

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

Nayara Simas Frauches

**EFEITO DE EXTRATOS DE JABUTICABA, JAMELÃO E JAMBO SOBRE LINHAGEM
DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO HT-29.**

Rio de Janeiro,
2017

Nayara Simas Frauches

EFEITO DE EXTRATOS DE JABUTICABA, JAMELÃO E JAMBO SOBRE LINHAGEM
DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO HT-29.

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

Rio de Janeiro,

2017

S524 Simas Frauches, Nayara
EFEITO DE EXTRATOS DE JABUTICABA, JAMELÃO E
JAMBO SOBRE LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON
HUMANO HT-29. / Nayara Simas Frauches. -- Rio de
Janeiro, 2017.

92

Orientador: Anderson Junger Teodor.

Coorientadora: Renata Galhardo Borguini.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Alimentos e Nutrição, 2017.

1. Frutas da família myrtaceae. 2. Câncer de colon
e reto. 3. Compostos bioativos. I. Junger Teodor,
Anderson, orient. II. Galhardo Borguini, Renata,
coorient. III. Título.

Nayara Simas Frauches

EFETO DE EXTRATOS DE JABUTICABA, JAMELÃO E JAMBO SOBRE
LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA DE CÔLON HUMANO HT-29.

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

Orientador: Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro

Co-orientador: Dra. Renata Galhardo Borguini

Co-orientador: Dra. Manuela Cristina Pessanha Araújo Santiago

Aprovado em: 06 / 03 / 2007

BANCA EXAMINADORA



Dr. Anderson Junger Teodoro
Escola de Nutrição-UNIRIO



Dr. Felipe Leite de Oliveira
Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ



Dr. Theresza Bargut – Instituto de Biologia - UERJ

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, a minha vó, minha irmã e meu namorado, pelo incentivo e apoio em minhas decisões e pela presença constante em minha vida...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sua presença em minha vida, por me amparar nos momentos difíceis e pelo auxílio nas minhas escolhas. Agradeço por me proporcionar força para lutar, saúde para trabalhar, estudar, viver e sorrir, hoje e sempre.

A minha mãe Nara, pelo grande exemplo de ser humano que você é, pelo cuidado, pelo carinho, pelo incentivo, pela dedicação e por todos os valores e ensinamentos que foram conferidos a mim. É uma honra ser sua filha. Tudo que eu faço é por você e para você.

A minha vó Celua, palavras me faltam para te agradecer, a sua incansável dedicação e esforço, muito obrigado por tudo.

A minha irmã Nandara, por sempre estar presente e por nunca ter me deixado esquecer que estamos juntas sempre nessa linda jornada que é a vida.

Ao meu namorado Helder, a minha eterna gratidão não caberia nestas linhas. Muito obrigado pelo estímulo constante e pelo leve convívio diário. Principalmente por todo amor, por ter sido capaz de compreender minha ausência em muitos momentos, sendo sempre meu companheiro e meu melhor amigo. Você e seu apoio são fundamentais nessa importante etapa da minha vida. Essa conquista também é sua.

Ao Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro, por todos esses anos de vida acadêmica, pela dedicação, pela paciência e pelo aprendizado ao longo dessa jornada. Muito obrigado pela grande oportunidade e por sempre acreditar e confiar no meu trabalho.

A Prof. Dra. Renata Galhardo Borguini e a Prof. Dra. Manuela Santiago por terem aceitado ser minhas co-orientadoras, pelos ensinamentos, pela dedicação. Muito obrigada por tudo.

As amigas Barbara Faria e Roberta Grillo, as irmãs emprestadas que a vida me deu, obrigada por acreditarem sempre em mim e por todo incentivo.

A amiga Thuane Amaral, minha companheira de todas as horas. Obrigada pela enriquecedora convivência, pela sinceridade, competência e amizade sempre demonstradas, na alegria dos bons momentos e na ansiedade das horas difíceis, dando-me forças para que eu continuasse persistindo.

A Nathália Pereira Soares, pelo apoio e auxílio com os experimentos.

A Lana Rosa, por toda paciência, amizade sincera, por ter me ensinado sobre cultura de células e pelo grande apoio em todo o mestrado. Aos amigos de laboratório, em especial a Deborah Bauer, Joel Pimentel e Gabriela Laiber, sem vocês não teria chegado até aqui.

Ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição (PPGAN).

A CAPES pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

“Confia Sempre

Não percas a tua fé entre as sombras do mundo.

Ainda que os teus pés estejam sangrando, segue para a frente,
erguendo-a por luz celeste, acima de ti mesmo.

Crê e batalha.

Esforça-te no bem e espera com paciência.

Tudo passa e tudo se renova na Terra, mas o que vem do céu
permanecerá.

De todos os infelizes, os mais desditosos são os que perderam a
confiança em Deus e em si mesmos, porque o maior infortúnio é sofrer
a privação da fé e prosseguir vivendo.

Eleva, pois, o teu olhar e caminha.

Luta e serve.

Aprende e adianta-te.

Brilha a alvorada além da noite.

Hoje é possível que a tempestade te amarfanhe o coração e te atormente
o ideal, aguilhoando-te com aflição ou ameaçando-te com a morte...

Não te esqueças, porém, de que amanhã será outro dia”

(Chico Xavier)

RESUMO

O câncer de cólon é o terceiro mais prevalente, em todo mundo, sendo uma doença multifatorial, com complexas interações. Atualmente, uma grande atenção tem sido dada para estratégias preventivas e neste sentido, a utilização de alimentos funcionais com compostos quimiopreventivos parece contribuir neste processo, atuando com mecanismos de ação antioxidante e antiangiogênicos. A jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) O. Berg), jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) e o jambo (*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & LM Perry), destacam-se entre as espécies da família Myrtaceae, pelo seu alto potencial bioativo, devido a presença de antocianinas que atuam na redução do risco de desenvolvimento de câncer por possuírem elevada atividade antioxidante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e elucidar o efeito extratos obtidos a partir das cascas das frutas da família myrtaecae, sobre a proliferação, ciclo celular e apoptose sobre a linhagens de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29). A atividade antioxidante foi mensurada através dos métodos DPPH, FRAP, ABTS e ORAC onde a jaboticaba (JB) apresentou a maior atividade antioxidante, seguido do jamelão (JME) e jambo (JMB) respectivamente. As células da linhagem HT-29 foram cultivadas com DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, sob atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C e incubadas com diferentes concentrações dos extratos (5 a 1000 µM) por 24 h, dependendo do experimento. As análises de viabilidade celular, ciclo celular e apoptose foram realizadas, através do método MTT e por citometria de fluxo. Os resultados da JB evidenciaram uma redução da viabilidade celular com média de 60% quando incubado com o JB, 30% com o JME, 37% JMB. A JB, JME e JMB (na concentração 1000 µM) promoveram um aumento no percentual de células na fase G0/G1, um aumento da fase S, seguida de uma redução de células na fase G2/M. Além disso, o JB promoveu um aumento do percentual de células apoptóticas. Desta forma, os dados mostraram que a JB apresentou o maior efeito antiproliferativo, além de promover parada no ciclo celular e indução da apoptose. Esses resultados abrem uma série de perspectivas sobre a utilização dos pós das cascas das frutas da família myrtaceae na prevenção e tratamento do câncer de cólon.

Palavras-chave: Frutas da família myrtaceae. Câncer de Colón . Compostos bioativos.

ABSTRACT

EFFECT OF EXTRACTS OF JABUTICABA, JAMUN BERRY AND MALAY APPLE ON HT-29 HUMAN COLON ADENOCARCINOMA LINEAGE.

Colon cancer is the third most prevalent in the world, being a multifactorial disease with complex interactions. Currently, great attention has been given to preventive strategies and in this sense, the use of functional foods with chemopreventive compounds seems to contribute in this process, acting with antioxidant and antiangiogenic mechanisms of action. Jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) O. Berg), jamun berry (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) and malay apple (*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & LM, Perry) stand out among the Myrtaceae's fruits, due to its high bioactive potential, due to the presence of anthocyanins that act in reducing the risk of cancer development because they have high antioxidant activity. The objective of this work was to evaluate the antioxidant activity and elucidate the effect extracts obtained from the fruit peels from the myrtaceae family, on the proliferation, cell cycle and apoptosis on human colon adenocarcinoma (HT-29) lineage. The antioxidant activity was measured by the DPPH, FRAP, ABTS and ORAC assays, where jabuticaba (JB) presented the highest antioxidant activity, followed by jamun berry (JME) and malay apple (JMB) respectively. The HT-29 cells were cultured with DMEM, supplemented with 10% fetal bovine serum, under 5% CO₂ atmosphere at 37°C and incubated at different concentrations of the extracts (5 to 1000 µM) for 24 h, depending of the experiment. The assays of cell viability, cell cycle and apoptosis analyzes were performed using the MTT method and flow cytometry. The JB results showed a reduction in cell viability with a mean of 60% when incubated with JB, 30% with JME, 37% JMB. JB, JME and JMB (in the concentration 1000 µM) promoted an increase in the percentage of cells in the G₀ / G₁ phase, a increase of the S phase, followed by a reduction of cells in the G₂ / M phase. In addition, JB promoted an increase in the percentage of apoptotic cells. Thus, the data showed that JB presented the highest antiproliferative effect, besides promoting cell cycle arrest and induction of apoptosis. These results open a series of perspectives on the use of the fruit bark powders of the myrtaceae family in the prevention and treatment of colon cancer.

Keywords: Myrtaceae fruits. Colon cancer. Bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Estimativa de dez tipos de câncer mais incidentes para 2016/2017 categorizados por sexo.
- Figura 2 Sequência de formação do adenoma-câncer.
- Figura 3 Estágios da progressão da doença.
- Figura 4 Classes de compostos bioativos em alimento.
- Figura 5 Estrutura químicas dos principais tipos de flavonoides.
- Figura 6 Estrutura química das antocianinas.
- Figura 7 Jabuticabeira e seu fruto.
- Figura 8 Jamelão (*Syzygium cumini*).
- Figura 9 Jambo vermelho (*Syzygium malaccensis*).
- Figura 10 Compostos fenólicos totais: (A) extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME, JMB e (B) pós das cascas desidratadas de JB, JME, JMB.
- Figura 11 Perfil cromatográfico das amostras de JB, JME e JB.
- Figura 12 Atividade Antioxidante pelo método de DPPH (A) extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e (B) pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB.
- Figura 13 Atividade Antioxidante pelo método de FRAP (A) extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e (B) pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB.
- Figura 14 Atividade Antioxidante pelo método de ABTS. (A) extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e (B) pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB.
- Figura 15 Atividade Antioxidante pelo método de ORAC. (A) extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e (B) pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB.
- Figura 16 Efeito do (A) extrato liofilizado da casca desidratada de JB (B) pó da casca desidratada de JAB, (C) extrato liofilizado da casca desidratada de JME (D) pó da casca desidratada de JME (E) extrato liofilizado da casca desidratada de JMB (F) pó da casca desidratada de JMB sobre a viabilidade celular da linhagem, HT-29 após 24 horas de tratamento.
- Figura 17 Efeito do pó da casca desidratada de JB, JME e JMB na quantificação de células (HT-29), 24 horas após a incubação.

viabilidade celular da linhagem HT-29 após 24 horas de tratamento.

- Figura 19 Efeito do pó da casca desidratada de JB sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 24 horas após a incubação.
- Figura 20 Efeito do pó da casca desidratada de JME sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 24 horas após a incubação.
- Figura 21 Efeito do pó da casca desidratada de JMB sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 24 horas após a incubação.
- Figura 22 Efeito pó da casca desidratada de JB, JME e JMB, sobre o processo de morte programada em células HT-29 24 h após a incubação.

LISTA DE SIGLAS

AAPH	(2,2'-azinobis (2amidinopropano) dihidrocloreto)
ABRAPRECI	ABRAPRECI- Associação Brasileira de Prevenção ao Câncer de Intestino
ABTS	Radical ácido (2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico)
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Gene Supressor tumoral (do inglês, Adenomatous polyposis coli)
AUC	Área em baixo da curva
A549	Linhagem humana de câncer de pulmão
Bcl-2	Proteína oncogênica
Caco-2	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de cólon humano
CCR	Câncer colorretal
CEASA	Central de Abastecimento
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPIR	Taxa de inibição da proliferação celular
DCC	Molécula de adesão celular
DMEM	Meio base de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, deoxyribonucleic acid)
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EROS	Espécie reativa de oxigênio
ET	Equivalente de trolox
FRAP	capacidade ferri-redutora
GAE	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
HCT-116	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de cólon
HeLa	Linhagem de câncer cervical
HT-29	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de cólon humano
SC-3	Linhagem celular de câncer oral
IC50	Concentração necessária para inibir 50% da atividade de um composto
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JB	Jaboticaba

JMB	Jambo
JME	Jamelão
K-ras	Proteína de transdução (do inglês Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)
LC-DAD	Arranjo de diódos
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
M	Mitose
MCF-7	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de mama
MCF-7aro	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de mama
MCF-10 ^a	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de mama
MTT	(brometo de 3-[4,5dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio)
NCI	Nacional Cancer Institute
ORAC	Capacidade de absorção de radical de oxigênio
PAF	Polipose adenomatosa familiar
PBS	Solução salina tamponada (do inglês, phosphate buffered saline)
PC-3	Linhagem celular de câncer de próstata
PH	Potencial de hidrogênio
OS	Penicilina e estreptomicina
PSOF	Pesquisa de sangue oculto nas fezes
P450	Citocromo
P21	Proteína citoplasmática supressora de tumor
P27	Proteína citoplasmática supressora de tumor
P53	Proteína citoplasmática supressora de tumor
RPM	Rotação por minuto
S	Fase de replicação do DNA durante o ciclo celular
SBF	Soro bovino fetal
SiHa	Linhagem de câncer cervical
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente de trolox

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer colorretal.
- Tabela 2 Sistema de classificação de tumores malignos (TNM) para o estadiamento do câncer colorretal.
- Tabela 3 Sistema de classificação de tumores malignos (TNM) para o estadiamento do câncer colorretal.
- Tabela 4 Composição nutricional dos frutos da família myrtaceae.
- Tabela 5 Quantificação de antocianinas nos extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e nos pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB.
- Tabela 6 Efeito do pó da casca desidratada de JB, JME, JMB (100 μ M e 1000 μ M) sobre o processo de morte celular por apoptose nas células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) 24 h após a incubação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. CÂNCER DE COLON E RETO	20
2.1.1 Sinais, Sintomas, fatores de risco para o câncer de colón e reto.	22
2.1.2 Screening e diagnóstico	25
2.1.3. Estadiamento da doença	26
2.1.4 Bases de tratamento	29
2.2. LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO: HT-29	30
2.3 CÂNCER E COMPOSTOS BIOATIVOS	30
2.4 COMPOSTOS BIOATIVOS	33
2.5. COMPOSTOS FENÓLICOS	35
2.6. FLAVONÓIDES	36
2.7. ANTOCIANINAS	37
2.8. FAMÍLIA MYRTACEAE	38
2.8.1. Jabuticaba (<i>Myrciaria cauliflora</i>)	39
2.8.2. Jamelão (<i>Syzygium cumini</i>)	41
2.8.3. Jambo (<i>Syzygium malaccensis</i>)	42
3. OBJETIVOS	44
3.1. OBJETIVO GERAL	44
3.2. OBJETIVOS ESPÉCÍFICOS	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1. AMOSTRAS	45
4.1.1. Secagem, desidratação e preparo dos pós das cascas desidratadas de jabuticaba, jamelão e jambo.	45
4.1.2. Preparo do extrato aquoso liofilizado dos pós das cascas desidratadas de jabuticaba, jamelão e jambo.	46
4.2 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	46
4.3. ANÁLISE DE ANTOCIANINAS	46
4.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	47
4.4.1. Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH	47
4.4.2. Análise determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP).	48
4.4.3. Análise de atividade antioxidante total pela captura do radical abts•+	48

4.4.4. Ensaio de ORAC	49
4.5. CULTURA DE CÉLULAS	49
4.6. ENSAIO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	50
4.6.1. ENSAIO DE MTT	50
4.6.2. QUANTIFICAÇÃO CELULAR: CÂMARA DE NEUBAUER	50
4.7. ENSAIO DE CICLO CELULAR	51
4.8. ENSAIO DE APOPTOSE	51
5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
6. RESULTADOS	52
6.1. AVALIAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS LIOFILIZADOS DAS CASCAS DESIDRATADAS DE JB, JME, JMB E DOS PÓS DAS CASCAS DESIDRATADAS DE JB, JME E JMB.	52
6.2. QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS NOS EXTRATOS LIOFILIZADOS DAS CASCAS DESIDRATADAS DE JB, JME, JMB E DOS PÓS DAS CASCAS DESIDRATADAS DE JB, JME E JMB.	53
6.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS LIOFILIZADOS DAS CASCAS DESIDRATADAS DE JB, JME E JMB E DO PÓS DAS CASCAS DESIDRATADAS DE JB, JME E JMB.	54
6.4. VIABILIDADE CELULAR E PROLIFERAÇÃO CELULAR	57
6.4.1. Ensaio de MTT	57
6.4.2. Quantificação celular: câmara de Neubauer	60
6.5. EFEITO DO PÓ DA CASCA DESIDRATADA DE JB, JME E JMB SOBRE A PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR.	61
6.6. EFEITO DO PÓ DA CASCA DESIDRATADA DE JB, JME E JMB SOBRE A TAXA DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO (HT-29).	65
7. DISCUSSÃO	68
8. CONCLUSÃO	75
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO I- Perfil cromatográfico das amostras de JB, JME e JMB	91
ANEXO II- ARTIGO INTITULADO “Brazilian Myrtaceae Fruits: A Review of Anticancer Proprieties” PUBLICADO NA REVISTA <i>British Journal of Pharmaceutical Research</i>, EM JUNHO DE 2016.	92

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, mais de 1 milhão de novos casos de câncer de colon e reto (CCR) são diagnosticados anualmente no mundo. O CCR é a terceira neoplasia maligna mais comum e a quarta causa mais comum de mortalidade por câncer em todo o mundo (TERZIA *et al.*, 2010). O CCR, é definido por uma neoplasia maligna e, está relacionado a fatores ambientais, especialmente dietéticos, à predisposição genética e à obesidade, entre outros fatores. (DINI & KOFF, 2006). Diversos dados na literatura, apontam o papel da dieta habitual como um importante fator na etiologia do CCR. Evidências epidemiológicas nutricionais sugerem que dietas ricas em frutas e hortaliças, apresentam altos teores de compostos fitoquímicos e esses compostos podem contribuir para reduzir o risco de certos tipos de câncer, como o CCR (STEWART & KLEIHUES, 2003).

As frutas contêm altos níveis de antioxidantes como os compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides não antociânicos e antocianinas) e carotenoides, que podem diminuir os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) nos organismos de mamíferos e, assim, evitar danos ao DNA e mutações que impedem a progressão tumoral (ZHANG *et al.*, 2008; HOGAN *et al.*, 2010).

O efeito protetor exercido pelas frutas tem sido atribuído à presença de polifenóis, que são os antioxidantes naturais mais abundantes da alimentação humana. A capacidade antioxidante de um polifenol pode ser atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático responsável pela redução de radicais livres reativos. Esta atividade é influenciada pelo número e pela posição dos grupos OH (DALVI,2008).

Entre os polifenóis presentes nos alimentos, destacam-se as antocianinas, que são compostos fenólicos que pertencem ao grupo dos flavonóides e são responsáveis pela coloração desde o vermelho vivo ao violeta dos frutos. Embora não seja considerado como um nutriente, as antocianinas têm recebido muita atenção devido à sua atividade biológica. Alguns estudos sugerem que alimentos de origem vegetal contendo compostos fenólicos, quando ingeridos com frequência através da dieta, apresentem capacidade antioxidante na captura de radicais livres, responsáveis, por conferir efeitos benéficos à saúde, entre os quais os de anti-inflamatório, com propriedades antimutagênicas e anticancerosas (MARÇO *et al.*, 2008; EFRAIM *et al.*, 2010; VOLP *et al.*, 2008).

Alguns estudos presentes na literatura, vem relatando as propriedades antioxidantes de frutas e polpas de frutas comestíveis (MOKBEL & HASHINAGA, 2006). No entanto,

existem poucas informações disponíveis sobre o valor bioativo e nutricional dos frutos subtropicais, especialmente sobre as espécies mais exóticas.

Dentre as espécies nativas e subtropicais, evidencia-se a família Myrtaceae (GODINHO *et al.*, 2014 ; REYNERTSON *et al.*, 2006). Os gêneros *Eucalyptus*, *Malaleuca*, *Eugenia*, *Myrcia*, *Syzygium* e *Psidium*, desta família, são os mais comumente encontrados em florestas tropicais, desde a Amazônia até a região sul do Brasil. A jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) O. Berg), jambo (*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & LM Perry), jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) destacam-se entre as espécies brasileiras da família Myrtaceae, pelo seu alto potencial bioativo, devido a presença de antocianinas, principalmente nas cascas dos frutos. Alguns estudos, associam extratos de frutas da família Myrtaceae ricos em antocianinas e seu importante papel na redução do risco e no tratamento de doenças crônicas, como câncer (FRAUCHES *et al.*, 2016; AQIL *et al.*, 2012; LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012; REYNERTSON *et al.*, 2006). Esse papel pode ser atribuído a atividade antioxidante que pode reduzir os níveis de EROS em mamíferos e, assim, evitar danos no DNA e mutações que impedem o início da progressão tumoral (HOGAN *et al.*, 2010 ; ZHANG *et al.*, 2008).

A partir do exposto acima, justifica-se a realização de pesquisas direcionadas ao estudo da atividade antioxidante de extratos obtidos a partir das cascas das frutas da família myrtaceae e o efeitos dos mesmos sobre células de colón e intestino humano, no intuito de avaliar a implicação desses extratos sobre na prevenção, tratamento e no desenvolvimento do câncer colorretal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CÂNCER DE CÓLON E RETO

Atualmente, o câncer representa um dos maiores problemas relacionados a saúde pública no mundo. Dentre os diversos tipos de câncer, o câncer colorretal (CCR), é o terceiro mais prevalente entre os homens e segundo mais prevalente para as mulheres no Brasil, como mostra a figura 1 (BRASIL, 2016). No mundo, o CCR para ambos os sexos, apresenta uma taxa de incidência de um milhão de novos casos e, aproximadamente, meio milhão de mortes por ano (PARKIN *et al.*, 2001; ROBERTSON *et al.*, 2008).

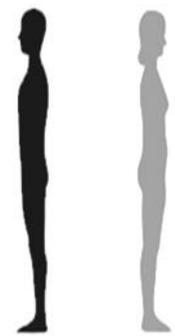
Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%		Homens Mulheres	Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 1. Estimativa de dez tipos de câncer mais incidentes para 2016/2017 categorizados por sexo.

Fonte: Adaptado, BRASIL, 2016.

O CCR é caracterizado como um tumor maligno localizado cavidade abdominal, na região do cólon descendente e do colon sigmóide. Este câncer, é proveniente de uma alteração genética, que causa proliferação de células anormais. O CCR, resulta em uma alteração da mucosa colônica normal, para lesões benignas, denominadas de adenomas ou pólipos adenomatosos, que em seguida podem evoluir para lesões malignas, os adenocarcinomas. Esta progressão é lenta, geralmente ocorre durante vários anos e pode ser induzida por fatores envolvendo oncogênese e mutações dos genes supressores tumorais (BENSON, 2007; ZANDONÁ *et al.*, 2011).

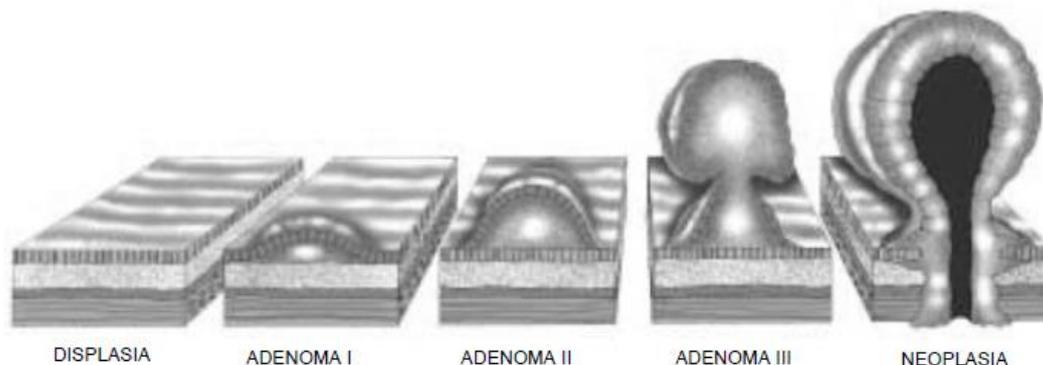


Figura 2. Sequência de formação do adenoma-câncer

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003.

