



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARCOS ANTONIO CUSTÓDIO NETO DA SILVA

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E
ÓLEO DA SEMENTE DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) EM MODELOS *IN VITRO* E
IN VIVO DE CÂNCER

CAMPINAS
2022

MARCOS ANTONIO CUSTÓDIO NETO DA SILVA

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E
ÓLEO DA SEMENTE DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) EM MODELOS *IN VITRO* E
IN VIVO DE CÂNCER

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, área de Concentração Clínica
Médica

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA DO DESTERRO SOARES BRANDÃO
NASCIMENTO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELO ALUNO MARCOS ANTONIO CUSTÓDIO NETO DA SILVA E ORIENTADA
PELO PROF. DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO.

CAMPINAS
2022

Ficha catalográfica

Universidade Estadual de Campinas

Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas

Patricia de Paula Ravaschio - CRB 8/6426

Si38a	<p>Silva, Marcos Antonio Custódio Neto da, 1992- Análise da atividade antitumoral do extrato hidroalcoólico e óleo da semente de açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) em modelos in vitro e in vivo de câncer / Marcos Antonio Custódio Neto da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.</p> <p>Orientador: João Ernesto de Carvalho. Coorientador: Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Euterpe. 2. Polifenóis. 3. Citotoxicidade imunológica. 4. Apoptose. 5. Autofagia. I. Carvalho, João Ernesto de, 1954-. II. Nascimento, Maria do Desterro Soares Brandão. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of antitumor activity of hydroalcoholic extract and açai seed oil (*Euterpe oleracea* Mart) in in vitro and in vivo cancer models

Palavras-chave em inglês:

Euterpe

Polyphenols

Cytotoxicity, Immunologic

Apoptosis

Autophagy

Área de concentração: Clínica Médica **Titulação:** Doutor em Ciências

Banca examinadora:

João Ernesto de Carvalho [Orientador]

Ana Lúcia Abreu Silva

Carmen Silvia Passos Lima

Rui Miguel Gil da Costa Oliveira

Tuany Zambroti Cândido

Data de defesa: 19-08-2022

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-2748-1564>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3978726536426901>

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO
MARCOS ANTONIO CUSTÓDIO NETO DA SILVA**

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO

**CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA DO DESTERRO SOARES BRANDÃO
NASCIMENTO**

MEMBROS TITULARES:

1. Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

2. Prof^a. Dr^a. Ana Lucia Abreu Silva

3. Prof^a. Dr^a. Carmen Silvia Passos Lima

4. Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira

5. Prof^a. Dr^a. Tuany Zambroti Cândido

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data da defesa: 19/08/2022

DEDICATÓRIA

A Deus, autor da vida, pelas bênçãos concedidas nesta caminhada.

Aos meus pais, minha eterna gratidão pela dedicação, amor, paciência e sabedoria.

Aos meus avós, José, Sebastião, Francisca e Raimunda (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e da existência, sem o qual não teria chegado até aqui. Por me dar forças para enfrentar as dificuldades, coragem para seguir em frente e por ter me ajudado a compreender que tudo acontece em seu devido tempo.

Aos meus pais, Marlene Custódio Neto da Silva e Antonio Ferreira da Silva, por acreditarem que eu poderia alcançar meus objetivos, por me apoiarem e aceitarem minhas escolhas. Obrigado pelo amor, carinho e cuidado incondicionais.

À minha esposa, Paulla Monteiro Soares, pelo amor, carinho e paciência e por compreender meus momentos de ausência. Obrigado por ser minha parceira em todos os momentos. Te amo

Aos meus irmãos, Quezia Jemima Custódio Neto da Silva e Marcos José Custódio Neto da Silva, pela admiração que tantas vezes demonstraram por mim e pelos exemplos de vida acadêmica exitosa.

A todos os meus familiares, em especial às minhas tias Vera Lúcia, Marlúcia, Margarida, Ivonete e Braw, por sempre me ajudarem em todos os momentos e pela compreensão sempre que necessário.

À Universidade Estadual de Campinas, local da minha formação em Clínica Médica (residência médica e Doutorado), pelas experiências exitosas e pelo conhecimento adquirido.

Ao Programa de Pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp pela formação integral e técnica. Agradeço aos colegas dessa jornada fascinante.

À Universidade Federal do Maranhão, pelos conhecimentos e habilidades adquiridos durante o curso de Medicina.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, pela orientação competente, dedicada e paciente. Obrigado por ter me aceito em seu grupo de pesquisa e por ter me aceito como seu orientando. Que os frutos dessa parceria possam perdurar por muitos anos.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, por sua dedicação e amor pela Medicina e pela ciência, bem como pelo exemplo de honestidade, perseverança e ética, que me contagiaram e serviram de estímulo ao longo desta caminhada. Agradeço especialmente pelo incentivo, confiança, paciência e carinho comigo em todos os momentos. Muito obrigado por ter me escolhido como seu pupilo.

Ao Laboratório de Farmacologia, Fitoquímica e Toxicologia Experimental (Laftex), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unicamp, pela realização de diferentes experimentos dessa caminhada, mas sobretudo pelas amizades construídas e que levarei para toda a vida. Agradeço em especial à Mary Ann, Aninha, Kaio, Camila, Aline Rangel pela parceria nessa pesquisa.

Ao Laboratório de Biologia Química Microbiana, em especial à Dra. Taicia Pacheco Fill e ao Dr. Jonas Henrique Costa, pela parceria na realização dos experimentos com espectrometria de massas

Ao Instituto Nacional de Câncer, Programa de Oncobiologia Celular e Molecular, Grupo de Biologia Estrutural, em especial ao Dr. José Morgado Díaz, Dr. Murilo Ramos e a doutoranda Josianne Tessmann pela realização dos experimentos com óleo da semente de açaí e células de adenocarcinoma colorretal.

Ao Instituto Militar de Engenharia (IME), em especial ao Dr. Tanos Celmar Costa França, pela parceria na realização dos experimentos com bioinformática e dinâmica molecular.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, em especial ao Dr. Marcelo Pascoal, pela parceria na realização da análise histopatológica e imunohistoquímica.

Ao Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada, lugar onde fiz grandes amigos e aprendi com mestres inigualáveis o prazer pela pesquisa científica. Agradeço em especial Kátia, Flávia Vidal, Maria do Carmo Lacerda, Josélia Alencar e Lais Wolff pela parceria científica.

Ao Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer (LIAC), em especial à Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos, André Vale e Sulayne Araújo, pela parceria na realização dos experimentos com tumor sólido de Ehrlich.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão - FAPEMA, pelo suporte financeiro através do Edital Universal 002/2019.

Aos meus amigos, em especial, Rebeca Costa Castelo Branco, Gabrielle Meirelles, Wilson Jardim (*in memoriam*), Gabriela Melo, Dinamara Rodrigues, Vitor Pimentel, Luadir Gasparotto e tantos outros que poderia citar, pela alegria de poder compartilhar cada momento juntos. Saibam que estes estão eternizados em minha memória. Ao longo dessa caminhada vocês se tornaram verdadeiros irmãos.

A todos que contribuíram de alguma forma, como agentes facilitadores para a execução deste projeto e concretização de um sonho.

MUITO OBRIGADO!

EPÍGRAFE

"Sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito".

Romanos 8:28

“Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar onde vocês estão... Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar”

