOLINA; GABILONDO-NAVARRO, 2015).

Mutações em alguns genes, como BRCA1 e BRCA2 mostraram ser risco independente para o desenvolvimento do câncer de próstata com chances aumentadas em duas e sete vezes, respectivamente. Além disso, nesses pacientes a agressividade tumoral se mostrou bem superior. Mutações em outra região do DNA, na região 8q24 também mostraram os mesmos resultados (SARRIS *et al.*, 2018).

O índice de mortalidade em países com alto desenvolvimento econômico, como Ásia, África e Europa Oriental e Central, têm crescido de forma considerável, as razões não estão totalmente esclarecidas, no entanto, podem estar relacionadas a fatores de risco como obesidade, dieta rica em gordura e sedentarismo (SILVA *et al.*, 2015). E de acordo com os dados do Instituto Nacional do Câncer (2002), tem sido apontada uma relação positiva entre o alto consumo energético total e ingestão de carne vermelha, gorduras e leite e o risco de câncer da próstata, assim como o consumo das aminas heterocíclicas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, advindas do preparo de alguns alimentos. No entanto, o consumo de frutas, vegetais ricos em carotenóides e leguminosas têm sido relacionados a um efeito protetor.

A prevenção desta doença pode levar a um diagnóstico em fases iniciais permitindo melhores resultados no tratamento de câncer de próstata.

2.1.3. Diagnóstico

No momento atual, para o diagnóstico desta neoplasia são utilizados testes de Antígeno Prostático Específico (PSA), toque retal, biópsia e rebiópsia de próstata, pois seu desenvolvimento é normalmente acompanhado por um aumento nos níveis plasmáticos de PSA, então, qualquer intervenção que afeta esses níveis pode indicar o aumento na progressão da doença (BERTOLDO; PASQUINI, 2010).

O PSA é uma protease que pertence a família calicreína, que têm como função a solubilização do esperma após a ejaculação, e sua alteração no nível sanguíneo não é específico ao CaP, pois este antígeno é produzido pelas células epiteliais da próstata, podendo estar elevado em casos de prostatites, hiperplasia benigna, infartos, pós-manipulação mecânica (biópsia, ressecção transuretral, cistoscopia) e ejaculação, tendo como limite máximo da normalidade o nível estabelecido de 4 ng/mL, e quando relacionado aos casos de câncer próstata sua avaliação deve ser realizada em conjunto com outros métodos clínicos, a exemplo do toque retal (LIMA; SILVA; ALVES, 2017).

O toque retal permite saber dados sobre o volume, consistência, presença de irregularidade, limites, sensibilidade e mobilidade da próstata, sendo possível diagnosticar em até 70% da superfície deste órgão masculino, que em casos de casos de próstata, apresenta uma massa irregular e consistência endurecida. Por meio deste exame é possível detectar pequenos nódulos e avaliar a extensão local da doença, e sua realização com frequência é uma das maneiras para diminuir a mortalidade por este câncer (SANTOS; SOUZA, 2017).

Outro método para diagnosticar o CaP, é por meio da biópsia, sendo considerada o método mais eficaz. Outro método usado para diagnosticar o CaP é a biópsia da próstata, que é indicada quando há um elevado aumento do nível do PSA do paciente, sendo um exame que pode ser confirmatório para esta neoplasia, no entanto, devido a alteração do antígeno apontar a presença de outras doenças, a realização da biópsia prostática pode gerar resultados falso-

negativos entre 10 a 22% dos casos. Neste caso, é necessária que os pacientes com fortes sinais de câncer e biópsia negativa, seja realizada uma rebiópsia (BACELAR JUNIOR *et al.*, 2015). Os diagnósticos precoces aumentam a possibilidade de cura para alguns cânceres e reduzem a morbidade resultante da doença e de seu tratamento.

2.1.4. Estadiamento da Doença

Confirmado o diagnóstico de câncer de próstata se faz necessário saber o grau em que esta patologia se encontra, em que o meio mais utilizado para saber o estadiamento desta neoplasia é por meio do score de Gleason, que tem como objetivo informar sobre a provável taxa de crescimento do tumor e sua tendência à disseminação, além de ajudar na determinação do melhor tratamento para o paciente. E a avaliação do escore se baseia na análise anatomopatológica a partir de tecido prostático obtido por cirurgia ou biópsia (DUARTE, 2016).

Na graduação histológica, as células do câncer são comparadas às células prostáticas normais. Quanto mais diferentes das células normais forem as células do câncer, mais agressivo será o tumor e mais rápida será sua disseminação. A escala de graduação do câncer da próstata varia de 1 a 5, com o grau 1 sendo a forma menos agressiva (MOREIRA *et al.*, 2012).

Para se obter o escore total da classificação de Gleason, que varia de 2 a 10, o patologista gradua de 1 a 5 as duas áreas mais frequentes do tumor e soma os resultados. Quanto mais baixo o escore de Gleason, melhor será o prognóstico do paciente. Escores entre 2 e 4 significam que o câncer provavelmente terá um crescimento lento. Escores intermediários, entre 5 e 7, podem significar um câncer de crescimento lento ou rápido e este crescimento vai depender de uma série de outros fatores, incluindo o tempo durante o qual o paciente tem o câncer. Escores do final da escala, entre 8 e 10, significam um câncer de crescimento muito rápido (Figura 3) (BERTOLDO; PASQUINI, 2010).

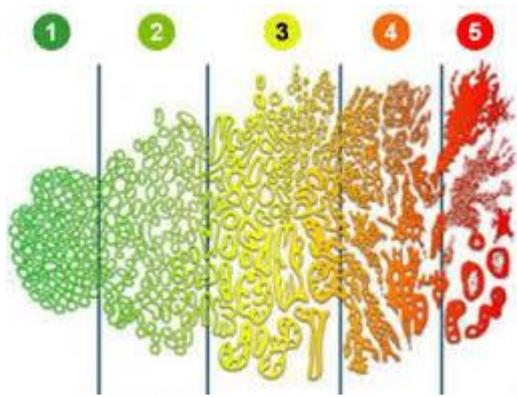


Figura 3. Sistema de graduação de Score de gleason.
Fonte: Sanches, 2018.

Assim, a classificação do câncer de próstata segue o sistema TNM de 2002, em que esse sistema avalia a dimensão do tumor primário (T), a extensão de sua disseminação para os linfonodos locais (N) e a presença, ou não, de metástase à distância (M), que pode ser observado na figura 4 (DAMIÃO *et al.*, 2015).

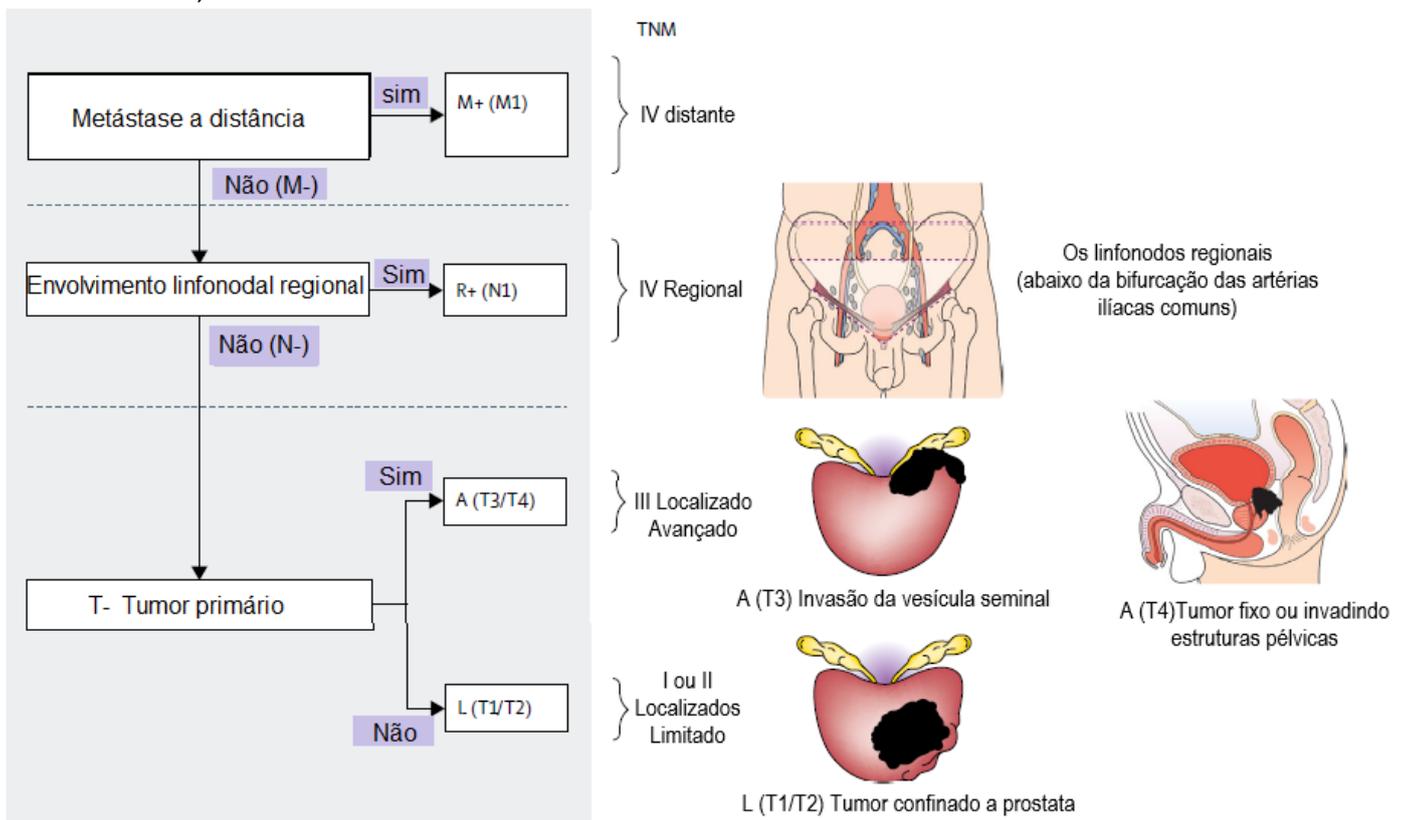


Figura 4. Sistema TNM.
Fonte: Modificado por Parkin, 2019.

2.1.5. Terapêutica

A partir da detecção da neoplasia as principais propostas terapêuticas atualmente disponíveis são a conduta expectante como a observação e o tratamento medicamentoso, a prostatectomia radical, a radioterapia, o bloqueio androgênico e a quimioterapia (RAMOS *et al.*, 2018). E em casos de câncer de próstata de baixo grau em homens idosos, não é necessário tratamento, e ultimamente têm-se experimentado tratamento local para câncer metastático, principalmente para os casos oligometastáticos (GUO *et al.*, 2019).

A prostatectomia radical é o tratamento cirúrgico indicado para câncer próstata localizado, sendo indicado com base no risco de reaparecimento da doença, em que é escolhido para CaP com diagnóstico de risco baixo a intermediário, com estimativa de vida superior a dez anos. O acompanhamento após este tratamento é realizado com análises em séries de PSA, e caso haja reincidência da patologia, pode ser complementado com exame de toque retal e exames de imagem (DAMIÃO *et al.*, 2015).

Dentre as opções de tratamento, a radioterapia, geralmente, é indicada nos casos de tumores localizados, sendo uma terapêutica local, com aplicação delimitada e específica, podendo ser utilizada de forma isolada ou em combinação com outro tratamento. Ainda que mantenha a integridade dos órgãos, os pacientes podem experimentar inúmeros efeitos colaterais ou reações adversas, comuns às diferentes modalidades de radioterapia, como os sintomas miccionais irritativos, proctite em 70% a 80% dos casos, retenção urinária e disfunção erétil (em 45% dos pacientes) (GROZESCU; POPA, 2017).

Outra técnica terapêutica é a supressão de andrógenos testiculares que tem como objetivo diminuir a atividade da testosterona a níveis de castração, uma vez que estes favorecem o crescimento de CaP. No entanto, este método apresenta diversos efeitos colaterais, como perda da libido, anemia, ginecomastia, instabilidade emocional, fadiga, entre outros, que podem ser minimizados por meio de uma boa alimentação e realização de atividades físicas (CRUZ, 2015).

Em casos de pacientes com câncer de próstata metastáticos resistente à castração, faz-se necessário o uso da quimioterapia, na qual consiste em uma

terapia citotóxica, em que o primeiro quimioterápico com benefício confirmado nesta patologia foi o docetaxel (HEIDENREICH *et al.*, 2012).

2.2. Modelo de estudo em câncer de próstata- linhagem celular PC-3

O uso de linhagem celular é um dos principais meios para o estudo de câncer, uma vez que permite analisar o perfil biológico de substâncias e extratos bioativos, identificar as propriedades funcionais das células, como proliferação, indução a apoptose, entre outras. Entre as linhagens de câncer de próstata mais utilizadas na pesquisa, encontra-se a PC-3, proveniente de adenocarcinoma primário metastático, exibindo maior agressividade tumoral, permitindo seu crescimento *in vitro* (PIANTINO, 2009).

Esta linhagem de células foi determinada em 1979, em homem branco com grau IV de câncer de próstata, através da metástase em osso. São células hormônio independentes, portanto, não respondem aos andrógenos, glicocorticoides ou a fatores de crescimento de fibroblastos. E seu crescimento ocorre em monocamada, em que a maioria das células tem características poligonais, com nucléolos abundantes e aspecto granular, com fenótipo alongado (Figura 5) (SOUZA, G., 2015).

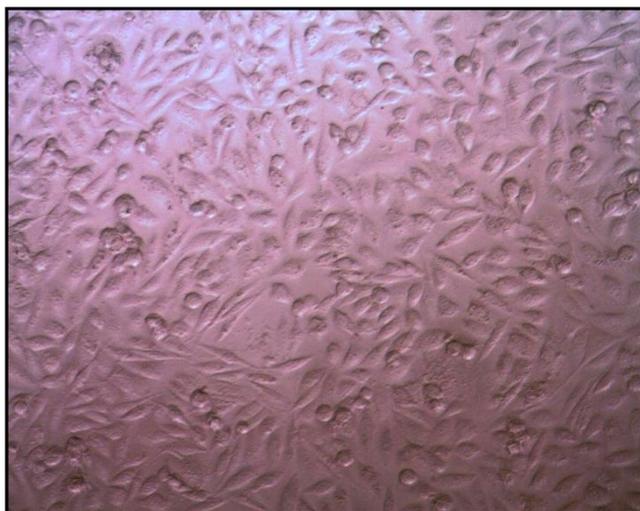


Figura 5. Linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (PC-3).
Fonte: Autor

O mecanismo de metástase em osso exige que as células PC-3 adquiram características que lhe permitam diferenciar-se do tumor primitivo e entrar na circulação sanguínea e firma-se no osso, onde deverão encontrar boas condições para seu desenvolvimento, condicionados a fortes interações com o tecido ósseo. O câncer de próstata normalmente está relacionado a metástases de aspecto osteosclerótico ou osteoblástico (VISCARDI, 2018).

Uma vez apresentada tais características, a utilização da linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano PC-3 tratadas com extratos de frutos da Amazônia, pode resultar em um efeito benéfico na prevenção de CaP com metástase óssea.

2.3. Compostos bioativos e câncer de próstata

As ingestão de frutas e vegetais, têm sido considerado nos últimos anos algo de suma importância, uma vez que apresentam muitos nutrientes, e tal característica têm sido ligada a prevenção do câncer, devido especialmente a presença de fibras alimentares, vitaminas, minerais, carotenóides, dentre outros fitoquímicos. Os vegetais crucíferos e produtos de tomate são os que apresentam especial interesse, uma que vez que podem conter efeitos quimiopreventivos dos indóis, isotiocianatos e licopeno (PETIMAR *et al.*, 2017).

Há indícios de que o surgimento do câncer de próstata é favorecido pelos hábitos alimentares ocidentais, como o consumo de alimentos hipercalóricos e hiperlipídicos, ricos em ácidos graxos saturados, assim como pobre em vitamina E, selênio, licopeno e fibras. Nesse sentido, recomenda-se uma alimentação com baixo teor de gordura animal, hábito comum nos países onde a incidência da doença é baixa (COSTA; MATIAS, 2014).

SHAMI; MOREIRA (2004) descrevem que o consumo de frutas e verduras reduzem o risco de aparecimento de alguns tipos de câncer, e que o consumo abundante de tomate e seus derivados pode diminuir em 35% os riscos de câncer da próstata. O efeito benéfico do tomate é resultante da presença de grandes quantidades de licopeno, e também, a complementação dietética com vitamina E e selênio pode promover um efeito protetor contra o câncer da próstata.

A alta ingestão de frutas e vegetais pode estar associada com redução da oxidação do ácido desoxirribonucleico (DNA), lesão e inflamação de baixo grau, além de aumentar atividade das enzimas de desintoxicação. Além disso, diferentes tipos de frutas e vegetais consumidos podem fornecer compostos bioativos com diferentes ações no câncer de próstata (PEREZ-CORNAGO *et al.*, 2017).

O conhecimento de que uma dieta habitual oferece, além dos macro e micronutrientes essenciais, alguns compostos químicos, encontrados em sua maioria em frutas e hortaliças, e que desempenham uma potente atividade biológica, já foi comprovada por diversos pesquisadores, no quais esses compostos são chamados de fitoquímicos ou de compostos bioativos e podem desempenhar diversas funções benéficas à saúde humana (JERONIMO, 2016).

Estas substâncias mesmo em baixas concentrações, quando comparadas a um substrato oxidável, diminuem ou inibem a oxidação desse substrato. O sistema de anti-oxidação é composto por agentes enzimáticos e não-enzimáticos, que podem estar presentes no organismo ou nos alimentos ingeridos, apresentando diversas estruturas químicas e funções biológicas. A maioria dos compostos bioativos são metabólitos secundários das plantas e normalmente, são resultantes dos sistemas de defesa destas contra a radiação ultravioleta ou às agressões de insetos (COSTA; RIBEIRO; BARBOSA, 2014).

Os compostos bioativos existentes nos alimentos podem agir de diferentes formas, tanto no que se refere aos alvos fisiológicos como aos seus mecanismos de ação. A ação antioxidante, presente nesses compostos deve-se ao potencial de óxido-redução de determinadas moléculas, à capacidade dessas moléculas em competir por sítios ativos e receptores nas diversas estruturas celulares ou, ainda, à modulação da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em mecanismos intracelulares de defesa contra processos oxidativos degenerativos de estruturas celulares (DNA, membranas). Alimentos de origem vegetal são a principal fonte de compostos bioativos, dos quais o metabolismo humano também necessita (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009).

Os compostos bioativos que apresentam capacidade antioxidante têm sido associados à proteção da saúde humana contra doenças crônicas não

transmissíveis, como o câncer (LAKO *et al.*, 2007). Sendo classificados em três categorias, e uma delas inclui a glutatona, vitamina C, albumina, carotenóides, flavonoides , entres outros compostos que podem ser encontrados em frutas (CASTELUCCI, 2015).

E de acordo com SANTOS; MELO; SOUZA (2013), os efeitos antitumorais dos alimentos quimiopreventivos estão relacionados a sua ação antioxidante, anti-inflamatória, anti-hormonais e antiangiogênica, bloqueando as espécies reativas de oxigênio, promovendo apoptose de células tumorais, inibindo a angiogênese e atuando como opositor aos fatores de crescimento de células cancerígenas (Figura 6).



Figura 6. Possíveis efeitos quimiopreventivos. de compostos bioativos presente em alimentos.
Fonte: Santos; Melo; Souza, 2013.

A eficácia de um composto bioativo ou alimento em inibir a proliferação das células cancerígenas é outro aspecto esperado na progressão da doença. No entanto, as diferenças de atividade antiproliferativa dos alimentos podem modificar dependendo da forma de utilização deste e das partes utilizadas na preparação dos extratos potencialmente bioativos (CRUZ, 2015).