O adenoma ou pólipso adenomatoso tem papel fundamental no desenvolvimento do câncer. Estima-se que 95% dos casos de adenocarcinomas, independente da etiologia, são originários de pólipos adenomatosos. (KUMAR *et al.*, 2005). Um pólipso é representado uma massa tumoral protusa em direção à luz intestinal que se origina, como uma pequena massa sésil que, à medida seu tamanho aumenta, pode permanecer como sésil ou adquirir uma haste, tornando-se pediculado. Os pólipos que se originam de proliferação epitelial displásica, variando de leve (baixo grau) a intensa (alto grau) são denominados pólipos adenomatosos ou adenomas) (CHEN, 2003; WALSH & TERDIMAN, 2003; GARFOLO *et al.*, 2004).

O desenvolvimento do CCR, envolvem diversos estágios que induzem alterações genéticas dando origem a sequência adeno-carcinoma, como mostra a figura 2 .

A sequência adenoma-carcinoma e a elucidação da genética molecular envolvida na patogênese do CCR passou a ser estudada intensamente e muitos avanços foram obtidos. Vários genes como APC, DCC e p53, entre outros, foram identificados como participantes da sequência adenoma-carcinoma, estando envolvidos na gênese tumoral baseada na teoria de múltiplos passos, onde o acúmulo de mutações genéticas em células instáveis é o fator principal que origina o câncer (PINHO *et al.*, 1999). Estes eventos de alterações mutacionais, que dão início a sequência são divididas em 4 estágios: 1) Alteração do gene APC, a desativação do gene APC, que exercer uma função reguladora na proliferação epitelial, irá

favorecer um desequilíbrio no sentido de promover a maior produção celular, devido a hipometilação do DNA, desenvolvendo um estado hiperproliferativo e ocasionando a produção de um pequeno adenoma. 2) Ativação das proteínas K-ras, essas proteínas, promovem ativação do crescimento e diferenciação celular a partir de estímulos extracelulares. Desta forma, a presença do adenocarcinoma com desequilíbrio de proliferação celular, propicia uma mutação no gene K-ras, reproduzindo proteínas com presença alterações, que vão atuar como um agente oncogene, estimulando a proliferação, ocasionando a evolução do adenoma inicial, para o um adenoma intermediário. 3) Mutação da proteína DCC: Esta proteína atua na adesão entre as células e sua mutação acarreta a perda da capacidade de aglutinação celular, sendo considerada uma etapa tardia e decisiva na sequencia adeno-carcionoma. 4) Mutação da proteína p53: Essa mutação é considerada decisiva no processo de malignização de uma lesão adenomatosa benigna encontrada em 75% dos casos de câncer colón retal. Atuando na parada do ciclo celular, a proteína p53, apresenta um papel protetor contra a reprodução celular contendo alterações de DNA. Com a perda desta função, o tecido com em um estado avançado de hiperproliferação com acúmulo de mutações cromossomiais, é caracterizado como carcinoma invasivo. (PINHO *et al.*, 1999).

2.1.1 Sinais, Sintomas, fatores de risco para o câncer de colón e reto

O estágio inicial do CCR, pode não apresenta sintomas. Em geral, os sinais e sintomas se manifestam nos estágios mais avançados da doença e dependem do tamanho e localização do tumor. Os principais sinais e sintomas são: sangramento retal, presença de sangue nas fezes, alteração do hábito intestinal, constipação, diarreia, cólicas na parte inferior do abdômen, sensação de desconforto, ausência de peristaltismo e perda de peso anormal. Alguns sintomas não específicos foram definidos como: náusea, inchaço, êmese e a presença de gases intestinais (CHEN *et al.*, 2016).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2003, os principais fatores de risco associados ao câncer do intestino são: ambientais, genéticos, idade maior ou igual a 50 anos, alimentação pobre em frutas, vegetais e fibras, o consumo excessivo de bebidas alcoólicas e gordura animal; tabagismo e obesidade (BRASIL,2003).

Os fatores ambientais e genéticos relacionados ao CCR estão, são considerados primordiais para a classificação do tipo do câncer. Os fatores genéticos podem ser correlacionados à predisposição hereditária ou não, sendo que estes determinam a

suscetibilidade do indivíduo ao desenvolvimento de adenomas e/ou o próprio CCR (BRASIL, 2003).

A hereditariedade representa aproximadamente 10% dos casos com este tipo de neoplasia, sendo o CCR hereditário representado por dois grupos: nos quais há ou não a presença de pólipos. Nos casos em que existem a polipose (presença de pólipo), possuem dois tipos de fatores de risco hereditários, a polipose adenomatosa familiar (PAF) e a síndrome de polipose hamartomatosa, conhecida também como polipose juvenil ou síndrome de Peutz-Jeghers. Já nos casos em que há a ausência de polipose, destaca-se o CCR não polipóide, identificado como síndrome de Lynch. Apesar da literatura ressaltar a associação entre os fatores genéticos com o aparecimento de CCR, em aproximadamente 70% dos casos dessa patologia é esporádica, tendo como implicações para sua manifestação fatores ambientais (ALEGRÍA & GARRIDO, 2009). Em 25% dos pacientes o CCR, é de origem familiar, evidenciando que indivíduos que possuem histórico desta doença na família, cujo modelo não se aplica a nenhuma das síndromes hereditárias vistas anteriormente. O risco de adquirir esse tipo de câncer aumenta se o integrante familiar com o histórico de CCR for de primeiro grau (ALEGRÍA; GARRIDO, 2009).

Segundo BERNSTEIN *et al.*, 2001, portadores de doença inflamatória intestinal crônica, como, colite ulcerativa e doença de Crohn, possuem um grande risco de desenvolver câncer colorretal. O risco de desenvolver o CCR aumenta de acordo com a extensão e duração da doença (BERNSTEIN *et al.*, 2001).

A incidência do CCR, também está associada à obesidade e especialmente dietéticos (DINI & KOFF, 2006). A tabela 1, exemplifica os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer colorretal.

Tabela 1. Principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer colorretal

FATORES QUE AUMENTAM O RISCO	RISCO RELATIVO (*)
Hereditariedade e história médica	
História familiar	
▪ 1 parente de primeiro grau	2.2
▪ Mais do que 1 parente	4.0
▪ Parentes com diagnóstico antes dos 45 anos	3.9
Doença inflamatória intestinal (cólon)	
▪ Doença de Crohn	
▪ Colite ulcerativa	2.6
Cólon	
Reto	1.9
Diabetes	1.2
Outros fatores	
▪ Obesidade	1.2
▪ Consumo de carne vermelha	1.2
▪ Consumo de carne processada	1.2
▪ Fumar	1.2
▪ Consumo de álcool	1.1
Fatores que diminuem o risco	
▪ Atividade física	
Homens	0.8
Mulheres	0.7
▪ Cálcio	0.8
▪ Ingestão de leite	0.9

(*)Risco relativo compara o risco de desenvolvimento da doença entre um grupo de pessoas com uma determinada exposição em relação a um grupo de pessoas sem esta exposição. Fatores de risco dietéticos são normalmente avaliados comparando-se um alto consumo com baixo consumo. Se o risco relativo for maior do que 1.0, o risco é maior entre as pessoas expostas do que as não expostas. Se o risco relativo for menor do que 1.0 indica um efeito protetor.

Fonte: adaptado de Alteri *et al.*, 2011.

Alguns estudos têm demonstrado que os hábitos alimentares exercem um papel fundamental na etiologia do câncer. De acordo com Fortes et al. (2007), cerca de 35% dos casos de câncer estão relacionados à uma dieta inadequada. Dentre os fatores dietéticos, destacam-se dietas com altos teores de gorduras saturadas e baixos teores de alimentos de origem vegetal. Além da dieta inadequada, sabe-se que o alcoolismo, o tabagismo e o sedentarismo estão entre os fatores de risco (FORTES *et al.*, 2007; INCA, 2012).

2.1.2. Screening e diagnóstico

O diagnóstico precoce constitui um dos aspectos mais importantes para a diminuição da mortalidade associada ao CCR, já que este câncer é frequentemente identificado após a manifestação dos sintomas. Na maioria dos casos, ele é silencioso e assintomático. Desta forma, o rastreamento precoce, pode auxiliar na prevenção e atuar para um bom prognóstico do CCR. (AMERICAN CÂNCER SOCIETY, 2016).

Segundo a Associação Brasileira de Prevenção ao Câncer de Intestino (ABRAPRECI), o rastreamento para câncer do intestino é realizado de acordo com a estimativa de risco para a neoplasia de cada população (HABR-GAMA, 2005). O protocolo de para população de risco baixo e moderado consiste na realização anual da pesquisa de sangue oculto nas fezes (PSOF), seguida pela colonoscopia ou retossigmoidoscopia nos indivíduos com resultado positivo. A literatura até o momento sugere que o início do rastreamento para o câncer do intestino com pesquisa de sangue oculto nas fezes ocorra a partir dos 50 anos de idade (BRASIL, 2003).

A PSOF é um exame confiável para a detecção de sangramento e não para diagnóstico de câncer gastrointestinal. A realização desta prova é justificável no CCR, já que as lesões neoplásicas sangram mais que mucosa intestinal normal. Por essa razão, é importante a associação do toque retal e da retossigmoidoscopia à pesquisa do sangue oculto, para aumentar a porcentagem de diagnósticos positivos no diagnóstico do câncer colorretal (BRASIL, 2003).

A retossigmoidoscopia é um exame ambulatorial, indolor, não necessita sedação e preconiza a limpeza do canal retal. Este exame possibilita a avaliação das características da mucosa do reto e sigmóide, como coloração, presença de edema e de lesões, assim como a colheita de secreções (sangue, muco), além de biópsias de lesões suspeitas (HABR-GAMA, 2005). O exame de retossigmoidoscopia apresenta vantagens ao ser comparado ao PSOF, dentre elas, são: a visualização direta da mucosa colorretal; detecção de lesões e possibilidade de realizar biópsia ou ressecá-las durante o exame (LAU; SUNG, 2004).

O exame de colonoscopia é indicado para os indivíduos que apresentam um PSOF positivo. Este exame é considerado o método padrão ouro para a investigação e prevenção do CCR, possibilitando a polipectomia endoscópica que reduz a incidência de CCR em até 90% (WINAWER et al., 2003; GANNON et al., 2002; SEITZ et al., 2004). A colonoscopia, permite a visualização de todo o intestino grosso e do íleo terminal inclusive, O exame colonoscópico

requer a preparação mecânica do intestino e sedação do paciente, possibilita o diagnóstico e o tratamento das lesões em tempo único (realização de biópsias e polipectomias) (BRASIL, 2003 ; REX, 2007). Apesar de ser considerado padrão ouro para detecção do CCR, a colonoscopia possui limitações. Este procedimento leva a perda de aproximadamente 20% de todos os adenomas e 10% de grandes dimensões ou adenomas avançados. A colonoscopia apresenta um grande risco de complicações quando comparado com os demais testes de diagnóstico, incluindo lágrimas intestinais e hemorragias especialmente quando um pólipó é removido (ALTERI et al., 2014).

2.1.3. Estadiamento da doença

O Estadiamento é o sistema usado para classificar neoplasias e seu objetivo é tornar possível a previsão da evolução e prognóstico de cada tumor em cada paciente, através das informações obtidas pelos resultados dos testes laboratoriais e radiológicos pré-operatórios, pelo patologista, através do exame histológico da peça cirúrgica retirada, e completado pela avaliação intra-operatória do cirurgião.

Para o câncer de cólon e reto, o estadiamento é determinado pela avaliação da extensão de sua penetração na espessura da parede intestinal, pela presença ou ausência de tumor nos linfonodos (metástases linfáticas) que habitualmente fazem parte da estrutura anatômica do órgão, ou pela propagação do tumor para outros órgãos (metástases), das quais os mais frequentes são fígado, pulmão e ossos (BRASIL,2003; ALTERI *et al.*, 2011).

Apesar de existirem vários sistemas classificação de tumores malignos, como de Dukes e Astler-Coller, porém, o TNM (Tumour-node-metastasis), é o mais utilizado como estadiamento pelos sistemas de saúde e é classificado como padrão tanto pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC), quanto pela União Internacional do Combate ao Câncer (Schwartz *et al.*, 2004; WOLPIN *et al.*, 2007; WOLPIN & MAYER, 2008). Este sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente(BRASIL, 2003). A Tabela 2 e 3 apresentam as definições propostas pelo sistema de classificação de tumores malignos (TNM) para determinar o estadiamento do câncer colorretal.

Tabela 2. Sistema de classificação de tumores malignos (TNM) para o estadiamento do câncer colorretal.

TNM			
Tumor Primário (T)		Linfonodos Regionais (N)	Metástases à distância (M)
(TX)	Tumor primário inacessível	(NX) Linfonodos regionais inacessíveis	(MX) Presença de metástases a distância não pode ser observada
(TO)	Sem evidência do tumor primário	(NO) Sem evidências de linfonodos regionais	(MO) Sem metástases à distância
(Tis)	Carcinoma <i>in situ</i> intraepitelial ou invasão da lâmina própria	(N1) Metástases em um até três linfonodos pericólicos ou perirretais	(M1) Metástases à distância
(T1)	Tumor invadindo submucosa	(N2) Metástases em quatro ou mais linfonodos pericólicos ou perirretais	
(T2)	Tumor invadindo a muscular própria	(N3) Metástase em qualquer linfonodo ao longo da cadeia vascular principal e/ou metástase no linfonodo apical desta cadeia	
(T3)	Tumor invadindo através da muscular própria até subserosa ou nos tecidos pericólicos não peritonizados ou perirretais		
(T4)	Tumor invadindo diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou perfurando vísceras peritoneais		

* T traduz a extensão do tumor primário, seu grau de penetração na parede intestinal;
 N traduz a presença ou ausência e extensão das metástases linfonodais;
 M traduz a presença ou ausência de metástases a outros órgãos.

Fonte: BRASIL, 2003.

Tabela 3. Sistema de classificação de tumores malignos (TNM) para o estadiamento do câncer colorretal.

AJCC/UICC ESTÁGIO	TUMOR PRIMÁRIO	LINFONODOS REGIONAIS	METASTASES À DISTÂNCIA	DUKES	ASTLER COLLER
Estádio 0	Tis	N0	M0		
Estádio I	T1	N0	M0	A	
	T2	N0	M0	A	B1
Estádio II	T3	N0	M0	B	B2
	T4	N0	M0	B	B3
Estádio III	Qualquer T	N1	M0	C	C1
	Qualquer T	N2	M0	C	C2
	Qualquer T	N3	M0	C	C3
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	C	D

* T traduz a extensão do tumor primário, seu grau de penetração na parede intestinal;
 N traduz a presença ou ausência e extensão das metástases linfonodais;
 M traduz a presença ou ausência de metástases a outros órgãos.
 Fonte: BRASIL, 2003.

A progressão do câncer de cólon está dividida em estágios e/ou fases, que são classificados de acordo com o sistema TNM, conforme mostra a Figura 3.

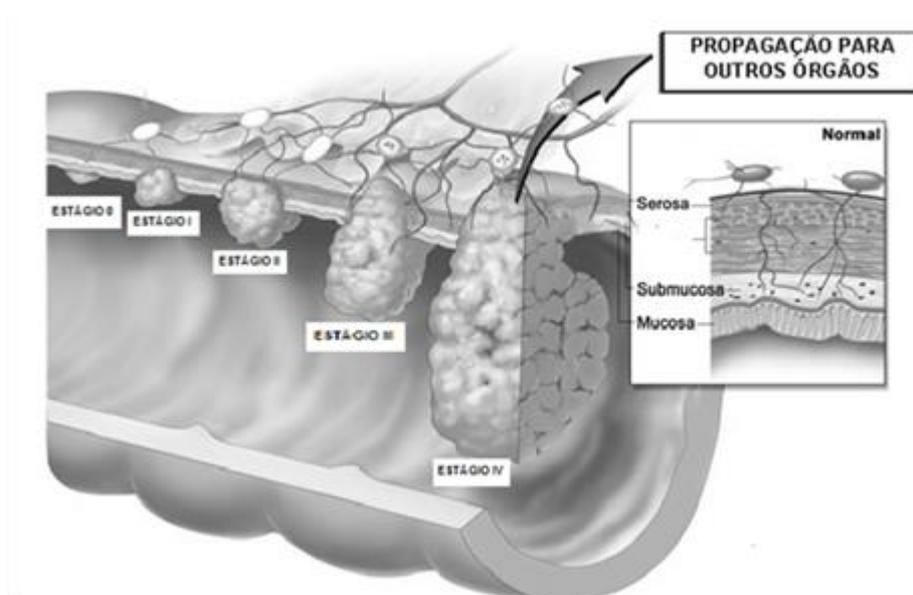


Figura 3. Estágios da progressão da doença

Fonte: NCI, 2006.

Conforme ilustrado na Figura 3, a doença é dividida em cinco estágios e/ou fases: 1) fase 0= é o estágio mais inicial de classificação, também chamado de carcinoma, pois o câncer se restringe ao revestimento interior do cólon; 2) fase 1= o câncer se estende às camadas médias do cólon, mas não atravessa as paredes do intestino; 3) fase 2= o tumor ultrapassa as paredes do intestino e dissemina-se para tecidos vizinhos, mas ainda não acomete os gânglios da região; 4) fase 3= o câncer invade os gânglios vizinhos, mas não

outras partes do corpo; 5) fase 4= é o estágio mais avançado da doença. Nesta fase, o tumor já é detectado à distância do local de origem, como no fígado e nos pulmões (NCI, 2006).

2.1.4. Bases de tratamento

A metodologia de tratamento escolhida para o câncer colorretal depende do grau de lesão do tumor e da área atingida, além de ter ou não metástase (BRASIL, 2003). As modalidades terapêuticas disponíveis para o tratamento do CCR incluem a cirurgia, a quimio e a radioterapia, assim como novos fármacos antiangiogênicos (SCHWARTZ *et al.*, 2004).

De acordo com o INCA, a cirurgia é o tratamento inicial mais comum para o CCR, esta opção terapêutica traz a possibilidade de cura de até 90% (FERNANDES *et al.*, 2009, BRASIL, 2003). O procedimento cirúrgico chamado de colectomia, consiste na remoção do tumor, dos linfonodos adjacentes e de uma parte do cólon saudável ou do reto. Esta intervenção, cirúrgica pode remover de modo eficaz a neoplasia maligna e podendo ser utilizada nos diferentes tipos e estágios do mesmo quando o CCR está nos estágios 0 ou I, tendo portanto ausência de metástase (SÁENZ *et al.*, 2009).

O tratamento cirúrgico é considerado curativo quando resulta na remoção total do tumor primário, órgãos e estruturas localmente comprometidas e de metástases identificadas, observados os preceitos técnicos oncológicos. É considerado paliativo quando resulta em reduzir e/ou amenizar os sintomas em indivíduos que não apresentando prognóstico de cura por ressecção (metástases irrissecáveis à distância ou localmente disseminadas e invasão de estruturas vitais) (BRASIL, 2003).

A quimioterapia é um tratamento sistêmico do câncer e sua indicação de tratamento deve ser de acordo com o estágio da doença. Esta terapêutica, consiste no uso de drogas anti-câncer que atuam sobre o processo de divisão das células neoplásicas. As drogas entram na circulação sanguínea e percorrem todo o organismo. A maioria das drogas anticâncer é administrada por injeção direta na veia ou através de um cateter (porth-a-cath ou intra-cath). Recentemente, algumas drogas anticâncer têm sido administradas oralmente sob forma de comprimidos. (MACHADO;SAWADA, 2008; FERNANDES *et al.*, 2009; BRASIL 2003).

A terapia por radiação ou radioterapia é realizada com o uso de raios-X de alta energia para destruir as células cancerosas. A radioterapia tem ação local, atingindo as células cancerosas localizadas apenas nas regiões que estão sendo tratadas e na maioria das vezes atuam para a redução do tamanho de tumores grandes, podendo também diminuir o risco de

recidivas e metástase. Tanto a radioterapia como a quimioterapia podem ser usadas antes da operação (terapia neoadjuvante) para redução da massa tumoral e assim facilitar a retirada cirúrgica do tumor, ou após a cirurgia (terapia adjuvante), para destruir células cancerosas que tenham permanecido na área tratada. A radioterapia também é utilizada para o alívio de sintomas (ALMEIDA *et al.*, 2005; BRASIL, 2003).

2.2. LINHAGEM CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO: HT-29

Em 1964, a linhagem HT-29 foi obtida, a partir do tumor de uma mulher de 44 anos de idade com adenocarcinoma de cólon. As células HT-29 são células epiteliais intestinais humanas, com característica aderente e tumorigênica. Suas estruturas morfológicas incluem microvilosidades, microfilamentos, mitocôndrias com grânulos escuros e lisos, retículo endoplasmático rugoso e ribossomos livres, gotículas lipídicas e muitos lisossomos secundários (FOGH *et al.*, 1977).

As células HT-29 expressam receptores de uroquinase, mas não possuem atividade detectável do fator ativador de plasminogênio (REITER *et al.*, 1993). São negativas para CD4, mas possuem uma expressão na superfície da célula de galactose ceramida (um possível receptor alternativo para o HIV) (FOGH, 1975; CHEN *et al.*, 1987).

Na linhagem celular HT-29 o antígeno da proteína p53 é produzido em excesso. Consequentemente, os efeitos de indução da apoptose, mediados pela proteína p53, estão inativados garantindo a sobrevivência da célula (FOGH, 1975; CHEN *et al.*, 1987).

Em nosso estudo foi escolhida a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano HT-29 para o estudo do efeito de extratos de jabuticaba, jamelão e jambo e o efeito dos mesmos sobre células de câncer de cólon humano, no intuito de avaliar a implicação desses extratos na prevenção do desenvolvimento do câncer colorretal.

A origem da linhagem HT-29 e a escassez de trabalhos em relação a mesma e aos frutos da família myrtaceae foram determinantes na escolha desta linhagem para o estudo.

2.3. CÂNCER E COMPOSTOS BIOATIVOS

O câncer é considerado como uma doença multifatorial de complexas interações, sendo caracterizado como um importante problema de saúde pública. Atualmente, é uma das maiores causas de morte, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é o nome

dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum alterações genéticas que resultam no crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos e podem se espalhar por outras partes do corpo. O processo de formação do câncer ou carcinogênese, passa por vários estágios para alcançar a formação de tumor (INCA, 2009).

A incidência da doença está relacionada a fatores ambientais, predisposição genética, obesidade e especialmente o fator dietético (DINI & KOFF, 2006). Alguns estudos têm mostrado que os hábitos alimentares desempenham um papel fundamental na etiologia do câncer, atuando como fator determinante para o desenvolvimento de diversas formas de câncer. Estima-se que 35% dos casos de câncer ocorrem devido à adoção de dietas inadequadas (GARÓFOLO *et al.*, 2004).

Diversas investigações epidemiológicas têm demonstrado que os antioxidantes podem diminuir o risco de vários tipos de patologias, entre eles o ácido ascórbico, fitoestrógenos da soja e carotenóides (α -caroteno, β -caroteno, luteína, zeaxantina) (BRAGA, *et al.*, 2010; CABRAL *et al.*, 2009). Esses componentes alimentares participam de diversos processos bioquímicos e fisiológicos, demonstrando papéis importantes na prevenção e no tratamento de doenças crônicas, como o câncer. Evidências sugerem que a quimioprevenção através do consumo de compostos bioativos pode reduzir a morbidade e a mortalidade por câncer. (DAVIS, 2007; JIRTLE & SKINNER, 2007).

Na patogenicidade do câncer, o efeito do estresse oxidativo é demonstrado. A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também leva à produção de radicais (ADEGOKE *et al.*, 1998). A superprodução de oxidantes em certas condições pode causar um desequilíbrio (stress), levando a um dano oxidativo de várias biomoléculas, tais como os lipídios, DNA e proteínas (SOARES, 2002). Evidências sugerem que este dano oxidativo pode ser indutor potencial para o desenvolvimento do câncer e pode ser prevenido ou limitado através de dietas ricas em antioxidantes encontrados em frutas e hortaliças. Os benefícios muitas vezes estão associados ao fato desses compostos serem antioxidantes (DAVIS, 2007; JIRTLE & SKINNER, 2007). Com base nestes dados, a importância da pesquisa por antioxidantes naturais tem aumentado (SHAHIDI *et al.*, 1992).