Augusto Cury

RESUMO

O açaí, *Euterpe oleracea* Mart. é rico em diversas substâncias fitoquímicas com atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral. A semente do açaí é um produto de descarte, sendo pouco utilizado na economia, sendo relevante estudar as propriedades antitumorais desse subproduto. O objetivo do presente estudo é analisar os efeitos do extrato hidroalcoólico e do óleo da semente de açaí em modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer. Os frutos utilizados foram coletados no Parque Ecológico do Maracanã (Parque da Juçara), em São Luís, Maranhão. Amostras da planta foram coletadas e realizada confecção da exsicata, devidamente armazenada no Herbário Rosa Mochel. O extrato foi obtido após trituração da semente e uso de etanol 400mL e óleo foi extraído com n-hexano. Posteriormente o extrato e óleo foram analisados quanto ao perfil fitoquímico por cromatografia de coluna delgada e LC-MS/MS para o extrato e CG/MS para o óleo. Foram realizadas análises *in vitro* nas linhagens celulares MCF-7 (adenocarcinoma de mama), CACO-2, HCT-116 e HT-29 (adenocarcinoma colorretal), HeLa (adenocarcinoma cervical) e NCI-H460 (adenocarcinoma de pulmão), além de células GM derivadas de fibroblastos humanos. As linhagens foram tratadas com 04 concentrações do extrato e do óleo por 24, 48 e 72 horas e feitas as análises de viabilidade celular, morte celular e morfologia. Após as análises *in vitro*, foi analisado o efeito do extrato hidroalcoólico da semente de açaí em modelo de tumor sólido de Ehrlich. Os animais foram tratados com diferentes concentrações do extrato (100, 300 e 1000mg/kg) por gavagem em esquemas preventivos (30 dias antes da indução do tumor) e de intervenção (15 dias após indução do tumor). O extrato da semente de açaí é rico em flavonoides, tais como (-) – epicatequina, cianidina 3-glucosídeo, procianidina B2 e kaempferol-3-O-rutinosídeo e os ácidos graxos principais do óleo são: ácido mirístico, oleico, linoleico, láurico e palmítico. O ensaio de viabilidade com MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) demonstrou efeito citotóxico do extrato na linhagem MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e do óleo nas linhagens de adenocarcinoma colorretal (CACO-2, HCT-116 e HT-29). Extrato e óleo da semente de açaí induziram alterações morfológicas nas células em que induziram redução de viabilidade celular. O extrato do açaí reduziu o potencial clonogênico das células MCF-7. O ensaio com caspase 3 e 7 não evidenciou morte celular por apoptose nas células MCF-7 após tratamento com o extrato da semente de açaí. Para avaliar os mecanismos de morte celular, foi realizado o ensaio laranja de acridina que evidenciou aumento de vesículas ácidas, sugestivas de autofagia. Após o tratamento com o extrato da semente de açaí, houve aumento na detecção de espécies reativas de oxigênio. A análise por microscopia eletrônica de transmissão confirmou a presença de vesículas autofágicas e também o aumento no número de mitocôndrias após tratamento com o extrato da semente de açaí. Nos experimentos *in vivo*, o uso do extrato na dose de 1000mg/kg em esquemas preventivos reduziu o volume tumoral, diminuiu o peso do tumor, manteve o peso dos animais tratados e induziu resposta imunomoduladora, com aumento de TNF- α . O tratamento também aumentou a área de necrose do tumor quando comparado ao controle. O óleo da semente de açaí induziu aumento de apoptose nas células CACO-2 e HCT-116, bem como interferiu no ciclo celular, aumentando a porcentagem de células CACO-2 na fase S. Para avaliar o possível envolvimento de espécies reativas de oxigênio, as células foram pré-tratadas com n-acetilcisteína (NAC) e houve aumento na viabilidade celular nas linhagens testadas. Western blotting sugeriu aumento da expressão de LC3-B, sugestivo de autofagia e de anexina A2, uma proteína reguladora de apoptose. Docking molecular confirmou

interação dos ácidos graxos principais com a anexina A2. Nossos resultados sugerem o potencial antitumoral do extrato da semente de açaí em modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer de mama e do óleo da semente de açaí em células de adenocarcinoma colorretal, contribuindo para a obtenção de um fármaco ativo oriundo de um produto natural conhecido. Além disso, o aproveitamento do resíduo da semente de açaí contribuirá para a economia local e para a sustentabilidade.

Palavras-chave: *Euterpe oleracea* Mart. Polifenóis. Citotoxicidade. Apoptose. Autofagia.

ABSTRACT

The açai, *Euterpe oleracea* Mart. is rich in several phytochemical substances with antioxidant, anti-inflammatory and antitumor activities. The açai seed is a waste product, being little used in the economy, being relevant to study the antitumor properties of this by-product. The aim of the present study is to analyze the effects of hydroalcoholic extract and açai seed oil in in vitro and in vivo models of cancer. The fruits used were collected in the Ecological Park of Maracanã (Parque da Juçara), in São Luís, Maranhão. Plant samples were collected and the exsiccata was made, properly stored in the Rosa Mochel Herbarium. The extract was obtained after grinding the seed and using 400mL of ethanol and the oil was extracted with n-hexane. Subsequently, the extract and oil were analyzed for phytochemical profile by thin column chromatography and LC-MS/MS for the extract and GC/MS for the oil. In vitro analyzes were performed on cell lines MCF-7 (breast adenocarcinoma), CACO-2, HCT-116 and HT-29 (colorectal adenocarcinoma), HeLa (cervical adenocarcinoma) and NCI-H460 (lung adenocarcinoma), in addition to GM cells derived from human fibroblasts. The strains were treated with 04 concentrations of extract and oil for 24, 48 and 72 hours and cell viability, cell death and morphology were analyzed. After in vitro analyses, the effect of the hydroalcoholic extract of açai seed was analyzed in a model of Ehrlich's solid tumor. The animals were treated with different concentrations of the extract (100, 300 and 1000mg/kg) by gavage in preventive (30 days before tumor induction) and intervention (15 days after tumor induction) regimens. Açai seed extract is rich in flavonoids such as (-)-epicatechin, cyanidin 3-glucoside, procyanidin B2 and kaempferol-3-O-rutinoside and the main fatty acids of the oil are: myristic acid, oleic, linoleic, lauric and palmitic. The viability assay with MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) showed a cytotoxic effect of the extract in the MCF-7 strain (breast adenocarcinoma) and the oil in the strains of colorectal adenocarcinoma (CACO-2, HCT-116 and HT-29). Açai seed extract and oil induced morphological changes in cells that induced a reduction in cell viability. The açai extract reduced the clonogenic potential of MCF-7 cells. The caspase 3 and 7 assay did not show cell death by apoptosis in MCF-7 cells after treatment with açai seed extract. To evaluate the mechanisms of cell death, the acridine orange assay was performed, which showed an increase in acid vesicles, suggestive of autophagy. After treatment with açai seed extract, there was an increase in the detection of reactive oxygen species. Analysis by transmission electron microscopy confirmed the presence of autophagic vesicles and also the increase in the number of mitochondria after treatment with açai seed extract. In in vivo experiments, the use of the extract at a dose of 1000mg/kg in preventive regimens reduced tumor volume, decreased tumor weight, maintained the weight of treated animals and induced an immunomodulatory response, with an increase in TNF- α . The treatment also increased the area of tumor necrosis when compared to the control. Açai seed oil induced increased apoptosis in CACO-2 and HCT-116 cells, as well as interfered with the cell cycle, increasing the percentage of CACO-2 cells in S phase. To assess the possible involvement of reactive oxygen species, the cells were pre-treated with n-acetylcysteine (NAC) and there was an increase in cell viability in the tested lines. Western blotting suggested increased expression of LC3-B, suggestive of autophagy and of annexin A2, an apoptosis regulatory protein. Molecular docking confirmed the interaction of major fatty acids with annexin A2. Our results suggest the antitumor potential of açai seed extract in in vitro and in vivo models of breast cancer and of açai seed oil in colorectal adenocarcinoma

cells, contributing to obtain an active drug from a known natural product . In addition, the use of açai seed residue will contribute to the local economy and sustainability.

Keywords: *Euterpe oleracea* Mart. Polyphenols. Cytotoxicity. Apoptosis. Autophagy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ranking Nacional de Câncer como Causa de Morte em Idades <70 Anos em 2019.	Pág. 24
Figura 2	Distribuição de Casos e Óbitos por Área Mundial em 2020 para ambos os sexos.	Pág. 25
Figura 3	Distribuição de casos e óbitos para os 10 principais cânceres mais comuns em 2020 para ambos os sexos.	Pág. 26
Figura 4	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.	Pág. 27
Figura 5	Estratégias para alterar a homeostase redox. Redox, redução-oxidação; ROS, espécies reativas de oxigênio.	Pág. 37
Figura 6a	ROS e morte celular por apoptose.	Pág. 39
Figura 6b	ROS e morte celular por autofagia.	Pág. 40
Figura 7	Estrutura tridimensional da Anexina A2 (estrutura secundária mostrada em verde) complexada com um derivado da heparina (em azul)	Pág. 51
Figura 8	Cromatografia em camada delgada do extrato hidroalcoólico da semente de açaí a 365 e 254 nm (a) utilizando o revelador NP/PEG e do óleo e extrato da semente de açaí utilizando o revelador DPPH (b).	Pág. 59
Figura 9	Zoom na análise MS/MS dos extratos de sementes, polpas e frutos totais de <i>E. oleracea</i> Mart. As cores indicadas na legenda correspondem aos diferentes extratos (vermelho: semente; azul: polpa e verde: fruto total). Os nós em negrito circundados por linhas azuis representam os compostos com ocorrências na biblioteca do GNPS.	Pág. 60
Figura 10	Cromatograma dos ésteres provenientes dos ácidos graxos do óleo da semente da <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	Pág. 64
Figura 11	Determinação da atividade sequestrante do radical DPPH do extrato (A) e óleo (B) da semente de açaí. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.	Pág. 65
Figura 12	Avaliação da citotoxicidade do extrato (A) e óleo (B) da semente de açaí em linhagem de adenocarcinoma colorretal humano CACO-2 através do ensaio de viabilidade com MTT.	Pág. 66
Figura 13	Avaliação da citotoxicidade do extrato (A) e óleo (B) da semente de açaí em linhagem de adenocarcinoma colorretal humano HCT-116 através do ensaio de viabilidade com MTT.	Pág. 67
Figura 14	Comparação de citotoxicidade em linhagem de adenocarcinoma colorretal CACO-2 do óleo e extrato da semente de açaí em 24, 48 e 72h após tratamento com diferentes concentrações: 0,25 (A), 2,5 (B), 25 (C) e 250 µg/ml	Pág. 68
Figura 15	Comparação de citotoxicidade em linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT-116 do óleo e extrato da semente de açaí em 24, 48 e 72h após tratamento com diferentes concentrações: 0,25 (A), 2,5 (B), 25 (C) e 250 µg/ml (D).	Pág. 70
Figura 16	Avaliação da citotoxicidade do extrato (A) e óleo (B) da semente de açaí em linhagem de adenocarcinoma cervical HeLa através do ensaio de viabilidade com MTT.	Pág. 71
Figura 17	Comparação de citotoxicidade em linhagem de adenocarcinoma cervical HeLa do óleo e extrato da semente de açaí em 24, 48 e 72h após tratamento com diferentes concentrações: 0,25 (A), 2,5 (B), 25 (C) e 250 µg/ml (D).	Pág. 72
Figura 18	Avaliação da citotoxicidade do extrato (A) e óleo (B) da semente de açaí em linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7 através do ensaio de viabilidade com MTT.	Pág. 73