Segundo RODRIGUES (2016), o efeito antioxidante presente em frutas pode estar relacionado com a presença de três grupos de compostos como, vitaminas (principalmente o ácido ascórbico), compostos fenólicos (hidrofílicos) e carotenóides (lipofílicos). Diversas pesquisas têm demonstrado que vários compostos naturais apresentam atividade anticâncer de próstata, seja *in vitro* ou *in vivo*, como as isoflavonas de soja, o ácido elegeíaco e elagitaninos (extrato de romã), polifenóis (chá verde), curcumina, licopeno, vitamina D e selênio. Tais compostos agem em uma ou mais via de sinalização que são desreguladas quando há câncer de próstata, como por exemplo, a sinalização do fator nuclear B (NFκ-B), Wnt, Akt, Notch e Hedgehog (Hh) (KALLIFATIDIS; HOY; LOKESHWAR, 2016).

O licopeno é o carotenóide de maior poder antioxidante, estando de forma predominante no plasma, em diversos tecidos, e na glândula prostática, sendo este o carotenóide com mais evidências descritas na literatura em relação ao potencial protetor com CaP (APPLEGATE; ROWLES; ERDMAN, 2019). Sua presença no plasma e tecidos humanos é devida principalmente ao consumo de uma diversidade de produtos de tomate, molho de espaguete, salsa, sopa de tomate e ketchup, além do próprio tomate. A maior parte dos estudos epidemiológicos sugerem que o tomate tem papel benéfico risco de câncer de próstata, e que embora este fruto e seus produtos contenham muitos nutrientes e fitoquímicos que são propostos para inibir a carcinogênese, o licopeno é o que mais tem recebido atenção da comunidade científica (LIN; ARONSON; FREEDLAND, 2019)

Estudos realizados demonstraram que a concentração de 1µM de licopeno, é encontrada no sangue de pessoas que consomem grandes quantidades de produtos de tomate, sendo capaz de inibir de forma significativa a proliferação de células de câncer de próstata (LINNEWIEL-HERMONI *et al.*, 2015). E que

este composto nesta mesma concentração foi capaz de induzir parada na primeira fase do ciclo celular, arrastando células de CaP para a fase G₀/G₁ (TANG *et al.*, 2015).

Outros compostos pertencentes a classes dos carotenóides também têm sido relacionados a prevenção deste câncer, como por exemplo a luteína, que pode ser encontrada em frutas e vegetais, e apresenta capacidade de diminuir a proliferação de células PC-3, induzir parada no ciclo celular e promover apoptose desta mesma linhagem de CaP (RAFI *et al.*, 2014). Assim como, a astaxantina, que exerce efeitos benéficos contra inflamação, dano oxidativo em diferentes tipos de câncer, incluindo o de próstata, uma vez que inibiu o crescimento de tumor prostático em camundongos, por meio de vias de sinalização envolvidas na apoptose e proliferação (NI *et al.*, 2017).

No entanto existem outros compostos bioativos que têm sido estudados em relação a prevenção de CaP, como os compostos fenólicos, produtos naturais têm sido isolados de plantas e frutas e avaliados em relação a sua eficácia citotóxica. No qual diversos compostos que ocorrem naturalmente são avaliados para inibir o crescimento de CaP e sua metástase, sendo portanto uma abordagem promissora para o tratamento desta neoplasia (GIOTI; TENTA, 2015).

SUN, S. *et al.* (2015) isolaram três compostos bioativos de polpa de graviola, sendo eles, C-35 acetogeninas anonáceas, muricinas M e N e acetogeninas anonáceas C-37, muriceno, nos quais foram avaliados quanto à atividade antiproliferativa contra as células PC-3 de câncer da próstata humano. Neste estudo, todas as substâncias identificadas mostraram efeito inibitório, especialmente, as muricinas M e N, que demonstraram atividades antiproliferativas mais potentes contra esta linhagem celular.

Dentro da classe de compostos fenólicos, os ácidos fenólicos também são de grande interesse, uma vez que os alimentos ricos nestes compostos apresentam associação com a redução do risco de câncer de próstata. O ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico) é um composto fenólico descrito com a capacidade de inibir a proliferação celular e diminuir a expressão oncogênica na linhagem celular do câncer de próstata de LNCaP e PC-3. O ácido caféico,

um ácido fenólico predominante em café, demonstrou ser capaz de ativar a via do fator nuclear potenciador da cadeia kappa do inibidor de células B ativadas (NF- κ B), sendo relacionado a redução do risco de CaP (RUSSO *et al.*, 2017).

SPILIOTI *et al.* (2014), ao estudarem a ação de uma variedade de mel em câncer de próstata, identificaram a presença de diferentes substâncias com potencial antiproliferativo, incluindo: o ácido protocatecuico, ácido p-hidróxico benzóico, ácido vanílico, ácido caféico e ácido p-cumárico. O ácido fenólico mais abundante neste alimento foi ácido protocatecuico, sendo este capaz de causar morte celular em células de câncer humano de próstata (PC-3), exibindo significativa atividade antioxidante, anticâncerígena e antiaterogênica.

Outro grande grupo dos compostos fenólicos são os flavonoides, que demonstram potente atividade antioxidante contra o estresse oxidativo, revelando em estudos *in vitro* e *in vivo* que possuem propriedades anticarcinogênicas contra diferentes tipos de cânceres (RODRÍGUEZ-GARCÍA; SÁNCHEZ-QUESADA; J. GAFORIO, 2019).

Um estudo de caso-controle de base populacional realizado em uma população de homens sicilianos analisou associação entre fatores dietéticos, como flavonoides e risco de câncer de próstata. Os resultados sugeriram que o risco de câncer de próstata pode ser reduzido por uma alta ingestão de catequinas e flavonol (REALE *et al.*, 2018).

A literatura também tem reportado que a quercetina é capaz de impedir a transição epitelial-mesenquimal (TEM) induzida pelo fator de transformação do crescimento (TGF- β) em células de câncer de próstata (PC-3), por meio da inibição da expressão de N-caderina e vimentina, e aumento de E-caderina (BARUAH; KHANDWEKAR; SHARMA, 2016).

A fisetina, outro composto da classe dos flavonoides, foi capaz de diminuir a viabilidade celular de células de câncer de próstata, assim como aumentar o nível da população dessas células tumorais na fase G₁ do ciclo celular, acompanhada por uma diminuição concomitante na população de células da fase S e da fase G₂/M (KHAN *et al.*, 2008).

O potencial bioativo presente nos alimentos tem sido estabelecido devido a ação desses diversos compostos, principalmente na modulação de uma série

de vias de sinalização de câncer. As ações quimiopreventivas, anti-inflamatórias e antioxidantes estão associadas à sua capacidade de ativação apoptótica, parada do ciclo celular, entre outros (KIM; KIM, 2018).

2.4. Frutos da região amazônica – fontes de compostos bioativos

A região Amazônica contém uma gama de variedades de frutas com diversos aromas e sabores exóticos, que apresentam potencialidade econômica e uma perspectiva de valorização importante para a região (BRAGA *et al.*, 2010). E apesar do desenvolvimento e do grande interesse de pesquisas nesta área, muitos produtos de origem vegetal ainda não são valorizados, recebendo pouca importância comercial e com poucos estudos científicos. Nesse contexto, pode-se destacar o abricó (*Mammea americana*), o camapu (*Physalis angulata*), e o uxi (*Endopleura uchi*).

2.4.1. Abricó

Os frutos de abricó (*Mammea americana*) são drupas globosas e volumosas, de 12 – 18cm de diâmetro, peso de até 1kg, casca rugosa, coriáceo-flexível de cor pardo-alaranjada, mesocarpo (parte comestível) constituído de uma polpa compacta, firme, fibrosa, cor de abóbora, sementes ovaladas, plano-convexas, com 6 – 8cm de comprimento, imersas na polpa e envolvidas pelo endocarpo rugoso. Pode ser encontrado em toda Amazônia e em algumas outras regiões, especialmente no estado do Pará, e por este motivo, também denominado de abricó-do-Pará (Figura 7) (CALVACANTE, 1991).

Poucas pesquisas têm sido realizadas neste fruto, porém (LIM, 2012), relata em seu trabalho de revisão bibliográfica que os frutos de abricó apresentam atividade inseticida, antioxidante, anticâncer, antiHIV, antifúngica, antibacteriana, antimicrobiana e antibiótica, uma vez que este fruto contém substâncias da classe das cumarinas e flavonoides .

SAMPAIO *et al.* (2015) ao estudar o perfil químico do extrato etanólico do núcleo da semente de *Mammea americana*, encontrou a substância 4-propil-6-prenila-5-isopentiloxidodihidroxicumarina, na qual é denominada de mammea B/BB, e pertencente a classe das cumarinas.



Figura 7: Abricó (*Mammea Americana*).
Fonte: Autor (2017)

Em um estudo realizado com quinze compostos isolados de abricó, apresentou que algumas cumarinas foram capazes de demonstrar efeito citotóxico nas linhagens celulares de câncer de cólon humano SW-480, HT-29 e HCT-116, exibindo aumentos de forma dose-dependente em células sub-diplóides por citometria de fluxo, indicando que indução de apoptose, assim como apresentaram alta atividade antioxidante no ensaio com DPPH (IC₅₀ faixa 86 - 135 µM) (YANG *et al.*, 2005). Verificou-se também que cumarinas isoladas de *Mammea americana* são capazes de inibir a ativação de HIF-1 (fator induzível por hipóxia-1) em células tumorais humana de mama e próstata (DU *et al.*, 2012).

2.4.2. Camapu

O camapu (*Physalis angulata*) é uma planta nativa brasileira que cresce como erva daninha, especialmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil e em outros países tropicais da África, América e Ásia. No Brasil o *Physalis angulata* apresenta várias denominações populares como “Camapu”, “Bucho de Rã”, “Juá de Capote”, “Mata-Fome”, “Camaru”, “Camambu”, entre outras, e seu suco tem sido utilizado como sedativo e depurativo, sendo indicado contra o reumatismo (JUNIOR, 2013; SILVA, 2013).

O gênero *Physalis* pertence à família Solanaceae, contendo aproximadamente cem espécies, em que na América do sul há ocorrência de 12 espécies, na qual encontra-se *Physalis angulata*. São plantas anuais e perenes, e se diferem por suas frutas apresentarem um envoltório, denominado cálice, apresentando sabor doce e sendo bastante consumida pelos povos indígenas (Figura 8) (RUFATO *et al.*, 2003).



Figura 8: Camapu (*Physalis angulata*).
Fonte: Autor (2017)

Nos frutos de camapu é possível encontrar além de nutrientes essenciais e de micronutrientes como minerais, fibras, vitaminas, compostos fenólicos, elevados níveis de niacina, e carotenoides, trazendo um grande interesse em seus potenciais com relação aos efeitos benéficos à saúde humana, sua atividade antioxidante e seus efeitos antimicrobianos (CAMLOFSKI, 2014).

Devido à presença desses nutrientes e compostos, no oeste da África o fruto vêm sendo utilizada na medicina popular para o tratamento do câncer (LAWAL *et al.*, 2010). Assim como no Brasil que também é utilizado pela medicina tradicional como anticoagulante, antileucêmico, antimutagênico, anti-inflamatório, antiespasmódico, antisséptico, analgésico, entre outros (SILVA, 2013).

Em concordância com estudo realizado por HSEU *et al.* (2011), outro trabalho confirmou que este fruto é um potencial agente anti-metastático e anti-angiogênico para o tratamento de inflamação e câncer. Tais características

podem ser justificadas por esta espécie ser fonte natural de vinatolidos, que são compostos que apresentam efeitos farmacológicos (TUAN ANH *et al.*, 2018).

Em estudo realizado por (GAO *et al.*, 2018), foi relatado que alguns vitanolídeos isolados de *Physalis angulata* apresentaram atividade citotóxica para o câncer de fígado (HepG2), mama (MDA-MB-231) e osteossarcoma (MG-63). SUN *et al.*, (2017) mostrou ainda atividades antiproliferativas significativas contra os cânceres humanos de próstata (C4-2B e 22Rv1), renal (786-O, A-498, e ACHN) e melanoma (A375-S2) e atividades inibitórias significativas contra a produção de NO (Óxido nítrico) pela ação do camapu.

Outro composto com alguns estudos na literatura, presente no gênero *Physalis*, é o witangulatina A, no qual é um composto ativo de vitanolídeos, capaz de exibir atividades antitumorais e tripanocidas, e afetar a função de linfócitos T em camundongos, inibindo a expressão de COX-2 por meio das vias de sinalização da translocação nuclear MAPKs e NF-kappaB (SUN *et al.*, 2010).

2.4.3. Uxi

O uxi (*Endopleura uchi*) é uma espécie nativa da Amazônia Brasileira (Figura 9), estando praticamente dispersa em todos os estados da região com maior distribuição e frequência nos estados do Pará e Amazonas, sendo de grande utilização pela população nativa dessa região (BENTO, 2013).



Figura 9: Uxi (*Endopleura Uchi*)
Fonte: Autor (2017)

O fruto é uma drupa elipsoide de 5 a 7 cm de comprimento, 3 a 4 cm de diâmetro, com peso entre 50 e 70g e apresenta uma coloração verde-amarelada ou pardo-escura quando maduro com uma ou duas sementes. É possível encontrar no uxi, ácidos graxos (principalmente ácido oleico e palmítico), fibras, esteroides, sais minerais e vitaminas C e E, podendo haver a presença do composto bioativo carotenoide (ARAGÃO, 2013).

Segundo TACON (2012), a polpa do fruto é farinácea, pastosa oleosa e rica em nutrientes, tendo importância econômica e nutricional para a população amazônica, sendo consumida de forma *in natura* ou na fabricação de sorvete e licor. Sua casca vem sendo utilizada com finalidades terapêuticas, no tratamento de tumores benignos e como anti-inflamatório.

A polpa deste fruto têm sido pouco estudada, no entanto, exibe elevados teores de fitoesteróis, principalmente β -sitosterol+sitostanol (88,0 mg/100g), brassicasterol (19,0 mg/100g) e stigmasterol (12,0 mg/100g), e tocoferóis, com 37,49 $\mu\text{g/g}$ de γ -tocoferol e 200,92 $\mu\text{g/g}$ de α -tocoferol, sugerindo altos valores de vitamina E (COSTA *et al.*, 2010). E em torno de 42 compostos voláteis foram identificados na polpa deste fruto, que consistem principalmente de 3,3-dimetil-2-butanol e eugenol, assim como ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos (MARX *et al.*, 2002).

Das cascas de *Edonpleura uchi* pode ser isolada a substância berginina, na qual tem capacidade inibitória do crescimento de microorganismo como, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *Aspergillus flavus*, *A. nidulans*, *C. tropicalis*, *A. nidulans*, *A. niger*, *Shigella sonnei*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*, apresentando boa atividade antimicrobiana e justificando seu uso tradicional contra infecções que afetam o aparelho reprodutor feminino (SILVA *et al.*, 2009). A berginina também foi encontrada na polpa dos frutos de uxi por (MAGALHÃES *et al.*, 2007).

Embora o fruto de uxi tenha amplo potencial econômico e biológico, esta espécie ainda necessita de estudos referentes aos seus componentes presentes, além de pesquisas que comprovem a sua eficácia nos seus diversos usos terapêuticos.

3. Justificativa

A Amazônia representa uma das maiores riquezas naturais existentes no mundo, onde encontram-se os frutos de abricó, de camapu e de uxi. Estas espécies vegetais apresentam um enorme potencial do ponto de vista medicinal, apresentando atividades biológicas como principal ativo.

A biodisponibilidade dos compostos bioativos nos alimentos, as suas rotas metabólicas e o modo de ação de seus metabólitos são importantes fatores no seu efeito nas doenças crônicas não transmissíveis, pois estes podem ativar diferentes vias de sinalização intracelulares adaptativas contra o estresse oxidativo, exercendo efeitos benéficos à saúde humana.

Pesquisas de aspectos relacionados ao desenvolvimento do câncer prostático são de suma importância, uma vez que esse adenocarcinoma é a neoplasia maligna mais comum na população masculina, e que este talvez possa ser prevenido por modificações de hábitos alimentares.

Há poucos estudos relacionados à ação dos extratos dos frutos de abricó, camapu e uxi, no câncer de próstata, e o desenvolvimento deste projeto contribuirá para a compreensão do impacto dos extratos sobre a proliferação, ciclo celular e apoptose de células de adenocarcinoma de próstata. Os resultados decorrentes deste estudo poderão contribuir para o esclarecimento do processo de captação intracelular desses compostos e a relação da atividade antioxidante dos mesmos com o desenvolvimento do câncer de próstata.

Consequentemente, este trabalho tem por finalidade fornecer dados para a comunidade científica, com vistas a auxiliar na elucidação do papel dos extratos de abricó, camapu e uxi, o controle e prevenção do desenvolvimento do câncer prostático.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Avaliar a Influência de extratos de abricó (*Mammea americana*), camapu (*Physalis angulata*) e uxi (*Endopleura uchi*) em linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata.

4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar os compostos bioativos dos extratos dos frutos de abricó, camapu e uxi;
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos de abricó, camapu e uxi;
- Avaliar o efeito dos extratos de abricó, camapu e uxi em função do tempo de incubação e da concentração, sobre a viabilidade celular da linhagem das células de próstata;
- Analisar os efeitos dos extratos de abricó, camapu e uxi sobre o ciclo celular e apoptose em culturas de células da linhagem de próstata.

5. Material e Métodos

5.1. Matéria-prima e obtenção dos extratos

As amostras de abricó (*Mammea americana*), camapu (*Physalis angulata*) e uxi (*Endopleura uchi*) foram coletadas de regiões produtoras do Estado do Pará. Tais amostras foram transportadas e armazenadas no Laboratório de Alimentos Funcionais da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), RJ.

5.2. Elaboração dos extratos

Os extratos de abricó, camapu e uxi, foram produzidos com etanol e água, no Laboratório de Alimentos Funcionais, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, para a elaboração dos extratos aquosos foram pesado 250g das amostras (polpas) em um bécher e em seguida, adicionado 80 mL da solução extratora. Após 15 minutos de repouso, a solução foi colocada no ultrassom (Brandon 2210) por período de 10 minutos. O resíduo foi coletado para três novas extrações. A solução foi filtrada e avolumada em um balão volumétrico de vidro de 1L. Após a extração, os extratos foram congelados em recipientes apropriados no ultrafreezer a -86°C (Indrel[®] Ultrafreezer) e em seguida liofilizados em liofilizador (LD300 Terroni[®]) por 24 horas. As amostras liofilizadas foram armazenadas em tubo falcon, em freezer a -18°C até o momento das análises.

Para a elaboração dos extratos etanólicos de abricó, camapu e uxi, o processo de extração seguiu as mesmas etapas de extração que o extrato aquoso liofilizado, com adição de filtração da solução em papel de filtro Whatman number 1, e em seguida o resíduo de etanol secundário foi evaporado sob baixa pressão a 45°C em rotaevaporador, para logo após serem liofilizados e então armazenados em tubo falcon no freezer a -18°C até o momento das análises (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

Os extratos de abricó, camapu e uxi, foram padronizados para os experimentos de atividade citotóxica, e foram realizadas três repetições para os

tratamentos descritos, os quais foram submetidas à todas as análises propostas nos itens abaixo.

5.3. Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). O DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical de hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável e desta forma, é reduzido na presença de um antioxidante. Para avaliação da atividade antioxidante, os padrões comerciais dos ácidos foram adicionados para reação com o radical estável DPPH em uma solução de metanol. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 515 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio arrancado de um composto antioxidante. A redução do radical do DPPH foi medida através da leitura da absorbância a 515 nm em 30 min de reação. A atividade antioxidante foi expressa de acordo com a Equação 1 de MENSOR *et al.* (2001), descrita abaixo:

$$\%AA = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right]$$

5.4. Análise determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do Ferro (FRAP)

A atividade antioxidante pelo método de FRAP será determinada de acordo com (RUFINO *et al.*, 2006). Este método baseia-se na quantificação da capacidade de redução do complexo Fe(III)-TPTZ (cor azul clara) para o complexo Fe(II)-TPTZ (cor azul escura) em meio ácido, reação esta que é desencadeada pelo antioxidante presente na amostra. O método consiste em adicionar a 100 µL da amostra e quantificar, em 2,7 mL de reagente FRAP somado a 270µL de água destilada. Após 30 minutos em banho-maria é efetuada a leitura de absorbância a 595 nm. Os resultados serão expressos em µM de sulfato ferroso por grama de amostra. A curva padrão será produzida com uma solução de sulfato ferroso com quatro diluições diferentes.