Os antioxidantes podem ser categorizados, de acordo com seu mecanismo de defesa, em primários e secundários. Os primários agem diretamente interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, transformando-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo

lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autoxidação, por diferentes maneiras, que incluem complexação de metais, seqüestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (ADEGOKE *et al.*, 1998).

Os antioxidantes presentes nos compostos bioativos agem em sinergismo, preferencialmente, com o radical peroxil por ser este mais abundante na etapa da autoxidação e por possuir menor densidade energética do que outros radicais, o que contribui para a abstração do seu hidrogênio (DECKER *et al.*, 1998). O radical fenoxil resultante, embora relativamente estável, pode interferir na reação de propagação ao reagir com um radical peroxil, via interação entre radicais. O composto formado, por ação da luz ultravioleta e temperaturas elevadas, poderá originar novos radicais, comprometendo a eficiência do antioxidante, que é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como, pelo tamanho da cadeia desses grupos (JADHAV *et al.*, 1995; SHAHIDI *et al.*, 1992.). Este mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (RAMARATHNAM *et al.*, 1995; NAMIKI, 1990).

A capacidade de um composto ou alimento em inibir a proliferação das células cancerígenas é um fator desejável na progressão do câncer. A função de nutrientes antioxidantes na etiologia do câncer continua em discussão, visto que estes nutrientes possuem importante função estrutural e atuam como cofatores de diversas enzimas (BARGELLINI *et al.*, 2003).

O principal grupo de agentes inibidores da carcinogênese é representado por antioxidantes, bloqueadores de radicais livres. Além destes, também temos os indutores da morte celular programada (apoptose) e os inibidores das enzimas do citocromo P450 (responsável pelo metabolismo de drogas, cuja ativação leva à formação de radicais livres carcinogênicos).

Atualmente, uma grande atenção tem sido direcionada a estratégias que podem reduzir o risco de desenvolvimento de câncer e o consumo de alimentos funcionais. As propriedades quimiopreventivas podem desempenhar um papel anti-carcinogênico, antioxidante e anti-inflamatório. Eles também podem agir contra o câncer que são induzidos ou sustentados por

hormônios, ou podem apresentar atividade anti-angiogênica (FACINA, 2012; UPADHYAYA *et al.*, 2007). Alguns estudos ligaram o consumo de frutas e hortaliças coloridos com o risco de câncer de mama e a recorrência de pólipos coloretal, devido à presença de agentes fitoquímicos, porque agem como quimioprotetores, atuando na indução de enzimas, que metabolizam carcinógenos, transformando-os em suas formas menos reativas (WU *et al.* 2013; . CLERECI *et al.* 2011). Entre os compostos bioativos, o consumo de antocianinas presentes nos frutos da família Myrtaceae estão associados à sua atividade antioxidante que pode reduzir os níveis de ROS em mamíferos e, assim, evitar danos ao DNA e as mutações que impedem o início da progressão do tumor (HOGAN *et al.*, 2010 ; ZHANG *et al.*,2008).

2.4. COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos estão amplamente distribuídos na natureza, são os antioxidantes mais abundantes da dieta e estão presentes nas frutas e hortaliças. A ingestão regular de uma dieta rica em alimentos de origem vegetal, oferecem, uma gama de nutrientes e diferentes compostos bioativos, incluindo fitoquímicos (compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides), vitaminas (vitamina C, ácido fólico, e pró-vitamina A), minerais (potássio, cálcio e magnésio) e fibras (CARRATU; SANZINI *et al.*, 2005; LIU, 2013). Desta forma, a adoção de escolhas alimentares saudáveis representa um importante fator protetor para a saúde (KALIORA *et al.*, 2006).

Algumas evidências científicas, elucidam a correlação do papel protetor dieta e a redução do risco de desenvolver doenças crônicas, porém, os efeitos benéficos dos compostos bioativos na saúde humana, dependem da quantidade consumida e sobre a sua biodisponibilidade. (MANACH *et al.*, 2004).

Diariamente, quantidades significativas de compostos bioativos são ingeridos na alimentação habitual. No entanto, as concentrações desses compostos no organismo humano são muito baixas – na faixa de micromoles, o que está relacionado à sua limitada absorção e biodisponibilidade. (DE CASTRO,2015).

A literatura reporta vários fatores que modificam a biodisponibilidade de compostos bioativos presentes nos alimentos: a complexidade da matriz alimentícia, a forma química do composto de interesse, estrutura e quantidade de outros compostos ingeridos concomitantemente (fatores exógenos) e ainda o tempo de trânsito intestinal, esvaziamento

gástrico, metabolismo do composto e grau de conjugação, possíveis interações com proteínas na circulação sanguínea e tecidos, composição da microflora intestinal e o perfil genético do indivíduo (OLIVEIRA & BASTOS, 2011).

Esses compostos, tais como vitaminas, compostos fenólicos e outros pigmentos, variam extensamente em estrutura química e, conseqüentemente, na função biológica, e estes apresentam algumas características em comum: pertencem a alimentos do reino vegetal, são substâncias orgânicas e geralmente de baixo peso molecular, não são indispensáveis nem sintetizados pelo organismo humano e apresentam ação protetora na saúde humana quando presentes na dieta em quantidades significativas. Em sua maioria, são metabólitos secundários e geralmente, estão relacionados com os sistemas de defesa das plantas contra a radiação ultravioleta ou as agressões de insetos ou patógenos (MANACH *et al*, 2004).

Os mecanismos pelo qual estas substâncias proporcionam estes benefícios estão relacionados à atividades como: antioxidante, desintoxicante, antimicrobiana, citotóxica, fungicida, hipocolesterolêmica, anticoagulante e antiinflamatória (PENNINGTON, 2002).

Por existirem em grande número, estes compostos podem ser subdivididos em grupos com milhares de compostos distintos. Algumas substâncias são próprias de alguma espécie ou gênero de plantas, outras são unidas por um complicado critério de classificação. A Figura 4, mostra as diversas classes de compostos bioativos presentes nos alimentos.

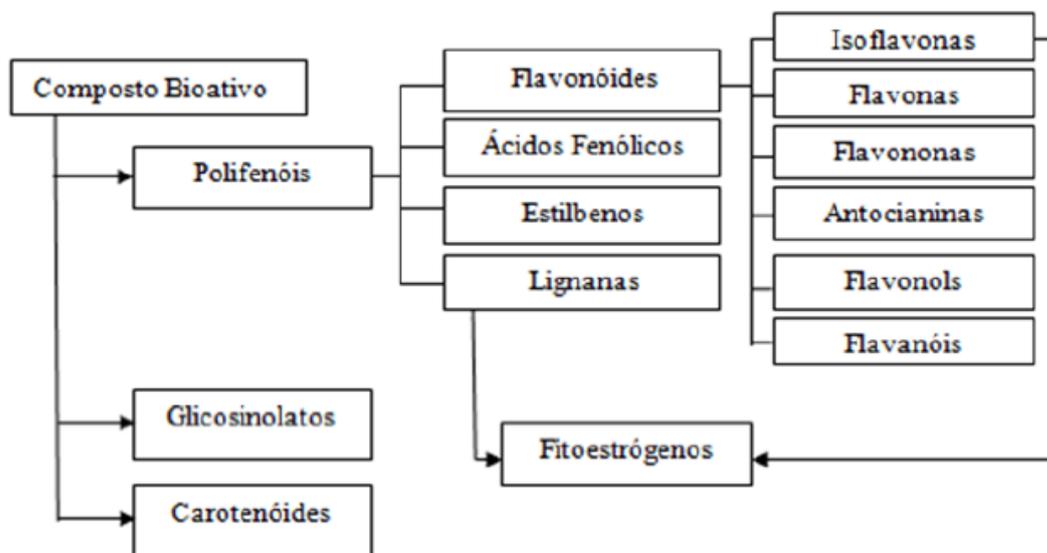


Figura 4. Classes de compostos bioativos em alimento.

Fonte: Adaptado CORREA, 2016.

2.5. COMPOSTOS FENÓLICOS

Dentre os compostos bioativos presentes nos alimentos, destacam-se os compostos fenólicos ou polifenóis, que são as substâncias fitoquímicas mais abundantes em alimentos de origem vegetal, e desta forma, são também as estruturas mais elucidadas pela literatura. Estruturalmente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Apresentam estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Existem cerca de oito mil compostos fenólicos descritos na literatura, dentre eles, podemos citar, os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis. Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Os compostos fenólicos estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas. (PEREIRA *et al.*, 2011).

Alguns estudos têm evidenciado que os compostos fenólicos, são os principais responsáveis pela propriedade antioxidante desempenhada pelos alimentos de origem vegetal (BOUDET, 2007; YU *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos são excelentes antioxidantes e agem neutralizando e sequestrando de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação (SHAHIDI *et al.*, 1992). Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias. Os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila adjacentes (orto-difenóis), localizados em várias posições dos anéis A, B e C, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação com o oxigênio (-C=O) de algumas moléculas de flavonóides garantem a esses compostos sua alta atividade antioxidante (HRAZDINA *et al.*, 1970; RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Estudos correlacionam a atividade antioxidante dos compostos fenólicos e sua ação anticarcinogênica devido à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele. Uma vez que protegem moléculas como o DNA, os compostos fenólicos, podem vir a abortar alguns processos carcinogênicos (HARBORNE & WILLIAMS, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002; DE CASTRO, 2015).

2.6. FLAVONÓIDES

Os flavonóides, constituem um dos grupos mais importantes entre os polifenóis, pertencem a uma enorme classe de substâncias fenólicas e representam a classe dos pigmentos naturais, no caso das antocianinas. Os flavonóides são produzidos a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato e estão presentes na maioria das plantas, concentrados em sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores (FELDMANN, 2001; MANN, 1987).

A estrutura química dos flavonóides, é representada por um esqueleto com 15 átomos de carbono na forma C₆-C₃-C₆, e são divididos em classes dependendo do estado de oxidação do anel central de pirano (IKAN, 1991). A literatura descreve que mais de 8 mil flavonoides diferentes, foram identificados (PIETTA, 2000). A figura 5, representa as estruturas químicas dos principais tipos de flavonóides encontrados.

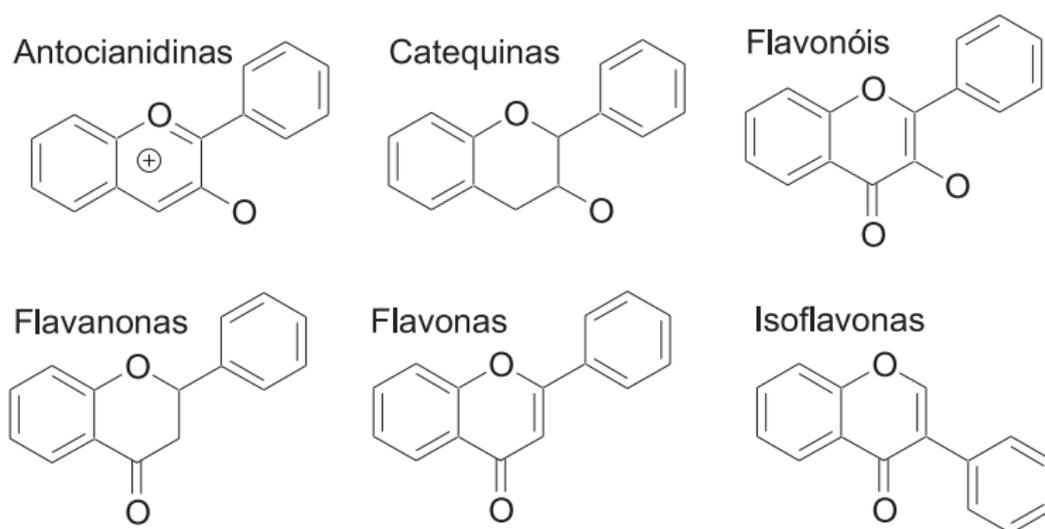


Figura 5. Estrutura químicas dos principais tipos de flavonoides.

Fonte: Molnár-Perl & Füzfai, 2005.

Nos alimentos, as principais fontes dos flavonóides são frutos (uvas, cerejas, maçã, groselhas, frutas cítricas, entre outros) e hortaliças (pimenta, tomate, espinafre, cebola, brócolis, dentre outras folhosas) (BARNES *et al.*, 2001), sendo seu consumo estimado na dieta humana entre 1-2gramas por dia (DEVRIES *et al.*, 1997).

A literatura associa a ingestão de alimentos que contenham flavonoides em sua composição e sua ação benéfica no organismo, uma vez que, sua atividade antioxidante apresenta função protetora e sua atividade biológica atua tratamento de doenças degenerativas mediadas por estresse oxidativo (LOPEZ-REVUELTA *et al.*, 2006). A atividade biológica

dos flavonóides e de seus metabólitos é mediada através da sua estrutura química e dos substituintes da molécula, devido as alterações ocorrem na sua estrutura básica da molécula, tais como, glicosilação, esterificação, amidação, hidroxilação, que modulam a polaridade, toxicidade e direcionamento intracelular destes compostos.

Dentre o grupo dos flavonóides, as antocianinas são os compostos mais estudados pela literatura. É um grupo de pigmentos naturais hidrossolúveis, amplamente distribuídos no reino vegetal, encontrados em diversas frutas como o mirtilo, a amora, o morango, a framboesa, o jamelão, a jabuticaba, a uva, entre outras frutas (WANG; LIN, 2000; CONNOR *et al*, 2002; VIZZOTTO; PEREIRA, 2008).

2.7. ANTOCIANINAS

As antocianinas são metabólitos secundários sintetizados por plantas e são pertencentes à classe dos flavonoides. Compõe o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal e são responsáveis pela coloração do vermelho ao azul exibida por flores e frutos e são encontradas em maior quantidade nas angiospermas (BRIDLE & TIMBERLAKE, 1997). A figura 6, representa a estrutura química das antocianinas.

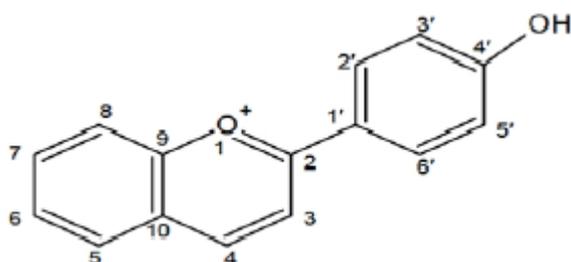


Figura 6. Estrutura química das antocianinas

Fonte: DE CASTRO & TEODORO, 2015.

A estrutura química básica das antocianinas é baseada em uma estrutura policíclica de quinze carbonos ligados aos grupos hidroxila OH-. Quando livres desses açúcares são chamadas de antocianidinas ou agliconas e as que ocorrem com maior frequência nos alimentos (EIBOND *et al.*, 2004).

Alguns estudos presentes na literatura, descrevem que as antocianinas são um potente antioxidante comparado com antioxidantes clássicos como butilato hidroxianisol, butilato hidroxitolueno e alfa tocoferol (vitamina E). As antocianinas atuam como agente natural,

quando adicionado a alimentos, além de conferir a coloração aos alimentos propicia a prevenção contra auto-oxidação e peroxidação de lipídeos em sistemas biológicos. (NARAYAN *et al.*, 1999). Além de suas funções como corantes naturais, as antocianinas têm apresentado grandes efeitos biológicos múltiplos com benefícios potenciais à saúde humana devido às suas atividades biológicas, que incluem propriedades antioxidante, anti-inflamatórias, inibição da oxidação do LDL, diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares e de câncer(GARCIA-ALONSO *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2006; TOUFEKTSIAN *et al.*, 2008).

2.8. FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae é definida por 130 gêneros e 5671 espécies de árvores e arbustos. Estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da Austrália, Ásia e América (GOVAERTS *et al.*, 2008).

No Brasil, esta família está representada por 26 gêneros e 1.000 espécies. Os principais gêneros dessas famílias são *Eucalyptus* (300 espécies), *Malaleuca* (100 espécies), *Eugenia* (600 espécies), *Myrcia* (300 espécies), *Syzygium* (200 espécies) e *Psidium* (100 espécies), sendo consideradas uma das maiores famílias da flora brasileira (REYNERTSON *et al.*, 2006; GODINHO *et al.*, 2014).

As plantas desta família, consistem em árvores ou arbustos e são caracterizados por terem, folhas opostas simples e glândulas aromáticas. As flores são regulares, hermafroditas, solitárias ou agregadas em floração e frutas normalmente presentes em forma de cápsula. Os frutos apresentam principalmente coloração vermelha ao roxo, com bagas de 2-4 cm de diâmetro. Nas regiões tropicais, estas espécies são frequentemente cultivadas em jardins residenciais, terrenos agrícolas de pequena escala, ou colhida-selvagem.

As diversas espécies da família Myrtaceae possuem grande importância econômica devido a sua utilização em alimentos, sendo principalmente consumidos, *in natura* ou utilizadas para fazer doces, sobremesas, vinhos, licores e vinagres. Para além da sua utilização como alimento, muitos destes frutos têm sido utilizados nas práticas de medicina tradicional, devido ao seu importante potencial bioativo (REYNERTSON *et al.*, 2006).

A tabela 5 mostra a composição centesimal de três frutas importantes da família Myrtaceae.

Tabela 5. Composição centesimal dos frutos da família myrtaceae.

Composição Centesimal (g.100 g-1)	Frutas		
	Jaboticaba(*)	Jamelão(**)	Jambo(***)
Carboidratos	15,03	11,63	4,02
Proteínas	1,65	1,89	0,67
Lipídios	1,06	0,62	0,15
Fibras	12,13	1,5	2,3
Cinzas	1,92	0,79	2,86
Umidade	34,04	83,59	11,4
Valor energético(Kcal)	58	47,64	52,8

Valores médios: (*)Asheri *et al.*,2006; Taco, 2011; Lima *et al.*, 2008; Leggati-Leite *et al.*,2012
(**) Pereira 2011;Taco, 2011; Lago *et al.*,2006; (***)Taco, 2011; Cardoso, 1994; Morton 1987.

2.8.1. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) O. Berg)

A jaboticaba, pertence à família Myrtaceae e é oriunda da árvore frutífera jaboticabeira. Sua distribuição ocorre naturalmente em áreas tropicais do Brasil e é originária da Mata Atlântica, podendo ser encontrada desde o Estado do Pará, até o Rio Grande do Sul, estando as maiores produções desse fruto na região Sudeste. Dentre as espécies atualmente conhecidas, destacam-se a *Myrciaria cauliflora* (DC) Berg e a *Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg, sendo conhecidas como jaboticaba sabará e jaboticaba paulista respectivamente (LORENZI *et al.*, 2006; DONADIO, 2000).

A jaboticabeira apresenta em torno de 3 a 6 metros de altura, sendo caracterizada como uma árvore de tamanho médio, apresenta casca lisa e cor parda com aspecto manchado. Suas folhas, são lanceoladas com comprimento de 3 a 7 cm. As flores possuem a tonalidade branca, são aglomeradas entre o caule e os ramos e são formadas entre a primavera e o verão. Os frutos são globosos, apresentam 2 a 3,5 cm de diâmetro e coloração de casca que variam do vermelho ao preto, com uma polpa gelatinosa e esbranquiçada, que é ao mesmo tempo doce e azedo e bastante saborosa. Os frutos têm geralmente apenas uma semente, mas podem conter até quatro. A jaboticabeira dá frutos em dois períodos ao longo do ano, entre agosto e setembro e janeiro e fevereiro (RUFINO, 2008; ALEZANDRO *et al.*, 2013).



Figura 7. Jaboticabeira e seu fruto .

Fonte: Propriedade rural, 2012.

A jaboticaba é utilizada para vários fins culinários e medicinais. Geralmente, o fruto é consumido *in natura* ou utilizado no preparo de geléias e licores. (LIMA *et al.*, 2008).

Do ponto de vista nutricional, a literatura se refere a jaboticaba como um fruto que apresenta baixa densidade calórica, (58 kcal/100g), fonte de carboidrato (15,3g/100g) e uma das mais ricas fontes de vitamina C (10,5mg/100g), vitaminas do complexo B (principalmente B2 e niacina), sais minerais como, cálcio e fósforo. O fruto também apresenta um elevado teor de fibras em sua composição (12,13g/100g) (TACO, 2011; DONADIO, 1983; MATTOS, 1983; BRUNINI *et al.*, 2004). A casca da jaboticaba apresenta elevados teores de antocianinas, ácido elágico, rutina e quecetina, que apresentam atividades anticarcinogênicas e antioxidantes (HAGIWARA *et al.*, 2001; LEGATTI-LEITE *et al.*, 2012; KONG *et al.*, 2003; PLAGEMANN *et al.*, 2012; AURICCHIO *et al.*, 2003; REYNERTSON *et al.*, 2008).

Estudos recentes *in vivo* e *in vitro*, apontam os benefícios da ingestão de jaboticaba. A suplementação com a casca de jaboticaba (1 e 2% na dieta), aumentou a capacidade antioxidante 1,7 vezes pelo método TEAC e 1,3% pelo método ORAC (LEITE *et al.*, 2011;). Batista *et al.*, (2013), em seu estudo com suplementação com a casca de jaboticaba e (1, 2 e 4% na dieta) verificou a diminuição do índice de peroxidação lipídica hepática nos ratos alimentados com 2% de casca de jaboticaba liofilizados. Leite-Legatti *et al.*, (2012). Em seu estudo, estudaram o extrato aquoso da casca de jaboticaba e verificaram alto efeito antiproliferativo em diversas linhagens de câncer humano (LEGATTI-LEITE *et al.*, 2012). Em 2006, Reyneston e seus colaboradores (2006), avaliaram o composto jabuticabin, isolado da fruta jaboticaba e demonstraram citotoxicidade em relação a linhagem cancer de colon (HT-29) e exibiu efeito antiproliferativo contra células de câncer de colon humano (HCT-116)(

REYNESTON *et al.*, 2006). Nesse sentido, observa-se a perspectiva de crescimento para produtos a base de jabuticaba para a comercialização e utilização pelas indústrias alimentícia, de cosméticos e farmacêutica (APEL *et al.*, 2006; SASSO *et al.*, 2010).

2.8.2. Jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

O Jamelão é uma planta pertencente à família Myrtaceae, botanicamente classificada como *Eugenia jambolana* e posteriormente, reclassificada, como *Syzygium cumini* (SRIVASTAVA *et al.*, 2013). É originária da Indonésia e Índia, podendo ser cultivada em vários países, pois se adapta muito bem em diferentes tipos de solo e clima. No Brasil, é cultivada como árvore ornamental e de sombra em áreas litorâneas, sendo comumente encontrados na região Nordeste. Sua árvore é de grande porte, apresentando entre 15 a 20 m, frondosa, com copa densa. A folhagem possui coloração esverdeada e aspecto lustroso. Suas flores são hermafroditas e dominadas pelos estames de coloração branca a creme e ficam dispostas em grandes quantidades em ramos axilares ramificados (AYYANAR & SUBASH-BABU, 2012). Os frutos, que são pequenos e ovóides, que são roxos quando maduros, sua pele é fina, lustrosa e aderente. Sua polpa, também roxa, é carnosa, suculenta e envolve um caroço único e grande (SRIDHAR *et al.*, 2005). O sabor é suave, sem aroma característico, apesar de um pouco adstringente, é agradável ao paladar, e a cor apresenta grande impacto visual. A frutificação em território brasileiro ocorre no período de janeiro a maio (LORENZI, 2006).



Figura 8. Jamelão (*Syzygium cumini*)

Fonte: Frutas exóticas, 2015.

O fruto é geralmente consumido *in natura*, porém pode ser processado na forma de compotas, licores, vinhos, vinagre, geléias, geleadas, tortas, doces, entre outras (DONADIO, 2007). Do ponto de vista nutricional, o jmelão é um fruto que apresenta baixo conteúdo energético, (51 kcal/100g), alto teor de carboidrato, (11,3 g/100g) como mostra a tabela 5, sendo considerado uma excelente fonte de vitamina C (27,1 mg/100g) e de fósforo (4 mg/100g) e baixo teor de fibras (1,5g /100g). (LAGO *et al.*, 2006;VIZZOTTO *et al.*, 2009; TACO, 2011.)