Figura 19	Comparação de citotoxicidade em linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7 do óleo e extrato da semente de açaí em 24, 48 e 72h após tratamento com diferentes concentrações: 0,25 (A), 2,5 (B), 25 (C) e 250 µg/ml (D).	Pág. 74
Figura 20	Avaliação da citotoxicidade do extrato (A) e óleo (B) da semente de açaí em linhagem de adenocarcinoma de pulmão NCI-H460 através do ensaio de viabilidade com MTT.	Pág. 75
Figura 21	Comparação de citotoxicidade em linhagem de adenocarcinoma de pulmão NCI-H460 do óleo e extrato da semente de açaí em 24, 48 e 72h após tratamento com diferentes concentrações: 0,25 (A), 2,5 (B), 25 (C) e 250 µg/ml (D).	Pág. 76
Figura 22	Avaliação da citotoxicidade do extrato (A) e óleo (B) da semente do açaí em linhagem de fibroblasto humano (GM) durante 24h através do ensaio de viabilidade com MTT.	Pág. 77
Figura 23	Quantificação de colônias da linhagem celular MCF-7 de câncer de mama tratada com extrato de semente de açaí realizada após 15 dias de cultivo.	Pág. 78
Figura 24	Análise da morfologia por microscopia <i>time lapse</i> de células MCF-7 tratadas com extrato de semente de açaí (25 µg/mL).	Pág. 79
Figura 25	Detecção de caspases ativas 3-7 após tratamento com extrato da semente de açaí.	Pág. 80
Figura 26	Avaliação da expressão de organelas vesiculares ácidas e marcação com laranja de acridina após tratamento com extrato da semente de açaí.	Pág. 81
Figura 27	Efeito do extrato nos níveis de NO expressos como diferença percentual de fluorescência na linhagem celular de câncer de mama MCF-7 (1 x 10 ⁵ céls/mL) usando DAF-2DA (10 µM) incubado por 30 minutos.	Pág. 82
Figura 28	Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão das células MCF-7 após tratamento com o extrato da semente de açaí.	Pág. 83
Figura 29	Avaliação da citotoxicidade do óleo da semente de açaí em linhagem de adenocarcinoma colorretal CACO-2 através do ensaio de viabilidade com MTT.	Pág. 85
Figura 30	Avaliação da citotoxicidade do óleo da semente de açaí em linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT-116 através do ensaio de viabilidade com MTT.	Pág. 86
Figura 31	Avaliação da citotoxicidade do óleo da semente de açaí em linhagem de adenocarcinoma colorretal HT-29 através do ensaio de viabilidade com MTT.	Pág. 87
Figura 32	IC50 da concentração do óleo nas linhagens de adenocarcinoma colorretal: HT-29, CACO-2 e HCT-116 após 24h de tratamento.	Pág. 88
Figura 33	Avaliação da porcentagem de células mortas e vivas após tratamento com óleo da semente de açaí nas concentrações de 25 e 100 µg/mL e pré-tratadas com N-acetilcisteína na concentração de 5 mM 2h antes do tratamento com óleo.	Pág. 89
Figura 34	Avaliação da viabilidade celular da linhagem CACO-2 tratada com óleo da semente de açaí e pré-tratadas com NAC nas concentrações 2,5, 5 e 10mM através do ensaio de viabilidade com MTT.	Pág. 90
Figura 35	Avaliação da viabilidade celular da linhagem HCT-116 tratada com óleo da semente de açaí e pré-tratadas com NAC nas concentrações 2,5, 5 e 10mM através do ensaio de viabilidade com MTT.	Pág. 91
Figura 36	Avaliação da viabilidade celular da linhagem HT-29 tratada com óleo da semente de açaí e pré-tratadas com NAC nas concentrações 2,5, 5 e 10mM através do ensaio de viabilidade com MTT.	Pág. 92
Figura 37a	Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos do óleo da semente de açaí na linhagem celular CACO-2.	Pág. 93
Figura 37b	Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos do óleo da semente de açaí na linhagem celular HCT-116.	Pág. 94

Figura 37c	Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos do óleo da semente de açaí na linhagem celular HT-29.	Pág. 95
Figura 38	Porcentagem de células em apoptose após tratamento com 25 µg/ml de óleo da semente do açaí.	Pág. 96
Figura 39	Histogramas representativos do conteúdo de DNA em células CACO-2.	Pág. 97
Figura 40	Histogramas representativos do conteúdo de DNA em células HT-29.	Pág. 98
Figura 41	Análise da expressão da proteína LC3-B II através da técnica de Western Blotting.	Pág. 100
Figura 42	Análise da expressão da proteína Anexina A2 total e fosforilada através da técnica de Western Blotting.	Pág. 100
Figura 43	Regiões preferenciais da ANXA2 para complexação dos cinco ácidos graxos.	Pág. 101
Figura 44	Poses selecionadas de cada ligante para simulações de DM.	Pág. 102
Figura 45	Média e desvio padrão da energia dos complexos ANXA2-ligante ao longo do tempo de DM.	Pág. 104
Figura 46	DRMQ dos ligantes e da ANXA2 em cada complexo.	Pág. 105
Figura 47	Média e desvio padrão dos valores de DRMQ dos complexos proteína-ligante.	Pág. 105
Figura 48	Ligações hidrogênio entre ANXA2 e os durante a DM.	Pág. 106
Figura 49	Efeito do extrato da semente de açaí no desenvolvimento do tumor de Ehrlich.	Pág. 108
Figura 50	Efeito do extrato da semente de açaí no peso absoluto (A) e relativo (B) do do tumor de Ehrlich.	Pág. 109
Figura 51	Efeito do extrato da semente de açaí na variação do peso dos animais ao final do tratamento (A) e cinética do peso ao longo do tratamento (B).	Pág. 109
Figura 52	Efeito do extrato da semente de açaí na variação do peso dos órgãos: baço (A), fígado (B e C) e rim (D e E).	Pág. 111
Figura 53	Efeito do extrato da semente de açaí nos valores hematimétricos, contagem de leucócitos e plaquetas. Resultados expressos como média + desvio-padrão. (A) hemácias, (B) hemoglobina, (C) hematócrito, (D) VCM (volume corpuscular médio), (E) HCM (hemoglobina corpuscular média), (F) CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), (G) leucócitos totais, (H) neutrófilos, (I) linfócitos e (J) plaquetas	Pág. 114
Figura 54	Efeito do extrato da semente de açaí na celularidade do baço (A) e da medula óssea (B).	Pág. 115
Figura 55	Efeito do extrato da semente de açaí na expressão de citocinas TNF (A) e MCP-1 (B)	Pág. 116
Figura 56	Análise histopatológica em tumor sólido de Ehrlich. Apresentam-se os grupos controle negativo (A), controle positivo (B), grupos preventivos nas doses de 100 (C), 300 (D) e 1000mg/kg (D) e de intervenção nas doses de 100 (F), 300 (G) e 1000mg/kg (H)	Pág. 118
Figura 57	Fotomicrografias de fígado apresentando arquitetura lobular preservada e tratos portais discretamente alargados.	Pág. 119
Figura 58	Fotomicrografias de rim apresentando arquiteturas cortical e medular preservadas, com glomérulos e túbulos viáveis. Observam-se pequenos cistos epiteliais simples na camada cortical.	Pág. 120
Figura 59	Imunomarcacão com anticorpo primário anti-anexina. (A) Controle, 40x, (B) Tumor de Ehrlich, 40x.	Pág. 121
Figura 60	Imunomarcacão com anticorpo primário anti-Bax (A) Controle, 40x, (B) Tumor de Ehrlich, 40x.	Pág. 122