5.5. Análise de atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS^{•+}

O método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) foi utilizado como descrito (RUFINO *et al.*, 2007). O radical ABTS^{•+} é formado por uma reação química com persulfato de potássio em uma relação estequiométrica de 1: 0,5. Uma vez formado, o radical ABTS^{•+} é diluído em etanol até obter uma medida de absorvância de 0,70 (\pm 0,02) a um comprimento de onda de 734 nm. Alíquotas com três diferentes volumes das amostras de ácidos serão utilizadas de modo a restar um volume final de 3ml em cada leitura. As leituras foram realizadas em triplicata. Uma curva padrão com soluções de Trolox e outra curva com ácido ascórbico serão produzidas.

Os resultados foram expressos em TEAC, atividade antioxidante equivalente ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) em μ mol de trolox e μ mol de ácido ascórbico por grama de amostra.

5.6. Determinação de compostos fenólicos totais

A análise de compostos fenólicos totais dos extratos foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965), utilizando o ácido gálico como padrão. A determinação foi realizada usando alíquotas de 0,25 ml a 1 ml dos extratos obtidos anteriormente, que foram transferidas para tubos de ensaio e adicionado 2,5ml do reagente Folin Ciocalteu, diluído em água 1:10. A mistura permaneceu em repouso de 3 a 8 minutos. Em seguida foi adicionado 2ml de carbonato de sódio 4% e os tubos foram deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A absorvância foi medida em espectrofotômetro a 760nm.

5.7. Ensaio ORAC

Este método, mede a capacidade do antioxidante em sequestrar radicais peroxil que são gerados por uma fonte radicalar, AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorado), a 37°C. O radical peroxil, gerado pela reação do com oxigênio atmosférico, reage com o indicador fluorescente para formar um

produto não fluorescente, que pode ser medido por espectrofotometria com máxima emissão de fluorescência em 575 nm e 578 nm. Este ensaio avalia a atividade antioxidante através da inibição da oxidação, induzida pelo radical peroxil, por transferência de átomos de hidrogênio. A atividade antioxidante das substâncias foi determinada através da diferença entre a área da amostra subtraída pela área do branco, medida pelo decaimento da fluorescência com a adição da substância antioxidante no decorrer do tempo.

Usando-se Trolox de concentrações conhecidas, uma curva padrão foi gerada e a atividade ORAC da amostra foi calculada. Este ensaio expressa o resultado em unidade de ORAC ou equivalentes de Trolox, o qual corresponde à quantidade de Trolox em micro mols que tem a mesma atividade antioxidante de um litro da solução testada.

5.8. Caracterização do perfil fitoquímico por UPLC-MS^E

Os extratos dos frutos foram pesados (1g) para extração com solução de metanol no banho de ultra-som com posterior centrifugação até descoloração da solução. Em seguida, uma alíquota (1ml) do extrato foi seca com ar comprimido, sendo a mesma ressuspensa em metanol e ácido fórmico para análise cromatográfica. Na análise cromatográfica utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) (Alliance 2695, Waters) equipado com detector de arranjo de fotodiodos e utilizando uma coluna C18 BDS (100 mm x 4,6 mm, 2,4 µm, ThermoScientific) e modo de eluição de gradiente com acetonitrila e ácido fórmico. Para análises UPLC-MS, 2 µl de extratos e padrões foram injetados em triplicata em um Acquity UPLC (Waters, Milford, MA) acoplado ao sistema Xevo G2-S QTOF-MS / MS (Waters, Manchester, Reino Unido) equipado com uma electrospray, fonte de ionização (ESI) operando no modo iônico negativo. A coluna utilizada foi UPLC HSS T3 C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,8 µm) (Waters, Irlanda). A coluna e o amostrador automático foram mantidos a 30 ° C e 8 ° C, respectivamente. A taxa de fluxo foi de 0,6 mL / min e a eluição gradiente de fase móvel consistiu em água acidificada (formiato de amônio 5 mM e 0,3% ácido fórmico, v / v) (bomba A) e acetonitrila contendo 0,3% de ácido fórmico (bomba

B). seguinte: 97% A a 0 min, 50% A a 6,8 min, 15% A a 7,4-8,5 min, seguido por um passo de equilíbrio adicional 97% A a 9,1-12 min. Os dados foram adquiridos usando uma aquisição MS/MS multiplexada com aquisição de energia baixa e alta alternada (MSE) no modo centróide, coletando dados de m/z 50-1000. A tensão capilar e do cone foram ajustadas em 3,0 kV e 30 V, respectivamente. O gás de dessolvatação (N₂) foi regulado para 600 L / h a 450 ° C, o gás cone foi regulado para 50 L / h e a temperatura da fonte a 120 ° C. Experimentos MS/MS foram realizados com energia de colisão variando de 30-55 e usando argônio puro ultra-alto (Ar) como um gás de colisão. A aquisição de dados foi realizada utilizando MassLynx 4.1 (Waters Corporation, Milford, MA). Para garantir precisão e reprodutibilidade, todas as aquisições foram realizadas pela infusão de calibração de massa de bloqueio com leucina-encefalina (Waters Corporation, EUA) (m/z 554.2615) em uma concentração de 1,0 ng / L em acetonitrila: H₂O (50:50, v / v) com 0,1% (v / v) de ácido fórmico a um caudal de 10 μ L / min.

Os dados brutos de todas as réplicas foram processados com Progenesis Q1 v2.1 (Nonlinear Dynamics, Waters Corporation, Reino Unido) com as seguintes condições: todas as corridas, limites automáticos, dados centróides, resolução total largura a metade do máximo (FWHM) de 50000 Modo de ionização negativa, molécula desprotonada [M-H]⁻. A identificação dos compostos bioativos foi realizada através da pesquisa de polifenóis com MetaScope, utilizando um banco de dados customizado de compostos de polifenol da PubChemID, utilizando os seguintes parâmetros: tolerância ao erro precursor e massa de fragmentos (5 e 10 ppm, respectivamente), tempo de retenção 7,5 min. A análise de alvos foi também aplicada para a identificação dos compostos fenólicos, comparando os parâmetros de execução de padrões fenólicos, como o tempo de retenção, massa exata, erro de massa e os espectros de MS-MS, além dos demais parâmetros acima mencionados. Os dados processados foram exportados para o EZinfo, onde foi elaborada a Análise de Componentes Principais (ACP).

5.9. Cultura de células e protocolo de tratamento

A linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (PC-3) foi obtida a partir do Banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A linhagem de próstata foi cultivada em meio DMEM - high glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina, pH 7,4, sob atmosfera de 5% de CO₂. Para cada experimento, as células foram plaqueadas (10⁴ células/cm²) em placas de 6 e 96 poços, para análises de ciclo celular e proliferação celular, respectivamente.

5.10. Incubação dos compostos na linhagem celular de próstata

As células adenocarcinoma de próstata foram incubadas com os extratos em diferentes concentrações, no tempo de incubação de 24 horas. Tais células foram incubadas com os extratos aquosos e etanólicos de abricó, camapu e uxi, dissolvidos em meio de cultura não suplementados com soro. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS refrigerado a cerca de 10°C. As células foram então retiradas da placa, centrifugadas e o sobrenadante, reservado para análise. O precipitado celular foi mantido a -80°C até o momento da extração.

5.11. Ensaio de viabilidade e proliferação celular (MTT)

A viabilidade celular foi determinada conforme descrito por Mosman (1983) pelos ensaios de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio).

Após serem tratadas com os extratos de abricó, camapu e uxi nas diferentes concentrações, no tempo de 24 horas (5 poços em duplicata para cada amostra), foram adicionados à cada poço 10 µL de MTT (5 g/L). Após 4 horas de incubação, o meio foi removido e 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados para dissolver o formazan produzido. A leitura foi feita em leitor de ELISA no comprimento de onda de 570 nm. A taxa de inibição da proliferação

celular (CPIR) foi expressa em percentual e calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{CPIR} = \frac{1 - \text{valor médio do grupo experimental}}{\text{valor médio do grupo controle}} \times 100$$

5.12. Análise de ciclo celular

As células de adenocarcinoma de próstata incubadas na presença e ausência dos extratos de abricó, camapu e uxi em diferentes concentrações e tempos de incubação foram lavadas rapidamente com solução salina tamponada (PBS) livre de cálcio e magnésio e foram destacadas com auxílio de tripsina em temperatura ambiente. A suspensão celular do extrato aquoso de abricó foi filtrada e junto com os demais extratos foi analisada para conteúdo de DNA por citometria de fluxo. As células com conteúdo menor de DNA que G_1 na distribuição do ciclo celular foram contadas como células hipodiplóides (subfase G_1). As proporções relativas de células com conteúdo de DNA indicativo de apoptose ($<2n$), G_0/G_1 diplóide ($2n$), S (fase $>2n$, mas $<4n$), e fase G_2/M ($4n$) foram adquiridos e analisados utilizando CellQuest e FlowJo, respectivamente (SUN, K.; WANG; HUANG, 2006). A percentagem de população de células em uma fase específica foram estimada com FlowJo software.

5.13. Avaliação da indução da apoptose

O número de células sinoviais em apoptose ou necrose foi identificado pelo ensaio de externalização da fosfatidilserina por meio da técnica de citometria de fluxo proposta por BUCCHIERI *et al.* (2002). As células de adenocarcinoma de próstata foram incubadas em tubos de propileno, protegidas da luz e mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos. A detecção do percentual de células em apoptose e necrose foi determinada em citômetro de fluxo utilizando-se o software Cell Quest iPro. As populações celulares

analisadas foram reconhecidas por meio das propriedades FSC/SSC das mesmas. A fluorescência verde do FITC foi mensurada a $530\pm 30\text{nm}$ (detector FL1) e a fluorescência vermelha do iodeto de propídeo foram mensuradas a $585\pm 42\text{nm}$ (FL2).

6. Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como médias \pm desvio padrão de dois experimentos independentes feitos em triplicata ($n=3$). Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.

7. Resultados

7.1. Compostos fenólicos totais

Os frutos de abricó, camapu e uxi foram submetidos à análise de compostos fenólicos totais a partir de extrações submetidas a diferentes solventes (água e etanol), com o intuito de determinar a melhor solução extratora destes compostos. Os resultados obtidos a partir da capacidade redutora de Folin-Ciocalteu mostraram que a maior parte dos extratos etanólicos dos frutos de abricó, camapu e uxi apresentaram maior quantidade ($p < 0,05$) de compostos fenólicos quando comparados aos extratos aquosos (Figura 10).

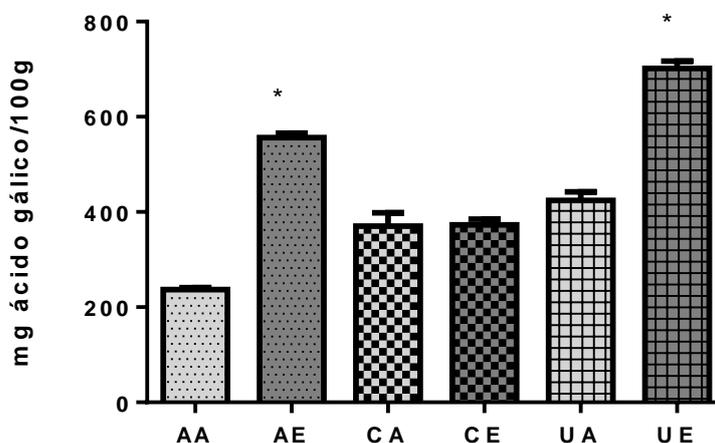


Figura 10. Compostos fenólicos totais em extrato aquoso de abricó (AA, camapu (CA) e uxi (UA)) e etanólico (E) de abricó (AE), camapu (CE), e uxi (UE). Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

De modo geral, pode-se observar que o extrato etanólico de uxi foi o fruto que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos (701,839 mg AGE/100g), seguido pelo abricó (556,105 mg AGE/100g) e camapu (237,39 mg AGE/100g). Em relação aos extratos aquosos destes frutos, foi possível encontrar 237,329 mg AGE/100g e 424,512 mg AGE/100g de compostos fenólicos totais para os frutos de abricó e uxi, respectivamente, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$), quando comparados a seus extratos etanólicos. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) no teor de compostos

fenólicos entre o extrato aquoso (370,385 mg GAE/100g) e o extrato etanólico na amostra de camapu.

7.2. Caracterização do perfil de compostos bioativos por UPLC-MS^E

Os metabólitos secundários dos extratos aquosos e etanólico de abricó, camapu e uxi foram determinados por UPLC-MS^E, no qual 293 compostos foram separados e tentativamente identificados (Tabela 1) e classificados em oito classes, sendo estas: ácido fenólico, flavonoides, chalconas, cumarinas, compostos relacionados a aminoácidos, compostos relacionados a ácidos graxos e terpenos.

Entre os frutos, os extratos de abricó foram os que identificaram maior quantidade de compostos, no qual 209 pertenciam ao extrato aquoso e 188 ao extrato etanólico. O extrato de camapu apresentou 183 compostos para extrato aquoso e 186 para extrato etanólico. Uxi foi o fruto com menor número de compostos identificados, sendo o valor de 164 para o extrato aquoso e 165 para o extrato etanólico. Alguns metabólitos foram encontrados apenas em um extrato particular de frutas, no qual 50 compostos foram encontrados somente no fruto de abricó (25 para o extrato aquoso, 25 para o extrato etanólico), 43 apenas em camapu (22 para o extrato aquoso, 23 para o extrato etanólico) e 36 exclusivamente no fruto de uxi (14 para o extrato aquoso, 22 para o extrato etanólico).

Os metabólitos droserona (m/z 203,03), e Norlichexantona (m/z 6,92) foram encontrados apenas no extrato hidrofílico de abricó, e Procyanidin C1 (m/z 865,19), Cis-3,4-Leucopelargonidin II (m/z 289,07) e Piquerol A (m/z 165,09) foram encontrados apenas nos extratos etanólicos deste fruto. Myristicin, 11-Deoxocucurbitacin foram identificados em extratos hidrofílicos de camapu e ácido sinápico I (m/z 223,06) e pseudopurpurina (m/z 299,01), em seu extrato etanólico.

No que se refere aos extratos de uxi, o metabólito 4-Coumaroilchiquimato foi reconhecido em seu extrato hidrofílico e os metabólitos Ácido Ferúlico I (m/z 193,05), Kaempferol II (m/z 285,04), Jacareubin (m/z 325,07), 6-Deoxyjacareubin

(*m/z* 309,07), Ácido Vanilático II (*m/z* 167,03), Nigakilactona A (*m/z* 377,19), Ácido Asiático (*m/z* 487,34), Ácido Jasmônico (*m/z* 209,11), em seu extrato etanólico .

Tabela 1. Classes de compostos bioativos de extratos aquoso (A) e etanólico (E) de extratos de abricó, camapu e uxi.

Compostos (n/%)	Abricó		Camapu		Uxi	
	A	E	A	E	A	E
Ácidos Fenólicos	43 (20.57%)	37 (19.68%)	44 (24.04%)	40 (21.51%)	38 (23.17%)	35 (21.21%)
Flavonoides	36 (17.22%)	30 (15.96%)	33 (18.03%)	29 (15.59%)	24 (14.63%)	27 (16.36%)
Chalconas	2 (0.96%)	2 (1.06%)	2 (1.09%)	2 (1.08%)	3 (1.83%)	3 (1.82%)
Cumarinas	16 (7.66%)	15 (7.98%)	14 (7.65%)	14 (7.53%)	8 (4.88%)	9 (5.45%)
Compostos relacionados a aminoácidos	17 (8.13%)	14 (7.45%)	17 (9.29%)	20 (10.75%)	18 (10.98%)	15 (9.09%)
Compostos relacionados a ácidos graxos	22 (10.53%)	22 (11.70%)	11 (6.01%)	12 (6.45%)	14 (8.54%)	15 (9.09%)
Terpenos	46 (22.01%)	43 (22.87%)	39 (21.31%)	39 (20.97%)	39 (23.78%)	35 (21.21%)
Outros compostos fenólicos	27 (12.92%)	25 (13.30%)	23 (12.57%)	30 (16.13%)	20 (12.20%)	26 (15.76%)
Total	209 (100%)	188 (100%)	183 (100%)	186 (100%)	164 (100%)	165 (100%)

n – número de compostos identificados / % - porcentagem total de compostos entre as classes comparado com o total.

A classe dos ácidos fenólicos foi a predominante em relação a presença de compostos fenólicos nos frutos estudados, nos quais os extratos de camapu aquoso (CA) e etanólico (CE) apresentou 44 e 40 metabólitos, respectivamente, seguido de 43 compostos para o extrato de abricó aquoso (AA) e 37 para o extrato etanólico (AE) , e 38 metabólitos para o extrato de uxi aquoso (UA) e 35 para uxi etanólico (UE), sendo o uxi o fruto com menor identificação de ácido fenólicos. Os flavonoides, também foram compostos fenólicos identificados nos extratos dos frutos , estando presente em maior quantidade nos extratos aquosos de AA e CA, e no extrato etanólico de uxi.

Foi possível identificar uma segunda classe de metabólitos secundário em abundância neste estudo, sendo esta, os terpenos, no qual para para extratos a AA e extratos AE, os principais compostos foram identificados nesta classe, sendo 46 compostos de AA e 43 para AE. Esta classe de compostos foi também predominante em amostras de UE em um total de 39 compostos.

Para caracterizar e classificar os seis extratos de frutos de acordo com o perfil fitoquímico, utilizou-se a Análise de Componentes Principais (ACP) (Fig. 11). Os resultados mostraram que a Hallactona B II, Eleganin I, 5-Hydroxyferulic acid methyl ester II, Justicidina A, 7,2'-Di-hidroxi-4'-metoxi-isoflavanol, Lancerin II, 6-Methoxytaxifolin II, Zapoterina, Salvinorina A, Ácido mecônico, Ácido Benzóico II, Mammeisin II, Auriculoside, Lancerin I, Loforforina, Visnagin, Ácido sinápico II, Álcool sinápico II, 6-Methoxytaxifolin I, Isobruceína A, Syringin I, Graminiliatrin I, Hymenoxon III, Mammeisin, Picrotoxina I, 7-desoxiloganato, Oleoside Dimetiléster II, Gossipol, Ácido logânico, Ácido 2-hidroxicinâmico II, foram os metabólitos mais significativos para caracterização e classificação dos extratos de frutos. Estes parâmetros foram significativamente carregados nos dois principais componentes principais (PC 1 e PC 2), explicando mais de 72% da variância. O primeiro componente principal (PC1) foi capaz de explicar 36,37% da variação, enquanto o segundo (PC2) explicou 36,06% da variação total (Figura 11). O gráfico de dispersão dos escores dos extratos de frutos para PC1 e PC2 demonstra que os extratos dos frutos apresentam composições diferentes, mas os extratores removem metabólitos similares para abricó, camapu e uxi.

A abundância relativa dos compostos que explicaram o ACP pode ser analisada na figura 12, cada célula colorida no mapa corresponde à abundância relativa, com compostos em linhas e amostra em colunas. O álcool sinápico II (133) é um metabólito com grande abundância relativa em extratos de abricó. Um dos metabólitos com maior abundância relativa para o extrato de camapu foi o Seringina (129) e o ácido mecônico (224) demonstra alta abundância relativa aos extratos de uxi. Estes compostos foram tentativamente identificados a partir destes frutos pela primeira vez.