Segundo Sá, (2008), os componentes mais importantes presentes na composição do jmelão são: a água, pigmentos antociânicos, vitaminas, minerais e outros componentes como o ácido elágico e o ácido gálico. Esses componentes, denominados compostos bioativos, apresentam propriedades anti-diarreico, anti-bacteriana e atividades anti-inflamatórias (SÁ, 2008; SRIDHAR *et al.*, 2005; CHANDRASEKARAN *et al.*, 2004;WANG *et al.*, 2008;RAVI *et al.*, 2004).

Alguns estudos presentes na literatura, reportaram o efeito dos extratos de jmelão: Shidrar, *et al.* (2005), realizaram um estudo *in vivo*, utilizando pó de sementes de jmelão, em ratos wistar diabéticos, nas concentrações (250 , 500, 100 mg/Kg), verificou a redução da glicemia de jejum na concentração de 500mg/Kg, mostrando efeitos anti-diabéticos, podendo atuar no tratamento complementar da diabetes tipo 1 e 2 (SHIDAR *et al.*,2005); Grover *et al.* (2002), utilizaram em seu estudo, a administração oral do extrato da polpa do fruto de jmelão em ratos, que mostrou efeito hipoglicêmico em 30 minutos, possivelmente mediado pela secreção de insulina (GROVER *et al.*, 2002). Estudos mostram que o extrato das sementes de jmelão reduz danos no tecido cerebral em ratos diabéticos (PRINCE *et al.*, 2004).

Li *et al.* (2009), avaliaram extratos de jmelão que mostraram efeito anti apoptótico conta a linhagem de câncer de mama humano (MCF-7, MDA-MB-231, MCF-7aro) e citotoxicidade em relação a linhagem de câncer de mama humano (MCF-10^a).

2.8.3. Jambo (*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & LM Perry)

O jambo (*Syzygium malaccensis*) é originário da árvore frutífera, jambeiro, que pertencente à família Myrtaceae. Apesar de originária da Ásia, é encontrado facilmente no Brasil nas regiões Norte, Nordeste e nas regiões quentes do Sudeste onde é cultivado tanto como fruteira quanto como planta ornamental (VIERA, 2004; OLIVEIRA, 2005).

O jambeiro possui tronco reto, copa densa com forma piramidal, podendo alcançar

vinte metros de altura. As folhas são verde escuras e brilhantes na parte superior e verde opaca na parte inferior, medindo de 20 a 22 cm de comprimento. Suas flores apresentam coloração rósea. Os frutos do jambeiro são piriformes, carnosos, do tipo bacóide, sua polpa é esbranquiçada, suculenta, e com sabor pouco adocicado. Possui apenas uma semente e exalam aroma de rosas, persistente e bastante agradável ao olfato. A época de colheita ocorre de janeiro a maio (DONADIO *et al.*, 1998; FALCÃO *et al.*, 2002; WHISTLER, ELEVITCH, 2006; IKARAM, 2009).



Figura 9. Jambo vermelho (*Syzygium malaccensis*)

Fonte: A planta da vez, 2016.

O jambo é comumente consumido *in natura* ou utilizados como matéria-prima para vários outros produtos como doces, geleias, polpa congelada, sucos, néctares e sorvetes, podendo ainda haver aproveitamento das cascas para obtenção de farinhas utilizadas no enriquecimento da alimentação ou na obtenção de corantes naturais.

Em relação aos aspectos nutricionais, o fruto do jambeiro, apresenta baixo teor energético, (27Kcal/100g), contem alto teor de carboidratos (4,02 g/100g), elevada acidez e altas concentrações de ácido ascórbico (27,1 mg/100g), antocianinas e fibras (2,3g/100g) (TACO,2011; MORTON 1987; FALCÃO *et al.*, 2002). O pigmento natural presente na casca do jambo, representa, seu alto teor de antocianinas, (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2004; ORTÍZ *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2006; ZAMBELLI *et al.*, 2006; OLIVEIRA,2012). Estes compostos presentes na casca do jambo, estão relacionados a sua atividade antioxidante e são responsáveis pelos efeitos terapêuticos incluem a redução do risco de desenvolvimento de doença cardíaca coronária, efeitos anticancerígenos, anti-

inflamatório, anti-diabético, melhora da acuidade visual e cognitiva comportamento, estes efeitos relacionados com a sua antioxidante atividade (ORTÍZ *et al.*, 2011).

A literatura reporta alguns estudos que avaliaram extratos de diferentes partes do jambo: Em 1998, Guerrero & Guzman, em seu estudo, avaliaram 19 extratos de diferentes espécies de Myrtaceae sobre o metabolismo das purinas, em relação a inibição da enzima xantina oxidase. Os extratos obtidos de *S. malaccense* na concentração de 51 µg, apresentaram 64 % de inibição da atividade enzimática (GUERRERO & GUZMAN, 1998). Oliveira e seus colaboradores (2006), estudaram a atividade inibitória de extratos da casca, da folha e do caule de *S. malaccense* sobre o vetor da dengue e o hospedeiro intermediário da esquistossomose. Estes pesquisadores demonstraram que os extratos etanólicos da casca do caule e das folhas eram inativos em relação as larvas de *Aedes aegypt*. Porém, os extratos se mostraram letais para os caramujos adultos da espécie *Biomphalaria glabrata* (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A alta atividade antioxidante do composto bioativo, mircitina, foi avaliada no estudo de (ARUMUGAM *et al.*, 2014). Este composto, presente no extrato de folha de jambo atuando no tratamento da diabetes mellitus, funcionando como um adjuvante natural no controle da doença. Em seu estudo em 2014, Rabeta e seus colaboradores, evidenciaram, a viabilidade antiproliferativa do extrato de jambo e suas propriedades anticarcinogênicas contra a linhagem de câncer de mama humano (MCF-7) (RABETA *et al.*, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a atividade antioxidante e caracterizar e investigar a influência dos extratos de jabuticaba, jambo e jamelão sobre a linhagem de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de jabuticaba, jamelão e jambo;

- Caracterizar o perfil de antocianinas em extratos de jabuticaba, jamelão e jambo;
- Determinar a atividade antioxidante de jabuticaba, jamelão e jambo;
- Avaliar o efeito dos extratos de jabuticaba, jamelão e jambo; sobre a proliferação e viabilidade celular e células da linhagem HT-29;
- Avaliar o efeito dos extratos de jabuticaba, jamelão e jambo em função do tempo de 24 horas de incubação, da concentração, sobre a viabilidade celular de linhagem de células HT-29;
- Avaliar os efeitos dos extratos de jabuticaba, jamelão e jambo sobre o ciclo celular e apoptose em culturas de células da linhagem HT-29.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS

Para elaboração dos extratos liofilizados das cascas desidratadas de jabuticaba (JB), jamelão (JME) e jambo (JMB), as amostras de JME foram coletadas na região de Guaratiba, Rio de Janeiro, no período de fevereiro de 2013 e os frutos JMB e JB foram adquiridos no mercado varejista da cidade do Rio de Janeiro (CEASA), no período de janeiro de 2013 e novembro 2012 respectivamente. Para o preparo dos pós desidratados das cascas de JB, JME e JMB, as amostras de JMB e JME foram coletadas na região da guaratiba, Rio de Janeiro no período de janeiro e fevereiro de 2016 e as amostras de JB foram adquiridas diretamente com o produtor em uma fazenda localizada em de na região de Joaquim Egídio, Campinas – São Paulo, no período de fevereiro de 2015.

4.1.1. Secagem, desidratação e preparo dos pós das cascas desidratadas de jabuticaba, jamelão e jambo.

Para realizar o processo de secagem, as amostras foram previamente higienizadas com solução de 1% de hipoclorito e descascadas manualmente. Em seguida as cascas dos três frutos foram acondicionadas no secador de frutas desenvolvido pela Embrapa Agroindústria de Alimentos. A desidratação dos frutos ocorreu pelo processo de secagem convectiva e este processo de secagem foi conduzido a 60°C por 20h e velocidade do ar de 1m/s.

Posteriormente as cascas desidratadas foram colocadas no moinho (Laboratory mil 3600), com auxílio de uma colher previamente higienizada, para que as cascas pudessem ser reduzidas a partículas menores. Para este processo, foi utilizado a granulometria 0. Em seguida, as cascas previamente moídas foram transferidas para o Moinho de Martelo (Laboratory Mill 3100). Após o processo de moagem, pó obtido, foi transferido para uma embalagem laminado de fechamento hermético, para evitar a absorção de umidade e a exposição a luz, para que fosse garantido a conservação das amostras.

4.1.2. Preparo do extrato aquoso liofilizado dos pós das cascas desidratadas de jabuticaba, jamelão e jambo.

Para o preparo do extrato aquoso liofilizado, pesou-se 2,5g das amostras (cascas desidratadas de JB, JME, JMB) em um bécher e em seguida, foi adicionado 10 ml da solução extratora (5 ml de metanol 50 + 5 ml de acetona 70%). Após 15 minutos de repouso, a solução foi colocada no ultrassom (Brandon 2210) no período de 30 minutos. O resíduo foi coletado para duas novas extratações. A solução foi filtrada e avolumada em um balão volumétrico de vidro de 50 ml. Após a extração, os extratos foram congelados em tubos falcon de 50 ml de 50 ml no freezer - 18 graus e em seguida foram liofilizadas em um liofilizador (LIOTOP 100) por 24 horas. As amostras liofilizadas foram armazenadas no próprio tubo falcon no freezer a -18 graus.

4.2. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A análise de fenólicos totais foi realizada de acordo com o ensaio de Folin-Ciocalteu, Singleton, *et al.* (1965). As alíquotas dos extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e dos pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB (250, 500 e 1000 µL) foram pipetadas e ficaram ao abrigo da luz por duas horas e após esse período, foi realizada leitura em espectrofotômetro na absorbância de 750nm. Os resultados foram comparados com a reação do padrão ácido gálico e expresso em mg de ácido gálico (GAE)/100g de amostra.

4.3. ANÁLISE DE ANTOCIANINAS

Para a análise das antocianinas pesou-se 0,01g das amostras e foi acrescentado 10 mL da solução extratora (metanol/ácido formico 90:10 v/v). As amostras foram agitadas com

solução extratora no período de 1 minuto. Em seguida, as amostras foram colocadas em ultrassom (Brandon 2210) por 30 minutos, com posterior centrifugação na centrífuga hettich zentrifugen® com a velocidade de 3 mil rpm com duração de 10 minutos até descoloração da solução. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e transferido para um balão volumétrico de 10 ml, avolumado com a solução extratora de metanol e ácido fórmico e transferido para um ependorff o volume de 2 mL. Posteriormente realizou-se o processo de centrifugação na centrífuga hettich zentrifugen, com duração de 5 minutos com velocidade de 1400 rpm. Foi retirado a alíquota de 1 mL e realizado o processo de secagem do extrato em ar comprimido, que foi posteriormente resuspendido em 200 µL de solução injetora. A análise cromatográfica foi realizada segundo Santiago *et al.* (2010). No desenvolvimento da análise cromatográfica foi utilizado um cromatógrafo de alta eficiência Waters® Alliance 2695, detector de arranjo de fotodiodos Waters® 2996, coluna Thermo® Scientific C18 BDS (100mm x 4,6mm; 2,4µm) e modo de eluição gradiente com acetonitrila e ácido fórmico. A quantificação das antocianinas foi feita por padronização externa, a partir de padrões isolados no próprio laboratório o segundo Gouvêa *et al.* (2012).

4.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da atividade antioxidante dos extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e o pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB, foi avaliada através de quatro métodos distintos: método DPPH, método ABTS, capacidade ferri-redutora (FRAP) e a capacidade de absorção de radical de oxigênio (ORAC).

4.4.1. 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 *et al.*, (1995). O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) 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 extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e o pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB, 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. Os volumes de extrato utilizados foram de 300µl, 150µl, 60µl, 30µl no qual os dois últimos foram 60µl e 30µl com uma diluição de 100µl para 900 µl de água. A atividade antioxidante foi expressa de acordo com a equação descrita abaixo:

$$\%AA = 100 - \{[(Absamostra - Absbranco) \times 100] / Abs\ controle\}$$

4.4.2 ANÁLISE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP).

A atividade antioxidante pelo método de FRAP foi 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 consistiu em adicionar os seguintes volumes: 300µl, 150µl, 60µl, 30µl, 60µl e 30µl dos extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e dos pós das cascas desidratadas JB, JME e JMB e quantificar, em 2,7ml de reagente FRAP somado aos seguintes volumes 0 µl, 150 µl, 240 µl, 270 µl, 240 µl e 270 µl de água destilada. Após 30 min em banho maria é efetuada a leitura de absorbância a 595nm. A curva padrão foi produzida com uma solução de sulfato ferroso e os resultados. Os resultados foram expressos em µM de sulfato ferroso por grama de amostra. A curva padrão foi produzida com uma solução de sulfato ferroso com quatro diluições diferentes (500; 1000; 1500 e 2000 µM).

4.4.3. 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 por 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 absorbância de 0,70 (± 0,02) a um comprimento de onda de 734 nm. Alíquotas com três diferentes volumes das amostras dos extratos liofilizados das cascas desidratadas JB, JME e JMB e dos pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB, foram 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 foram produzidas. Os resultados foram

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

4.4.4. ENSAIO ORAC

Este ensaio avalia a atividade antioxidante através da inibição da oxidação, induzida pelo radical peroxil, por transferência de átomos de hidrogênio. Foi pesado 0,01g dos extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e dos pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e avolumadas em um balão volumétrico de 10 ml com tampão fosfato. Para a análise, 20 μL das amostras em diferentes concentrações, (concentrações de 1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 e 0,1 mg/ml) foram adicionadas nos poços com 80 μL do tampão fosfato que foram adicionados a microplaca, todos em duplicata. Em todos os poços, foi adicionado, em seguida, 120 μL da solução de fluoresceína e 60 μL de AAPH (2,2'-azinobis (2amidinopropano) dihidroclorato). A microplaca contendo as amostras, e o tampão fosfato, foram incubados por 3 horas a 37 °C. A leitura da fluoresceína foi realizada sob excitação a 485 nm e emissão a 535 nm, com um espaço de 30s entre uma leitura e outra. A partir dos dados de absorbância em relação aos tempos obtidos, foi calculada a área abaixo da curva (AUC). A atividade antioxidante do composto 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 antioxidante do composto foi calculada. Todas as análises foram feitas em duplicata e os valores foram expressos em μmoles equivalentes de Trolox/g.

4.5. CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Brasil). A cultura de células HT-29 foi realizada em frascos próprios para cultura, em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1 % de penicilina e estreptomicina (PS), 2g/L tampão HEPES, pH 7,4, sob atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C. As células quando em confluência de 70-80%, sofriam processo de tripsinização, cerca de duas vezes por semana.

Para cada experimento, as células foram semeadas em concentrações que variavam de $2,0 \times 10^5$ a $4,0 \times 10^4$ células/cm², em placas de 06 e 96 poços, durante as análises de ciclo celular, apoptose e viabilidade celular, respectivamente. Foi incluído um grupo controle para todas as amostras analisadas, sendo tratadas somente com próprio meio, isento das amostras. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6. ENSAIO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

4.6.1. Ensaio de MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio), conforme descrito por Mosmann (1983). Foram plaqueadas $2,0 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços que, 24 horas depois, foram incubadas com os extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e com os pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB em diferentes concentrações que variavam de 5 µM a 1000 µM. Após 24 h de incubação, foram adicionados 10 µL de MTT (5g/L) em cada poço. O meio foi, então, recolhido depois de 4 h de incubação e 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados, a fim de dissolver o produto gerado. Por fim, a placa foi lida em leitor de microplacas (BioRad 2550, USA) a 570nm. A taxa de inibição da proliferação celular (CPIR) foi calculada com base na fórmula: $CPIR = (1 - \text{valor médio do grupo experimental} / \text{valor médio do grupo controle}) \times 100\%$.

4.6.2. Quantificação celular: câmara de Neubauer

Para a realização dos experimentos de citotoxicidade, bem como para a manutenção das células viáveis em estoque, foi estimado o número de células viáveis com o uso do corante azul de Trypan. O fundamento desse método baseia-se na observação de que células viáveis são impermeáveis ao referido corante, ao passo que as células não viáveis apresentam permeabilidade, devido à formação de poros na membrana, o que permite a penetração do corante e assim as células não viáveis exibem coloração azul após tratamento (KONOPKA *et al*, 1996). Para a realização do ensaio, as células foram plaqueadas e após atingirem 50% de confluência, em média 24 horas após o plaqueamento, o meio foi retirado e, então, adicionou ao meio diferentes concentrações (100 µM e 1000 µM) dos pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB. Posteriormente a essa etapa, as células foram coletadas através de tripsinização

e adicionou-se à suspensão de células o corante azul de trypan na proporção 1:3, sendo contadas as células viáveis na câmara de Neubauer.

4.7. ENSAIO DE CICLO CELULAR

A análise de ciclo celular foi realizada utilizando ensaio com iodeto de propídio. As células foram ressuspensas em 500 µL de solução fria de Vindelov (VINDELOV, 1977), contendo 0,1% de Triton X-100, 0,1% de RNase e 50 µg/mL iodeto de propídio (Sigma). Após incubação por 15 minutos, a suspensão celular foi analisada para conteúdo de DNA em citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences), após a aquisição de 20000 eventos. As proporções relativas de células com conteúdo de DNA indicativo de apoptose (<2n), fase G0-G1 (2n), fase S (fase > 2n mas <4n), e fase G2/M (4n) foram adquiridos e analisados utilizando FlowJo. A percentagem de população de células em uma fase específica foi estimada com FlowJo software de análise versão 1.2.

4.8. ENSAIO DE APOPTOSE

Para avaliação de apoptose, as células em estudo foram submetidas à marcação com anexina V conjugada à FITC (BD Pharmigen, San Diego, EUA). As células foram ressuspensas em 400 µL de solução tampão do kit II de detecção de apoptose (BD Pharmigen), 5 µL de anexina V FITC e 5 µL de iodeto de propídio por 15 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences), após a aquisição de 20000 eventos e, os dados analisados em software FlowJo software de análise versão 1.2.

5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram apresentados como médias ± desvio padrão de dois experimentos independentes feitos em triplicata (n=6). 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 5.0.

6. RESULTADOS

6.1. AVALIAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS LIOFILIZADOS DAS CASCAS DESIDRATADAS DE JB, JME, JMB E DOS PÓS DAS CASCAS DESIDRATADAS DE JB, JME, JMB.

Na análise do teor de compostos fenólicos totais, observou-se que os valores maiores foram referentes às amostras de JB (Figura 10A e 10B) O valor médio apresentado pelo extrato liofilizado da casca desidratada, de JB foi de $1190 \pm 9,48$ mg em equivalente de ácido gálico/100g.

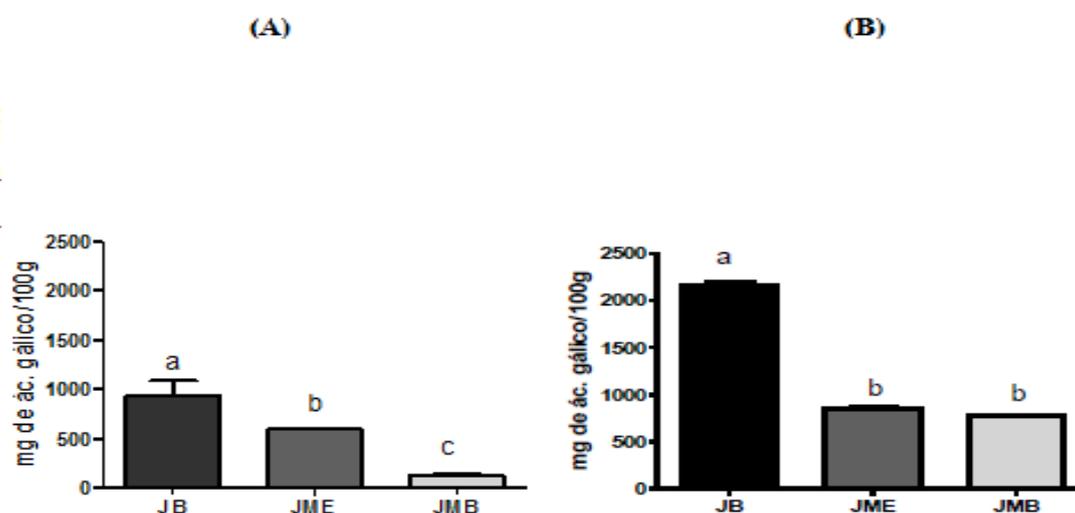


Figura 10. Compostos fenólicos totais: (A) extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME, JMB e (B) pós das cascas desidratadas de JB, JME, JMB extraídos por água. Resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

A amostra de JME, apresentou valor médio de $618,72 \pm 348$ mg em equivalente de ácido gálico/100g, enquanto que a amostra de JMB, exibiu o menor teor de compostos fenólicos com valor médio de $137,43 \pm 1,79$ mg em equivalente de ácido gálico/100g. Em relação aos pós das cascas desidratadas, a amostra de JB exibiu o valor médio de $2149,58 \pm 6,89$ mg em equivalente de ácido gálico/100g. As amostras de JME e JMB, não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$), apresentando valor médio de $852,17 \pm 17,02$ mg em equivalente de ácido gálico/100g e $775,09 \pm 6,35$ mg em equivalente de ácido gálico/100g respectivamente. Quando as duas amostras (extrato liofilizado x pó da casca desidratada),

foram comparadas entre si, observou-se que as amostras apresentaram diferença estatística significativa entre si ($p < 0,05$).

6.2. QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS NOS EXTRATOS LIOFILIZADOS DAS CASCAS DESIDRATADAS DE JB, JME, JMB E DOS PÓS DAS CASCAS DESIDRATADAS DE JB, JME, JMB.

A tabela 6 mostra o teor de antocianinas em diferentes amostras de JB, JME e JMB. Inicialmente, ao avaliar o teor de antocianinas dos extratos liofilizados das cascas desidratadas das amostras de JB, JME e JMB, constatou-se que o JME apresentou maior teor total de antocianinas (231,03 mg/100g), além de maior variedade de antocianinas presentes na sua composição, sendo a petunidina-3,5-O-diglicosídeo a antocianina com maior valor (86,90 mg/100g).

Tabela 6. – Quantificação de antocianinas nos extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e nos pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB.

Antocianinas (mg /100g)	Extrato liofilizado			Pó da casca desidratada		
	JB	JME	JMB	JB	JME	JMB
Cianidina-3,5-O diglicosídeo	-	9,75	8,46	-	11,18	11,37
Cianidina-3-O-glicosídeo	171,39	-	61,87	789,48	-	144,68
Delfinidina-3-O-diglicosídeo	9,30	-	-	13,42	206,26	-
Delfinidina-3,5-O-glicosídeo	-	51,37	-	-	-	-
Petunidina-3,5-O-diglicosídeo	-	86,9	-	-	208,26	-
Malvidina-3,5-O-diglicosídeo	-	83,01	-	-	149,50	-
Total	180,69	231,03	70,33	802,90	575,20	156,05

As amostras de JMB e JB apresentaram a cianidina-3-O-glicosídeo como a antocianina majoritária em sua composição com valores médios de, 171,39 mg/100 g e 61,87 mg/100g, respectivamente.

Ao analisar o teor de antocianinas presentes nos pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB, verificou-se que a JB apresentou o maior teor total de antocianinas, com o valor total de 802,9 mg/100g, onde a cianidina-3-O-glicosídeo exibiu o maior resultado com valor de 789,48 mg/100g, seguido do JME 575,2 mg/100g e de JMB 156,05 mg/100g. A figura 11A, 11B e 11C exibe os cromatogramas referentes à análise de quantificação de antocianinas dos frutos da família myrtaceae. Tanto o extratos liofilizados das cascas desidratadas e os pós

das cascas desidratadas, apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, alterando apenas a concentração das antocianinas (Anexo I).

6.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS LIOFILIZADOS DAS CASCAS DESIDRATADAS DE JB, JME E JMB E DO PÓS DAS CASCAS DESIDRATADAS DE JB, JME E JMB.

A atividade antioxidante dos extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e dos pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB foi avaliada por quatro diferentes métodos (DPPH, ORAC, FRAP e ABTS).