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Divisão dos grupos experimentais.	Pág. 56
Tabela 1	Identificação dos compostos do extrato de açaí por LC-ESI-MS.	Pág. 61
Tabela 2	Ésteres provenientes dos ácidos graxos encontrados no óleo da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	Pág. 63
Tabela 3	Valores de energia e resíduos de interação das melhores poses de cada ácido nas duas regiões.	Pág. 102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANXA2 – Anexina A2
AO – Acridine orange
APAF-1 - Fator de ativação da protease apoptótica-1
ATG – Proteína relacionada à autofagia
ATTC - American Type Tissue Collection
AVOs – Organelas Vesiculares Ácidas
BAK - Bcl-2 relative bak
BAX - BCL-2 associated protein X
BCL-2 - B-cell lymphoma protein 2
B16F10 – Células derivadas de melanoma humano
C-6 – Células derivadas de glioma humano
CACO-2 – Células de adenocarcinoma colorretal
CCD – Cromatografia de Coluna Delgada
CG/MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CEUA – Comitê de Ética em Experimentação Animal
CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
COX – Ciclo-oxigenase
CRC – câncer colorretal
DISC - Death-inducing signaling complex
DM – Dinâmica Molecular
DMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DPPH – 1, 1-difenil-2-picrilhidrazil
EC50 - concentração necessária para atingir 50% da atividade antioxidante
EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERK - Extracellular signal-regulated kinases
EROS – Espécies Reativas de Oxigênio
FADD – FAS-associated death domain
FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FOP – Faculdade de Odontologia de Piracicaba
g/L – Gramas/litro
GLOBOCAN – Global Cancer Observatory
GNPS - Global Natural Products Social Molecular Networking
HB – Hemoglobina
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média
HCT-116 - Células de adenocarcinoma colorretal
HeLa – Células de adenocarcinoma cervical
HL-60 – Células derivadas de leucemia promielocítica
HT - Hematócrito
HT-29 - Células de adenocarcinoma colorretal
IC50 – Concentração inibitória de 50%
ICAM-1 - Molécula de adesão intracelular-1
IDH – Índice de Desenvolvimento Humano
IFN- γ - Interferon- γ
IL – interleucina

INCA – Instituto Nacional de Câncer
INFABIC - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fotônica Aplicada à
Biologia Celular
JNK - c-Jun N-terminal cinase
KG - Quilograma
LC MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LC3-B - Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos
LIAC - Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer
MCF-7 – Células de adenocarcinoma mamário
MCP-1 - Monocyte chemoattractant protein-1
MDAMB-468 - Células de adenocarcinoma mamário
MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão
MG - Miligrama
MTT - Ensaio de captação do corante Tetrazolium (atividade metabólica mitocondrial)
NAC – N-acetilcisteína
NCI – National Cancer Institute
NCI-H460 – Células de adenocarcinoma de pulmão
NF- κ B - Fator nuclear-kappa B
NIST - National Institute of Standards and Technology
NLRP3 - Receptor tipo nod 3
P38 – MPK - p38 mitogen-activated protein kinases
PARP-1 – Poli (ADP-ribose) polimerase 1
PBS - Phosphate buffered saline
ROS – Reactive Oxygen Species
SISGEN – Sistema de Gestão do Patrimônio Genético
SW-480 – Células derivadas de adenocarcinoma colorretal
TGF-B - Transforming Growth Factor Beta.
TNF α –Tumoral Necrosis Factor alfa
TRAIL - TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
UEMA – Universidade Estadual do Maranhão
UFMA – Universidade Federal do Maranhão
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
VCAM-1 - Molécula de adesão celular vascular-1
VCM – Volume Corpuscular Médio
VEGF-1 - Vascular Endothelial Growth Factor

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	
LISTA DE QUADROS E TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 Epidemiologia do Câncer no Brasil e no Mundo	24
3.2 Produtos Naturais e Câncer	27
3.3 <i>Euterpe oleracea</i> Mart (açai)	29
3.4 Radicais livres de oxigênio (ROS) e Câncer	37
3.5 ROS e apoptose	38
3.6 ROS e autofagia	39
3.7 Papel da Anexina A2 na tumorigênese	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. Área da pesquisa	41
4.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico liofilizado e do óleo do caroço de <i>Euterpe oleracea</i> Mart	42
4.3. Cromatografia de Coluna Delgada (CCD)	42
4.4. Análise do extrato de açai por espectrometria de massas (LC M/S-M/S)	43
4.4.1 MS/MSMolecular Networking	43
4.5 Esterificação do Óleo	44
4.5.1 Análise do óleo por Cromatografia Gasosa (CG-MS)	44
4.6 Avaliação da atividade antioxidante por DPPH	45
4.7. Linhagens celulares	45
4.8. Tratamentos com o extrato e óleo da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart	45
4.9. Ensaio de Viabilidade Celular – MTT	46
4.10 Ensaio Clonogênico	46
4.11. Análise morfológica por microscopia de luz invertida, <i>Time-lapse</i> e microscopia eletrônica	47
4.12. Determinação de caspases 3 e 7 ativas por Citometria de Fluxo	48
4.13 Ensaio com Anexina – V	49
4.14. Ciclo celular	49
4.15. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo (DAF-2DA)	49
4.16. Laranja de Acridina	50
4.17. Extração total de proteínas e Western Blotting	50
4.18 Docking Molecular	51
4.18.1 Obtenção da estrutura tridimensional da Anexina A2 e construção dos ligantes	51
4.18.2 Ancoramento molecular no MVD®	52
4.19 Dinâmica molecular (DM)	52
4.20 Avaliação da atividade antitumoral do extrato da semente de açai (<i>Euterpe oleracea</i>) <i>in vivo</i>	54
4.20.1 Local de experimentação	54
4.20.2 Animais e aspectos éticos	55

4.20.3 Inoculação do tumor e tratamento dos animais	55
4.20.4 Procedimentos experimentais	56
4.20.5 Avaliação da celularidade nos órgãos linfoides	57
4.20.6 Quantificação de citocinas	57
4.20.7 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica	58
4.21 Análise Estatística	59
5. RESULTADOS.....	59
5.1 Cromatografia de Coluna Delgada (CCD)	59
5.2 Composição Química do Extrato (LC M/S-M/S)	60
5.3 Composição Química do Óleo (GC-M/S)	63
5.4 Atividade Antioxidante – DPPH	64
5.5 Triagem Farmacológica – Ensaio de Viabilidade Celular com MTT	65
5.6. Experimentos realizados na linhagem MCF-7 com o extrato hidroalcoólico da semente de açaí	78
5.6.1 Ensaio Clonogênico	78
5.6.2 <i>Time-lapse</i>	78
5.6.3 Caspase 3/7	79
5.6.4 Indução de autofagia e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio	80
5.7 Experimentos Realizados nas linhagens de adenocarcinoma colorretal (CACO-2, HT-29 e HCT-116)	84
5.7.1 Ensaio de Viabilidade Celular – MTT	84
5.7.2 Análise morfológica por microscopia de luz invertida	92
5.7.3 Ensaio de apoptose - Anexina V	96
5.7.4 Ciclo Celular	97
5.7.5 Western Blotting	98
5.7.6 Dinâmica Molecular (DM).....	100
5.7.6.1 Ancoramento molecular no MVD®	100
5.7.6.2 Simulações de DM	104
5.8 Experimentos <i>in vivo</i> – Tumor sólido de Ehrlich	107
5.8.1 Avaliação do efeito do extrato da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. no desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich	107
5.8.2 Avaliação do efeito do extrato da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. no peso dos animais	109
5.8.3 Avaliação do efeito do extrato da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. no peso dos órgãos	110
5.8.4 Avaliação do efeito do extrato da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. em parâmetros hematológicos	112
5.8.5 Avaliação da celularidade dos órgãos linfoides	114
5.8.6 Efeito do extrato da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. sobre as citocinas inflamatórias	116
5.8.7. Avaliação histopatológica após tratamento com extrato da semente de açaí	117
5.8.8. Imunohistoquímica	121
6. DISCUSSÃO.....	123
7. CONCLUSÕES	130
REFERÊNCIAS.....	131
ANEXOS.....	157

1. INTRODUÇÃO

Euterpe oleracea, da família *Arecaceae* é uma espécie típica da Amazônia e está presente em diferentes países, tais como: Brasil, Equador, Colômbia, Guianas, dentre outros. No Brasil, encontra-se amplamente distribuída nos estados da região Norte e no Estado do Maranhão, com distribuição predominantemente tropical e subtropical (JONES, 1995).