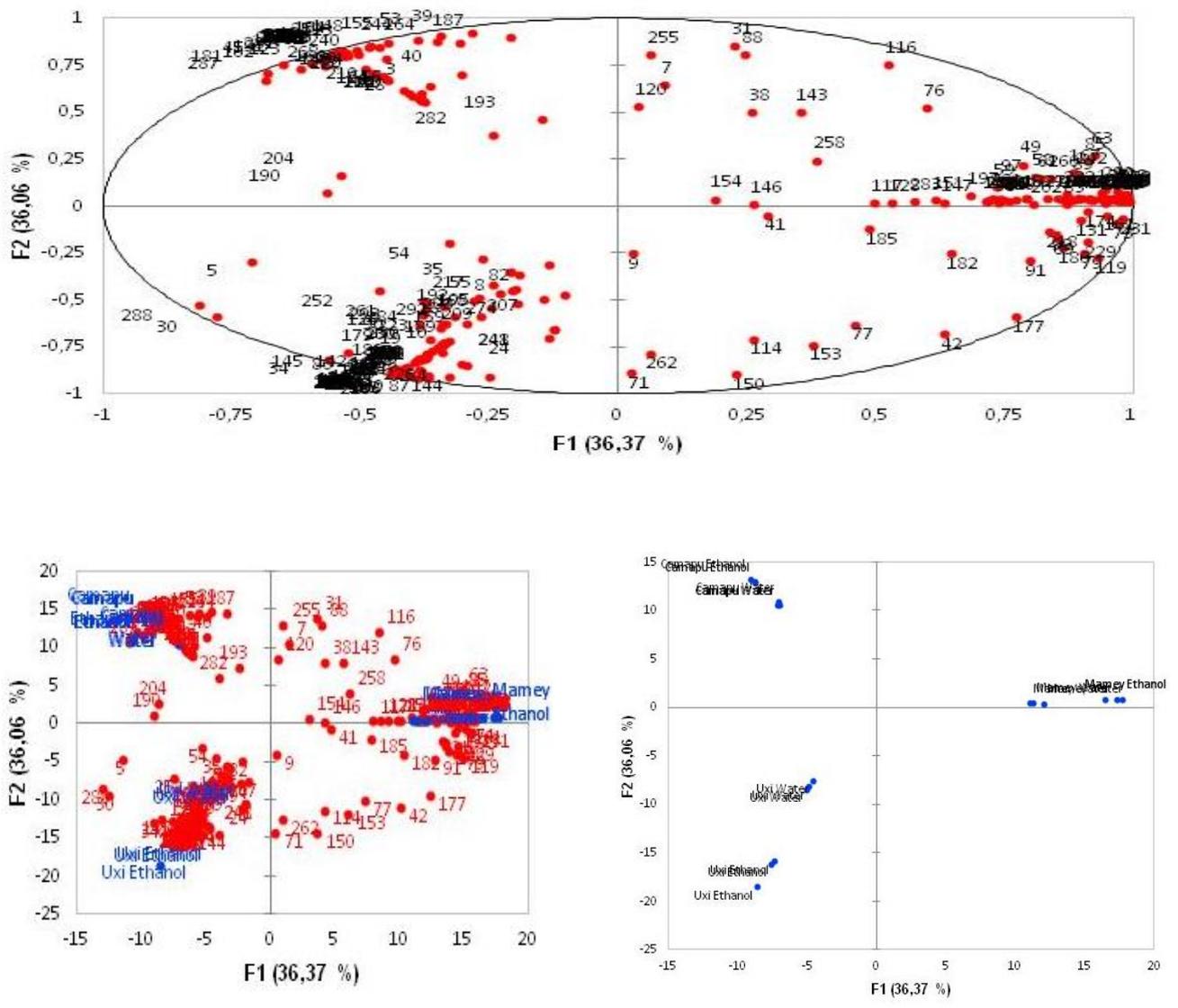


Figura 11. Projeção variável dos compostos fenólicos tentativamente identificáveis em extratos aquosos e etanólicos de abricó, camapu e uxi (CAP).

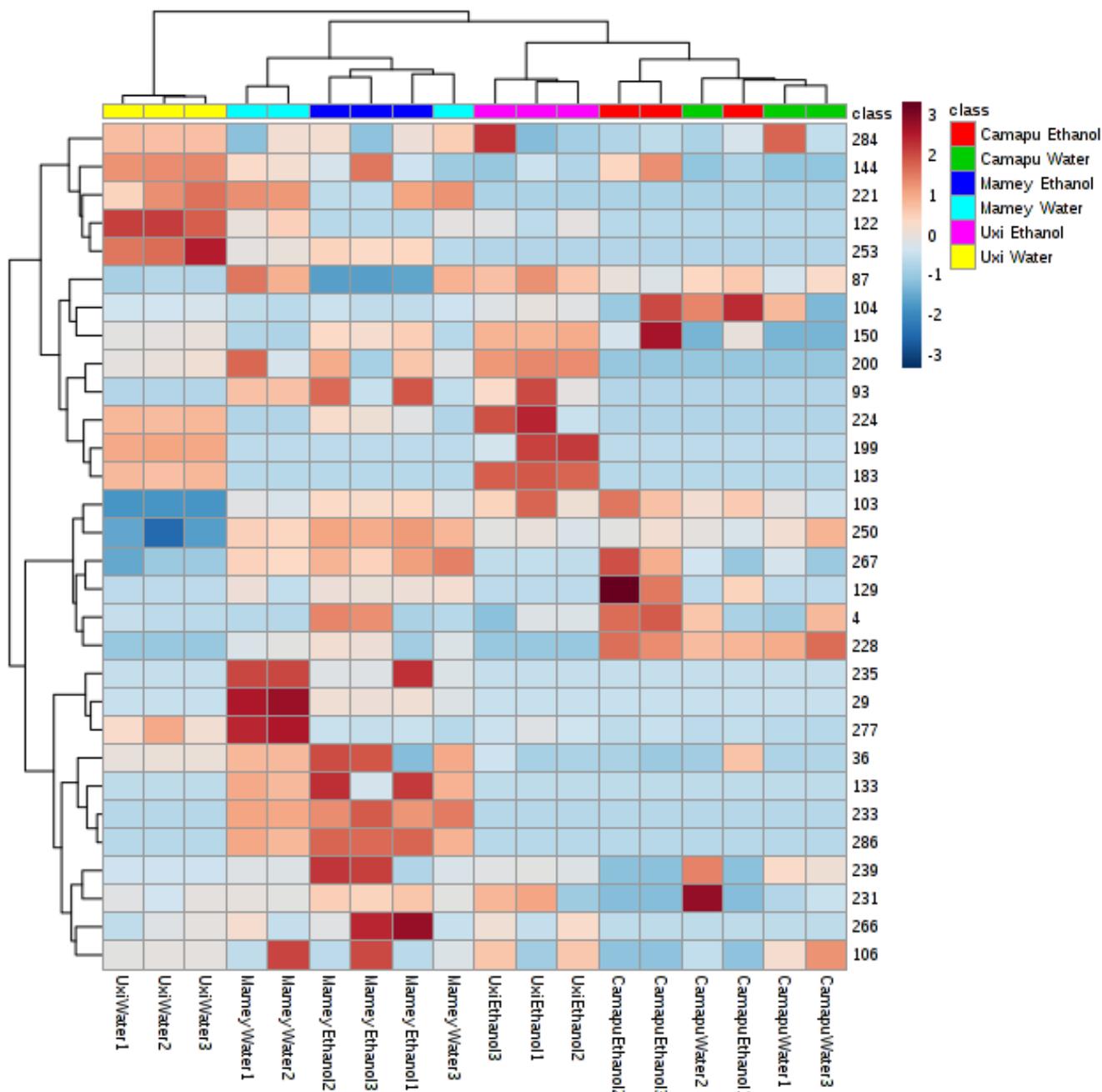


Figure 12. Heat map gerado a partir de análise hierárquica de agrupamentos (HCA) baseada na intensidade de 30 compostos fenólicos em extratos aquoso e etanólico de abricó, camapu e uxi. A abundância dos compostos fenólicos avaliados por UPLC-MSE é representada por cores no eixo X. Hallactona B II (266), Eleganin I (239), 5-Hydroxyferulic acid methyl ester II (122), Justicidina A (144), 7,2'-Di-hidroxi-4'-metoxi-isoflavanol (87), Lancerin II (200), 6-Methoxytaxifolin II (104), Zapoterina (284), Salvinatorina A (267), Ácido mecônico (224), Ácido Benzoico II (4), Mammeisin II (150), Auriculoside (106), Lancerin I (199), Loforforina (183), Visnagin (221), Ácido sinápico II (29), Álcool sinápico II (133), 6-Methoxytaxifolin I (103), Isobruceína A (277), Seringina I (129), Graminiliatrin I (233), Hymenoxon III (231), Mammeisin (93), Picrotoxina I, 7-desoxiloganato (235), Oleoside Dimetiléster II (286), Gossipol (228), Ácido logânico (253), Ácido 2-hidroxicinâmico II (36).

7.3. Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos dos frutos amazônicos foram determinados por quatro diferentes métodos com diferentes mecanismos de ação: ABTS, DPPH, FRAP e ORAC (Tabela 2). De acordo com BARROS *et al.* (2017), um único método não explica com precisão todos os grupos de compostos antioxidantes, devido à complexidade das matrizes dos frutos e as interferências que essas metodologias podem sofrer.

O ensaio ABTS revelou valores variando entre $263,67 \pm 23,90$ e $1602,7 \pm 30,16 \mu\text{M Trolox/g}^{-1}$, em que a maior capacidade antioxidante foi apresentada em amostras de UE ($1602,7 \pm 30,16 \mu\text{M Trolox g}^{-1}$), seguido de AE ($937.66 \pm 218.49 \mu\text{M Trolox/g}^{-1}$) e CE ($419.43 \pm 18.55 \mu\text{M Trolox g}^{-1}$). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre o extrato aquoso e etanólico de camapu, também não foi possível obter resultados com diferença estatística entre AA ($263.67 \pm 23.90 \mu\text{M Trolox/g}^{-1}$) e UA ($271.86 \pm 22.14 \mu\text{M Trolox/g}^{-1}$) ($p < 0,05$).

Em antioxidante medido por DPPH, a maior atividade encontrada foi no extrato etanólico de abricó, cujo valor foi de $1168,42 \mu\text{mol TE/100 g}$, seguido dos extratos etanólicos de camapu ($705,771 \mu\text{mol TE/100 g}$) e uxi ($509,68 \mu\text{mol TE/100 g}$). O extrato aquoso de uxi apresentou menor atividade antioxidante, por meio deste método ($46.95 \pm 17.17 \mu\text{mol TE/100 g}$) (Tabela 2).

Table 2. Atividade antioxidante dos extratos de abricó, camapu e uxi pelos métodos de ABTS, DPPH, FRAP e ORAC.

Método	Abricó		Camapu		Uxi	
	Aquoso	Etanólico	Aquoso	Etanólico	Aquoso	Etanólico
ABTS ($\mu\text{M Trolox g}^{-1}$)	$263.67^a \pm 23.90$	$937.66^b \pm 218.49$	$432.74^c \pm 16.17$	$419.43^c \pm 18.55$	$271.86^a \pm 22.14$	$1602.7^d \pm 30.16$
DPPH ($\mu\text{M Trolox g}^{-1}$)	$336.60^a \pm 3.05$	$1168.42^b \pm 218.56$	$386.24^c \pm 116.99$	$705.77^d \pm 100.74$	$46.95^e \pm 17.17$	$509.27^f \pm 26.95$
FRAP ($\mu\text{mol sulfato ferroso/g}$)	$564.18^a \pm 18.90$	$1381.13^b \pm 189.95$	$970.60^c \pm 28.92$	$1183.98^{bc} \pm 46.62$	$376.66^d \pm 1.81$	$448.68^e \pm 41.97$
ORAC (mM Trolox g^{-1})	$5.17^a \pm 0.56$	$8.88^b \pm 0.52$	$12.30^c \pm 1.15$	$11.15^c \pm 0,42$	$14.33^d \pm 1.36$	$15.04^d \pm 0.84$

Resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

O extrato etanólico de abricó também apresentou a maior atividade ao poder redutor férrico (FRAP) em relação a extração hidrofílica, 1381,13 μmol sulfato ferroso/g e 564,85 μmol sulfato ferroso/g, respectivamente.

Em relação ao ensaio ORAC, os resultados revelaram que o extrato de uxi obteve o valor elevado para este método ($15,04 \pm 0,84$ mM Trolox/ g^{-1} - etanólico e $14,33 \pm 1,36$ mM Trolox/ g^{-1} - aquoso), seguido do extrato de camapu ($11,15 \pm 0,42$ mM Trolox g^{-1} - etanólico e $12,30 \pm 1,15$ mM Trolox/ g^{-1} - aquoso) e por abricó ($8,88 \pm 0,52$ μmol TE/100 g - etanólico e $5,17 \pm 0,56$ μmol TE/100 g - aquoso), apenas os diferentes extratos de abricó apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

7.4. Correlação entre compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante

Os coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico são apresentados na figura 13. Os resultados sugerem que os compostos fenólicos totais contribuíram para a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos de acordo com o método utilizado.

Para abricó, o extrato aquoso obteve forte correlação entre os compostos fenólicos totais e o ensaio ORAC ($r = 0,958$), e baixa correlação para os métodos ABTS ($r = 0,118$) e DPPH ($r = 0,147$) (Figura 13A). Para o extrato etanólico, as únicas metodologias de capacidade antioxidante com correlação positiva com compostos fenólicos totais foi ORAC ($r = 0,640$) e DPPH ($r = 0,910$).

Em relação ao fruto de camapu, o extrato aquoso apresentou boa correlação entre compostos fenólicos totais e ABTS ($r = 0,843$) e ORAC ($r = 0,752$), e correlação negativa com o DPPH ($r = -0,999$). Para o extrato etanólico, os métodos que utilizam radicais comerciais demonstraram correlação negativa com os compostos fenólicos totais, no entanto, o ORAC foi o único ensaio que apresentou boa correlação ($r = 0,221$) (Figura 13B).

Em relação ao fruto uxi, o extrato aquoso apresentou baixa correlação com compostos fenólicos totais em relação ao ensaio de DPPH, $r = 0,019$. Para o extrato etanólico, o único ensaio com boa correlação com os compostos fenólicos foi o ORAC ($r = 0,529$) e DPPH.

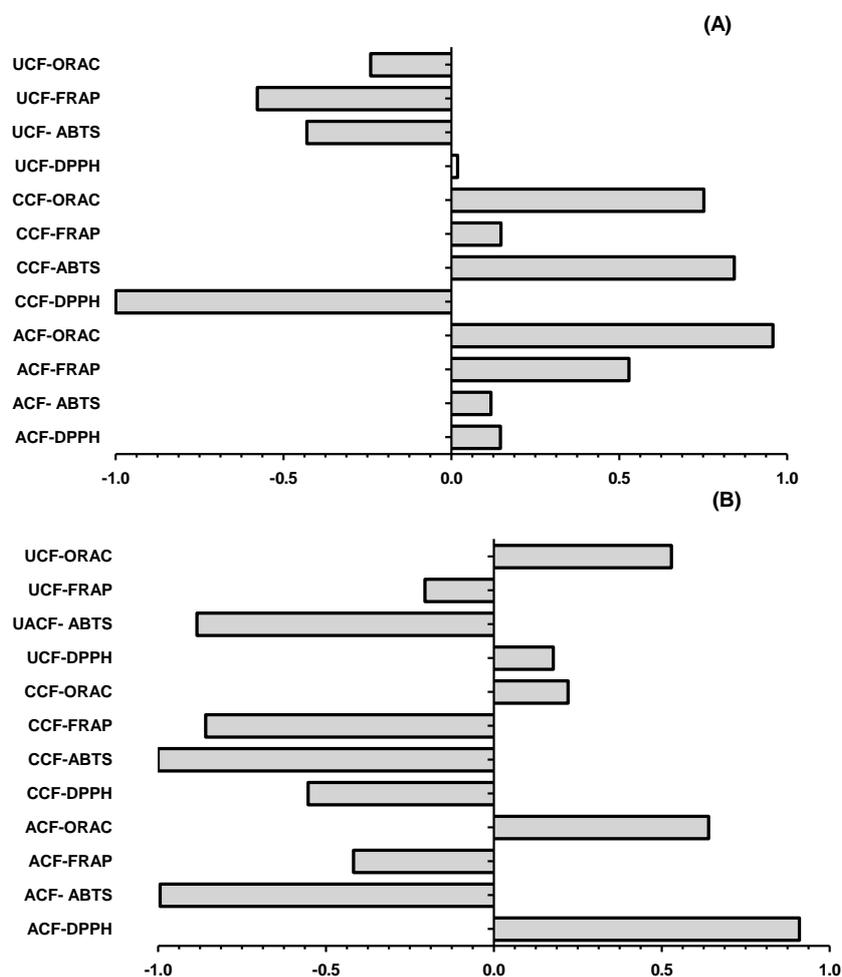


Figura 13. Coeficiente de correlação entre os diferentes métodos de antioxidante (ABTS, DPPH, FRAP e ORAC) e compostos fenólicos totais (CF) em extratos aquoso (A) e etanólico (B) de abricó (A), camapu (C) e uxi (U).

7.5. Efeitos dos extratos de abricó, camapu e uxi em linhagem de célula de câncer de próstata

7.5.1. Viabilidade celular - MTT

Para avaliar a atividade citotóxica dos diferentes extratos de abricó, camapu e uxi em linhagem de células de câncer de próstata (PC-3), foram incubados diferentes concentrações de extrato (0.62, 1.45, 2.5, 5.0, 10, 20, e 40 mg/mL), após 24 horas de incubação, a viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT. Os extratos aquosos e etanólicos das frutas inibiram o crescimento de maneira dose-e tempo-dependente (Figura 14), foi possível

observar que as concentrações iniciais não foram capazes de modificar a quantidade de células viáveis, em relação as células não tratadas. No entanto, a concentração de 20 mg/mL de extrato é possível observar efeito citotóxico para ambos os extratos, quando comparados as células não tratadas.

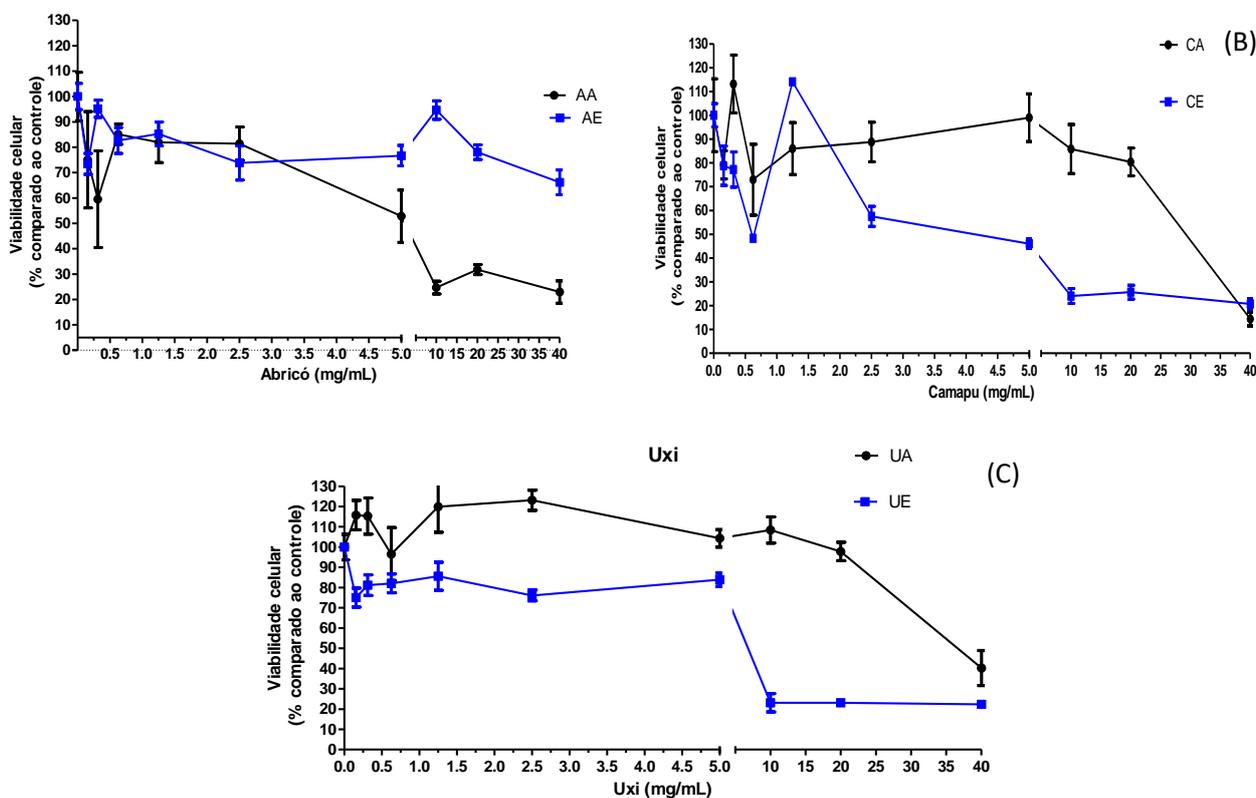


Figura 14. Efeito do extrato aquoso (AA) e etanólico (AE) de abricó (A), do extrato de camapu aquoso (CA) e etanólico (CE) (B) e do extrato de uxi aquoso (UA) e etanólico (EU) (C) sobre a viabilidade celular da linhagem PC-3 após 24 horas de tratamento.