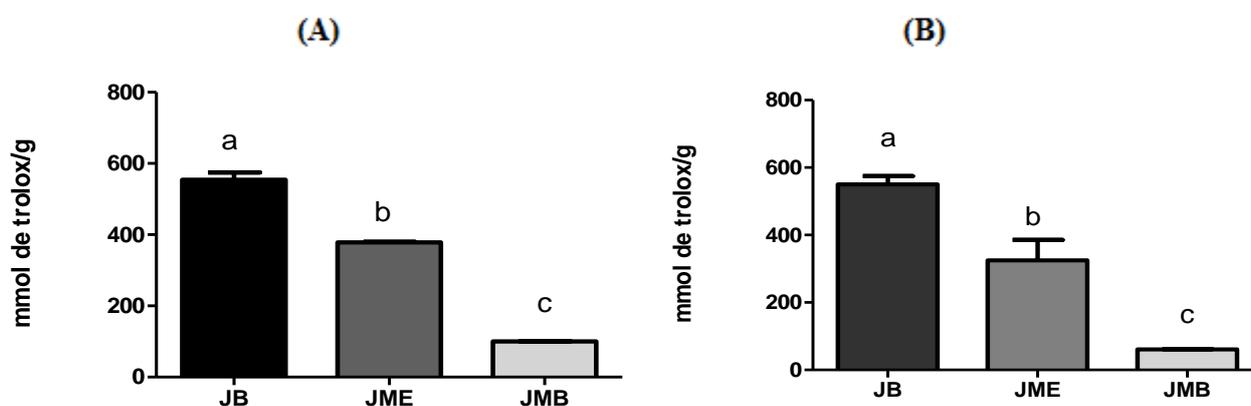


Figura 12. Atividade Antioxidante pelo método de DPPH (A) extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e (B) pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB, extraídos por água. Resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($*p < 0,05$).

Pelo método DPPH, a atividade antioxidante das frutas da família myrtaeace em ambos os extratos produzidos (liofilizado e pó da casca desidratada), revelaram que a JB apresentou maior teor de redução do radical DPPH. No extrato liofilizado, o valor médio de redução do DPPH da amostra de JB foi de $554 \pm 2,68 \mu\text{mol trolox/g}$, seguido do JME $378 \pm 1,07 \mu\text{mol trolox/g}$ e JMB $100 \pm 1,43 \mu\text{mol trolox/g}$ (Figura 12A). Já em relação ao pó da casca desidratada, os resultados evidenciaram que a JB apresentou redução do radical DPPH com valor médio de $576 \pm 3,66 \mu\text{mol trolox/g}$, seguido do JME $382 \pm 4,33 \mu\text{mol trolox/g}$ e JMB $161 \pm 0,22 \mu\text{mol trolox/g}$. Não houve diferença significativa entre as amostras analisadas (extrato liofilizado e pó da casca desidratada).

Ao avaliar a atividade antioxidante pelo método de FRAP constatou-se que novamente, a amostra de JB apresentou maior atividade antioxidante em relação as amostras do extrato liofilizado das cascas desidratadas e apresentou a atividade antioxidante com valor médio de $338,14 \pm 3,77 \mu\text{mol}$ de sulfato ferroso/ g, seguido do JME com valor médio de $154,74 \pm 9,85 \mu\text{mol}$ e JMB $119,03 \pm 4,49 \mu\text{mol}$ de sulfato ferroso/ g.

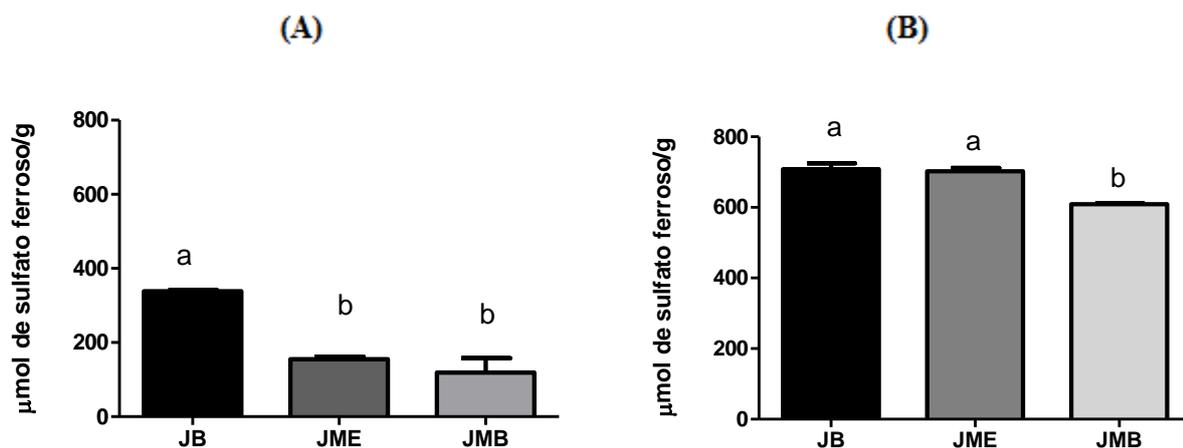


Figura 13. Atividade Antioxidante pelo método de FRAP (A) extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e (B) pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB, extraídos por água. As análises foram realizadas em triplicata. Resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($*p < 0,05$).

As amostras dos pós das cascas desidratadas de JB e JME, não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), com valor médio de $688,42 \pm 7,61 \mu\text{mol}$ de sulfato ferroso/ g e $702,42 \pm 9,04 \mu\text{mol}$ de sulfato ferroso/ g, respectivamente. O JMB apresentou valor médio de $610 \pm 3,09 \mu\text{mol}$ de sulfato ferroso/ g. Ao comparar as amostras entre si (extrato liofilizado e os pó da casca desidratada), verificou-se que existe diferença significativa entre elas ($p > 0,05$).

Os resultados observados pelo método ABTS (Figura 14A), nos extratos liofilizados das cascas desidratadas, ressaltaram uma maior atividade antioxidante no extrato de JME pela maior captura do radical ABTS, com valor médio de $1465 \pm 6,8 \mu\text{mol}$ trolox/g, seguido da JB com valores médios de $934 \pm 0,5 \mu\text{mol}$ trolox/g.

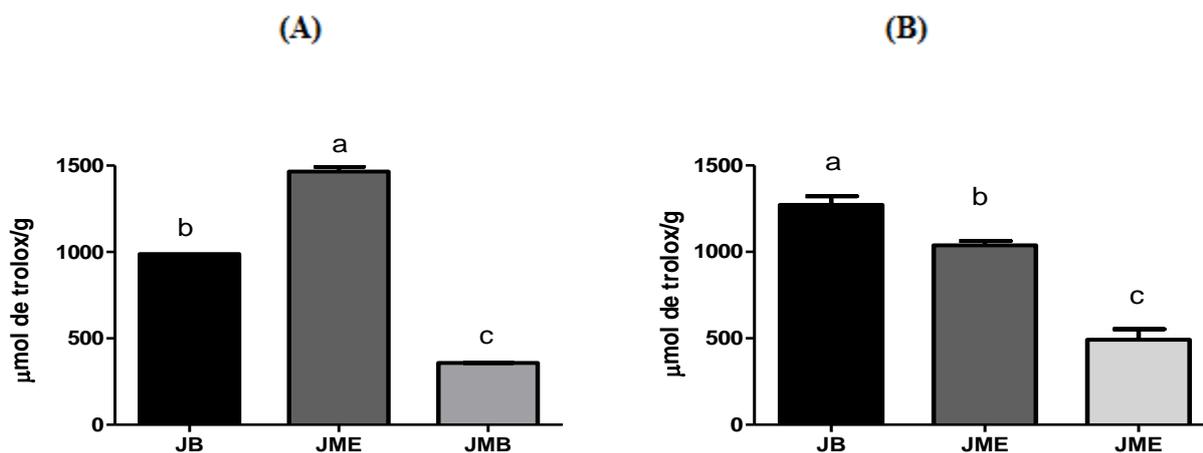


Figura 14. Atividade Antioxidante pelo método de ABTS. (A) extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e (B) pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB, extraídos por água. As análises foram realizadas em triplicata. Resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($*p < 0,05$).

A amostra de JMB apresentou menor atividade antioxidante com valor médio de $374 \pm 0,7$ µmol trolox/g. O pó desidratado da casca de JB, apresentou o maior valor da captura do radical ABTS, com valor médio de $1438,56 \pm 3,55$ µmol de trolox/g, seguido do JME com o valor médio de $1038,50 \pm 7,22$ µmol de trolox/g e JMB com valor médio de $492,02 \pm 7,19$ µmol de trolox/g. Ao realizar a comparação das amostras entre si (extrato liofilizado e os pó da casca desidratada), verificou-se que existe diferença significativa entre elas ($p > 0,05$).

A determinação da atividade antioxidante pelo método de ORAC identificou que a JB foi à amostra com a maior atividade antioxidante em ambas as amostras, corroborando com os resultados encontrados na análise de DPPH. O extrato liofilizado da casca desidratada de JB, exibiu o valor médio de $552,15 \pm 9,04$ µmol ET/g, seguido do JME, com valor médio de $252,88 \pm 3,66$.

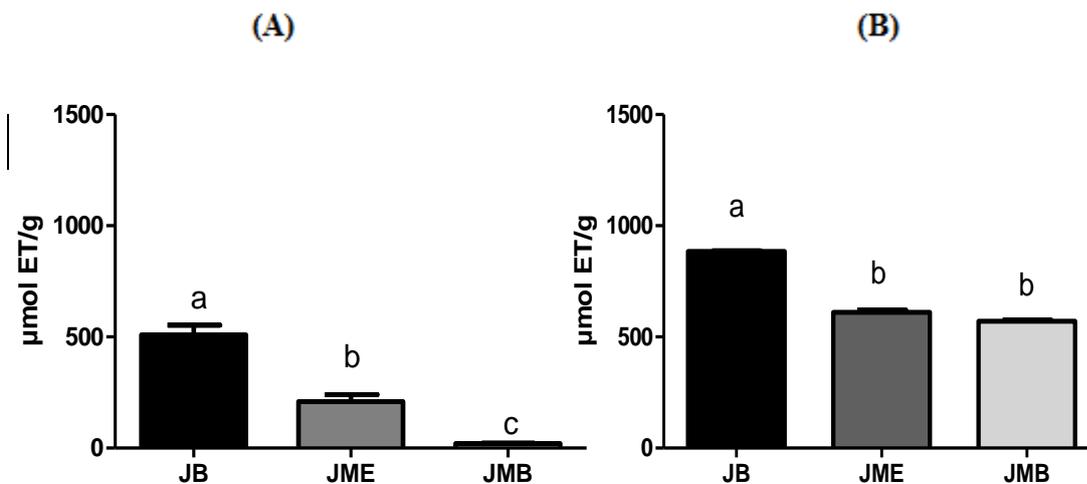


Figura 15. Atividade Antioxidante pelo método de ORAC. (A) extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB e (B) pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB, extraídos por água. As análises foram realizadas em triplicata. Resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($*p < 0,05$).

A amostra de JMB apresentou o valor médio de $158,37 \pm 24,45$ $\mu\text{mol ET/g}$. A amostra da casca desidratada de JB, apresentou o valor médio de $883,34 \pm 4,96$ $\mu\text{mol ET/g}$, já o JME exibiu o valor médio de $610,23 \pm 4,80$ $\mu\text{mol ET/g}$, seguido do JMB com valor médio de $570,18 \pm 7,20$ $\mu\text{mol ET/g}$. Ao comparar as amostras entre si (extrato liofilizado e os pó da casca desidratada), verificou-se que existe diferença significativa entre elas ($p > 0,05$).

6.4. VIABILIDADE CELULAR E PROLIFERAÇÃO CELULAR

6.4.1. Ensaio de MTT

Para análise de viabilidade celular, as células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) foram incubadas com concentrações de 5 μM a 1000 μM com as amostras de JB, JME e JMB do extrato liofilizado e do pó da casca desidratadas de JB, JME e JMB e analisadas 24 h depois do início da incubação.

Foi possível notar o efeito inibitório das amostras de JB, em relação à viabilidade celular a partir da concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 16A e 16B) após 24 horas de tratamento. O extrato liofilizado da casca desidratada de JB exibiu redução máxima de 45,86 % na

concentração 1000 μ g/ mL com diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparadas ao controle. Em relação ao pó da casca desidratada de JB, após 24 horas de incubação, constatou-se que as doses utilizadas foram capazes de promover uma redução máxima de 57,77% nas concentrações de 1000 μ g/mL, quando comparadas ao controle, com diferença significativa ($p < 0,01$).

No extrato liofilizado da casca desidratada de JME, foi possível observar que a concentração inicial de 5 μ g/mL não modificou o perfil de células viáveis quando comparados ao controle. O extrato de JME exibiu uma redução máxima de 24,17% de viabilidade, na concentração 1000 μ g/mL quando comparado ao grupo de células não tratadas (controle), com diferença significativa de $p < 0,01$ (Figura 16C). Para as células incubadas com o pó da casca desidratada de JME, a maior concentração (1000 μ g/mL) foi capaz de promover uma redução de 30 % no percentual de células viáveis, com diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle (Figura 16D).

Quando as células da linhagem HT-29 foram incubadas com o extrato liofilizado da casca desidratada de JMB, alteraram o perfil de crescimento das células viáveis quando comparado ao controle em 16,08% na concentração máxima de 1000 μ g/mL, não apresentando diferença estatística em relação ao controle (Figura 16E). Já as células da linhagem HT-29, que foram incubadas com o pó da casca desidratada de JMB, foi observada uma redução significativa do percentual de células viáveis, com média de 37,57% na concentração 1000 μ g/mL, com diferença significativa de $p < 0,05$ em relação ao controle (Figura 16F). Ao comparar as amostras entre si (extrato liofilizado e os pó da casca desidratada), verificou-se que existe diferença significativa entre elas ($p > 0,05$).

A fim de verificar as amostras que apresentaram um maior percentual de inibição no presente estudo, foi realizado um *screening* a partir da viabilidade apresentada nos resultados acima. Desta forma, as análises a seguir foram realizadas apenas com as amostras referentes aos pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB, já que estas apresentaram um maior potencial antitumoral e se mostraram mais eficazes no controle da proliferação de células tumorais.

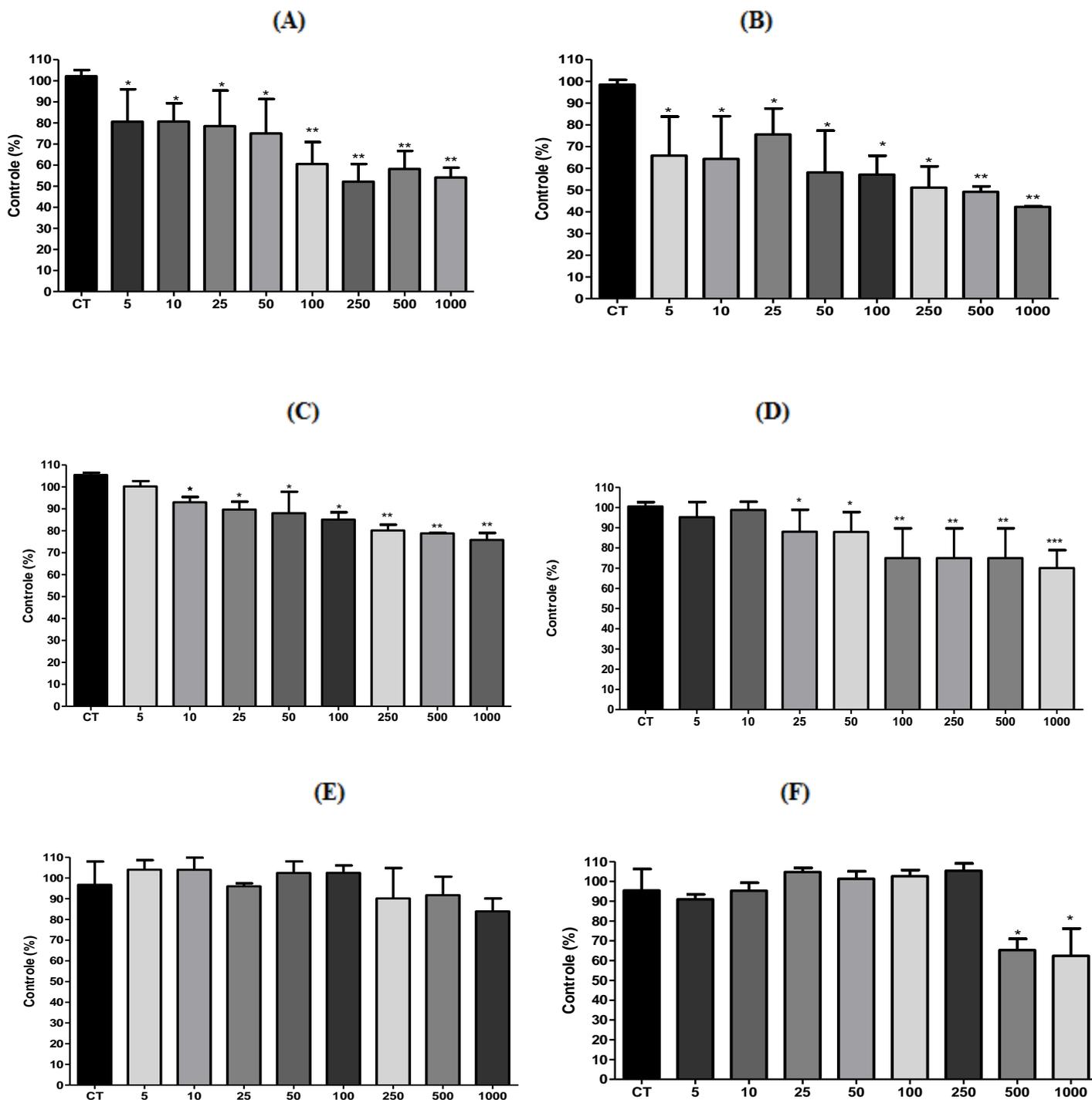


Figura 16. Efeito do (A) extrato liofilizado da casca desidratada de JB (B) pó da casca desidratada de JB, (C) extrato liofilizado da casca desidratada de JME (D) pó da casca desidratada de JME (E) extrato liofilizado da casca desidratada de JMB (F) pó da casca desidratada de JMB sobre a viabilidade celular da linhagem, HT-29 após 24 horas de tratamento. Foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

6.4.2. Quantificação celular: câmara de Neubauer

Para análise de quantificação celular pela câmara de Neubauer, a fim de avaliar o potencial inibitório do pó da casca desidratada de JB, JME e JMB, as células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) foram incubadas com concentrações de 100 μM e 1000 μM do pó da casca desidratada de JB, JME e JMB. As concentrações utilizadas foram estabelecidas a partir das concentrações no ensaio de MTT que apresentaram redução da viabilidade celular quando comparadas ao controle. Para este ensaio, os dados foram analisados 24 h após o início da incubação (Figura 17).

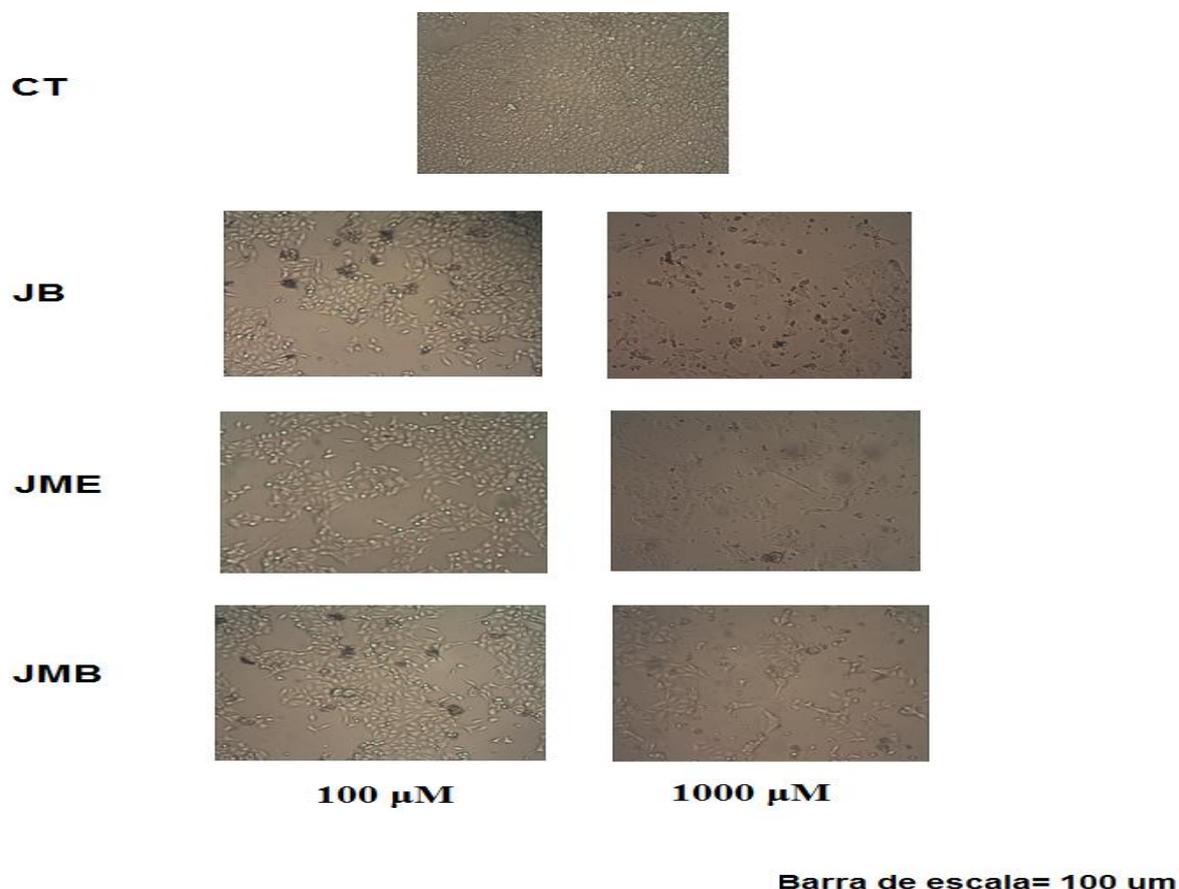


Figura 17. Efeito do pó da casca desidratada de JB, JME e JMB na quantificação de células (HT- 29), 24 horas após a incubação. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as incubadas nas concentrações (100 μM e 1000 μM).

As células tratadas com os pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB, apresentaram percentual de redução da viabilidade celular na concentração de 100 μM com diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparados a células controle. Na concentração de 1000 μM as células tratadas com JB apresentaram o maior percentual de inibição (Figura 18).

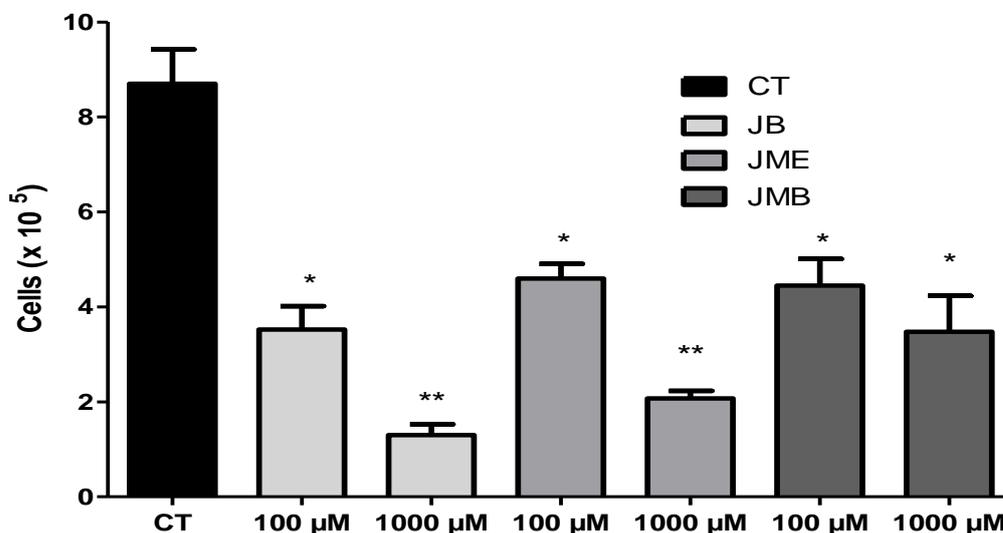


Figura 18. Efeitos pó da casca desidratada de JB , JME e JMB sobre a viabilidade celular da linhagem HT-29 após 24 horas de tratamento. Células HT-29 visualizadas em microscópico não tratadas (CT) e após tratamento com duas concentrações (100 μM e 1000 μM).