Considerando o uso tradicional da *Euterpe oleracea*, os frutos são popularmente conhecidos como açaí, açaí do pará e juçara, sendo a última denominação mais conhecida no Estado do Maranhão (CALZAVARA, 1972; VILLACHICA *et al.*, 1996).

Segundo dados da EMBRAPA, o açaí é considerado uma “super fruta”, devido seu alto valor nutricional e energético. A polpa do açaí possui alto percentual de minerais, proteínas e lipídeos, sendo alimento base da dieta da população ribeirinha do Rio Amazonas (EMBRAPA, 2006).

A partir do consumo do fruto e do seu despulpamento, são gerados resíduos que se constituem basicamente de semente e de fibras. A semente é obtida através do despulpamento do fruto, representando 83% do fruto total. Apesar de ser uma fonte de ligninas e celulose renovável, os resíduos do açaí representam um importante problema ambiental (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Apesar do uso significativo da polpa do açaí, a extração da polpa gera um excedente de cerca de 365 toneladas por dia de lixo orgânico, constituído principalmente das sementes, habitualmente descartadas em aterros sanitários e lixões (IBGE, 2007). O uso da semente de açaí com vistas ao desenvolvimento de produtos fármaco-ativos pode contribuir para a valoração econômica desse resíduo sólido, contribuindo para a economia e tendo impacto significativo no meio ambiente.

A partir dos avanços em métodos diagnósticos e de tratamento, houve um aumento significativo de incidência e mortalidade por doenças crônico-degenerativas, em especial o câncer. De acordo com dados do GLOBOCAN (2020) ocorreram no mundo cerca de 18 milhões de casos novos de câncer e 9,8 milhões de óbitos, sendo o câncer de mama feminino o mais incidente, com cerca de 2,3 milhões de novos casos (11,7%). Em relação à mortalidade, o

câncer de pulmão continuou sendo a principal causa de morte, sendo responsável por cerca de 1,8 milhão de mortes (18%). Segundo dados da mesma agência, em 2040 devem ocorrer cerca de 28,4 milhões de novos casos de câncer, com um aumento de quase 50% quando comparado à 2020. (SUNG *et al.*, 2021).

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer, para o triênio 2020-2022 ocorrerão cerca de 625 mil casos novos de câncer, incluindo os cânceres de pele não-melanoma. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma, os cânceres de mama e próstata (cerca de 66 mil casos) e cólon e reto (41 mil casos) serão os mais incidentes) (INCA, 2019)

Existem vários constituintes químicos da *Euterpe oleracea* Mart. com propriedades bioativas. Análises fitoquímicas prévias revelaram a presença de flavonoides, antocianinas, lignanos benzenóides, benzoquinona, monoterpenóides, norisoprenoides, além de ácidos graxos essenciais (GALLORI *et al.*, 2004, RODRIGUES *et al.*, 2006, SCHAUSS *et al.*, 2006 e CHIN *et al.*, 2008). Mantovani, Fernandes e Menezes (2003) descreveram predominância, do ácido oleico e ácido palmitoleico, ácidos graxos não saturados também encontrados no óleo de oliva.

Além de servir como alimento, o açaí tem sido utilizado na medicina tradicional por diversas comunidades indígenas e ribeirinhas, com efeito analgésico, antidiarreico, antimalárico, contra infecções renais e hepáticas (GALOTTA, 2005).

Em relação ao efeito anticâncer, apesar do potencial bioativo do açaí, poucos estudos têm sido descritos na literatura, porém com resultados bastante significativos, evidenciando efeito quimiopreventivo e terapêutico do açaí em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer: câncer de esôfago (STONER *et al.*, 2010), câncer urotelial (FRAGOSO *et al.*, 2012), câncer de cólon (FRAGOSO *et al.*, 2018, FRAGOSO *et al.*, 2013, CHOI *et al.*, 2017, DIAS *et al.*, 2014), melanoma (MONGE-FUENTES *et al.*, 2017), câncer de mama (ALESSANDRA-PERINI *et al.*, 2018, SILVA *et al.*, 2014, FREITAS *et al.*, 2017, SILVA *et al.*, 2021).

Alessandra-Perini *et al.* (2018) observou redução da incidência, proliferação tumoral, multiplicação celular e tamanho do tumor devido às propriedades anti-inflamatórias e antiapoptóticas do açaí.

Mediante os conhecimentos atuais acerca do uso de produtos naturais bioativos, com propriedades antitumorais, antioxidantes e anti-inflamatórias, o objetivo do trabalho foi analisar os efeitos do extrato e óleo da semente do açai (*Euterpe oleracea* Mart.) em diferentes linhagens de células malignas humanas e em modelos *in vivo* de câncer, tendo em vista o desenvolvimento de compostos fármaco-ativos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos antitumorais do extrato hidroalcoólico e óleo da semente de açai (*Euterpe oleracea* Mart.) em diferentes linhagens de células tumorais e em modelos animais de adenocarcinoma mamário e câncer colorretal.

2.2 Objetivos específicos

- Obter e caracterizar por espectrometria de massas o extrato hidroalcoólico e óleo bruto da semente do açai;
- Analisar a viabilidade celular, morfologia e mecanismos de morte associados das linhagens celulares após tratamento com extrato e óleo da semente de açai;
- Avaliar atividade antitumoral do extrato de açai em modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich, em esquemas preventivos e de intervenção;
- Analisar a atividade antitumoral do óleo da semente do açai no modelo experimental de colite/câncer colorretal em camundongos, em esquemas preventivos e de intervenção.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Epidemiologia do Câncer no Brasil e no Mundo

Considerado um importante problema de saúde pública, o câncer é uma das principais causas de mortalidade por doenças crônicas, superando em algumas regiões as doenças cardiovasculares. Devido à elevada incidência, o câncer é uma importante barreira para o aumento da expectativa de vida mundial. (Figura 1) (SUNG et al, 2021).

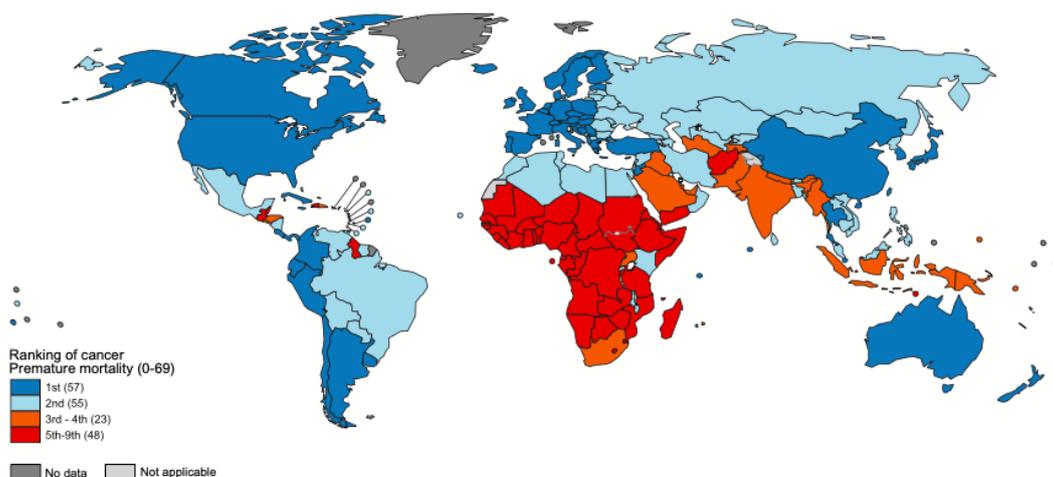


Figura 1. Ranking Nacional de Mortalidade por Câncer em Indivíduos < 70 anos em 2019.

Fonte: Organização Mundial de Saúde. Extraído de SUNG et al, 2021 (adaptado)

De acordo com dados do GLOBOCAN para 2020, estimam-se cerca de 19,3 milhões de casos de câncer e cerca de 10 milhões de óbitos. A maior parte dos casos e cerca de 60% dos óbitos concentram-se no continente asiático. Para a Ásia e África, a proporção de mortalidade é maior que a proporção de incidência, considerando à distribuição não igualitária dos diferentes tipos de câncer e maiores taxas de letalidade nessas regiões. (Figura 2) (SUNG et al, 2021).