Os extratos aquosos foram capazes de inibir a viabilidade celular das células cancerígenas de PC-3, na qual a concentração de 40 mg/mL reduziu em mais de 50% o número de células viáveis, em relação as células não tratadas. Na figura 14 (B) é possível observar que o extrato aquoso de camapu (CA), foi o extrato que apresentou maior efeito inibitório, capaz de promover máxima redução de percentual de células viáveis de 85,62%, seguido do extrato aquoso de abricó (AA) para 77,05% e logo o extrato aquoso de uxi (UA) para 40,26% (Fig. 14 (C)). Os extratos etanólicos de camapu (CE) e uxi (UE), nesta mesma concentração, reduziram o número de células PC-3 para 79,31% e 77,69%, respectivamente, gerando também um efeito inibitório de mais 50% sobre viabilidade celular. O extrato etanólico de abricó (AE) reduziu para 66,15%.

Em relação aos tratamentos com 20 mg/mL de extrato destes frutos é possível observar que alguns extratos foram capazes de realizar grande alteração metabólica nas células de câncer de próstata, como, AA (31,76%), CA (25,65%), e UE (23,09%). No entanto, os extratos AE (57,80%), CE (80,39%) e UA (83,43%) não apresentaram uma boa redução da viabilidade celular.

7.5.2. Ciclo Celular

Devido os extratos dos frutos inibirem significativamente o crescimento de células PC-3 nas concentrações de 20 e 40mg/mL, no tempo de 24 horas, avaliou-se os efeitos dos mesmos na progressão do ciclo celular. Na figura 15, é possível observar a ação do extrato AA na fase S do ciclo celular, com o tratamento de 20 mg/mL, ocasionando o aumento de 16,68% \pm 1,43 de células PC-3 em relação as células não tratadas (5,63% \pm 0,51).

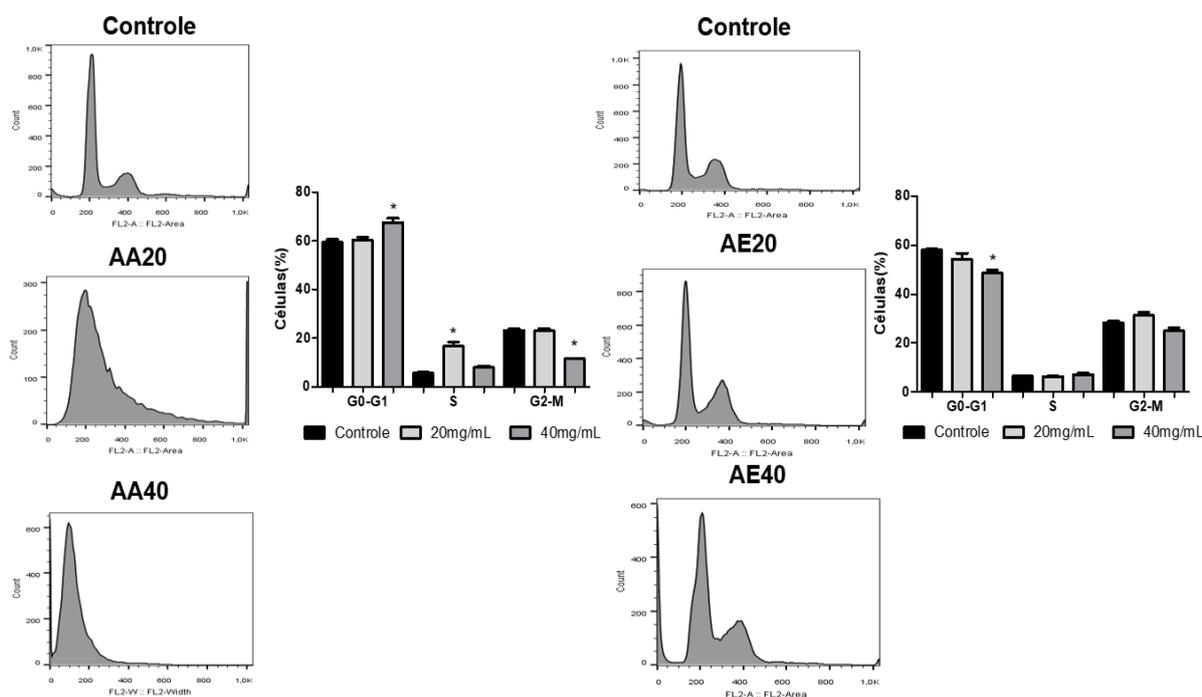


Figura 15. Efeito do extrato aquoso (AA) e etanólico (AE) de abricó sobre a progressão do ciclo celular em células PC-3, 24 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em controle, abricó água 20mg/mL (AA20), abricó água 40mg/mL (AA40), abricó etanol 20 mg/mL (AE 20) e abricó etanol 40 mg/mL (AE40). Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas (20mg/mL e 40mg/mL) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$).

A figura 16 mostra que o extrato CA, na concentração de 20 mg/mL foi capaz de aumentar o nível das células na fase G₂/M em 60,24% ± 1,25 e na fase S em 8,08% ± 0,09, havendo diferença estatística em relação ao controle (P<0,05). O tratamento com o extrato UA, nesta mesma concentração, realizou alterações na primeira fase do ciclo celular, levando a redução quantidades de células PC-3 presentes em G₀/G₁ em relação as células não tratadas (54,03 ± 2,58 vs. 63,57 ± 1,02%).

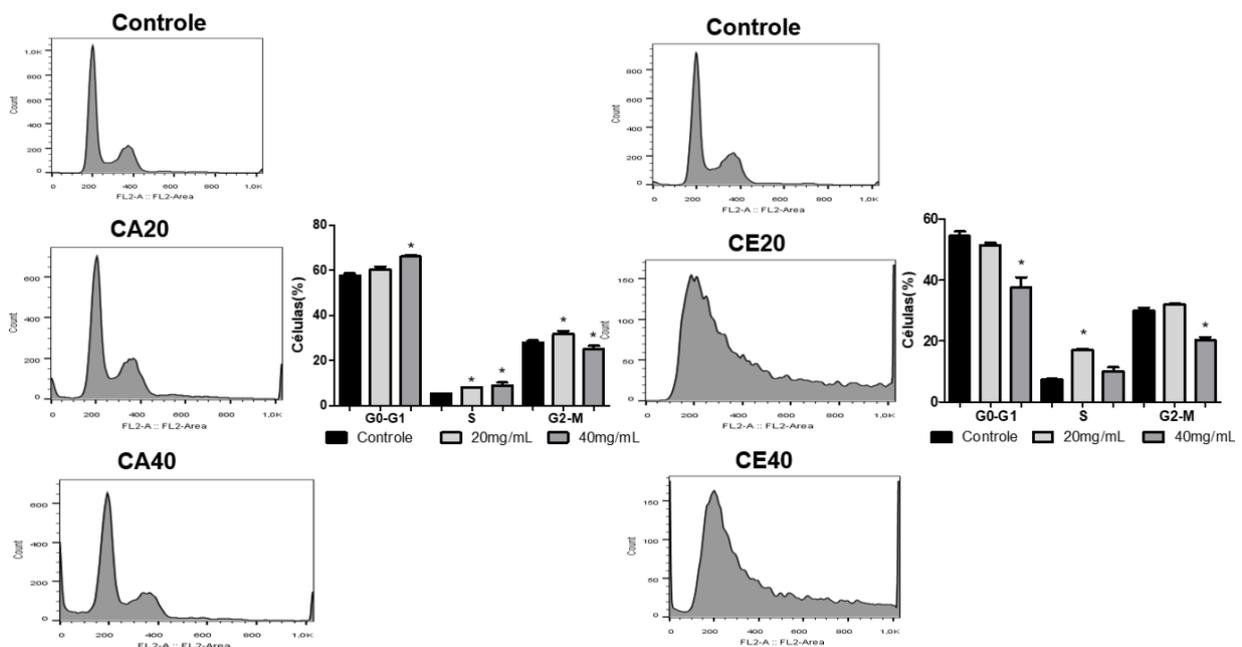


Figura 16. Efeito do extrato aquoso (CA) e etanólico (CE) de camapu sobre a progressão do ciclo celular em células PC-3, 24 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em controle, camapu água 20mg/mL (CA20), camapu água 40mg/mL (CA40), camapu etanol 20 mg/mL (CE 20) e camapu etanol 40 mg/mL (CE40). Os resultados são expressos com média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas (20mg/mL e 40mg/mL) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (*p <0,05).

O tratamento com os extratos AA e CA na concentração de 40mg/mL interrompeu as células PC3 na fase G₀/G₁ do ciclo celular, 67,65 ± 1,40 e 66,13 ± 0,48%, respectivamente, enquanto a progressão do ciclo permaneceu inalterada nas células não tratadas, (Figuras 15 e 16). Esses dados sugerem que estes extratos inibem, pelo menos em parte, o crescimento de células PC-3 induzindo a parada G₀/G₁. O tratamento com 40 mg/mL de extrato UA aumentou significativamente o número de células retidas na fase G₂/M, em comparação ao controle (30,17 ± 0,96 vs. 24,0 ± 0,88%, p<0,05) (Fig. 17).

Em relação aos extratos etanólicos na menor concentração (20mg/mL), o extrato de camapu foi único que apresentou modificação significativa ($p < 0,05$) na fase S do ciclo celular, resultando no aumento de $17,15\% \pm 0,22$ de células em comparação a $7,36\% \pm 0,20$ de células PC-3 não tratadas, ocorrendo mais que o dobro de concentração de células.

O extrato UE, nesta mesma concentração, ocasionou mudanças em duas fases do ciclo celular, em relação ao controle, sendo esta a diminuição ($48,73 \pm 3,29$ vs. $57,97 \pm 0,68\%$, $p < 0,05$) de células presentes na fase G_0/G_1 e a concentração ($37,43 \pm 3,25$ vs. $27,65 \pm 1,33\%$, $p < 0,05$) em G_2/M . O extrato de AE apresentou o mesmo comportamento, no entanto, sem diferença significativa ($p < 0,05$).

O tratamento com extratos etanólicos (Figuras 15, 16 e 17) nas concentrações de 40mg/mL dos três frutos estudados ocasionaram as mesmas alterações no ciclo celular, sendo esta modificação ocorrida na fase inicial do ciclo, com diminuição de células em G_0/G_1 , no qual o extrato CE diminuiu em $37,67\% \pm 2,29$, seguido do extrato UE, $48,45\% \pm 0,98$, e subsequente o extrato AE, $48,57\% \pm 1,01$, $p < 0,05$, em relação às células PC-3 não tratadas.

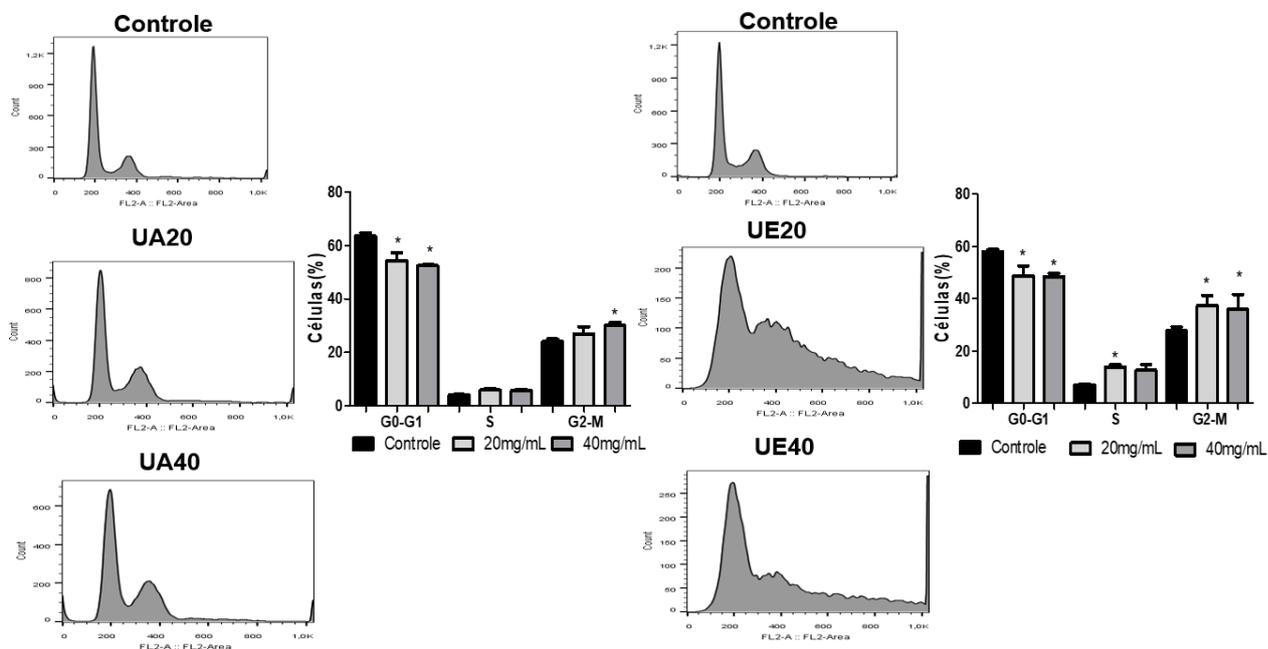


Figura 17. Efeito do extrato aquoso (UA) e etanólico (UE) de uxi sobre a progressão do ciclo celular em células PC-3, 24 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em controle, uxi água 20mg/mL (UA20), uxi água 40mg/mL (UA40), uxi etanol 20 mg/mL (UE 20) e uxi etanol 40 mg/mL (UE40). Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas (20mg/mL e 40mg/mL) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$).

Por meio destes resultados, é possível inferir que 40mg/mL do extrato CE apresenta um maior potencial para diminuir a quantidade de células presentes na fase G₀/G₁ do ciclo celular, em relação aos demais extratos, na mesma concentração. Os extratos CE e UE, na concentração de 40mg/mL também fizeram modificações na fase G₂/M do ciclo, havendo redução de 20,07% ± 0,75 de células PC-3 no tratamento com camapu, e aumento e 35,86% ± 4,94 quando houve tratamento das células câncerígenas prostáticas com extrato de etanólico de uxi.

7.5.3. Apoptose

Células de câncer de próstata (PC-3) tratadas com os extratos de aquosos e etanólicos de abricó, camapu e uxi também foram avaliadas por citometria de fluxo para analisar se esses extratos eram capazes de afetar a apoptose das células PC-3 (Tabela 3). Células coradas com anexina V⁺/PI⁻ são consideradas como apoptóticas precoces; as células coradas com anexina V⁺/PI⁺ são consideradas como apoptóticas tardias; as células coradas com anexina V⁻/PI⁺ são consideradas necróticas (LI *et al.*, 2017).

Em relação às células não tratadas, todos os extratos promoveram aumento da taxa de apoptose em células PC-3 de um modo dependente da concentração, após 24 horas de incubação.

É possível observar na tabela 3 que o tratamento com 20 mg/mL de CA foi capaz de aumentar o número de células em em apoptose inicial (18,04%), e o tratamento com 40 mg/mL do mesmo extrato, provocou um aumento expressivo de em apoptose tardia (80,47%), diferindo estatisticamente das células não tratadas (p<0,05).

Tabela 3. Efeito dos extratos aquoso e etanólico de abricó, camapu e uxi em diferentes concentrações (20mg/mL e 40mg/mL) sobre o processo de morte celular por apoptose nas células PC-3 após 24h de incubação.

Extrato	Fases	Controle	20mg/mL	40mg/MI
AH	Células viáveis (Anexina V- PI-)	98,02 ± 0,13 ^a	73,27 ± 8,16 ^b	93,40 ± 3,30 ^c
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	0,42 ± 0,42 ^a	9,18 ± 2,82 ^b	3,95 ± 1,92 ^c
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	0,54 ± 0,07 ^a	12,21 ± 6,96 ^b	1,33 ± 0,82 ^c
	Células não apoptóticas (Anexina V- PI+)	1,26 ± 0,10 ^a	5,40 ± 1,57 ^b	1,30 ± 0,78 ^a
AE	Células viáveis (Anexina V- PI-)	98,02 ± 0,13 ^a	68,27 ± 1,92 ^b	42,06 ± 0,68 ^c
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	0,42 ± 0,42 ^a	4,80 ± 0,48 ^b	10,08 ± 0,99 ^c
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	0,54 ± 0,07 ^a	9,27 ± 0,49 ^b	7,26 ± 0,88 ^b
	Células não apoptóticas (Anexina V- PI+)	1,26 ± 0,10 ^a	19,02 ± 0,90 ^a	38,95 ± 1,49 ^b
CA	Células viáveis (Anexina V- PI-)	98,02 ± 0,13 ^a	71,42 ± 1,28 ^b	4,12 ± 0,82 ^c
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	0,42 ± 0,42 ^a	16,50 ± 0,22 ^b	14,75 ± 1,98 ^c
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	0,54 ± 0,07 ^a	3,36 ± 0,32 ^b	80,47 ± 2,84 ^c
	Células não apoptóticas (Anexina V- PI+)	1,26 ± 0,10 ^a	8,69 ± 0,87 ^b	0,61 ± 0,10 ^a
CE	Células viáveis (Anexina V- PI-)	98,02 ± 0,13 ^a	77,80 ± 2,65 ^b	96,77 ± 0,83 ^a
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	0,42 ± 0,42 ^a	9,63 ± 1,27 ^b	0,54 ± 0,29 ^a
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	0,54 ± 0,07 ^a	15,49 ± 4,12 ^b	1,11 ± 0,42 ^a
	Células não apoptóticas (Anexina V- PI+)	1,26 ± 0,10 ^a	3,12 ± 1,75 ^a	1,57 ± 0,63 ^a
UA	Células viáveis (Anexina V- PI-)	98,02 ± 0,13 ^a	89,72 ± 4,35 ^b	25,77 ± 0,76 ^c
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	0,42 ± 0,42 ^a	4,30 ± 1,87 ^b	45,05 ± 1,46 ^c
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	0,54 ± 0,07 ^a	2,17 ± 1,37 ^a	0,78 ± 0,06 ^a
	Células não apoptóticas (Anexina V- PI+)	1,26 ± 0,10 ^a	3,80 ± 1,12 ^a	28,42 ± 0,71 ^b
UE	Células viáveis (Anexina V- PI-)	98,02 ± 0,13 ^a	39,83 ± 3,06 ^b	52,43 ± 4,21 ^c
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	0,42 ± 0,42 ^a	0,01 ± 0,00 ^b	0,02 ± 0,02 ^c
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	0,54 ± 0,07 ^a	49,93 ± 3,09 ^b	35,23 ± 3,10 ^b
	Células não apoptóticas (Anexina V- PI+)	1,26 ± 0,10 ^a	5,61 ± 1,59 ^a	11,31 ± 2,94 ^b

Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey. Letras diferentes na mesma linha se diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Os tratamentos com extratos UA modificaram a fração de apoptose tardia, no entanto somente 40 mg/mL de extrato foi capaz de alterar essa fração de forma significativa, em relação ao controle ($p < 0,05$), conferindo um aumento de 28,42% de células PC-3 (Figura 18). O extrato AA, foi o único que não foi capaz de causar morte destas células de forma expressiva.