6.5. EFEITO DO PÓ DA CASCA DESIDRATADA DE JB, JME E JMB SOBRE A PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR.

Com o objetivo de avaliar a influência do pó da casca desidratada de JB, JME E JMB as células em estudo foram incubadas com concentrações de 500 μM e 1000 μM de cada amostra, já que estas concentrações apresentaram um maior percentual de redução na análise de MTT. Após 24 horas as células em estudo foram analisadas nas diferentes fases do ciclo celular.

Foi observado que a linhagem HT-29, quando incubadas com o JB, apresentou um aumento no percentual de células na fase G0/G1 na concentração de 1000 μM ($p < 0,05$), seguido por um aumento no percentual de células na fase S em ambas concentrações (Figura 19) mostrando diferença significativa na concentração de 500 μM, quando comparadas ao grupo controle. Foi possível observar também uma diminuição no percentual de células presentes na fase G2/M, 24 h após a incubação de ambas concentrações com JB ($p < 0,05$). A concentração de 500 μM de JB promoveu ainda aumento do percentual de células na fase S ($p < 0,05$), indicando assim efeito dose-dependente.

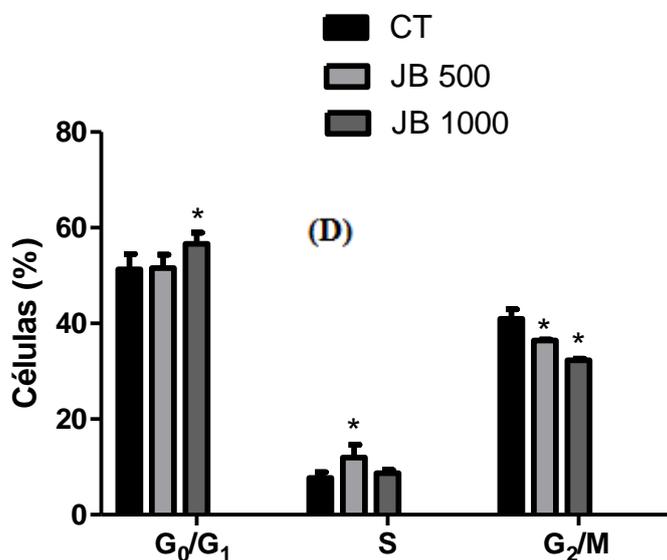
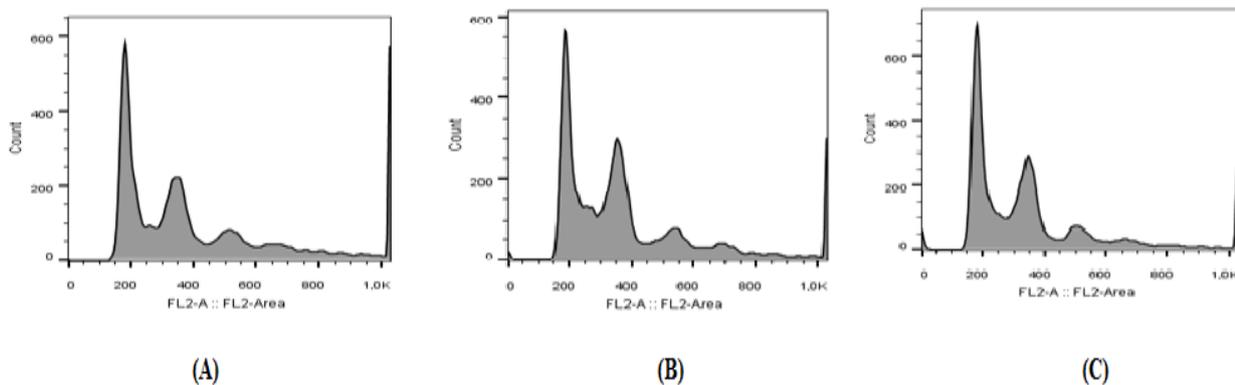


Figura 19. Efeito do pó da casca desidratada de JB sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 24 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em A (CT), B (500 μ M) e C (1000 μ M). Os resultados quantitativos do efeito do pó da casca desidratada de JB sobre esta linhagem celular estão ilustrados no gráfico (D). Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas (500 μ M e 1000 μ M) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$).

Quando as células de HT-29 foram tratadas com JME, com a concentração de 500 μ M, foi possível verificar que não houve alteração do percentual de células na fase G₀/G₁ quando comparadas ao controle. Já a concentração de 1000 μ M mostrou um aumento no percentual de células na fase G₀/G₁. Na fase S, ambas concentrações apresentaram um aumento no percentual de células na fase S, apresentando diferença significativa quando comparadas ao grupo de células não tratadas (controle) (* $p < 0,05$) (Figura 20). Foi possível observar também

uma redução no percentual de células presentes na fase G₂/M. em ambas concentrações, com diferença significativa, quando comparadas ao grupo controle (p <0,05).

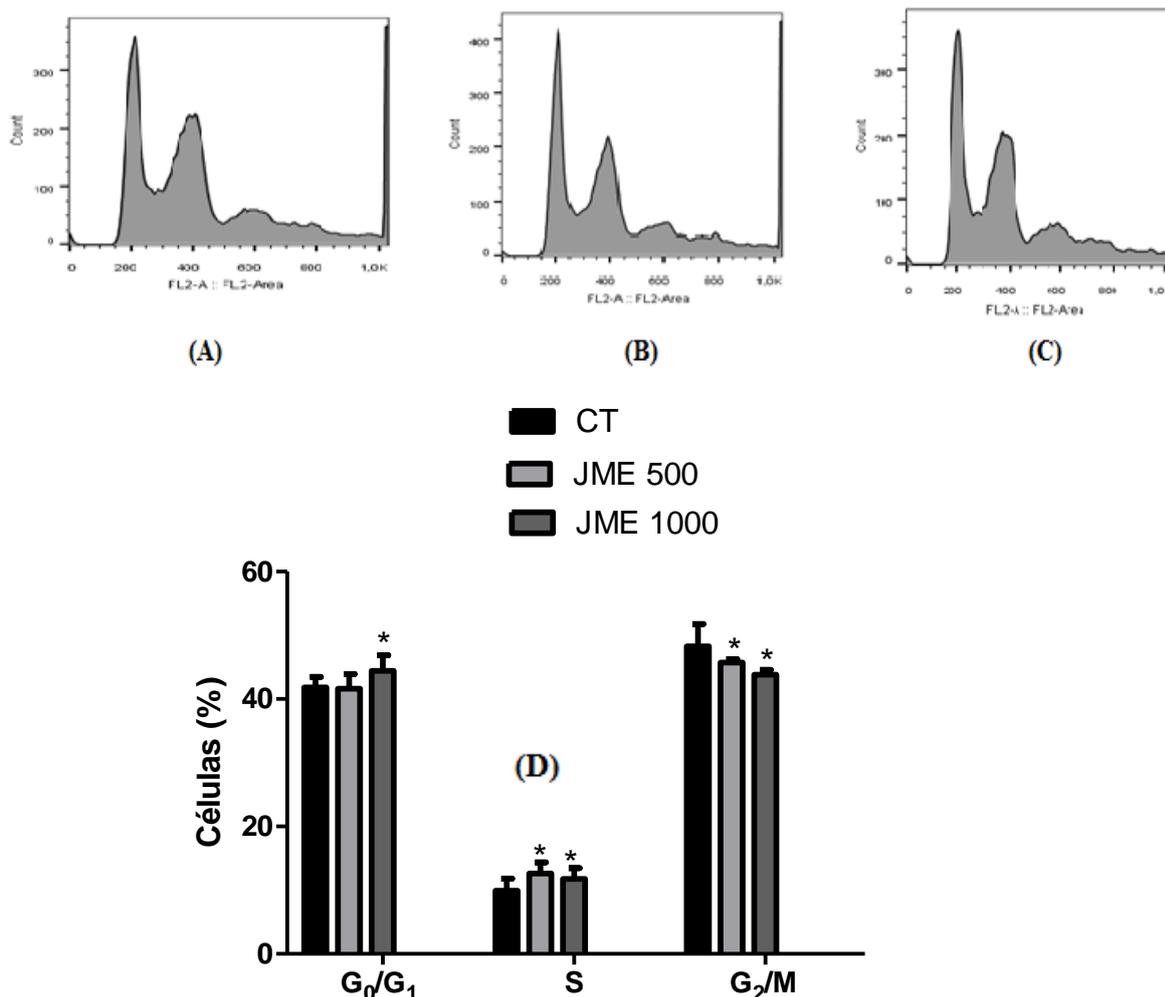


Figura 20. Efeito do pó da casca desidratada de JME sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 24 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em A (CT), B (500 μ M) e C (1000 μ M). Os resultados quantitativos do efeito do pó da casca desidratada de JME sobre esta linhagem celular estão ilustrados no gráfico (D). Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas (500 μ M e 1000 μ M) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (*p <0,05).

Após incubar as células de HT-29 com JMB, nas concentrações de 500 μ M e 1000 μ M, foi possível verificar um aumento no percentual de células na fase G₀/G₁. Em relação a fase S, a concentração de 500 μ M, não apresentou alteração no percentual de células em relação ao grupo controle. Já a concentração de 1000 μ M mostrou uma diminuição no percentual de células na fase S (Figura 21) apresentando diferença significativa entre a concentração utilizada, quando comparadas as células não tratadas (controle). Foi possível observar também uma redução no percentual de células presentes na fase G₂/M, em ambas

concentrações, 24 h após a incubação. Onde as células que foram tratadas com JMB, com a concentração de 1000 μM , apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle (* $p < 0,05$).

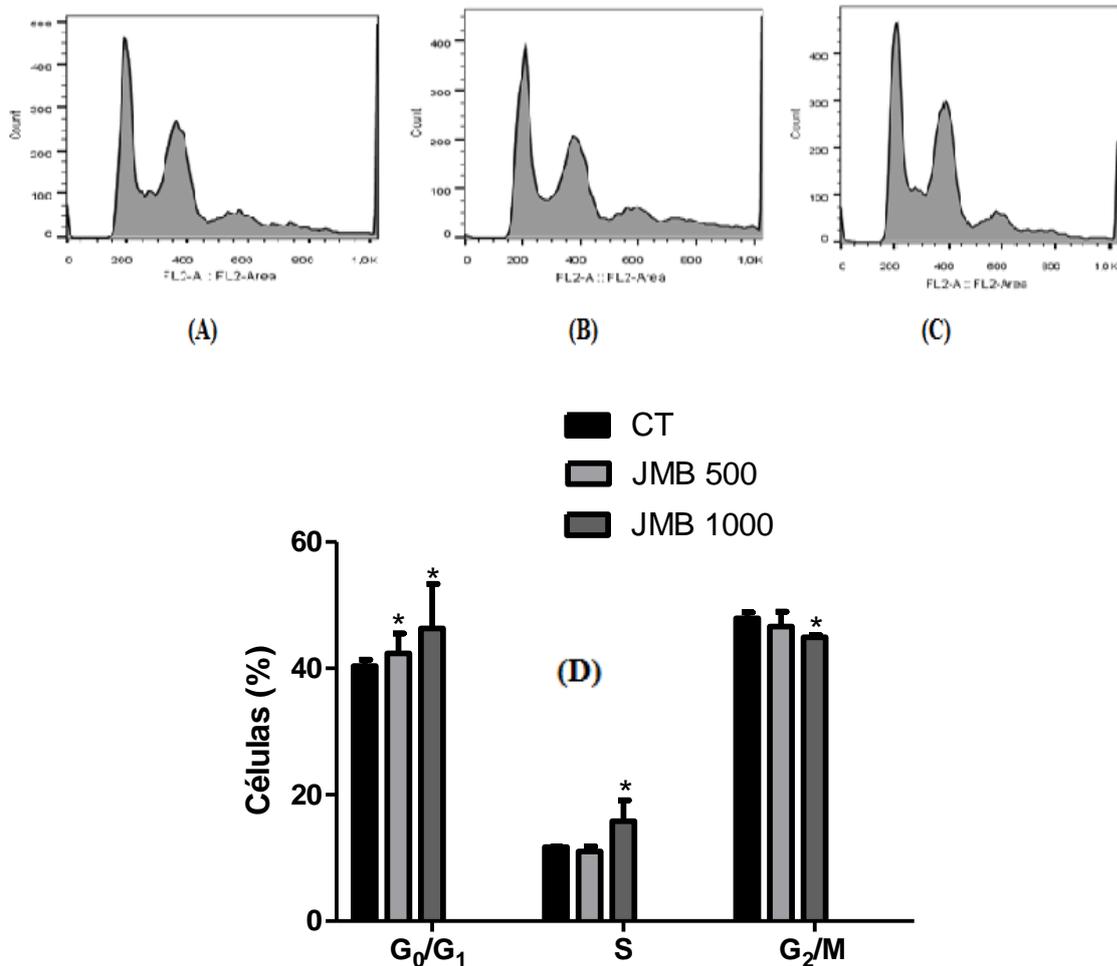


Figura 21. Efeito do pó da casca desidratada de JMB sobre a progressão do ciclo celular em células HT-29 24 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em A (CT), B (500 μM) e C (1000 μM). Os resultados quantitativos do efeito do pó da casca desidratada de JMB sobre esta linhagem celular estão ilustrados no gráfico (D). Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas (500 μM e 1000 μM) foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$).

6.6. EFEITO DO PÓ DA CASCA DESIDRATADA DE JB, JME E JMB SOBRE A TAXA DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO (HT-29).

O processo de apoptose é fundamental para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, e consiste na via de morte celular para eliminar células defeituosas através da ativação de enzimas que degradam o DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas. A quantificação do número de células em processo apoptótico pode ser uma medida útil para avaliar a cinética de células cancerosas. A alteração do equilíbrio entre proliferação celular e morte por apoptose tem sido associado à tumorigênese. Neste ensaio, as células em estudo foram incubadas com pó da casca desidratada de JB, JME e JMB, nas concentrações (500 μM (Figura 22).

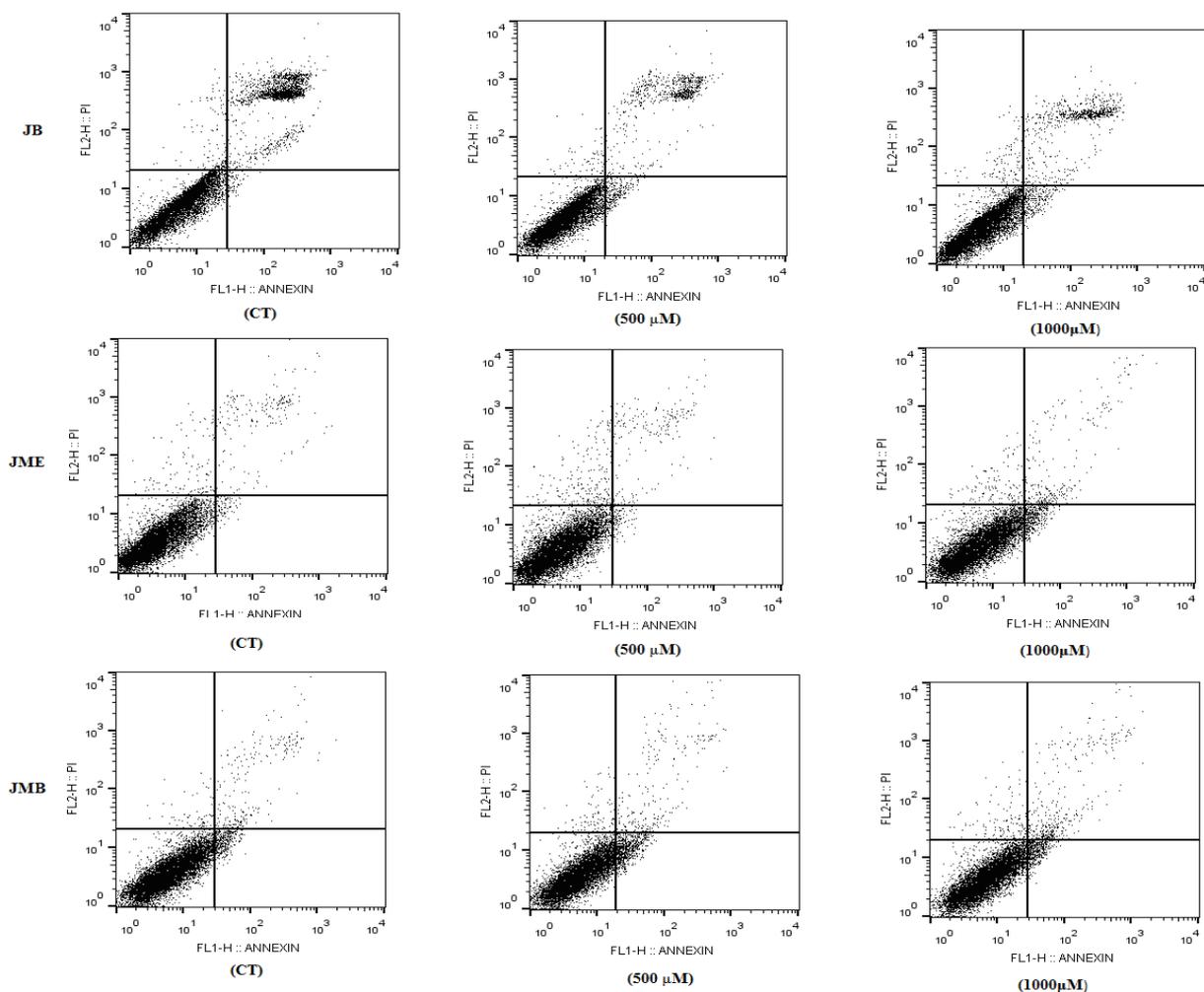


Figura 22. Efeito pó da casca desidratada de JB, JME e JMB, sobre o processo de morte programada em células HT-29 24 h após a incubação. As análises por citometria de fluxo do grupo controle estão ilustrada em JB , JME e JMB com as concentrações 500 μM e 1000 μM .

Após a incubação com JB, nas concentrações de 500 μ M e 1000 μ M, foi possível observar que em ambas as concentrações apresentaram uma diminuição no percentual de células viáveis e mostraram um aumento significativo no percentual de células em apoptose inicial e uma redução no percentual de células em apoptose tardia, quando comparada as células não tratadas (controle). ($p < 0,05$). O percentual de células não-apoptóticas sofreu uma redução significativa após incubação com JAB em ambas as concentrações quando comparadas ao controle ($p < 0,05$).

Ao ser incubada com 500 μ M e 1000 μ M de JME, a linhagem celular HT-29 apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no percentual de células viáveis, quando comparadas as células do grupo controle. Na concentração de 1000 μ M houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de células em apoptose inicial e uma diminuição no percentual de células em apoptose tardia, quando comparadas as células não tratadas (controle) e um aumento de células não apoptóticas. Quando incubadas com 500 μ M de JME, as células apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de células em apoptose tardia e uma redução no percentual de células não apoptóticas e em apoptose inicial (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito do pó da casca desidratada de JB, JME, JMB (100 μ M e 1000 μ M) sobre o processo de morte celular por apoptose nas células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) 24 h após a incubação. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey. Letras diferentes na mesma coluna se diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

		Células viáveis (Anexina V-PI-)	Células não apoptóticas (Anexina V-PI+)	Apoptose inicial (Anexina V+PI-)	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)
JB	CT	91,85 \pm 2,19 ^a	4,04 \pm 1,086 ^a	2,51 5 \pm 0,78 ^a	3,57 \pm 0,85 ^a
	500 μ M	89,52 \pm 0,47 ^a	2,62 \pm 0,01 ^b	6,88 \pm 0,10 ^b	0,61 \pm 0,09 ^c
	1000 μ M	90,9 \pm 3,00 ^a	1,77 \pm 1,145 ^c	5,25 \pm 2,72 ^c	1,03 \pm 0,13 ^b
JME	CT	94,55 \pm 0,75 ^a	2,89 \pm 1,01 ^b	2,31 \pm 0,31 ^b	0,74 \pm 0,11 ^c
	500 μ M	92,8 \pm 2,00 ^b	1,84 \pm 0,66 ^a	2,27 \pm 0,23 ^b	3,08 \pm 1,09 ^a
	1000 μ M	91,00 \pm 0,80 ^b	5,45 \pm 1,01 ^a	2,58 \pm 0,22 ^a	0,98 \pm 0,40 ^b
JMB	CT	95,05 \pm 1,25 ^a	2,34 \pm 1,56 ^b	2,30 \pm 0,32 ^b	0,92 \pm 0,29 ^b
	500 μ M	89,60 \pm 0,6 ^b	6,60 \pm 1,01 ^a	3,00 \pm 0,40 ^a	0,82 \pm 0,05 ^c
	1000 μ M	91,95 \pm 0,95 ^b	3,97 \pm 0,97 ^b	2,80 \pm 0,86 ^a	1,27 \pm 0,11 ^a

Vinte e quatro horas após a incubação com JMB, verificou-se que em ambas concentrações, apresentaram uma redução significativa no percentual de células viáveis. ($p < 0,05$). Contudo, a concentração 500 μM , exibiu uma redução significativa no percentual de células em apoptose (inicial e tardia) e um aumento significativo no percentual de células não apoptóticas, quando comparadas ao controle ($p < 0,05$). Já a concentração de 1000 μM apresentou um aumento significativo no percentual de células em apoptose (inicial e tardia) e de células não apoptóticas, quando comparadas as células não tratadas (controle), ($p < 0,05$).

7. DISCUSSÃO

O presente trabalho forneceu diversos dados que apontam o papel dos extratos ricos em antocianinas obtidos a partir das frutas da família myrtaceae na redução do risco de desenvolvimento do câncer de colón e reto. A literatura científica associa extratos de frutas da família Myrtaceae ricos em antocianinas e seu importante papel na prevenção e no tratamento de doenças crônicas, como câncer (FRAUCHES *et al.*, 2016; AQIL *et al.*, 2012; LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012; REYNERTSON *et al.*, 2006). Esse papel pode ser atribuído a atividade antioxidante que reduz os níveis de ROS em mamíferos e, assim, evitar danos no DNA e mutações que impedem o início da progressão tumoral (HOGAN *et al.*, 2010 ; ZHANG *et al.*, 2008).

As primeiras análises realizadas neste trabalho são referentes ao teor de compostos fenólicos totais. Em ambas as amostras de JB, JME e JMB, (extrato liofilizado e pó da casca desidratada), foram extraídas com água. Segundo SHELEMBE *et al.* (2014), a maior parte dos compostos fenólicos possuem características polares, sendo, portanto, compatíveis com o extrator aquoso. Em um estudo feito por Rocha, *et al.* (2011), com as frutas uturubá e mangaba obteve-se os valores médios de 25,19 e 40,79 mg de ácido gálico/100g, respectivamente. Desta forma, os dados obtidos neste trabalho, demonstram que as frutas analisadas apresentam um maior potencial bioativo em todas as amostras de JB, JME e JMB. Reynertson *et al.* (2008) encontraram em seu estudo ao avaliar extrato de jabuticaba, encontraram o valor de 31.6 mg GAE/ 100g. Outro estudo feito com a fruta jamelão por Araújo (2014) mostrou valores médios de 102,9 mg equivalente de ácido gálico/100g. Já Brito *et al.* (2011), exibiu valor médio de 154,29 mg equivalente de ácido gálico/100g, ao avaliar a casca de jambo, indicando que os valores de compostos fenólicos totais encontrados nas frutas analisadas, são superiores a outras frutas descritas na literatura, com exceção do JMB.

Ao quantificar o teor de antocianinas, constatou-se que a casca de jabuticaba, o jamelão e o jambo são ricas em antocianinas, uma vez que são considerados frutos ricos em antocianinas aqueles que apresentam mais do que 2 mg de antocianinas g-1 do fruto (MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990). Portanto, sob esse aspecto, todos estes frutos vêm despertando a atenção de produtores e consumidores em função dos benefícios que proporcionam ao organismo, devido à presença de elevado teor de compostos fenólicos com poder antioxidante (LAGO *et al.*, 2006).