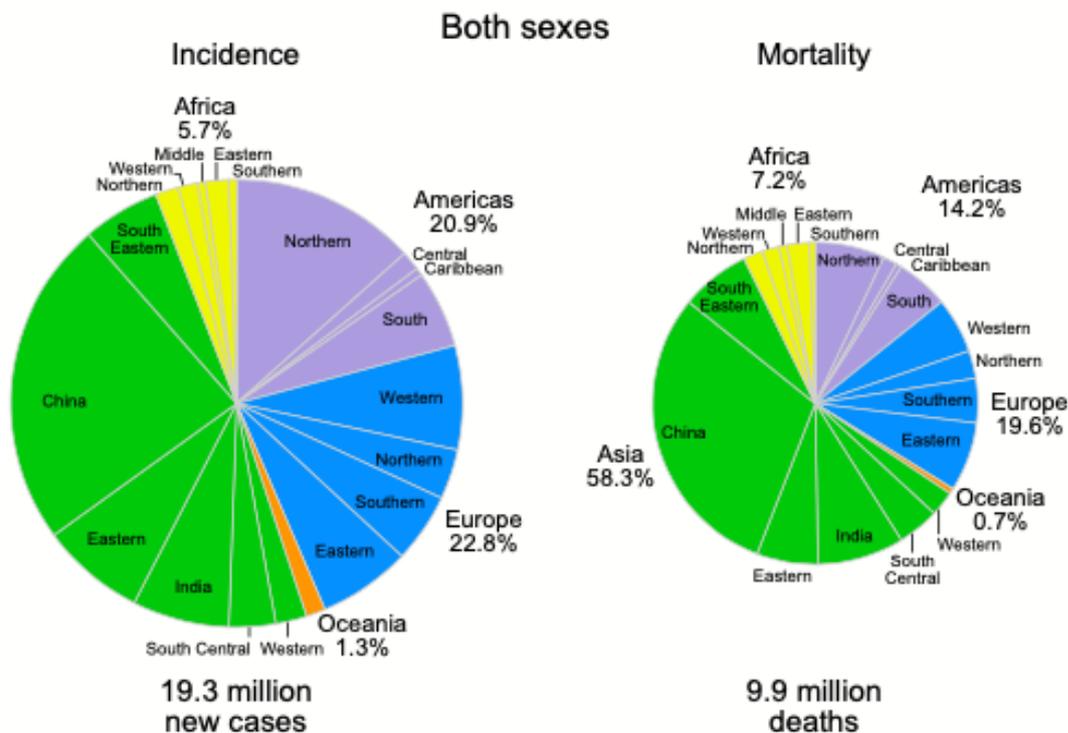


Figura 2. Distribuição de Casos e Óbitos por Continente, ambos os sexos, em 2020.

Fonte: GLOBOCAN, 2020

Considerando os diferentes tipos de cânceres, os mais incidentes são: câncer de mama feminino (11,7%), câncer de pulmão (11,4%) e câncer colorretal (10,0%). Em relação à mortalidade, o câncer de pulmão ainda é a principal causa de morte por neoplasia, seguido do câncer colorretal e hepatocarcinoma. Na análise por sexos, o câncer de pulmão é o câncer mais frequente e a principal causa de morte em homens, seguido pelo câncer de próstata. Nas mulheres, o câncer de mama é o câncer mais incidente e a principal causa de mortalidade, seguida por câncer colorretal e pulmão (Figura 3) (SUNG et al, 2021)

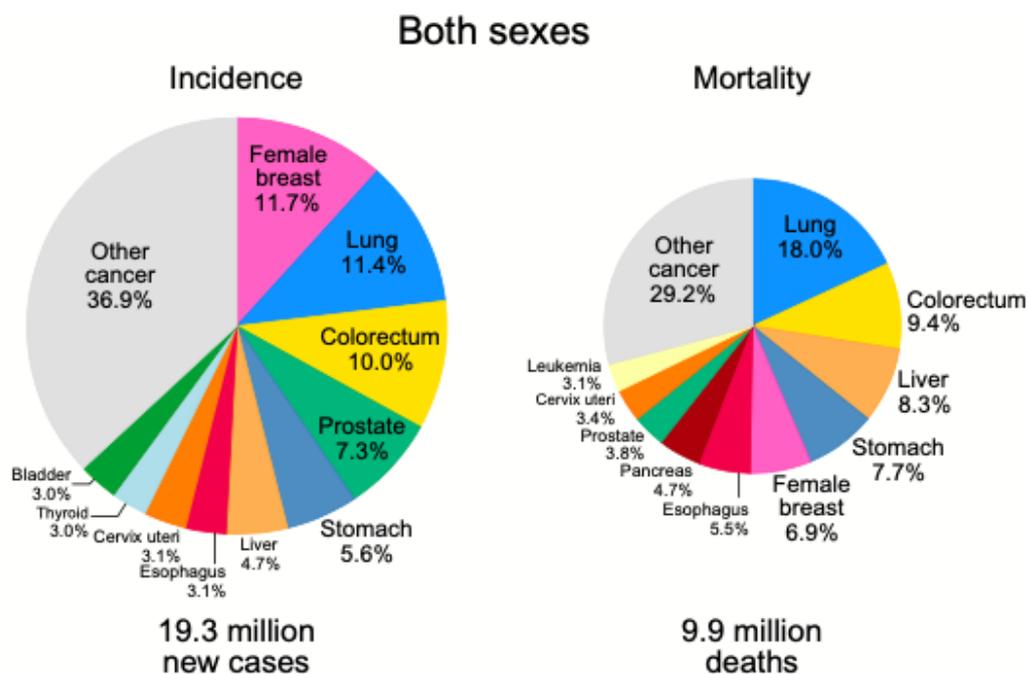


Figura 3. Distribuição de casos e óbitos para os 10 principais cânceres mais comuns em 2020 para ambos os sexos.

Fonte: GLOBOCAN, 2020.

A estimativa de novos casos de câncer para 2040 é de cerca de 28,4 milhões de casos, com um aumento de quase 50% em relação à 2020, refletindo o grande impacto da doença. Em todo o mundo, estima-se que 28,4 milhões de novos casos de câncer ocorram em 2040, um aumento de 47% em relação aos 19,3 milhões de casos correspondentes em 2020, supondo que as taxas nacionais estimadas em 2020 permaneçam constantes. A magnitude relativa do aumento é mais notável nos países com IDH baixo (95%) e nos países com IDH médio (64%) (SUNG et al, 2021).

Para o Brasil, o Instituto Nacional de Câncer estimou para o triênio 2020-2022 cerca de 625 mil novos casos, incluindo os cânceres de pele não melanoma. Quanto à incidência, excluindo-se os cânceres de pele não melanoma, os cânceres mais frequentes são os de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2019).

exigiu uma mudança para terapias combinadas. Uma área de interesse ativo é a inclusão de produtos naturais em terapias combinadas para o tratamento do câncer (CHAMBERLIN et al, 2019).

A resistência adquirida aos medicamentos é observada tanto com quimioterapias citotóxicas quanto com terapias direcionadas, embora os mecanismos sejam diferentes. O conhecimento dos mecanismos moleculares de resistência pode informar estratégias terapêuticas. No câncer, esses mecanismos podem incluir sinalização molecular compensatória e redundante, mutações alvo adquiridas durante o tratamento, aumento da expressão das proteínas alvo, inativação de vias pró-apoptóticas, inibição de mecanismos de reparo de DNA, transição epitelial-mesenquimal, ativação de sinalização pró-sobrevivência e regulação positiva de transportadores de efluxo de células tumorais (HOLOHAN et al., 2013; HOUSMAN et al., 2014).

Compostos de produtos naturais mostram maior diversidade estrutural, bioatividade e complexidade do que compostos em bibliotecas de drogas sintéticas, têm a capacidade de inibir alguns alvos considerados “invencíveis”, como interações proteína-proteína, e direcionam inerentemente o espaço biologicamente relevante, uma vez que são principalmente metabólitos secundários, ou moléculas de sinalização (HARVEY et al., 2015). Produtos naturais, ou derivados de produtos naturais, são a fonte de 247 novas moléculas químicas contra o câncer desenvolvidos entre 1981 e 2019 (NEWMAN E CRAGG, 2020).

Embora o uso de produtos naturais bioativos para o tratamento do câncer possa ser pensado como medicina tradicional e complementar, vários estudos têm demonstrado o efeito sinérgico de produtos naturais e quimioterápicos para o tratamento do câncer (COTE et al., 2015; CHENG et al, 2016), superando a resistência aos medicamentos com a adição de produtos naturais (PEARSON et al., 2017), e sinergia paradoxal em células cancerosas ao demonstrar antagonismo em tecido saudável (COTE et al., 2015).