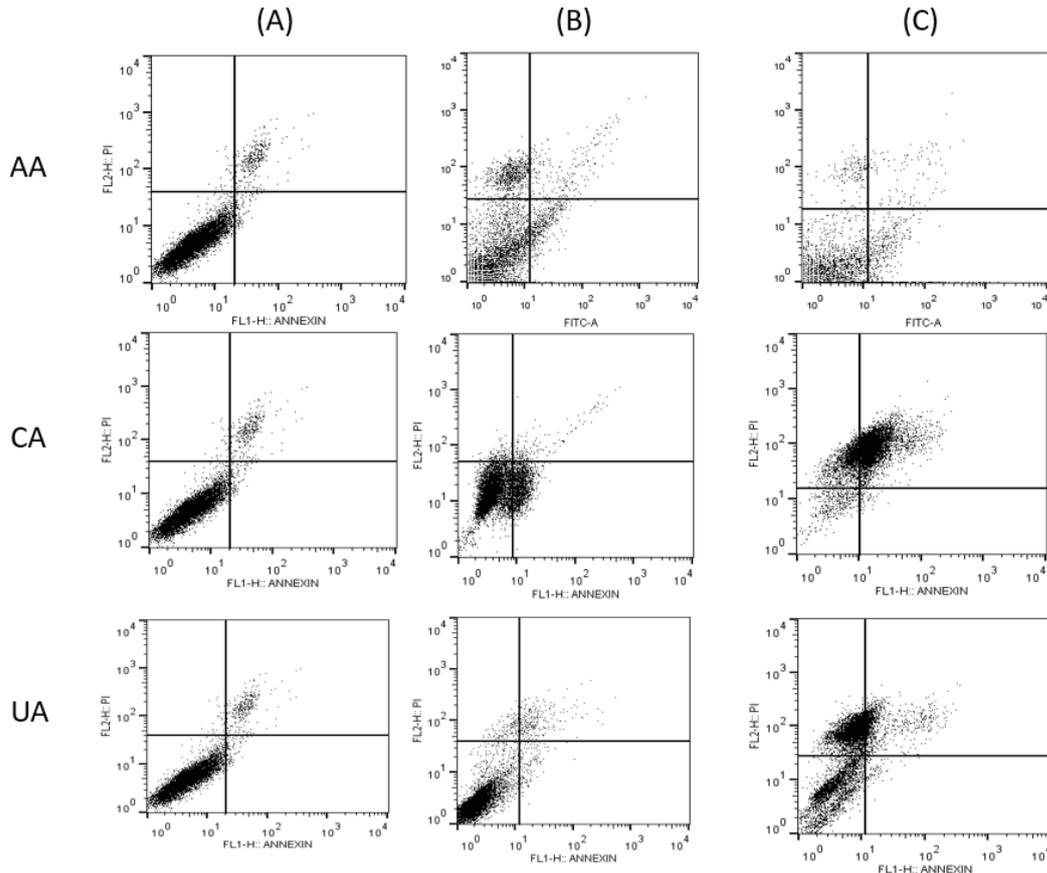


Figura 18: Efeitos dos extratos aquosos de abricó (AA), camapu (CA), e uxi (UA) sobre o processo de morte programada em células PC-3, 24H após a incubação. As análises por citometria de fluxo das células não tratadas (CT) estão ilustradas em A e das células tratadas em B (20mg/mL) e C (40mg/mL).

Os extratos de AE, em ambas as concentrações aumentaram o nível de células na fase de apoptose inicial (Figura 19), sendo caracterizada por 9,27% para a concentração de 20mg/mL e 7,26%, para a concentração de 40mg/mL, em relação ao controle (0,54%), não havendo diferença significativa entre as concentrações dos extratos, ocasionado também um grande concentração de células na fase de apoptose tardia, com um aumento de 19,02% para o tratamento com a menor concentração do extrato, e 38,95% para a maior concentração.

Pode-se observar na tabela 3 que o extrato CE (20mg/mL) aumenta a fração de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose em relação as células não tratadas, no entanto, o tratamento com 40 mg/mL resultou em níveis muito baixo de mudança em todas as fases, não apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) em relação as células não tratadas.

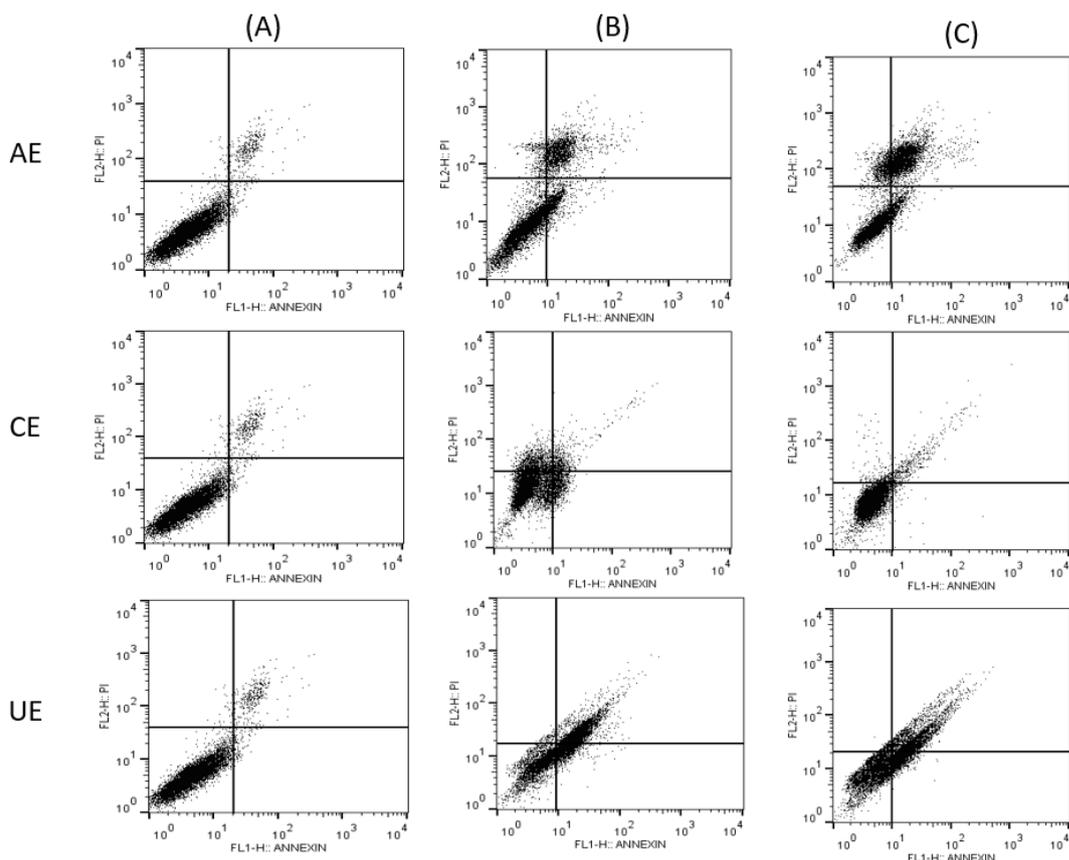


Figura 19: Efeitos dos extratos etanólicos de abricó (AE), camapu (CE), e uxi (UE) sobre o processo de morte programada em células PC-3, 24H após a incubação. As análises por citometria de fluxo das células não tratadas (CT) estão ilustradas em A e das células tratadas em B (20mg/mL) e C (40mg/mL).

O tratamento com 20mg/mL de extrato etanólico de uxi (Figura 19) promoveu efeitos citotóxicos as células PC-3, após 24 horas de exposição, sendo caracterizado por 49,93% em apoptose inicial. Para a concentração de 40mg/mL houve alteração na fase de apoptose inicial (35,23%). Em relação ao extrato aquoso deste fruto é possível observar que 40 mg/mL ocasionou maiores modificações na células cancerígenas nas fases de apoptose tardia e necrose (Figura 18).

8. Discussão

A floresta amazônica inclui uma das áreas mais ricas em biodiversidade no mundo, incluindo um grande número de recursos naturais com diferentes moléculas ativas biologicamente, como os compostos fenólicos, que são fontes de antioxidantes naturais presentes nas frutas (SOUZA *et al.*, 2016).

Pode-se observar que os resultados obtidos para extratos etanólicos neste trabalho são maiores que em alguns frutos da Amazônia, como o araçá-boi ($87,2 \pm 3,0$ mg AGE/100g⁻¹) e araçá ($129,1 \pm 9,3$ mg AGE/100g⁻¹), e menor que camucamu ($1797,2 \pm 37,7$ mg AGE/100g⁻¹) relatado por GENOVESE *et al.* (2008). Comparando os resultados deste estudo com os frutos do cerrado brasileiro, os frutos amazônicos apresentaram mais compostos fenólicos em relação ao jenipapo ($47,94 \pm 1,81$ mg AGE/100g⁻¹), maracujá doce ($245,36 \pm 3,70$ mg AGE/100g⁻¹), graviola ($281 \pm 5,40$ mg AGE/100g⁻¹) e murici ($334,37 \pm 9,07$ mg AGE/100g⁻¹), e inferior ao marolo ($739,37 \pm 7,92$ mg AGE/100g⁻¹) e gabioba ($1222,59$ mg AGE/100g⁻¹) (ALVES, 2013;SOUZA *et al.*, 2012).

Um estudo realizado com seis variedade de abricó apresentou resultados que variaram de 90 a 143 mg AGE/100g⁻¹ de compostos fenólicos totais (PÉROUMAL *et al.*, 2017). BRAGA *et al.* (2010), encontrou a quantidade de $25,41 \pm 2,30$ mg AGE/100g⁻¹, sendo tais valores inferiores aos presentes neste trabalho, podendo ser explicado pelo uso de diferentes condições fixas de extração, em que em ambos os estudos citados utilizaram uma mistura de diferentes solventes, onde o primeiro fez uso de água e acetona (70:30 v/v) e o segundo acetona, água e ácido acético (70:29,5:0,5 v/v), enquanto neste trabalho foi realizada extração com água e etanol, pra que os extratos pudessem ser utilizados em cultivo de linhagem celular.

BARROS *et al.*, (2017), ressalta que a extração de compostos fenólicos, principalmente os insolúveis, em frutas ou em outra classe de matrizes precisa de mais estudos, pois a preparação da amostra, a polaridade do solvente utilizado, a técnica empregada e também a temperatura, são fatores que podem influenciar na extração e no conteúdo desses compostos.

De acordo com a classificação proposta por Vasco, Ruales e Kamal-Eldin (2008), AA, AE, CA, CE e UA foram classificados como frutas como tendo conteúdo de fenólicos médio (100-500 mg AGE/100 g), e o extrato etanólico de Uxi (UE) classifica esta fruta com alto conteúdo de compostos fenólicos (>500 mg AGE/100 g).

Dentre as classes de compostos fenólicos encontradas por meio da análise de espectrometria de massas UPLC-MS^E, é possível destacar o grupo de ácido fenólicos e flavonoides. Os ácidos fenólicos são importantes antioxidantes com potencial de inibição na formação de compostos mutagênicos e carcinogênicos e além de reduzirem os riscos de outras doenças crônicas (MEZNI *et al.*, 2018).

Um dos ácidos fenólicos encontrados no extrato CE foi o ácido sinápico, no qual é um derivado do ácido hidroxicinâmico, sendo encontrado também em *Passiflora edulis Sims* por MEDINA *et al.* (2017) e apresentou capacidade de aumentar a expressão de BAX, CASP3, CASP8, CYCS, FAS, TIMP-1 e CDH1, e diminuir significativamente a expressão de MMP-9 (metaloproteinases da matriz extracelular) em células PC-3, além de suprimir a invasão celular como é relatado em estudo realizado por EROĞLU *et al.*, (2018).

De acordo com SILVA *et al.* (2015) o uso de flavonoides pode inibir as reações oxidativas nocivas a tecidos e inibir a ação de diversas enzimas relacionadas ao desenvolvimento de câncer de próstata, agindo de forma anti-promotora desta patologia. O Kaempferol um importante flavonol, que foi encontrado somente no extrato etanólico de uxi, e foi identificado em uvas híbridas por (ROSSO *et al.*, 2014) e no fruto amazônico remela-de-cachorro (*Clavija lancifolia Desf.*) por PAZ *et al.* (2018), já foi descrito como sendo capaz de causar arraste de células de PC-3 e LNCaP na fase G₂/M do ciclo celular (BARUAH; KHANDWEKAR; SHARMA, 2016).

Em outro trabalho, a urolitina A, um polifenol identificado nos extratos AA e AE, é um metabólito importante em nozes, que mostrou efeito modulatório na expressão de uma ampla gama de genes envolvidos no desenvolvimento de câncer de próstata, progressão e metástase. Além disso, este composto exerceu efeitos quimiopreventivos contra carcinogênese da próstata em um modelo de célula de câncer de próstata. Estes efeitos incluíram a inibição da proliferação

celular, e progressão do ciclo celular, através do regulação da proteína p21 e indução de apoptose acoplada a caspases 3 e 7 (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

Em relação a abundância relativa dos compostos identificados, foi possível observar que o álcool sinapílico II foi um metabólito com grande abundância relativa em extratos de abricó e o composto seringina no fruto de uxi. CHOI *et al.* (2004) ao estudarem estes compostos em células intestinais, pôde constatar a ação deles como agente anti-inflamatório e antinociceptivos. A seringina também foi determinada e relatada a partir de extrato metanólico de jabuticaba fresca por WU *et al.* (2012) e demonstrou ser citotóxica contra linhagem celular de câncer de próstata (DU-145) (LALL *et al.*, 2015).

Os compostos fenólicos são bastante abundantes em frutas, e seu consumo têm sido associado à redução de risco de desenvolvimento de câncer. Esta correlação pode ser explicada por meio da capacidade dessas substâncias serem capazes de atuar por meio da sua capacidade antioxidante, por meio da regulação do ciclo celular, entre outros mecanismos (OLIVEIRA e BASTOS, 2011). Devido às características multifuncionais dos compostos fenólicos encontrados em frutas amazônicas, a eficácia da medição da capacidade antioxidante de um extrato de polpa é melhor avaliada quando se utilizam testes comumente aceitos.

SCHIASSI *et al.* (2018), quando estudaram a atividade antioxidante da araçá ($10,92 \pm 0,11 \mu\text{M Trolox g}^{-1}$), buriti ($6,03 \pm 0,16 \mu\text{M Trolox g}^{-1}$), cagaita ($29,32 \pm 0,69 \mu\text{M Trolox g}^{-1}$), cajá amarelo ($5,55 \pm 0,01 \mu\text{M Trolox g}^{-1}$) e marolo ($132,16 \pm 1,40 \mu\text{M Trolox g}^{-1}$), encontraram valores inferiores aos do presente estudo, para o método de ABTS.

Os extratos etanólicos dos frutos de abricó, camapu e uxi apresentaram maior capacidade antioxidante para DPPH. Segundo (MOO-HUCHIN *et al.*, 2015; OROIAN; ESCRICHE, 2015), este método é capaz de extrair compostos hidrofílicos e lipofílicos, sendo o etanol um dos solventes mais utilizados para a extração de compostos bioativos, pois propõe alguns benefícios, como baixa toxicidade, boa produção da extração, é seguro para consumo humano, e permite que os extratos sejam usados na indústria alimentícia. (GONÇALVES,

2008) ao estudar frutas nativas, encontrou valores de DPPH de $141,00 \pm 5,00$ $\mu\text{M Trolox g}^{-1}$ e de ORAC de $137,00 \pm 10,00$ $\mu\text{M Trolox g}^{-1}$ para o fruto de uxi, resultados superiores aos encontrados neste trabalho.

A atividade antioxidante pelo método FRAP seguiu o mesmo padrão da análise do DPPH, onde valores mais altos foram encontrados para os extratos etanólicos. É provável que os compostos antioxidantes das amostras detectadas por FRAP sejam os mesmos daqueles avaliados por DPPH. O extrato etanólico de abricó também apresentou a maior atividade neste método.

Os resultados encontrados neste trabalho para os extratos aquosos na determinação da atividade antioxidante por FRAP, foram inferiores aos obtidos por BARROS *et al.* (2017) para extratos aquosos de achachairu ($712,35 \pm 6,61$ $\mu\text{mol de sulfato ferroso/g}$), araçá-boi ($798,92 \pm 1,52$ $\mu\text{mol de sulfato ferroso/g}$) e bacaba ($567,45 \pm 4,25$ $\mu\text{mol de sulfato ferroso/g}$). No entanto, foram maiores aos encontrados por Montenegro *et al.* (2017), para os frutos de taperebá ($19,95 \pm 0,68$ $\mu\text{mol de sulfato ferroso/g}$), muruci ($5,92 \pm 0,74$ $\mu\text{mol de sulfato ferroso/g}$) e bacuri ($4,97 \pm 0,99$ $\mu\text{mol de sulfato ferroso/g}$).

Em relação ao ORAC SANTOS *et al.* (2015) relataram em frutos da Amazônia como bacaca ($195,00 \pm 10,00$ mM Trolox g^{-1}), buriti ($83,00 \pm 6,00$ mM Trolox g^{-1}), inajá ($26,00 \pm 2,00$ mM Trolox g^{-1}), pupunha ($94,00 \pm 1,00$ mM Trolox g^{-1}) e tucumã ($64,00 \pm 4,00$ mM Trolox g^{-1}) resultados superiores aos extratos de abricó, camapu e uxi.

A correlação entre a capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu e os métodos de ABTS, DPPH, FRAP e ORAC demonstraram a importância da utilização de diferentes métodos para disponibilizar a atividade antioxidante, sobretudo em matrizes complexas.

A correlação positiva entre compostos fenólicos e ORAC pode ser explicada em parte devido a este ensaio ser considerado um método mais exato, pois utiliza uma fonte radical biologicamente relevante (peroxil) e permite a mensuração da capacidade antioxidante total através da combinação da capacidade antioxidante de frações hidrofílicas e lipofílicas (Dudonné *et al.*, 2009). A boa correlação de alguns extratos entre os compostos fenólicos totais e os métodos ABTS, DPPH e FRAP acontece devido à semelhança dos

mecanismos de reação que se fundamentam, principalmente, na transferência de elétrons (ALVES, 2013). De acordo com a metodologia utilizada, esses resultados sugerem que os compostos fenólicos podem ser um dos principais fatores responsáveis pela capacidade antioxidante dos frutos de abricó, camapu e uxi.

O câncer de próstata é considerado a neoplasia maligna mais frequente no sexo masculino em o todo território brasileiro, causando em torno de 17 mil mortes por ano no Brasil (RAMOS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2015). A relação da alimentação no desenvolvimento e progressão do câncer, em especial o de próstata, têm chamado atenção nos últimos anos. No entanto, a maneira como a alimentação atinge o câncer, pode ser também específico de acordo com o estágio e as características morfológicas do câncer de próstata (CAPURSO; VENDEMIALE, 2017).

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi selecionada a linhagem celular PC-3, devido ao alto número de estudos realizados com esta linhagem e suas características complementares. As células PC-3 são originárias de metástase em ossos, em que não respondem aos andrógenos, glicocorticóides ou fatores de crescimento de fibroblastos, sendo células que não dependem de andrógeno, e apresentam baixos níveis da enzima 5-alfa redutase, assim como da enzima fosfatase ácida, não expressando PSA (SOUZA, G., 2015).