A quantificação média do valor total de antocianinas mostrada por Terci (2004), foi de 314 mg/100g de casca para jabuticaba e de 386 mg/100g de casca para o jamelão respectivamente. Augusta *et al.* (2010), encontraram o valor médio na casca de jambo 300,54 mg/100g de casca. Ao comparar o teor de antocianinas com outras frutas deste estudo, com outros estudos presentes na literatura, verificamos que o estudo de Terci em 2004, exibiu o valor médio de antocianinas totais de 227 mg/100g em amostras de casca de uva (TERCI, 2004) e 263 mg/100g de casca para o açaí (BOBBIO *et al.*, 2000). Estes valores foram inferiores aos valores que foram exibidos neste trabalho em relação aos extratos liofilizados das cascas desidratadas de JB, JME e JMB. Já as amostras referentes ao pó da casca desidratada, JB e JME se mostraram superiores quando comparadas aos outros resultados presente na literatura, exceto a amostra do pó da casca desidratada de JMB.

Existe uma grande dificuldade de comparação entre dados experimentais referentes à atividade antioxidante, aferida por diferentes métodos, já que as metodologias para análise da atividade antioxidante baseiam-se em diferentes fundamentos. Soma-se a isto, ainda, a complexidade das reações envolvidas na atividade antioxidante. Portanto, é recomendada a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio utilizado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (HUANG, & PRIOR, 2005).

Neste estudo, a atividade antioxidante das diferentes amostras de JB, JME e JMB foram analisadas por quatro diferentes métodos (DPPH, FRAP, ORAC e ABTS). Foi possível observar em neste trabalho, que as amostras de JB e JME (extrato liofilizado e do pó da casca desidratada) apresentaram maior atividade antioxidante em relação às amostras de JMB. Os resultados encontrados para análise de DPPH, para as amostras de JB, se mostraram superiores ao exibido no estudo de Leite-Legatti *et al.*(2012), que apresentaram o valor médio de 45,35 $\mu\text{mol trolox/g}$ e por Reynertson *et al.* (2008), que mostrou valor médio de 19.4 $\mu\text{mol trolox/g}$. Rufino *et al.* (2010), apresentou valor de 1472 $\mu\text{mol trolox/g}$, se mostrando superior ao deste trabalho (LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012; REYNERTSON *et al.*, 2008; RUFINO *et al.* 2010) As amostras de JME apresentaram maior atividade antioxidante quando compradas aos estudos de Souza *et al.* (2015), que encontraram o valor de 5,67 $\mu\text{mol trolox/g}$, de Luzia *et al.* (2009), de 118,66 $\mu\text{mol trolox/g}$ (SOUZA *et al.*, 2015; LUZIA *et al.*, 2009). Ao comparar os resultados obtidos das amostras de JMB com o trabalho de Arumugam *et al.* (2014), que obteve o resultado de 16.65 $\mu\text{mol trolox/g}$ e Augusta *et al.* (2013), de 22,64 μmol

trolox/g em suas análises, consta-se que as amostras deste trabalho apresentaram valores superiores (ARUMUGAM *et al.* 2014; AUGUSTA *et al.*, 2013).

Ao avaliar a atividade antioxidante pelo método de FRAP, Leite-Legatti *et al.* (2012), exibiram o valor de 87,9 μmol de sulfato ferroso/ g para extrato de jabuticaba. Em estudo feito por Palha *et al.* (2013), na determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro com dois cultivares de morango, constatou-se valores de redução de 93,42 μmol de sulfato ferroso/ g e 199,72 μmol de sulfato ferroso/ g. Cazarin *et al.* (2014), em seu estudo feito com maracujá obteve o valor médio de 36,56 μmol de sulfato ferroso/ g (LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012; PALHA *et al.*, 2013; CAZARIN *et al.*, 2014).

Rufino *et al.* (2010), encontraram valores de ABTS de 317 μmol trolox/g. para jabuticaba e 125 μmol trolox/g para jamelão. Kuskoski *et al.* (2006), com as frutas manga, maracujá, polpa de uva e polpa de amora, obteve os seguintes valores $12,9 \pm 0,2$, $0,9 \pm 0,2$, $7,0 \pm 0,3$ e $4,3 \pm 0,2$ μmol trolox/g, respectivamente. Em outro estudo realizado por Soares *et al.* (2008), com casca de uva foi encontrado os valores médios de $17,10 \pm 1,24$ μmol trolox/g para fruta fresca e $89,22 \pm 6,46$ μmol trolox/g para fruta seca, indicando que estes valores, são inferiores aos encontrados no presente estudo (RUFINO *et al.*, 2010; KUSKOSKI *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2008).

Pode-se observar nos dados presentes neste estudo, que as amostras de JB e JMB apresentaram elevada atividade antioxidante em relação ao método de ORAC. Leite-Legatti *et al.* (2012), encontraram o valor médio de $25,514.24 \pm 303$ μmol ET/g para extrato liofilizado de jabuticaba. Enquanto Souza *et al.* (2015), mostrou o valor médio de $112,31 \pm 12,56$ μmol ET/g para o jamelão. Alguns estudos presente na literatura que avaliaram outras frutas pelo método de ORAC mostraram valores inferiores aos encontrados neste estudo para as amostras de JB, JMB e JME. Dentre as frutas avaliadas, encontravam-se a amora preta (88,575 μM de ET/g), framboesa (37,9875 μM de ET/g), o morango (32,265 μM de ET/g) (USDA, 2007) e utilizada para produção de vinho tinto (22,94 μM de ET/g) (USDA, 2007; LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012; SALES *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2015).

As diferenças observadas em relação à atividade antioxidante das amostras das frutas da família myrtaceae e os diferentes métodos utilizados podem ser atribuídas à composição química de cada fruta, além das características/especificidades de cada método (DÁVALOS *et al.*, 2004).

Nesse sentido, os valores expostos por este trabalho foram superiores para as amostras de JB e JME, em relação aos encontrados na literatura indicando alto potencial bioativo,

comprovada por todos os métodos antioxidantes analisados, pela quantidade de compostos fenólicos encontrada e principalmente pela concentração de cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo.

No presente trabalho, o efeito antiproliferativo das amostras de JB, JME e JMB sobre a viabilidade de células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) foi investigada. De acordo com resultados obtidos pelo ensaio de MTT, foi observada uma inibição na viabilidade celular a partir das menores doses de (5 µg/mL), com 24 horas de tratamento. O presente estudo, também avaliou a viabilidade usando o azul de trypan, e foi possível observar que as amostras do pó da casca desidratado de JB, JME e JMB apresentaram potencial inibitório com 24 horas de tratamento na linhagem HT-29.

Reyneston *et al.* (2006), mostraram um composto jabuticabin, formado a partir da condensação do grupo carboxil dos compostos fenolicos, extraído de *M. cauliflora*. Este composto, apresentou efeitos anti-proliferativos contra HT-29 (IC₅₀ = 65 µM) e HCT116 (IC₅₀ = 30 µM) linhas de cólon (REYNESTON *et al.*, 2006). Um estudo de 2012 analisou a ação anti-proliferativa de jabuticaba em 11 linhagens tumorais diferentes e concluiu que a fração polar do extrato de cascas teve maior atividade em células leucêmicas, e a fração apolar teve maior ação em células PC-3 de câncer de próstata (LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012). Wang *et al.* (2014) , avaliaram o efeito do extrato aquoso de diferentes partes da jabuticaba na linhagem celular de câncer oral (HSC-3). Os extratos de aquosos da semente de jabuticaba exibiram importantes efeitos anti-proliferativos, com o valor de IC₅₀ de 15 µg/mL (WANG *et al.* (2014).

Em relação ao JME, Aqil *et al.* (2012), relataram a inibição da proliferação celular em extratos de jamelão sobre a linhagem humana de câncer de pulmão (A549). O extrato hidrolisado da polpa de jamelão apresentou forte atividade anti-proliferativa com um valor IC₅₀ de 59 ± 4 µg/ mL. Já o extrato hidrolizado de sementes apresentou maior (IC₅₀ = 38 ± 3 µg / mL) (AQIL *et al.* 2012).

Li *et al.* (2009), investigaram o efeito antiproliferativo do extrato de jamelão sobre a linhagem de câncer de mama dependente de estrogênio/aromatase positiva (MCF-7aro), células de câncer de mama independente de estrogênio (MDA-MB-231) e em um câncer não-tumorigênico (MCF-10A). Os extratos de jamelão, mostraram mais efeitos sobre a linhagem MCF-7aro (IC₅₀=27 µg/mL), seguido por MDAMB-231 (IC₅₀=40 µg/mL) e exibiu leves efeitos anti-proliferativos contra a linhagem MCF-10A (IC₅₀>100 µg/mL) (LI *et al.*, 2009). Charepalli *et al.* (2016), realizou um estudo sobre o efeito anti-proliferativo de extratos de

jamelão sobre a linhagem de câncer de colon (HCT-116). O extrato de jamelão apresentou redução de aproximadamente 50 % em relação as células viáveis nas em ambas concentrações utilizadas (30 µg/ml e 40 µg/mL)(CHAREPALLI *et al.*, 2016).

A eficácia dos extratos de jambo (*Syzygium cumini*) sobre câncer de pele em camundongos, foram descritos por Pamar *et al.* (2011), a inibição de Incidência de tumores pelo extrato hidroalcoólico da semente de *S. cumini* foi avaliada em camundongos em duas fases do carcinoma de pele. O extrato mostrou a redução de 37,5, 50 e 25%, respectivamente, em comparação com o as células de controle (PAMAR *et al.*, 2011). Rabeta *et al.* (2013), avaliaram a ação de extratos metanólicos de jambo e encontraram um efeito antiproliferativo significativo com 79% de células viabilidade na linhagem de câncer de mama MCF-7 (IC₅₀= 632,3 ug / mL) (RABETA *et al.*, 2013). Além disso, Wongwattanasathien *et al.* (2010), também mostraram efeitos antiproliferativos do jambo sobre a linhagem de células MCF-7 (WONGWATTANASATHIEN *et al.*,2010).

Os dados obtidos neste trabalho através do ensaio de MTT corroboram com os dados obtidos através da quantificação celular pela câmara de Neubauer, onde as amostras de JB, JME e JMB apresentaram a seguinte ordem na redução da viabilidade celular: JB>JME>JMB. Desta forma, os dados presente na literatura científica e neste estudo sugerem que o JB, JME e o JMB possam desempenhar um papel de agente inibidor da viabilidade celular e preventivo na proliferação de células de câncer de cólon humano.

A desregulação no controle do ciclo celular é um aspecto fundamental no desenvolvimento do câncer. As células normais apenas proliferam em resposta ao desenvolvimento da célula ou a sinais presentes na mitose que indicam um requisito para o crescimento do tecido, enquanto que a proliferação das células cancerosas procede essencialmente sem controle. Isto indica que as células cancerosas proliferam devido à presença de defeitos de sinalização internos e/ou externos. Sabe-se que as células cancerosas perdem a capacidade de regular seu ciclo celular e, assim, controlar a sua taxa de proliferação. Um passo limitante no ciclo celular, que muitas vezes não é regulada no câncer, é a progressão de células na primeira fase (G1) do ciclo para a fase S. Falhas no processo da regulação do ciclo celular podem levar uma proliferação maior de células cancerosas, enquanto que esforços realizados para corrigir este problema, levam a um retardo no crescimento e indução da morte celular (NAKAYAMA *et al.*, 2006; BOROJEVIC *et al.*, 2010).

A eficácia de um composto bioativo de alimento no controle do câncer pode ser avaliada através da sua capacidade de bloquear o ciclo celular nas fases G0/G1 e G2/M, reduzindo a proporção de células em fase S (YAO *et al.*, 2011).

Neste estudo, as células de HT-29, na análise ciclo celular revelaram que o pó da casca desidratada de JB e de JMB aumentaram a proporção de células em fase sub G0/G1 e reduziram o total de células presentes em G2/M, em 24 horas pós-tratamento. Já o pó da casca desidratada de JME diminuiu a proporção de células em fase sub G0/G1 e reduziu o total de células presentes em G2/M. Estes dados sugerem uma parada de ciclo celular em fase G0/G1, onde as células ficam impossibilitadas de chegarem à etapa de mitose e, se multiplicarem. Com a parada do ciclo na fase G0/G1, presumiu-se que um menor número de células prossiga no ciclo e, alcance as fase S e G2/M, ocasionando, conseqüentemente, a redução no percentual de células observado nesta fase. A inibição da progressão do ciclo celular está relacionado com o mecanismo antiproliferativo (SHIN *et al.*, 2013). Neste sentido, os pós da casca desidratada de JB, JME e JMB foram capazes de reduzir a viabilidade celular e modificar o ciclo celular de adenocarcinoma colon humano HT-29.

O processo apoptótico é fundamental para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas como: a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos. Este processo ocorre pela ação de uma família de cisteína proteases, as caspases, que são ativadas em resposta a estímulos pró-apoptóticos. As caspases promovem apoptose por: (a) indução de enzimas destrutivas, como DNases, (b) liberação de citocromo c via Bcl-2 proteínas da família, e (c) destruição das principais proteínas estruturais e regulatórias (SLEE *et al.*, 2001; GRIVICICH *et al.*, 2007).

A quantificação do número de células mortas em processo apoptótico pode ser uma medida útil para avaliar os efeitos citotóxicos às células cancerosas. A alteração do equilíbrio entre proliferação celular e morte por apoptose tem sido associado à tumorigênese (GRIVICICH *et al.*, 2007).

A capacidade de um composto em inibir a proliferação de células cancerígenas é muito desejável. Neste trabalho foi possível constatar que os pós das cascas desidratadas de JB, JME e JMB demonstraram promover morte por apoptose em células de adenocarcinoma colon humano HT-29, quando comparado ao grupo controle, corroborando com os dados presentes na literatura. Wang *et al.* (2014), , avaliaram o efeito do extrato aquoso de diferentes partes da jabuticaba na linha celular de câncer oral (HSC-3). O extrato de aquoso da semente

de jabuticaba na concentração de 50 µg/mL aumentou a taxa de apoptose, apresentando o valor de para 57,1% em relação às células não tratadas (WANG *et al.*, 2014).

No estudo desenvolvido por Charepalli *et al.* (2016), o extrato de jamelão nas concentrações 30 µg/mL e 40µg/mL, foi capaz de induzir apoptose nas linhagens de câncer de cólon (HCT-116), apresentando aproximadamente 30 % de taxa de apoptose quando comparadas com células não tratadas (controle), após 24 horas de tratamento (CHAREPALLI *et al.*, 2016).

Barh & Viswanathan (2008), exibiram em sua pesquisa que o extrato da casca de jambo induz a apoptose em linhagens de câncer cervical HeLa e SiHa apresentou uma taxa de de apoptose de 20,5%para HeLa e 16,1% para SiHa, em relação as células não tratadas após 48 horas de tratamento (BARH & VISWANATHAN, 2008).

A literatura científica reporta, em alguns estudos, que extratos de frutas ricas em antocianinas podem prevenir o câncer através do seu efeito inibitório, da inibição da proliferação celular, da indução da apoptose e da parada do ciclo celular (YUN *et al.*, 2009; AMES, 1993).

O efeito inibitório das antocianinas na carcinogênese e do crescimento tumoral ocorrem através de dois mecanismos principais: a modificação do status redox e pela interferência das funções celulares básicas (ciclo celular, apoptose, inflamação, angiogênese, invasão e metástase). A proliferação celular pode ser inibida pela capacidade das antocianinas de bloquear alguns estágios do ciclo celular através das proteínas reguladoras do ciclo celular (p53, p21, p27, ciclina D1, ciclina A). Os extractos ricos em antocianinas induzem a apoptose por meio da liberação de citocromo C, da modulação de anticorpos anti-proapoptóticos dependentes de caspases e pelo fator de necrose tumoral (TNF) (CHANG *et al.*, 2005; . REDDIVARI *et al.*, 2007). Além disso, FENG *et al.* (2007), reportaram que o tratamento de células tumorais, com extratos ricos em antocianinas resultam em um acúmulo de ERO'S que por sua vez ocasionam uma apoptose subsequente, sugerindo que a via de espécies reativas de oxigênio caspase-independente é fundamental para a indução de apoptose mediada pelo tratamento com antocianina.

Mediante aos dados apresentados neste trabalho, sugere-se que as amostras de JB, JME e JMB (extrato liofilizado e pó da casca desidratda), podem desempenhar importante papel na redução da viabilidade celular, na modulação do ciclo celular e, no controle da progressão tumoral, via indução da apoptose.

8. CONCLUSÃO

A literatura científica atual sobre JB, JME e JMB ainda é escassa sobre o papel destas frutas como potentes antioxidantes, podendo ser utilizados na prevenção de diversas doenças, entre estas o câncer.

Os resultados obtidos revelaram que o pó da casca desidratada de JB apresentou alto teor de compostos fenólicos totais, elevada atividade antioxidante (DPPH, FRAP e ORAC) e exibiu um maior potencial antiproliferativo quando comparadas as amostras de JME e JMB.

Os dados desse trabalho mostram que a JB, JME e JMB (na concentração 1000 μ M), promoveram um aumento no percentual de células na fase G0/G1 e da fase S e seguido de um redução em ambas concentrações na fase G2/M. Além disso, o JB promoveu um aumento do percentual de células apoptóticas. Esta pesquisa mostrou que a JB apresentou o maior efeito antiproliferativo, além de promover parada no ciclo celular e indução da apoptose.

Desta forma, o consumo de frutas da família myrtaceae ricas em antocianinas, podem contribuir para a promoção à saúde e para a redução de doenças degenerativas, como o câncer, quando utilizada como alimento funcional ou na suplementação de dietas. No entanto, novos estudos sobre o potencial de toxicidade do pó da casca desidratada de JB, JME e JMB devem ser feito antes de qualquer aplicação em larga escala, além de novos ensaios em modelos animais e clínicos sobre a possível proteção das frutas da família myrtaceae no processo de tumorigênese, auxiliando a compreensão de outros mecanismos ainda não elucidados por este trabalho.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGOKE, G. O.; et al. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal of food science and technology**, v. 35, n. 4, p. 283-298, 1998.

ALEGRÍA, L.C.; GARRIDO, A. B. Fisiopatología y patogenia Del câncer colorrectal. P. 67-85. 2009. **Guia de prevenção y manejo Del câncer colorrectal em Atenção Primaria**, cap. 1, p. 1-19. 2009.

ALEZANDRO, M. R. et al. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 468-477, 2013.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Colorectal Cancer Facts & Figures 2011-2013**. Atlanta: American Cancer Society, 2011.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016**. Atlanta: American Cancer Society, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Colorectal cancer and facts & figures - special edition 2014-2016**. Atlanta, 2016.

AMES, B.N. et al. Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 90, p. 7915-7922, 1993.

ARAÚJO, A. L. M. **Polpa de Jambolão desidratada por liofilização e secagem em leite de jorro: caracterização físico-química e funcional e impacto da secagem**. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

APEL, M. A. et al. Essential oil composition of four *Plinia* species (Myrtaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, n. 3, p. 565-567, 2006.

AQIL, F. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry). **Nutrition and cancer**, v. 64, n. 3, p. 428-438, 2012.

ARUMUGAM, B. et al. Antioxidant and antiglycemic potentials of a standardized extract of *Syzygium malaccense*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 707-712, 2014.

ASCHERI, D.P.M.; ASCHERI, J.L.M; CARVALHO, C.W.P. Caracterização da farinha de bagaço de jaboticaba e propriedades funcionais dos extrusados. **Ciência e Tecnologia Alimentar Campinas**, v.26, n.4, p.1-9, 2006.

- AUGUSTA, I. M. et al. Caracterização física e química da casca e polpa de jambo vermelho (*Syzygium malaccensis*, (L.) Merryl & Perry). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 928-932, 2010.
- AUGUSTA, I. M. et al. Teor de antocianinas totais e atividade antioxidante da Flor de jambo vermelho (*Syzygium malaccensis*). **Higiene Alimentar**, v.27, n. 218/219, p. 1631-1634, 2013.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga: propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. Revista do Instituto Adolfo Lutz. v. 62, n. 1, p. 55-61, 2003.
- AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. 240-246, 2012.
- BARGELLINI, A. et al. Trace elements, anxiety and immune parameters in patients affected by cancer. **Journal of trace elements in medicine and biology**, v. 17, suppl. 1, p. 3-9, 2003.
- BARH, D.; VISWANATHAN, G. *Syzygium cumini* inhibits growth and induces apoptosis in cervical cancer cell lines: a primary study. **Ecancermedicalsecience**, v. 2, 2008.
- BARNES J.; ANDERSON L. A.; PHILLIPSON J. D. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 5, p. 583-600, 2001.
- BATISTA, Â. G. et al. Consumo de casca de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) melhorou a excreção de triglicerídeos e a peroxidação lipídica hepática de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. **Revista de Nutrição**, v. 26, n. 5, p. 571-581, 2013.
- BENSON, A. L. Epidemiology, disease progression and economy burden of colorectal cancer. **Journal of Managed Care Pharmacy**. v. 13, n. 6 Supp C, p. 5-18, 2007.
- BERNSTEIN, C. N. et al. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. **Cancer**, v. 91, n. 4, p. 854-862, 2001.
- BOBBIO, F. O. et al. Identificação e quantificação das antocianinas dos frutos do açazeiro (*Etuérpe oleracea*) Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 388-390, 2000.
- BOROJEVIC, R. et al. Influência dos carotenóides na proliferação e ciclo celular de linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia** 43, 152-153 (2010).
- BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22, p. 2722-2735, 2007.
- BRAGA, A. C. C. et al. Atividade antioxidante e quantificação de compostos bioativos dos frutos de abricó (*Mammea americana*). **Alimentos e Nutrição**, v.21, n.1, p.31-36, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LTW-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Como é o processo de carcinogênese**. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Falando sobre câncer do intestino**. Rio de Janeiro: INCA, 2003.

BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. **Food Chemistry**, v. 58, n. 1-2, p. 103-109, 1997.

BRUNINI, M. A. et al. Influência de embalagens e temperatura no armazenamento de jaboticabas (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg) cv ‘sabará’. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n.3, p.378-383, 2004.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1523-1527, 2009.

CARRATU, E.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetable. **Annali Istituto dell Superiori di Sanità**, v. 41, n.1, p.7-16, 2005.

CAZARIN, C. B. B. et al. Capacidade antioxidante e composição química da casca de maracujá (*Passiflora edulis*). **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p.1699-1704, 2014.

CHANDRASEKARAN ,M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 105-108, 2004.

CHANG, Y.C. et al. Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 1015-1023, 2006.

CHANG, Y.C, et al. Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.205, p. 201–212, 2005.

CHAREPALLI, V. et al. *Eugenia jambolana* (Java Plum) fruit extract exhibits anti-cancer activity against early stage human HCT-116 colon cancer cells and colon cancer stem cells. **Cancers**, v. 8, n. 3, p. 29, 2016.

CHEN, T.R. et al. WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.27, p.125-134, 1987.

CHEN, C. D. et al. A case-cohort study for the disease natural history of adenoma-carcinoma and de novo carcinoma and surveillance of colon and rectum after polypectomy: implication for efficiency of colonoscopy. **British journal of cancer**, v. 88, n. 12, p. 1866-1873, 2003.

CHEN, F. W., et al. Advanced Stage Colorectal Cancer in Persons Younger Than 50 Years not Associated With Longer Duration of Symptoms or Time to Diagnosis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology** (2016), p1-38.

CHEN, P. N. et al. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163, n. 3, p. 218-229, 2006.

CLERECI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1658-1670, 2011.

CONNOR, A. M. et al. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 893-898, 2002.

CORREA, M. G. Efeito dos extratos de cultivares de goiaba em linhagens celulares humanas de câncer de mama. 2016. 83 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

DALVI, L. T. **Mecanismos de ação de antioxidantes de origem vegetal: estudo do polifenol ácido elático e do extrato de caqui (*Diospyros kaki*)**. 2008. 143 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana). Universidade de Brasília, 2008.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC– fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48-54, 2004.

DAVIS, C. D. Nutritional Interactions: Credentialing of molecular targets for cancer prevention. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, n. 2, p.176-183, 2007.

DE BRITO, P. K. S. et al. **Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos na casca do jambo (*Syzygium malaccense*)**. 63^a Reunião Anual da SBPC, 2015. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/resumos/resumos/2262.htm>> Acesso em: 20 jan. 2017.

DE CASTRO, D. D. S. B. Obtenção de extrato de pitaya e avaliação da sua atividade antioxidante e antiproliferativa em linhagens celulares humanas de câncer de mama. 2015. 130 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

DE CASTRO, D. D. S. B.; TEODORO, A. J. Anticancer Properties of Bioactive Compounds of Berry Fruits - A Review. **British Journal of Medicine and Medical Research**, v. 6, n. 8, p. 771-794, 2015.