Diante disso, o estudo de produtos naturais bioativos com atividade antitumoral é promissor para o desenvolvimento de novos compostos fármaco-ativos com atividade anticâncer.

3.3. *Euterpe oleracea* Mart (açai)

3.3.1. Uso tradicional do açai

Açai é um termo de origem tupi yasa'y (i) que significa “palmeira de água” que tem diferentes nomes populares, tais como açai, açai do pará e juçara (OLIVEIRA et al., 2002; MOURÃO, 2010). O nome açai está associado a uma lenda indígena que conta que a filha de um cacique, devido à escassez de alimentos, sacrificou todas as crianças da tribo, incluindo sua neta, filha de laçã, que desolada chorou até a morte em seu túmulo, local onde nasceu a planta que foi utilizada para alimentar a tribo, por isso, passaram a chamá-la de açai (SOARES, 2015).

Dos frutos do açazeiro é extraída a polpa, extensamente consumida pela população ribeirinha e, também, o vinho do açai. A população frequentemente consome a polpa de açai com farinha, peixe seco, carne seca ou camarão, sendo a base da alimentação da população ribeirinha. Além disso, a indústria tem utilizado a polpa do açai para diferentes formulações como doces, geléias, licores, sorvetes, além da extração de corantes e antocianinas. As pesquisas mais recentes vêm demonstrando um novo aproveitamento do açai. O caroço corresponde a 85% de todo o fruto, sendo utilizado para diferentes finalidades, tais como obtenção de café, fitoterápicos, fibras para móveis, xaxim, compensados, dentre outros. (TINOCO, 2005).

Além de servir como alimento (LEE AND BALICK, 2008; GOULDING, SMITH, 2007), o açai é muito utilizado na medicina tradicional. Quanto ao uso etnomedicinal, diferentes porções da planta são utilizadas, tais como: raiz, folha, frutos e sementes. Existem relatos do uso da raiz e do talo contra dores musculares e picadas de cobras. (HENDERSON, 1995; BRIAN, 1988). A raiz tem sido descrita também para tratamento de malária e disfunções renais e hepáticas (PRANCE, 1975, KAHN; GRANVILLE, 1992). Da semente pode-se obter um óleo verde escuro que pode ser utilizado com antidiarreico (PRANCE, 1975; SCHAUSS et al., 2006a).

Outros relatos têm descrito o uso do suco de açai em diferentes doenças. Há descrição do uso do suco para prevenção de gripes, febres e dor. (MATHEUS et al., 2006). Gruca et al (2015) e Macía et al (2011) reportaram uso tradicional do açai para tratar doenças endócrinas.

Além disso, a casca da fruta ralada é usada topicamente para as úlceras da pele e as sementes da fruta são esmagadas e preparadas como um extrato líquido por maceração e imersão para febres. Na Amazônia peruana, uma infusão de sementes trituradas torradas é usada para a febre (Health Report, n.d.). As bagas foram utilizadas por indígenas para tratar diferentes doenças, tais como complicações de pele, diarreia e infecções parasitárias (FONT QUER, 1995).

A seiva de raiz de *Euterpe oleracea* é usada como sal e o palmito é considerado um bom cicatrizante (GRENAND et al, 1987).

O açaí vem sendo utilizado historicamente em diversas doenças. Acne, envelhecimento, abuso de álcool, anemia, antibacteriano, anti-inflamatório (NORATTO et al., 2011); SCHAUSS et al., 2006), antimutagênico, antiparasitários (ODONNE et al., 2011), antivirais (atividade do rotavírus humano, hepatite), adstringente, aterosclerose, depurador do sangue, câncer (POZO-INSFRAN et al., 2006; STONER et al., 2010), contraceptivos (controle de natalidade), diabetes (UDANI et al., 2011), procedimento diagnóstico-contraste) (CORDOVA-FRAGA et al., 2004), diarreia, digestivo, energético, febre, alimento funcional (SANGRONIS et al., 2006), queda de cabelo, hemorragia, hipercolesterolemia (UDANI et al., 2011), hipertensão, imunomodulador (HOLDERNESS et al., 2011; SCHAUSS et al., 2006), icterícia, problemas renais, doença hepática, malária, dor menstrual, dor (muscular e articular) (JENSEN et al., 2011), disfunção sexual, cuidados com a pele (FOWLER et al., 2010), proteção solar, perda de peso e prevenção de rugas.

De acordo com a Farmacopeia tradicional das Guianas, o broto terminal do açaí ("coração") era utilizado pelos povos tradicionais para formar um gesso que causa uma sensação de queimação, mas é considerado muito eficaz. A medula da ponta do estipe, carbonizada e pulverizada, tem propriedades idênticas. Uma preparação mais rápida do mesmo remédio é para suavizar o "coração" para a chama e torcê-lo para extrair um líquido tamponado nas feridas. Os mesmos medicamentos são válidos para cães (GRENAND et al, 1987).

Como base alimentar da maioria da população amazônica, pode ser aproveitado em sua totalidade para diferentes usos, por exemplo, raiz como produto medicinal, sua estirpe e folha são utilizadas para diferentes fins, mas é comumente utilizada nas construções rurais, o palmito e os frutos são alimentos

apreciados pela população (CAVALCANTE, 1991; CALZAVARA, 1987; OHASHI, KAGEYAMA, 2004), é utilizado também como produto da indústria de cosméticos (BALOGH, 2011; HERCULANO, 2013) e artesanato de biojóias (BENATII, 2013).

3.3.2. Fitoquímica

O açaí é um produto altamente consumido pela população, sendo o principal alimento de diversas comunidades tradicionais, em especial a população ribeirinha da região Amazônica, sendo considerado um alimento com alto valor energético, nutricional e calórico devido seu elevado percentual de lipídeos, proteínas e minerais (EMBRAPA, 2006).

Existem vários constituintes químicos da *Euterpe oleracea* Mart. com propriedades bioativas. Análises fitoquímicas prévias evidenciaram a presença de flavonoides, antocianinas, lignanos benzenóides, benzoquinona, monoterpenóides, norisoprenoides, além de ácidos graxos essenciais (GALLORI et al, 2004, RODRIGUES et al., 2006, SCHAUSS et al., 2006 e CHIN et al., 2008).

Euterpe oleracea Mart. (*Arecaceae*) contém antocianinas e suas agliconas são responsáveis pela cor densa do açaí. O fruto constitui-se de vários constituintes químicos, como proteínas, óleos, ácidos, grãos, vitaminas e minerais. Contém altos níveis de fitoquímicos antioxidantes tais como, antocianinas, cianidinas, ácidos graxos essenciais, fibras, ligninas, dentre outros. (EMBRAPA, 2006).

3.3.2.1. Polifenóis

Os polifenóis são importantes compostos bioativos em diferentes plantas. Os flavonoides e as antocianinas são os principais polifenóis constituintes do açaí (IADEROZA et al., 1992; PACHECO-PALENCIA et al., 2009, YAMAGUCHI et al., 2015).

3.3.2.2. Flavonoides

Gordon et al (2012) reportaram a presença de vitexina, isovitexina e quatro derivados da luteolina.

Homo-orientina, orientina e isovitexina foram encontrados por Schauss et al. (2006). Além disso, Kang et al. (2010) relataram vitexina, luteolina e crisoreol, como polifenólicos constituintes da polpa do açaí. Pacheco-Palencia et al. (2009); Schauss et al. (2006a) reportaram previamente a presença de derivados de taxifolina. Mulabagal e Calderón (2012) evidenciaram maiores concentrações de ácido protocatecólico, crossiol e quercetina.

Orientina, homo-orientina, vitexina, apigenina, luteolina, cromoseriol, quercetina e dihidrocampferol do açaí também foram identificadas em bagas de açaí (GALLORI et al., 2004; HEINRICH et al., 2011; KANG et al., 2010, BOBBIO et al., 2000; DEL POZO-INSFRAN et al., 2006; KANG et al., 2011; PACHECO-PALENCIA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2010; ROJANO et al., 2011; ROSSO et al., 2008; SCHAUSS et al., 2006b).

Quercertina também foi reportada por Lichtenthaler et al. (2005). Catequina e epicatequina também foram reportadas por Pacheco-Palencia et al. (2009), Pacheco-Palencia et al. (2007a,b), Pacheco-Palencia et al. (2008), Del-Pozo Insfran et al (2004) Rodrigues et al. (2006) e Pacheco-Palencia e Talcott (2010).

Procianidinas e protoantocianidinas também foram descritas por Pacheco-Palencia et al., 2007a,b, Pacheco-Palencia et al., 2008, Del-Pozo Insfran et al, 2004 Rodrigues et al., 2006 e Pacheco-Palencia e Talcott, 2010.