Diversos estudos têm apresentado relação entre o consumo regular de frutas e a prevenção de câncer. As frutas são importante fonte de antioxidantes, e tais compostos são capazes de dificultar a progressão do câncer de próstata, por meio da redução do estresse oxidativo e reparo do DNA em células epiteliais desta neoplasia, assim como por meio da ação de alguns compostos bioativos na metilação do DNA (CZORNY *et al.*, 2017; TABORELLI *et al.*, 2017).

No entanto, são encontrados poucos estudos experimentais avaliando o impacto de frutos da Amazônia em câncer de próstata, sobretudo com frutos poucos conhecidos como abricó, camapu e uxi.

Após o tratamento com diferentes extratos, aproximadamente 60% das células da linhagem de carcinoma de próstata (PC-3) não mantiveram-se viáveis

(com a membrana íntegra), portanto, com exceção dos extratos AE e UA, os demais são considerados citotóxicos (ABD GHAFAR *et al.*, 2013).

O extrato etanólico de camapu ocasionou um grande efeito inibitório na linhagem de células PC-3 e alguns estudos mostram a capacidade antiproliferativa de compostos extraídos de *Physalis angulata* contra diversos tipos de câncer humano, como em câncer de próstata (C4-2B, 22Rv1, LNCaP e PC-3), câncer renal (786-O, A-498 e ACHN), melanoma (A375-S2), câncer de pulmão (MCF-7) e câncer de pulmão (SUN *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2016). Devido as diferenças de composição química entre os frutos de abricó, camapu e o uxi, estes expressaram distintos graus de efeito inibitório contra as células de câncer de próstata, o que nos permitiu avaliar a ação dos extratos aquosos e etanólicos no ciclo celular de PC-3.

A regulação da progressão do ciclo celular é considerada uma estratégia potencialmente eficaz para o crescimento de células cancerígenas, e o tratamento com compostos bioativos provenientes de frutos, têm sido capaz de regular o ciclo celular em diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de próstata (CORRÊA, 2016; KIM *et al.*, 2016).

Neste estudo foi possível observar que os extratos aquosos dos frutos foram capazes de gerar alterações na fase G_0/G_1 e na fase G_2/M , nas duas concentrações, 20 mg/mL e 40 mg/mL, com exceção do tratamento com 20 mg/mL de extrato aquoso de abricó. A ação benéfica de um composto bioativo de um alimento no controle de células cancerígenas pode ser analisada por meio da sua capacidade em parar o ciclo celular nessas fases, reduzindo a quantidade de células presentes na fase S, uma vez que células tumorais demonstram frequente proliferação celular na fase S e G_2/M (CORRÊA, 2016).

Poucos trabalhos são encontrados relacionados ao uso de extrato de abricó, e sua interação com o ciclo celular de células de câncer de próstata. ÁLVAREZ-DELGADO *et al.* (2009), analisou o efeito da cumarina A/AA isolada de *Mammea americana* em células de carcinoma cervical humano (HeLa), e após 24 horas de tratamento, não obteve nenhuma alteração significativa no ciclo celular. O tratamento com 20mg/mL de extrato aquoso de abricó aumentou significativamente a quantidade de células na fração S, e este resultado sugere

que os compostos bioativos presentes neste extrato, podem ser capazes de modular a proliferação de células PC-3, bloqueando a progressão do ciclo celular na fase S. Este bloqueio pode ser devido a uma resposta de chek-point a danos no DNA ou devido a outros mecanismos não identificados neste trabalho (NEPOMUCENO *et al.*, 2017).

Alguns estudos tem demonstrado a capacidade de extratos de *Physalis angulata* em promover parada de células de câncer para a fase G₂/M do ciclo celular (HSEU *et al.*, 2011;MAGALHÃES *et al.*, 2007;WU, S. J. *et al.*, 2004). Corroborando com os resultados encontrados neste estudo, em que após 24 horas de tratamento com 40mg/mL de CE, houve uma redução na fração de células nas fases G₀/G₁ e G₂/M e aumento na fase S, REYES-REYES *et al.*, (2013), encontraram resultados similares para as células de câncer de próstata (DU145).

Os extratos UA (40 mg/mL) e UE (20 e 40 mg/mL) modificaram o ciclo na fase G₀/G₁, com redução da fração de células PC-3 nesta fase. Em estudo realizado por TILOKE *et al.* (2019) foi identificado que o extrato aquoso de moringa diminuiu significativamente a quantidade de células de Hep-G2 presentes na fase G₀/G₁, em relação ao controle, após 24 horas de tratamento.

Portanto, neste trabalho, para a análise do ciclo celular em células de PC-3, para os extratos que provocaram aumento da quantidades de células presentes na fase G₀/G₁ e redução do total de células presentes em G₂/M, após 24 horas de tratamento, sugere-se que estes extratos de frutos podem provocar parada na primeira fase do ciclo celular, impossibilitando as células de realizarem mitose, e se multiplicarem. Também é possível inferir que por meio da ação dos compostos bioativos presentes nos frutos de abricó, camapu e uxi, os extratos destes frutos foram capazes de inibir a viabilidade celular de câncer de próstata humano (PC-3), assim como a intervir nas fases do ciclo celular.

A parada na fase G₀/G₁ da progressão do ciclo celular apresenta uma oportunidade para as células passarem pelo processo de reparo dos mecanismos ou seguir a via apoptótica (morte celular) (KIM *et al.*, 2016).

No presente estudo, os ensaios de apoptose demonstraram que os extratos AE, CA, CE, UA e UE, nas concentrações de 20 e 40 mg/mL, foram capazes de

promover morte celular por apoptose em adenocarcinoma de próstata (PC-3), quando comparados ao grupo sem tratamento, após 24 horas de incubação. Dentre as vias apoptóticas, são conhecidos três tipos, sendo eles apoptose, necrose e autofagia. A apoptose é uma forma ativa de morte celular programada, na qual para acontecer, necessita de energia, sendo caracterizada por alterações morfológicas da célula, condensação da cromatina e desintegração da célula em pequenos fragmentos, e sua desregulação tem sido associada ao câncer, e sua indução é conhecida por ser uma estratégia eficiente para a terapia do câncer (XU *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos na análise de apoptose para os extratos de UA (20 mg/mL), AE e CE (40 mg/mL) coincidem com os resultados alcançados na análise de ciclo celular, uma vez que houve aumento do número de células em apoptose e redução em G_0/G_1 . A indução da morte celular é um dos principais meios de ação dos compostos bioativos na inibição de células de câncer (SOARES *et al.*, 2015).

Alguns estudos têm mostrado que o extrato de *Physalis angulata* é capaz de induzir ao processo de apoptose em diversas células de câncer humano, como em células de câncer de fígado HepG2 (WU *et al.*, 2004), em células de melanoma A375 (HSU *et al.*, 2012) e em células de câncer renal A498 (WU *et al.*, 2012). Outros trabalhos mostram que os frutos da amazônia são capazes de induzir a morte de células cancerígenas por apoptose. Cadoná e colaboradores (2016) ao estudarem os efeitos do guaraná em células de câncer de colón retal (HT-29), e JOBIM *et al.* (2019) ao avaliarem os efeitos antitumorais de frutos de açaí em linhagem celular de câncer de próstata (DU145) mostraram aumento da taxa de apoptose promovidas por estes alimentos.

De acordo com PROSKURYAKOV; GABAI, (2010) geralmente os tratamentos contra o câncer têm como objetivo a promoção de morte celular de preferência por apoptose, no entanto, a morte por necrose pode acontecer quando a apoptose é bloqueada por inibição de enzimas, como caspase, ou superexpressão de proteínas antiapoptóticas, justificando a concentração de células PC-3 na fase necrótica quando tratadas com extrato aquoso de uxi.

Na prática clínica, a apoptose é alvo para um potencial uso terapêutico de morte celular programada, sendo a compreensão dos mecanismos e das alterações nos componentes das vias apoptóticas, e sua correlação com a ocorrência do câncer, ferramentas importantes para o desenvolvimento de novas terapias e métodos de prevenção do câncer.

9. Conclusão

A literatura científica atual sobre os frutos de abricó (*Mammea americana*), camapu (*physalis angulata*) e uxi (*Endopleura uchi*) ainda é limitada, especialmente sobre a influência em linhagem de células cancerígenas. Mas o que se tem relatado até o momento, demonstra um importante papel destes frutos como potentes antioxidantes, podendo ser utilizados na prevenção de diversas doenças entre estas o câncer, uma vez que:

- Na caracterização dos extratos dos frutos de abricó, camapu e uxi, foi possível observar que os extratos etanólicos destes frutos, foram o que apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos totais, e o fruto de uxi teve maior sensibilidade para a metodologia utilizada neste trabalho, apresentando maior quantidade desses compostos.

- Para a caracterização dos compostos fenólicos presentes nos extratos dos frutos, foi identificado 293 compostos, sendo os ácidos fenólicos e flavonoides as classes de fenólicos encontradas nos extratos de abricó, camapu e uxi, e os extratos AA e CA identificaram maiores quantidades de metabólitos.

- Na caracterização dos extratos dos frutos de abricó, camapu e uxi, estes apresentaram atividade antioxidante elevada, na qual os extratos etanólicos foram capazes de extrair maiores quantidade de compostos bioativos, em relação aos extratos aquosos.

- Esses frutos foram capazes de inibir o crescimento de células de câncer de próstata humano (PC-3). Os extratos aquosos de abricó e camapu foram capazes de apresentar maior efeito citotóxico, com o fruto camapu demonstrando maior efeito na viabilidade celular dessa linhagem.

- Os extratos foram capazes de causar alterações no ciclo celular da linhagem celular de CaP, principalmente os extratos AA, CA, AE, CE, e UE, que ocasionaram parada na primeira fase do ciclo celular, aumentando a quantidade de células presentes na fase G₀/G₁ e diminuindo em G₂/M, sugerindo inibição, pelo menos em parte, do crescimento de células PC-3.

Sendo assim, o aprofundamento de estudos em modelos animais e novos ensaios *in vitro* sobre a possível proteção dos extratos de abricó, camapu e uxi no processo do desenvolvimento do câncer, permitirá a entender outros

mecanismos ainda não elucidados neste trabalho. Maiores investigações são necessárias para identificar os mecanismos de atividade antiproliferativa, as vias de indução de apoptose e modificações dos padrões de ciclo celular observados no presente estudo.

10. Referências

ABD GHAFAR, S. A. et al. **Cytotoxic Activity of Kenaf Seed Oils from Supercritical Carbon Dioxide Fluid Extraction towards Human Colorectal Cancer (HT29) Cell Lines.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, [s.l.], v. 2013, p. 1–8, 2013. ISSN: 1741-427X, DOI: 10.1155/2013/549705.

ADJAKLY, M. et al. **Prostate cancer : The main risk and protective factors – Epigenetic modifications.** *Annales d'Endocrinologie*, [s.l.], p. 1–17, 2015. ISSN: 0003-4266, DOI: 10.1016/j.ando.2014.09.001.

ALGOTAR, A. et al. **Comprehensive Lifestyle Improvement Program for Prostate Cancer (CLIPP): Protocol for a Feasibility and Exploratory Efficacy Study in Men on Androgen Deprivation Therapy.** *JMIR Research Protocols*, [s.l.], v. 8, nº 2, p. e12579, 2019. DOI: 10.2196/12579.

ÁLVAREZ-DELGADO, C. et al. **Coumarin A/AA induces apoptosis-like cell death in HeLa cells mediated by the release of apoptosis-inducing factor.** *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, [s.l.], v. 23, nº 4, p. 263–272, 2009. ISSN: 10956670, DOI: 10.1002/jbt.20288.

APPLEGATE, C. C.; ROWLES, J. L.; ERDMAN, J. W. **Can lycopene impact the androgen axis in prostate cancer?: A systematic review of cell culture and animal studies.** *Nutrients*, [s.l.], v. 11, nº 3, 2019. ISSN: 20726643, DOI: 10.3390/nu11030633.

ARAGÃO, A. B. De. **Caracterização bioquímica e centesimal das espécies de tucumã e uxi.** [s.l.], p. 97, 2013.

BACELAR JUNIOR, A. et al. **Câncer de próstata: métodos de diagnóstico, prevenção e tratamento.** *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research - BJSCR*, [s.l.], v. 10, nº 3, p. 40–46, 2015. ISSN: 23174404.

BARROS, R. G. C. et al. **Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity in some Brazilian exotic fruit residues.** *Food Research International*, [s.l.], v. 102, nº September, p. 84–92, 2017. ISSN: 18737145, DOI: 10.1016/j.foodres.2017.09.082.

BARUAH, M. M.; KHANDWEKAR, A. P.; SHARMA, N. **Quercetin modulates Wnt signaling components in prostate cancer cell line by inhibiting cell viability, migration, and metastases.** *Tumor Biology*, [s.l.], v. 37, nº 10, p. 14025–14034, 2016. ISSN: 14230380, DOI: 10.1007/s13277-016-5277-6.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. **Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade.** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, [s.l.], v. 53, nº 5, p. 646–656, 2009. DOI: 10.1590/s0004-27302009000500017.

BENTO, J. F. **CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA CASCA DE Endopleura uchi (Huber) Cuatrec:**

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO DECOCTO E DE FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS EM CÉLULAS HeLa E MACRÓFAGOS. [s.l.], p. 124, 2013.

BERTOLDO, S. A.; PASQUINI, V. Z. **Câncer de próstata: um desafio para a saúde do homem.** *Revista de Enfermagem UNISA*, [s.l.], v. 11, nº 2, p. 138–42, 2010.

BRAGA, A. C. C. et al. **Atividade Antioxidante E Quantificação De (M Ammea Americana)***. [s.l.], p. 31–36, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** *LWT - Food Science and Technology*, [s.l.], v. 28, nº 1, p. 25–30, 1995. ISSN: 00236438, DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

CAMLOFSKI, A. M. D. O. **AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS E CARACTERIZAÇÃO DAS PECTINAS DO FRUTO DE Physalis angulata L.** [s.l.], v. 2014, p. 561–565, 2014.

CAPURSO, C.; VENDEMIALE, G. **The Mediterranean Diet Reduces the Risk and Mortality of the Prostate Cancer: A Narrative Review.** *Frontiers in Nutrition*, [s.l.], v. 4, nº August, 2017. DOI: 10.3389/fnut.2017.00038.

CASTILLEJOS-MOLINA, R. A.; GABILONDO-NAVARRO, F. B. **Castillejos-Molina. Prostate cancer.** [s.l.], v. 58, nº 2, p. 279–284, 2015.

CHOI, J. et al. **Anti-inflammatory and antinociceptive effects of sinapyl alcohol and its glucoside syringin.** *Planta Medica*, [s.l.], v. 70, nº 11, p. 1027–1032, 2004. ISSN: 00320943, DOI: 10.1055/s-2004-832642.

CORRÊA, M. G. **Efeito dos Extratos de Cultivares de goiaba em linhagens celulares humanas de câncer de mama.** 82 p. 2016.

COSTA, J. A. P.; MATIAS, A. G. C. **Câncer de próstata e a relação quimiopreventiva do licopeno : revisão sistematizada . Prostate cancer and chemopreventive relationship of lycopene : systematic review . El cáncer de próstata y la relación quimiopreventivo de licopeno : revisión sistemática.** *Tempus, actas de saúde colet*, [s.l.], v. 8, nº 4, p. 223–238, 2014. ISBN: 0028-0836, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature14347.

COSTA, L. C.; RIBEIRO, W. S.; BARBOSA, J. A. **Compostos Bioativos E Alegações De Potencial Antioxidante De Flores De Maracujá, Cravo Amarelo, Rosa E Capuchinha.** *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, [s.l.], v. 16, nº 3, p. 279–289, 2014. DOI: 10.15871/1517-8595/rbpa.v16n3p279-289.

COSTA, P. A. Da et al. **Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits.** *Food Research International*, [s.l.], v. 43, nº 6, p. 1603–1606, 2010. ISSN: 09639969, DOI: 10.1016/j.foodres.2010.04.025.

CRUZ, M. D. de O. e. **Frutas e Produtos Hortícolas na Prevenção do Cancro.** [s.l.], p. 64, 2015.

CZORNY, R. C. N. et al. **Fatores De Risco Para O Câncer De Próstata: População De Uma Unidade Básica De Saúde.** *Cogitare Enfermagem*, [s.l.], v. 22, nº 4, 2017. DOI: 10.5380/ce.v22i4.51823.

DAMIÃO, R. et al. **Câncer de próstata.** *Medicina Clinica*, [s.l.], v. 146, nº 3, p. 121–127, 2015. ISSN: 15788989, DOI: 10.1016/j.medcli.2014.12.021.

DAVIS, C. et al. **Definition of the Mediterranean Diet : A Literature Review.** *Nutrients*, [s.l.], nº November, p. 9139–9153, 2015. DOI: 10.3390/nu7115459.

DU, L. et al. **Public Access NIH Public Access.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 32, nº 7, p. 736–740, 2012. ISBN: 1111111111, ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0178059.

DUARTE, S. R. **Expressão da proteína BRCA2 em prostatectomia e sua correlação com a biópsia em pacientes com câncer de próstata Expressão da proteína BRCA2 em prostatectomia e sua correlação com a biópsia em pacientes com câncer de próstata.** [s.l.], p. 65, 2016.

EROĞLU, C. et al. **Anticancer mechanism of Sinapic acid in PC-3 and LNCaP human prostate cancer cell lines.** *Gene*, [s.l.], v. 671, nº 2017, p. 127–134, 2018. ISSN: 18790038, DOI: 10.1016/j.gene.2018.05.049.

FERMOZELLI, R. A. “ **Júlio De Mesquita Filho** ” Faculdade De Medicina Veterinária Universidade Estadual Paulista “ **Júlio De Mesquita Filho** ”. [s.l.], p. 55, 2015.

GAO, C. et al. **Cytotoxic withanolides from *Physalis angulata*.** *Natural Product Research*, [s.l.], v. 32, nº 6, p. 676–681, 2018. ISSN: 14786427, DOI: 10.1080/14786419.2017.1338281.

GENOVESE, M. I. et al. **Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil.** *Food Science and Technology International*, [s.l.], v. 14, nº 3, p. 207–214, 2008. ISBN: 1082013208092, ISSN: 10820132, DOI: 10.1177/1082013208092151.

GIOTI, K.; TENTA, R. **Bioactive natural products against prostate cancer: Mechanism of action and autophagic/apoptotic molecular pathways.** *Planta Medica*, [s.l.], v. 81, nº 7, p. 543–562, 2015. ISSN: 1439-0221, DOI: 10.1055/s-0035-1545845.

GOMES, R. et al. **Prostate cancer prevention : a review of the literature.** [s.l.], p. 235–246, 2008.

GROZESCU, T.; POPA, F. **Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy.** *Journal of medicine and life*, [s.l.], v. 10, nº 1, p. 5–12, 2017. ISSN: 1844-3117.

GUO, Y. et al. **Prognostic significance of young age and non-bone metastasis at diagnosis in patients with metastatic prostate cancer: A SEER population-based data analysis.** *Journal of Cancer*, [s.l.], v. 10, nº 3, p. 556–567, 2019. ISSN: 18379664, DOI: 10.7150/jca.29481.

HEIDENREICH, A. et al. **Diretrizes Para O Câncer De.** [s.l.], p. 9–23, 2012.

HSEU, Y. C. et al. **Inhibitory effects of *Physalis angulata* on tumor metastasis and angiogenesis.** *Journal of Ethnopharmacology*, [s.l.], v. 135, nº 3, p. 762–771, 2011. ISSN: 03788741, DOI: 10.1016/j.jep.2011.04.016.

HSU, C. C. et al. **Physalin B from *Physalis angulata* triggers the NOXA-related apoptosis pathway of human melanoma A375 cells.** *Food and Chemical Toxicology*, [s.l.], v. 50, nº 3–4, p. 619–624, 2012. ISSN: 02786915, DOI: 10.1016/j.fct.2011.12.017.

JERONIMO, M. C. **Dissertação Pitaia Importante 2016.** [s.l.], 2016.