DECKER, E. A. Strategies for manipulating the prooxidative/ antioxidant balance of food to maximize oxidative stability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 6, p. 241-248, 1998.

DE VRIE, J. H. M. et al. Consumption of quercetin and kaempferol in free-living subjects eating a variety of diets. **Cancer letters**, v. 114, n. 1, p. 141-144, 1997.

DINI, L. I.; KOFF, W. J. Perfil do câncer de próstata no hospital de clínicas de Porto Alegre. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 1, P. 28-31 2006.

DONADIO, L. C. Cuidados com a Jaboticabeira. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 23 de novembro de 1983. Suplemento Agrícola, p.16.

DONADIO, L. C. **Dicionário das frutas**. Jaboticabal, 2007. 300p.

DONADIO, L. C. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg). **Dicionário das frutas nativas**. Jaboticabal Funep, 2000. 55p.

EFRAIM, P. et al. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, supl. 1, p. 142-150, 2010.

EIBOND, L. S. et al. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 23-28, 2004.

FACINA, T. Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 57, n. 4, p. 557, 2011.

FACINA, T. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, n. 1, p.63-64, 2014.

FALCÃO, M. A.; PARALUPP, N. D.; CLEMENT, C. R. Fenologia e produtividade do jumbo (*Sygygium malaccensis*) na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 32, n. 1, p. 3-8, 2002.

FELDMANN, K. A. Cytochrome P450s as genes for crop improvement. **Current opinion in plant biology**, v. 4, n. 2, p. 162-167, 2001.

FENG, R. et al. Cyanidin-3- rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, p.13468–13476,2007.

FERNANDES Jr, A. S. et al. Câncer de Cólon: Tratamento Quimioterápico. Sociedade Brasileira de Cancerologia. **Diretrizes Clínicas na Saúde Complementar**, p. 1-24, out. 2009.

Figura 7. Jaboticabeira e seu fruto . Disponível em: <http://www.saudedica.com.br/os-10-beneficios-da-jaboticaba-para-saude/> Acesso em out. 2016.

Figura 8. Jamelão (*Syzygium cumini*). Disponível em:
http://fenixartdecor.blogspot.com.br/2012_02_01_archive.html. Acesso em: jan 2017.

Figura 9. Jambo (*Syzygium malaccense*). Disponível em:
<http://www.aplantadavez.com.br/2016/01/jambo-syzygium-malaccense-l-merr-lm.html>
Acesso em jan. 2017.

FORTES, R. C. et al. Hábitos dietéticos de pacientes com câncer colorretal em fase pós-operatória. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.53, n. 3, p.277-289, 2007.

FOGH, J.; TREMPPE, G. New Human Tumor Cell Lines. In: J. Fogh (ed.), *Human Tumor Cells In Vitro*, pp. 115-160. **New York: Plenum Press**, 1975.

FOGH, J. et al. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. **Journal of the National Cancer Institute.**, v.59, p. 221-226, 1977.

FRAUCHES, N. S. et al. Brazilian Myrtaceae Fruits: A Review of Anticancer Properties. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2016.

GODINHO, W. et al. Volatile constituents from leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 3, p. 249-253, 2014.

GANNON, C. J. et al. Advanced Proximal Colon Cancer. **Surgical endoscopy**, v. 16, n. 3, p. 446-449, 2002.

GARCIA-ALONSO, M. et al. Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 7, p. 521, 2009.

GARÓFOLO, A. et al. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista Nutrição Campinas**, v. 17, n. 4, p. 491-505, 2004

GOUVÊA, A. C. M. S. et al. Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-ruenosideo) isolation from freeze-dried açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) by HPLC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 43-46, 2012.

GOVAERTS, R. et al. **World Checklist of Myrtaceae**. Kew, Royal Botanic Gardns. 2008. 455p.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancrologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

GROVER, J. K.; YADAV, S.; VATS, V., Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v 81, n. 1, p 81-100, 2002.

GUERRERO, R. O.; GUZMAN, A. Inhibition of xanthine oxidase by Puerto Rican plant extracts. **Puerto Rico health sciences journal**, v. 17, n. 4, p. 359-364, 1998.

HAGIWARA, A. et al. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-16-phenylimidazol (4,5-b) pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2- dimethylhydrazine. **Cancer Letters**, v.171, n.1, p.17-25, 2001.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 52, p. 481-504, 2000.

HABR-GAMA, A. Câncer coloretal: a Importância de sua prevenção. *Arquivos de gastroenterologia*, v.42, n.1, p. 2-3, 2005.

LORENZI, H. et al. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 382-386, 2006.

HOGAN, S. et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 208-214, 2010.

HRAZDINA, G. et al. Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5-diglucosides. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, n. 4, p. 201-204, 1970.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n. 6, p.1841-1856, 2005.

IKRAM, E. H. K. et al. Antioxidant capacity and total phenolic content of Malaysian underutilized fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 5, p. 388-393, 2009.

IKAN, R. **Natural Products - A Laboratory Guide**. 2nd ed. London: Academic Press, 1991.

ISHIGAKI, Y., et al. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. **Circulation**, v. 118, n. 1, p. 75-83, 2008.

JADHAV, S. J. et al. Lipid oxidation in biological and foods systems. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K.; editores. *Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives*. New York: Marcel Dekker; p. 5-62, 1995.

JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 4, p. 253-262, 2007.

KALIORA A. C.; DEDOUSSIS, G. V. Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 187, n. 187, p. 1-17, 2006.

KONG, J. M. et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.

KONOPKA, K. et al. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1312, n. 3, p. 186-196, 1996.

KUMAR, V.; FAUSTO, N.; ABBAS, A K. *Robbins & Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas: Wild fruits and pulps of frozen fruits: antioxidant activity, polyphenols and anthocyanins. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p.1285-1285, 2006.
- LAGO, E.S.; GOMES, E.; SILVA, R. Produção de geléia de jabolão (*Syzygium cumini* Lamarck): Processamento, parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 847-852, 2006.
- LAU, P.; SUNG, J. Screening for colorectal cancer. **Journal of Digestive Diseases**, v. 5, n. 3, p.87-92, 2004.
- LEITE, A.V. et al. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboricaba peel (*Myrciaria jaboricaba* Vell Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p.2277-2283, 2011.
- LEITE-LEGATTI, A.V. et al. Jaboricaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596-603, 2012.
- LI, L. et al. *Eugenia jabolana* Lam. berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 826-831, 2009.
- LIMA, A. J. B. et al. Caracterização química do fruto jaboricaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 58, n. 4, p. 416-421, 2008.
- LIU, R. H. Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. **Journal of Food Science**, v. 78, n. s1, p. A18-A25, 2013.
- LÓPEZ-REVUELTA, A. et al. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. **Chemico-biological interactions**, v. 161, n. 1, p. 79-91, 2006.
- LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Composição centesimal, potencial antioxidante e perfil dos ácidos graxos de sementes de jabolão (*Syzygium cumini* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 2, p. 219-223, 2009.
- MACHADO, S. M.; SAWADA, N. Avaliação da qualidade de vida de pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico adjuvante. **Revista Texto & Contexto – Enfermagem**, v. 17, n. 4, p. 750-757, 2008.
- MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruits Phenolics**. Boca Raton: CRC Press, 1990.
- MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.
- MANN, J. **Secondary metabolism**. Oxford: Clarendon Press; 1987. p.374.
- MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para

identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MATOS, J. L. R. **Frutíferas nativas do Brasil**. São Paulo: Nobel, 1983. 92p.

MOKBEL, M. S.; HASHINAGA, F. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 529-534, 2006.

MOLNÁR-PERL, I.; FÜZFAI, Z. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, n. 1, p. 201-227, 2005.

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

MORTON, J. Malay Apple. p. 378-381, 1987. In: Fruits of warm climates.

NAKAYAMA, K. I.; NAKAYAMA, K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 5, p. 369-381, 2006.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 273-300, 1990.

NARAYAN, M. S. et al. Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 60, n.1, p. 1-4, 1999.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **What you need to know about cancer of the colon and rectum**. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 2006. Disponível em: <http://www.cinj.org/sites/cinj/files/documents/WYNTK_Colon.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2017.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO (NEPA). **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. 4.ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. 161p.

OLIVEIRA, A. M. et al. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. supl, p. 618-624, 2006.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. B. Biodisponibilidade de Ácidos Fenólicos. **Química nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, R. N.; DIAS, I. J. M.; CÂMARA, C. A. G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, N. 1., p. 39-43. 2005.

ORTÍZ, M. A. et al. Propiedades funcionales de las antocianinas. **Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud**, v. 13, n. 2, p.16-22, 2011.

PALHA, M.G.; SOUSA, M.B.; RAMOS, A.C. Comparação de dois sistemas de produção de morango, em substrato e em solo, tendo em vista a obtenção de frutos no outono. In: VII Congresso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas, 7. 2013, Madrid. Anais. Madrid: Seaging, p. 5 – 5, 2013.

PARKIN, D. M. et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. **International journal of cancer**, v. 94, n. 2, p. 153-156, 2001.

PARMAR, Jyoti et al. Elimination of deleterious effects of DMBA-induced skin carcinogenesis in mice by *Syzygium cumini* seed extract. **Integrative cancer therapies**, v. 10, n. 3, p. 289-297, 2011.

PENNINGTON, J. A. T. Food composition databases for bioactive food components. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 15, n. 4, p.419-434, 2002.

PEREIRA, M. C. Avaliação dos compostos bioativos em frutos nativos do Rio Grande do Sul. 2011. 131f. Dissertação (mestrado em Ciências e Tecnologia dos alimentos) – Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PINHO, M.S.L. Biologia Molecular do Câncer Colorretal: uma revolução silenciosa em andamento. **Rev. Bras. Coloproct.**, 28 (3), 353-368, 2008.

PINHO, M.ROSSI B.M. Conceitos atuais sobre a carcinogenese colonretal. Ver Bra Coloproct. Vol 19 n.1, 1999.

PLAGEMANN, I. et al. Volatile constituents of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg) fruits. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 1, p. 45-51, 2012.

PRINCE, P.S.; KAMALAKKANNAN, N.; MENON, V.P. Restoration of antioxidants by ethanolic *Tinospora cordifolia* in alloxan-induced diabetic Wistar rats. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v.61, n.4, p. 283-287, 2004.

RABETA, M. S. et al. Anticancer effect of underutilized fruits. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 2, p. 551-556, 2013.

RAMARATHNAM, N. et al. contribution of plant food antioxidants to humans health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 3, p. 75-82, 1995.

RAVI, K.; SIVAGNANAM, K.; SUBRAMANIAN, S. Anti-diabetic activity of *Eugenia jambolana* seed kernels on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of medicinal food**, v. 7, n. 2, p. 187-191, 2004.

- REDDIVARI, L. Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways. **Carcinogenesis**.v.28, p. 2227–2235, 2007.
- REX, D.K. Colorectal Cancer Screening. **American Society of Gastrointestinal Endoscopy**, v. 14, n. 4, abr. 2007.
- REYNERTSON, K. A. et al. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**. v. 69, n. 8, p. 1228-1230, 2006.
- REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible *Myrtaceae* fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883-890, 2008.
- ROBERTSON, J.H. P. et al. An in vivo rat model for early development of colorectal cancer metastasis to liver. **International journal of experimental pathology**, v. 89, n. 6, p. 447-457, 2008.
- ROCHA, M. S. Compostos bioativos e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do cerrado piauiense. 93 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.
- RICE-EVANS, C. A. et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- REITER, L.S. et al. The role of the urokinase receptor in extracellular matrix degradation by HT29 human colon carcinoma cells. **International Journal of Cancer**, **53**, p.444-450, 1993.
- RUFINO, M. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996- 1002, 2010.
- RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 4p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 128).
- RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo Método de redução do Ferro FRAP. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 4p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 125).
- RUFINO, M. S. M. **Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais**. 2008. 236 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Semi-árido, 2008.
- SÁ, A. P. C. S. **Potencial antioxidante e aspectos químicos e físicos das frações comestíveis (polpa e cascas) e sementes de Jamelão (*Syzygium cumini*, L. Skeels)**. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia. 2008.
- SAÉNZ, E. C. et al. Tratamiento y seguimiento del cáncer colorrectal. **Guía de prevención y manejo del cáncer colorrectal em Atención Primaria**, cap. 4, p. 47-63. 2009.

- SALES, N. F. F. et al. Capacidade antioxidante de extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva tinta. In: XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. COEBEQ, p. 11435-11441, Búzios, RJ, 2012. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/70742/1/2012-189.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2017.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.
- SANTIAGO, M. C. P. A. et al., Adaptação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2010 (Comunicado técnico, 162. Biblioteca: CTAA (FL CTE 0162 UMT).
- SASSO, S. A. Z.; CITADIN, I.; DANNER, M. A. Propagação de jaboticabeira por estaquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 577-583, 2010.
- SCHWARTZ, R.N.; BLANKE, C. D.; PESKO, L. J. Target therapies in the treatment of colorectal cancer: what managed care needs to know. **Journal of managed care pharmacy**, v. 10, p. 5, Suppl B, p. S2-13, 2004.
- SEITZ, U. et al. Is endoscopic polypectomy an adequate therapy for malignant colorectal adenomas? Presentation of 114 patients and review of the literature. **Diseases of the colon & rectum**, v. 47, n. 11, p. 1789-1797, 2004.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical reviews in food science & nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.
- SHELEMBE, J. S. et al. Effect of acidic condition on phenolic composition and antioxidant potential of aqueous extracts from sorghum (*Sorghum bicolor*) bran. **Journal of Food Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 110-118, 2014.
- SHIN, S. Y. et al. Structural properties of polyphenols causing cell cycle arrest at G1 phase in HCT116 human colorectal cancer cell lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 16970-16985, 2013.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- SLEE, E. A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S. J. Executioner caspase-3,-6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. **Journal of biological Chemistry**, v. 276, n. 10, p. 7320-7326, 2001.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- SOARES, M. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOUSA, M. M.; DE LIMA, A.; NOGUEIRA, N. N. Jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels): caracterização física e química, conteúdo nutricional e ação antioxidante de compostos bioativos. **Revista Brasileira de Biodiversidade e Biotecnologia**, 2015. Disponível em: <<http://gpicursos.com/slab2015/Sistema/trabalho-pdf.php?id=684>>. Acesso em: 20 jan. 17

SRIDHAR, S. B. et al. Preclinical evaluation of the antidiabetic effect of *Eugenia jambolana* seed powder in streptozotocin-diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 3, p. 463-468, 2005.

SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: A review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2084-2093, 2013.

STEWART, B. W. et al. (Ed.). **World cancer report**. Lyon: IARC press, 2003.

TERCI, D. B. L. Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas. 213 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

TERZIĆ, J. et al. Inflammation and colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2101-2114, 2010.

TYSON, J. J.; NOVAK, B. Regulation of the eukaryotic cell cycle: molecular antagonism, hysteresis, and irreversible transitions. **Journal of theoretical biology**, v. 210, n. 2, p. 249-263, 2001.

TOUFEKTSIAN, M. C. et al. Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia reperfusion injury. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 4, p. 747-752, 2008.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Oxigen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of selected foods, Release 2, 2010. Disponível em: <www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=15866/>. Acesso em: 20 jan. 2017.

UPADHYAYA, K. R.; RADHA, K. S.; MADHYASTHA, H. K. Cell Cycle Regulation and Induction of Apoptosis by β -carotene in U937 and HL-60 Leukemia Cells. **BMB Reports**, v. 40, n. 6, p. 1009-1015, 2007.

VIEIRA, T.R. et al. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 536- 539, 2004.

VINDELOV, L. L. Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. **Virchows Archiv – B - Cell Pathology**, v. 24, n. 1, p. 227–242, 1977.

VIZZOTTO, M.; FETTER, M. R. Jambolão: o poderoso antioxidante: Artigo de Divulgação na Mídia. Embrapa - Clima Temperado. Publicado em 2009. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPACT-2010/12299/1/jambolao-Marcia.pdf>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2017.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. P. **Caracterização das propriedades funcionais do jambolão**. Embrapa clima temperado, 2008.

VOLP, A. C. P. et al. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Revista brasileira de nutrição clínica*, v. 23, n. 2, p. 141-9, 2008.

WALSH, J. M.; TERDIMAN, J. P. Colorectal cancer screening: scientific review. *Jama*, v. 289, n. 10, p. 1288-1296, 2003.

WANG, L. S.; STONER, G.D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, v. 269, n. 2, p. 281–290, 2008.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 2, p. 140-146, 2000.

WANG, W. H. et al. Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) seed extracts in oral carcinoma cells. *BioMed research international*, v. 2014, p. 1-7, 2014.

WHISTLER, W. A.; ELEVITCH, C. R. Species Profiles for Pacific Island Agroforestry: *Syzygium malaccense* (Malay apple), v. 2 n.1, p. 1-13 2006.

WINAWER, S. et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale—update based on new evidence. *Gastroenterology*, v. 124, n. 2, p. 544-560, 2003.

WOLPIN, B. M. et al. Adjuvant treatment of colorectal cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 57, n. 3, p. 168-185, 2007.

WOLPIN, B. M.; MAYER, R. J. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*, v. 134, n. 5, p. 1296-1310, 2008.

WONGWATTANASATHIEN, O.; KANGSADALAMPAI, K.; TONGYONK, L. Antimutagenicity of some flowers grown in Thailand. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, n. 4, p. 1045-1051, 2010.

WU, S. B. et al. Bioactive and marker compounds from two edible darkcolored *Myrciaria* fruits and the synthesis of jaboticabin. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 61, n. 17, p. 4035-4043, 2013.

WU, S. B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. *Food Research International*, v. 54, p. 148-159, 2013.

XIA, M. et al. Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation. *Atherosclerosis*, v. 202, n. 1, p. 41-47, 2009.

YAO, L.; WANG, T.; WANG, H. Effect of soy skim from soybean aqueous processing on the performance of corn ethanol fermentation. *Bioresource technology*, v. 102, n. 19, p. 9199-9205, 2011.

YU, F. et al. Antioxidant activities of crude tea polyphenols, polysaccharides and proteins of selenium-enriched tea and regular green tea. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 5-6, p. 843-848, 2007.

YUN, A.N. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, induces apoptosis and cell cycle arrest in human colon cancer HCT116 cells. **Molecular Carcinogenesis**. v.48, p.260–270, 2008.

ZAMBELLI, A. R. et al. Avaliação do potencial antioxidante e análise do teor de taninos totais de *Syzygium malaccense*. In: **58ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC**. Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC, Florianópolis, SC; 2006.

ZANDONÁ, B. et al. Prevalência de adenomas colorretais em pacientes com história familiar para câncer colorretal. **Revista brasileira Coloproctologia**, v. 31, n. 2, p. 147–154, 2011.

ZHANG, Y. et al. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 3, p. 670-675, 2008.

ANEXO I- PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS AMOSTRAS DE JB, JME E JMB

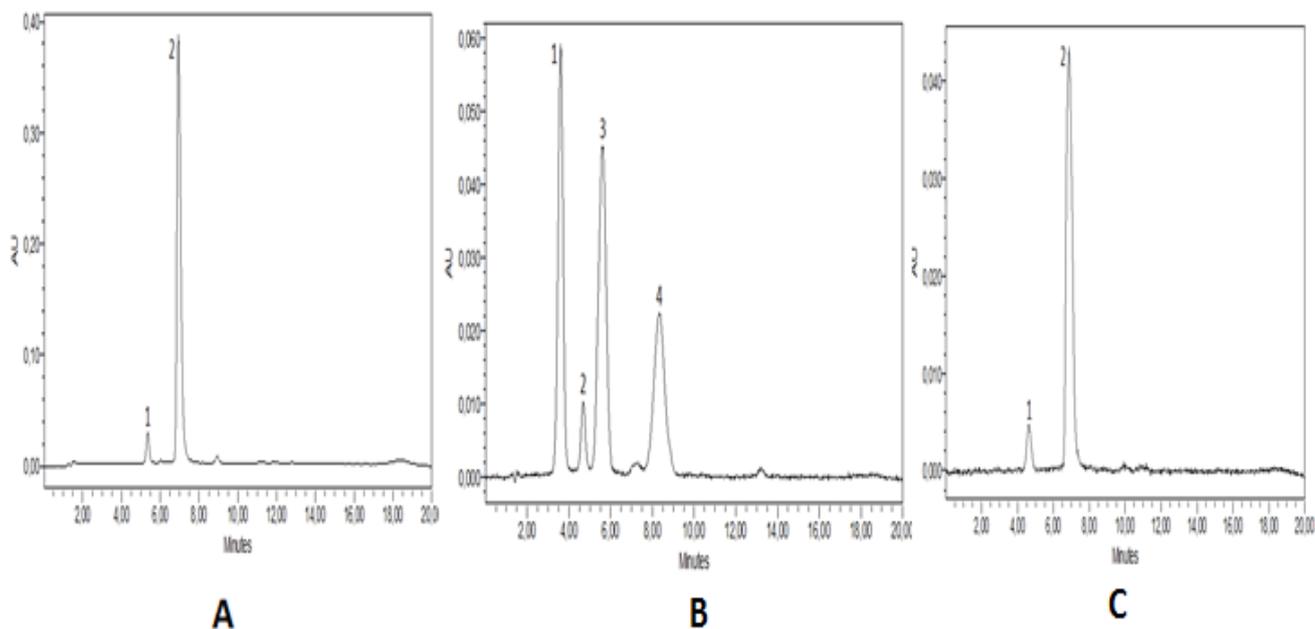


Figura 12. Perfil cromatográfico das amostras de JB (A) pico 1: delphinidina-3-O-glicosídeo; pico 2: cianidina-3-O-glicosídeo, JME(B) pico 1: delphinidina-3,5-O-diglicosídeo; pico 2: cianidina-3,5-O-diglicosídeo; pico 3: petunidina-3,5-O-diglicosídeo; pico 4: malvidina-3,5-O-diglicosídeo e JMB (C) pico 1: cianidina-3,5-O-diglicosídeo; pico 2: cianidina-3-O-glicosídeo

ANEXO II - ARTIGO INTITULADO “Brazilian *Myrtaceae* Fruits: A Review of Anticancer Proprieties” PUBLICADO NA REVISTA *British Journal of Pharmaceutical Research*, EM JUNHO DE 2016.



British Journal of Pharmaceutical Research
12(1): 1-15, 2016, Article no.BJPR.26782
ISSN: 2231-2919, NLM ID: 101631759



SCIENCE DOMAIN International
www.scienceomain.org

Brazilian *Myrtaceae* Fruits: A Review of Anticancer Proprieties

Nayara Simas Frauches^{1*}, Thuane Oliveira do Amaral¹,
Caroline Bekman Diniz Largueza¹ and Anderson Junger Teodoro¹

¹Nutritional Biochemistry Core, Laboratory of Food Function and Biotechnology, Federal University of Rio de Janeiro State, Rio de Janeiro, Brazil.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors AJT, CBDL, NSF and TOA designed the study and wrote the first draft of the manuscript. Authors NSF and CBDL managed the literature searches. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/BJPR/201626782

⁽¹⁾ Dongdong Wang, Department of Pharmacogenetics, West China College of Pharmacy, Sichuan University, China.

⁽¹⁾ Boguslaw Lipinski, Harvard Medical School, Boston, USA.

⁽²⁾ S. Ravishanker, SDM Centre for Research in Ayurveda and Allied Sciences, Udipi, India.
Complete Peer review History: <http://dx.doi.org/10.9734/BJPR/201626782>

Review Article

Received 1st May 2016
Accepted 27th May 2016
Published 3rd June 2016

ABSTRACT

The fruits belonging to *Myrtaceae* family are widely distributed throughout the Brazilian territory and are considered one of the most important families of the Brazilian flora, due to the high prevalence of species edible or used in traditional medicine. Medicinally, the fruits are reported to have antioxidant activity, anti-inflammatory, anticancer, antitumoral activity. Among these properties a lot of research has established that the dietary intake of this fruit has a positive and profound impact on human health and in chronic diseases. Evidences suggest that, rich diets with colored fruits, particularly belonging to *Myrtaceae* family, are highly chemoprotective because of their bioactive compounds. This review showed that the bioactive compounds presents in *Myrtaceae* fruits have anticancer properties and exhibit their chemoprevention effects, elucidating the importance of consuming these fruits.

Keywords: *Myrtaceae* family; cancer; anticancer properties; antioxidant; anthocyanins.

*Corresponding author: E-mail: ateodoro@gmail.com