JOBIM, M. . L. et al. **Açaí (*euterpe oleracea*, mart.), an amazonian fruit has antitumor effects on prostate cancer cells.** *Archives in Biosciences & Health*, [s.l.], p. 1–18, 2019.

JUNIOR, L. D. de A. **Atividade anti-inflamatória intestinal do extrato padronizado de *Physalis angulata* L . (camapú) Atividade anti-inflamatória intestinal do extrato padronizado de *Physalis angulata* L . (camapú).** [s.l.], 2013.

KALLIFATIDIS, G.; HOY, J. J.; LOKESHWAR, B. L. **Bioactive natural products for chemoprevention and treatment of castration-resistant prostate cancer.** *Seminars in Cancer Biology*, [s.l.], v. 40_41, p. 160–169, 2016. ISSN: 10963650, DOI: 10.1016/j.semcancer.2016.06.003.

KHAN, N. et al. **Fisetin, a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells.** *Carcinogenesis*, [s.l.], v. 29, nº 5, p. 1049–1056, 2008. ISSN: 01433334, DOI: 10.1093/carcin/bgn078.

KIM, C.; KIM, B. **Anti-Cancer Natural Products and Their Bioactive Compounds Inducing ER Stress-Mediated Apoptosis: A Review.** *Nutrients*, [s.l.], v. 10, nº 8, p. 1021, 2018. DOI: 10.3390/nu10081021.

KIM, S.-H. et al. **Monensin Induces PC-3 Prostate Cancer Cell Apoptosis via ROS Production and Ca²⁺ Homeostasis Disruption.** *Anticancer Research*, [s.l.], v. 36, nº 11, p. 5835–5844, 2016. ISSN: 02507005, DOI: 10.21873/anticancer.11168.

LAKO, J. et al. **Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods.** *Food Chemistry*, [s.l.], v. 101, nº 4, p. 1727–1741, 2007. ISSN: 03088146, DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.01.031.

LALL, N. et al. **Cytotoxicity of syringin and 4-methoxycinnamyl alcohol isolated from *Foeniculum vulgare* on selected human cell lines.** *Natural Product Research*, [s.l.], v. 29, nº 18, p. 1752–1756, 2015. ISSN: 14786427, DOI: 10.1080/14786419.2014.999058.

LAWAL, I. O. et al. **Ethno medicinal information on collation and identification of some medicinal plants in Research Institutes of South-west Nigeria.** *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, [s.l.], v. 4, nº 1, p. 1–7, 2010. ISSN: 1996-0816.

LI, X. et al. **Hollow boron nitride nanospheres as boron reservoir for prostate cancer treatment.** *Nature Communications*, [s.l.], v. 8, p. 1–12, 2017. ISSN: 20411723, DOI: 10.1038/ncomms13936.

LIM, T. K. **Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants.** *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*, [s.l.], v. 10, p. 1–659, 2012. ISBN: 9789401772761, DOI: 10.1007/978-94-017-7276-1.

LIMA, L. R.; SILVA, I. L. C. Da; ALVES, D. C. **Investigação e prevalência dos fatores de risco para elevação e desenvolvimento de câncer de próstata e elevação do PSA: uma revisão de literatura.** [s.l.], v. 4, n° 1, p. 11–16, 2017.

LIN, P. H.; ARONSON, W.; FREEDLAND, S. J. **An update of research evidence on nutrition and prostate cancer.** *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, [s.l.], v. 37, n° 6, p. 387–401, 2019. ISSN: 18732496, DOI: 10.1016/j.urolonc.2017.10.006.

LINNEWIEL-HERMONI, K. et al. **The anti-cancer effects of carotenoids and other phytonutrients resides in their combined activity.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, [s.l.], v. 572, p. 28–35, 2015. ISSN: 10960384, DOI: 10.1016/j.abb.2015.02.018.

MACHADO, S. P. **CÂNCER DE PRÓSTATA NA CIDADE DE FORTALEZA-CEARÁ FORTALEZA-CEARÁ.** [s.l.], p. 1–113, 2007.

MAGALHÃES, L. A. M. . et al. **Identification of bergenin and carotenoids in the uchi (*Endopleura uchi*, Humiriaceae) fruit [Identificação de bergenina e carotenóides no fruto de uchi (*Endopleura uchi*, Humiriaceae)].** *Acta Amazonica*, [s.l.], v. 37, n° 3, p. 447–450, 2007. ISBN: 0044-5967, ISSN: 0044-5967, DOI: 10.1590/S0044-59672007000300016.

MARON, P. E. G. et al. **Fatores anatomopatológicos preditivos para recorrência bioquímica do câncer de próstata após prostatectomia radical.** *Arq Med Hosp Cienc Med Santa Casa São Paulo*, [s.l.], v. 55, n° 2, p. 48–51, 2010.

MARX, F. et al. **Studies of edible Amazonian plants. Part 5: Chemical characterisation of Amazonian *Endopleura uchi* fruits.** *European Food Research and Technology*, [s.l.], v. 214, n° 4, p. 331–334, 2002. ISSN: 14382377, DOI: 10.1007/s00217-001-0477-7.

MEZNI, F. et al. **Phenolic profile and effect of growing area on *Pistacia lentiscus* seed oil.** *Food Chemistry*, [s.l.], v. 257, n° February, p. 206–210, 2018. ISSN: 18737072, DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.03.019.

MONTENEGRO, J. et al. **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS e ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FRUTAS DA REGIÃO AMAZÔNICA.** [s.l.], p. 3–6, 2017.

MOO-HUCHIN, V. M. et al. **Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico.** *Food chemistry*, [s.l.], v. 166, p. 17–22, 2015. ISSN: 1873-7072, DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.127.

MOREIRA, M. V. D. S. et al. **Comparação do escore de Gleason da biópsia prostática com o da peça cirúrgica em pacientes com câncer de próstata.** *Revista Brasileira de Clínica Médica*, [s.l.], v. 10, nº 5, p. 367–371, 2012.

MORI, R. R. **Comparação dos critérios de agressividade do câncer de próstata diagnosticado por rastreamento no Brasil, em idades superior e inferior a 70 anos.** *Dissertação. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.* [s.l.]: [s.n.], 2016.

NEPOMUCENO, L. L. et al. **MECANISMOS DE REPARO AOS DANOS NO DNA NOS PONTOS DE CHEGAGEM DO CICLO CELULAR** Leandro. [s.l.], p. 530–543, 2017. DOI: 10.18677/EnciBio.

NI, X. et al. **Astaxanthin inhibits PC-3 xenograft prostate tumor growth in nude mice.** *Marine Drugs*, [s.l.], v. 15, nº 3, p. 1–15, 2017. ISSN: 16603397, DOI: 10.3390/md15030066.

OLIVEIRA, G. M. A. De. **Diagnóstico de Enfermagem Disfunção Sexual em Homens em Tratamento para o Câncer de Próstata: uma proposta de cuidado de enfermagem.** [s.l.], p. 143, 2016.

OLIVEIRA, H. S. D. DE; BONETI, R. S.; PIZZATO, A. C. **Immunonutrition and the cancer treatment.** *Ciência & Saúde*, [s.l.], v. 3, nº 2, p. 59, 2010. DOI: 10.15448/1983-652x.2010.2.6236.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. **Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis.** *Food Research International*, [s.l.], v. 74, p. 10–36, 2015. ISSN: 18737145, DOI: 10.1016/j.foodres.2015.04.018.

PAZ, W. H. P. et al. **Remela de cachorro (Clavija lancifolia Desf.) fruits from South Amazon: Phenolic composition, biological potential, and aroma analysis.** *Food Research International*, [s.l.], v. 109, nº November 2017, p. 112–119, 2018. ISSN: 18737145, DOI: 10.1016/j.foodres.2018.04.019.

PEREZ-CORNAGO, A. et al. **Fruit and vegetable intake and prostate cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC).** *International Journal of Cancer*, [s.l.], v. 141, nº 2, p. 287–297, 2017. ISSN: 10970215, DOI: 10.1002/ijc.30741.

PÉROUMAL, A. et al. **Variability of traits and bioactive compounds in the fruit and pulp of six mamey apple (Mammea americana L.) accessions.** *Food Chemistry*, [s.l.], v. 234, p. 269–275, 2017. ISSN: 18737072, DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.04.145.

PETIMAR, J. et al. **A pooled analysis of 15 prospective cohort studies on the association between fruit, vegetable, and mature bean consumption and risk of prostate cancer.** *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, [s.l.], v. 26, nº 8, p. 1276–1287, 2017. ISSN: 10559965, DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-16-1006.

PIANTINO, C. B. **Estabelecimento de linhagens tumorais para estudos in vitro e in vivo de carcinoma urotelial da bexiga e adenocarcinoma de próstata.** [s.l.], 2009.

PROSKURYAKOV, S.; GABAI, V. **Mechanisms of Tumor Cell Necrosis.** *Current Pharmaceutical Design*, [s.l.], v. 16, nº 1, p. 56–68, 2010. ISSN: 13816128, DOI: 10.2174/138161210789941793.

RAFI, M. M. et al. **Dietary Lutein Modulates Growth and Survival Genes in Prostate Cancer Cells.** *Journal of Medicinal Food*, [s.l.], v. 18, nº 2, p. 173–181, 2014. ISSN: 1096-620X, DOI: 10.1089/jmf.2014.0003.

RAMOS, P. R. et al. **CÂNCER DE PRÓSTATA: REVISÃO GERAL DA LITERATURA ACERCA DOS DIVERSOS ASPECTOS DA DOENÇA** Felipe Pinheiro Ramos¹, Isabela Zanelato Sabino², Jorge Henrique Bittar de. [s.l.], p. 1–5, 2018.

REALE, G. et al. **Association between dietary flavonoids intake and prostate cancer risk: A case-control study in Sicily.** *Complementary Therapies in Medicine*, [s.l.], v. 39, nº May, p. 14–18, 2018. ISSN: 18736963, DOI: 10.1016/j.ctim.2018.05.002.

REYES-REYES, E. M. et al. **Physangulidine A, a withanolide from *Physalis angulata*, perturbs the cell cycle and induces cell death by apoptosis in prostate cancer cells.** *Journal of Natural Products*, [s.l.], v. 76, nº 1, p. 2–7, 2013. ISSN: 01633864, DOI: 10.1021/np300457g.

RODRIGUES, F. R. **FRUTOS NATIVOS DA FLORESTA AMAZÔNICA: CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DOS AROMAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.** [s.l.], v. 62, nº 1, p. 27–40, 2016.

RODRÍGUEZ-GARCÍA; SÁNCHEZ-QUESADA; J. GAFORIO. **Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies.** *Antioxidants*, [s.l.], v. 8, nº 5, p. 137, 2019. ISSN: 2076-3921, DOI: 10.3390/antiox8050137.

ROSSO, M. DE et al. **Identification of new flavonols in hybrid grapes by combined liquid chromatography-mass spectrometry approaches.** *Food Chemistry*, [s.l.], v. 163, p. 244–251, 2014. ISSN: 18737072, DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.04.110.

RUFATO, A. D. R. et al. **Série fruticultura – pequenas frutas a cultura da *physalis*.** *Série Fruticultura - Pequenas Frutas*, [s.l.], nº 172, 2003.

RUFINO, M. D. S. M. et al. **METODOLOGIA CIENTÍFICA: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM FRUTAS PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP).** *Comunicado Técnico on line*, [s.l.], p. 3–6, 2006.

_____. **Metodologia Científica : Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre.** *Comunicado Técnico on line*, [s.l.], v. 127, p. 0–3, 2007. ISBN: 1679-6535, ISSN: 1679-6535.

RUSSO, G. I. et al. **Dietary consumption of phenolic acids and prostate cancer: A case-control study in sicily, Southern Italy.** *Molecules*, [s.l.], v. 22, nº 12, p. 1–9, 2017. ISSN: 14203049, DOI: 10.3390/molecules22122159.

SAMPAIO, C. D. et al. **CUMARINA ISOLADA DA SEMENTE DA MAMMEA AMERICANA (ABRICÓ-DO-PARÁ)**. [s.l.], v. 1, nº 1c, p. 668–674, 2015.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, C. et al. **Urolithin A causes p21 up-regulation in prostate cancer cells**. *European Journal of Nutrition*, [s.l.], v. 55, nº 3, p. 1099–1112, 2016. ISSN: 14366215, DOI: 10.1007/s00394-015-0924-z.

SANTOS, A. J. A. O.; MELO, M. W. de L.; SOUZA, M. F. C. **Avaliação do consumo de alimentos com compostos bioativos e com agentes cancerígenos em pacientes oncológicos**. *HU Revista*, [s.l.], v. 39, nº 3 e 4, p. 45–50, 2013.

SANTOS, J. P. dos S.; SOUZA, A. P. **Considerações sobre o Câncer de Próstata: Revisão de Literatura**. [s.l.], p. 100–115, 2017.

SANTOS, M. DOS et al. **Amazonian Native Palm Fruits as Sources of Antioxidant Bioactive Compounds**. *Antioxidants*, [s.l.], v. 4, nº 3, p. 591–602, 2015. DOI: 10.3390/antiox4030591.

SARRIS, A. B. et al. **Câncer De Próstata: Uma Breve Revisão Atualizada. Visão Acadêmica**, [s.l.], v. 19, nº 1, p. 137–151, 2018. ISSN: 1518-5192, DOI: 10.5380/acd.v19i1.57304.

SCHIASSI, M. C. E. V. et al. **Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation**. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 245, nº October 2017, p. 305–311, 2018. ISSN: 18737072, DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.10.104.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. **Lycopene as an antioxidant agent [Licopeno como agente antioxidante]**. *Revista de Nutricao*, [s.l.], v. 17, nº 2, p. 227–236, 2004.

SILVA, J. F. S. Da et al. **Correlação entre produção agrícola, variáveis clínicas-demográficas e câncer de próstata: um estudo ecológico**. *Ciência & Saúde Coletiva*, [s.l.], v. 20, nº 9, p. 2805–2812, 2015. ISSN: 1413-8123, DOI: 10.1590/1413-81232015209.00582015.

SILVA, P. B. Da. **QUALIDADE, COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FRUTOS DE Physalis sp.** *Xa.Yimg.Com*, [s.l.], p. 1–18, 2013.

SILVA, S. L. Da et al. **Antimicrobial activity of bergenin from Endopleura uchi (Huber) Cuatrec**. *Acta Amazonica*, [s.l.], v. 39, nº 1, p. 187–191, 2009. DOI: 10.1590/s0044-59672009000100019.

SOARES, E. D. R. et al. **Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição**. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, [s.l.], v. 14, nº 3, p. 64–72, 2015. ISSN: 1676-8280, DOI: 10.12957/rhupe.2015.19942.

SOUZA, G. **Estudo do potencial migratório de células tumorais prostáticas expostas à fibronectina**. [s.l.], v. 55, nº 14, p. 51, 2015.

SOUZA, M. P. DE et al. **Phenolic and aroma compositions of pitomba fruit (*Talisia esculenta* Radlk.) assessed by LC-MS/MS and HS-SPME/GC-MS.** *Food Research International*, [s.l.], v. 83, p. 87–94, 2016. ISSN: 09639969, DOI: 10.1016/j.foodres.2016.01.031.

SOUZA, V. R. DE et al. **Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits.** *Food Chemistry*, [s.l.], v. 134, n° 1, p. 381–386, 2012. ISSN: 03088146, DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.191.

SPILIOTI, E. et al. **Phenolic acid composition, antiatherogenic and anticancer potential of honeys derived from various regions in Greece.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 9, n° 4, p. 1–10, 2014. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0094860.

SUN, C. P. et al. **Antiproliferative and Anti-inflammatory Withanolides from *Physalis angulata*.** *Journal of Natural Products*, [s.l.], v. 79, n° 6, p. 1586–1597, 2016. ISSN: 15206025, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00094.

_____. **Physalins V-IX, 16,24-cyclo-13,14-seco withanolides from *Physalis angulata* and their antiproliferative and anti-inflammatory activities.** *Scientific Reports*, [s.l.], v. 7, n° 1, p. 1–10, 2017. ISSN: 20452322, DOI: 10.1038/s41598-017-03849-9.

SUN, K.; WANG, Q.; HUANG, X.-H. **PPAR gamma inhibits growth of rat hepatic stellate cells and TGF beta-induced connective tissue growth factor expression.** *Acta pharmacologica Sinica*, [s.l.], v. 27, n° 6, p. 715–723, 2006. ISBN: 1671-4083 (Print)r1671-4083 (Linking), ISSN: 1671-4083, DOI: 10.1111/j.1745-7254.2006.00299.x.

SUN, L. et al. **Immunosuppression effect of Withangulatin A from *Physalis angulata* via heme oxygenase 1-dependent pathways.** *Process Biochemistry*, [s.l.], v. 46, n° 2, p. 482–488, 2010. ISSN: 13595113, DOI: 10.1016/j.procbio.2010.09.022.

SUN, S. et al. **Isolation of three new annonaceous acetogenins from *Graviola* fruit (*Annona muricata*) and their anti-proliferation on human prostate cancer cell PC-3.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, [s.l.], v. 26, n° 17, p. 4382–4385, 2015. ISSN: 14643405, DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.06.038.

TABORELLI, M. et al. **Fruit and vegetables consumption is directly associated to survival after prostate cancer.** *Molecular Nutrition and Food Research*, [s.l.], v. 61, n° 4, p. 9–11, 2017. ISSN: 16134133, DOI: 10.1002/mnfr.201600816.

TACON, L. A. **Estudo da extração e secagem por spray dryer das cascas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. Humiriaceae.** [s.l.], p. 12, 2012.

TANG, Y. et al. **Lycopene Enhances Docetaxel's Effect in Castration-Resistant Prostate Cancer Associated with Insulin-like Growth Factor I Receptor Levels.** *Neoplasia*, [s.l.], v. 13, n° 2, p. 108–119, 2015. ISSN:

14765586, DOI: 10.1593/neo.101092.

TILOKE, C. et al. **Moringa oleifera Aqueous Leaf Extract Induces Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Human Liver Hepatocellular Carcinoma Cells.** *Nutrition and Cancer*, [s.l.], v. 0, n° 0, p. 1–10, 2019. ISSN: 15327914, DOI: 10.1080/01635581.2019.1597136.

TUAN ANH, H. Le et al. **Phytochemical constituents and cytotoxic activity of Physalis angulata L. growing in Vietnam.** *Phytochemistry Letters*, [s.l.], v. 27, n° July, p. 193–196, 2018. ISSN: 18767486, DOI: 10.1016/j.phytol.2018.07.029.

VISCARDI, A. **Avaliação da atividade antiproliferativa de extratos hidroalcoólicos de plantas em linhagens celulares humanas de câncer de mama , fígado e próstata.** [s.l.], p. 117, 2018.

WU, S. J. et al. **Antihepatoma activity of Physalis angulata and P. peruviana extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells.** *Life Sciences*, [s.l.], v. 74, n° 16, p. 2061–2073, 2004. ISSN: 00243205, DOI: 10.1016/j.lfs.2003.09.058.

WU, S. Y. et al. **Physalin F induces cell apoptosis in human renal carcinoma cells by targeting NF-kappaB and generating reactive oxygen species.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 7, n° 7, 2012. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0040727.

XU, B. et al. **Hsa-miR-146a-5p modulates androgen-independent prostate cancer cells apoptosis by targeting ROCK1.** *Prostate*, [s.l.], v. 75, n° 16, p. 1896–1903, 2015. ISBN: 2012009212, ISSN: 10970045, DOI: 10.1002/pros.23068.

XU, Y. M. et al. **17 β -Hydroxy-18-acetoxywithanolides from Aeroponically Grown Physalis crassifolia and Their Potent and Selective Cytotoxicity for Prostate Cancer Cells.** *Journal of Natural Products*, [s.l.], v. 79, n° 4, p. 821–830, 2016. ISSN: 15206025, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00911.

YANG, H. et al. **Antioxidant and cytotoxic isoprenylated coumarins from Mammea americana.** *Planta Medica*, [s.l.], v. 71, n° 9, p. 852–860, 2005. ISBN: 2005871257, ISSN: 00320943, DOI: 10.1055/s-2005-871257.