3.3.2.3 Antocianinas

Cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo são as antocianinas mais comumente encontradas no açaí. Cianidina 3-sambubiosídeo, pelargonidina 3-glicosídeo e peonidina 3-glicosídeo também são encontradas em traços (CARVALHO et al, 2017, GORDON et al, 2012, AGAWA et al., 2011, ROSSO et al., 2008; GALLORI et al., 2004).

Lichtenthäler et al. (2005) também encontraram a cianidina 3-glicosídeo e a cianidina 3-rutinosídeo como os principais componentes da antocianina. A peonidina 3-rutinosídeo foi encontrada como um componente menor em sua amostra de açaí. Schauss et al. (2006) também encontraram principalmente cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo. Além disso, cianidina 3-sambubiosídeo, peonidina 3-glicosídeo e peonidina 3-rutinosídeo foram

encontrados como antocianinas menores. Del Pozo-Insfran, Brenes e Talcott (2004) encontraram o pelargonidina 3-glicosídeo como um dos principais componentes da antocianina no açaí, além da cianidina 3-glicosídeo. Além disso, o pelargonidina 3-glucosídeo estava presente em frutos de *Euterpe precatoria* (PACHECO-PALENCIA et al., 2009).

Cianidina-3-arabinosil-arabinosídeo, cianidina 3-arabinosídeo, cianidina 3-acetil -hexose também foram reportadas por Del Pozo-Insfran et al., 2004. Dias et al (2012) removeram os compostos lipofílicos do açaí e quantificaram as antocianinas, identificando cianidina-3-arabinosil-arabinosídeo, cianidina 3-arabinosídeo em maior quantidade, resultados diferentes dos demais autores.

3.3.2.4. Lignanós

Chin et al. (2008), descreveram nove lignanos, tais como: (+)-isolariciresinol, (+)-5-methoxy-isolariciresinol, erythro-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]-1,3-propanediol, threo-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]-1,3-propanediol, dentre outros.

Hu et al (2014) reportaram novos lignanos: (-)-7R8S-7',8'-dihydroxydihydrodehydroconiferyl alcohol-9-O- β -D-glucopyranoside (1) e (+)-7S8R-7',8'-dihydroxy-dihydrodehydroconiferyl alcohol-9-O- β -D-glucopyranoside.

3.3.2.5. Ácidos graxos essenciais

Mantovani, Fernandes e Menezes (2003) relataram a predominância de ácidos graxos não saturados no açaí em diferentes partes do fruto, especialmente o ácido oleico e o ácido palmítoleico, nas diferentes porções do fruto.

Ácido γ -linolênico, ácido linoleico, ácido palmítico e ácido oleico foram os principais constituintes descritos por Mulabagal e Calderón (2012). Os mesmos resultados também foram descritos por Yuyama et al (2011) e Nascimento et al (2008).

3.3.2.6. Ácidos fenólicos

Ácidos fenólicos são outros constituintes do açaí. Os principais ácidos encontrados no açaí são: ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido protocatecólico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido p-cumárico, ácido siríngico e ácido vanílico (GORDON et al, 2012). Compostos semelhantes também foram relatados por Dragovic-Uzelac et al (2007) e Gruz et al (2011).

Del Pozo-Insfran et al. (2004) identificou e quantificou o ácido elágico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido protocatecoico, ácido p-cumárico e ácido vanílico em polpa fresca de açaí. Além disso, Pacheco-Palencia et al. (2009) encontrou ácido protocatecoico, ácido piroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siríngico e ácido ferúlico em *E. oleracea*.

Este perfil de ácidos fenólicos foi posteriormente confirmado por outros estudos e, adicionalmente, outras substâncias foram descritas, ex. ácidos cafeicos, benzóicos, siríngico, clorogênico e resveratrol também foram descritos (GALLORI et al., 2004; LICHTENTHALER et al., 2005; RIBEIRO et al., 2010; ROJANO et al. 2011).

3.3.2.7 Outros compostos

Outros compostos dos frutos de *E. oleracea* foram identificados por Chin et al. (2008), incluindo nove lignanos, descritos anteriormente, quatro benzenoides simples, uma benzoquinona, três monoterpenóides e dois norisoprenóides.

Pequenas quantidades de carotenóides, por ex. β -caroteno, α -caroteno, luteína e α -tocoferol, foram detectados na polpa de *E. oleracea* (COSTA et al, 2010, RIBEIRO et al., 2010). De acordo com Darnet et al (2011), a polpa de açaí é rica em tocoferóis (α -, β -, γ - e δ -tocoferol), confirmando a propriedades do açaí com a presença de vitamina E.

3.3.3. Farmacologia e potencial anticâncer

Monge-Fuentes e colaboradores (2017) utilizando uma nanoemulsão com óleo da polpa de açaí evidenciaram fototoxicidade em linhagem celular de

melanoma, com redução da viabilidade após o tratamento. Além disso, a morfologia de células B16F10 evidenciou perda do volume celular, presença de corpos apoptóticos e perda de adesão celular. No ensaio com Anexina V e PI ocorreu morte celular por apoptose tardia/necrose, evidenciando um efeito fotossensibilizador de redução na carcinogênese do melanoma.

Silva e colaboradores (2014), estudaram os efeitos citotóxicos do açaí em diferentes linhagens de células humanas. Foram utilizadas células MCF-7 e MDAMB-468, ambas proveniente derivadas de adenocarcinoma de mama e células CACO-2 e HT-29 derivadas de adenocarcinoma colorretal. No estudo foram utilizados casca, caroço e fruto total do açaí em diferentes concentrações. Os extratos causaram redução na viabilidade celular e alteraram a morfologia celular induzindo a formação de vacúolos autofágicos, evidenciado por microscopia eletrônica de transmissão. Além disso, houve aumento da expressão de LC3BII, proteína de marcação da membrana do autofagossoma. Entretanto, não houve efeito citotóxico nas demais linhagens avaliadas.

Pacheco-Palencia e colaboradores (2008) estudando o efeito do extrato da polpa do açaí e do óleo em células HT-29 evidenciaram efeito citotóxico das duas formulações ($p < 0.01$), com efeito mais significativo do óleo, em relação ao extrato da polpa, em concentração menos ($4,5 \mu\text{g} \times 10.2 \mu\text{g}$). As diferenças encontradas nos efeitos inibitórios do extrato e do óleo do açaí podem estar relacionadas à composição dos polifenóis. O óleo do açaí contém 3,4 vezes mais ácido fenólico e 2-14 vezes menos flavanol monomérico e dimérico em relação ao extrato da polpa. Além disso, tanto o extrato quanto o óleo do açaí induziram elevação na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em concentrações mais baixas. Entretanto, em concentrações acima de $7.5 \mu\text{g}$ houve diminuição da produção de ROS, o que pode ser atribuído à maior concentração de polifenóis.

Avaliando o efeito do açaí em células HL-60 (leucemia promielocítica), Del Pozo-Insfram e colaboradores (2006) evidenciaram que frações polifenólicas do açaí em diferentes concentrações ($0,17-10,7 \mu\text{M}$) reduziram a proliferação celular em 56 a 86%, provavelmente relacionado ao desencadeamento de morte celular por apoptose (ativação de caspase-3). Antocianinas e as frações polifenólicas não foram aditivas em sua contribuição para a atividade antiproliferativa celular. As formas glicosídicas de ácidos

fenólicos e flavonóides induziram maior incremento na mudança nos parâmetros celulares (proliferação e apoptose) do que as formas agliconas, enquanto a tendência oposta foi observada para as agliconas de antocianina. Além disso, o açai teve efeito antioxidante evidenciado.

Hogan et al (2010) avaliaram o efeito antiproliferativo e antioxidante de um extrato do açai rico em antocianinas. O extrato foi utilizado em células de glioma C-6 de ratos e MDA-468 de adenocarcinoma mamário. Evidenciou-se efeito significativo do extrato na inibição da proliferação das células de glioma de rato, num efeito dose-dependente. Além disso, evidenciou-se morte celular por apoptose através da demonstração da fragmentação do DNA. Entretanto, o extrato do açai não teve efeito nas células MDA-468.

Freitas et al (2017) avaliaram o potencial citotóxico do caroço do açai em células MCF-7 derivadas de adenocarcinoma mamário. As células tumorais foram tratadas com as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila do extrato hidroalcoólico do açai e avaliadas quanto à viabilidade celular. Nesse estudo, todas as frações foram citotóxicas, com maior redução da viabilidade celular para a fração acetato de etila. Além disso, evidenciou-se morte celular por autofagia e necrose tardia.

Marques et al (2017) realizaram estudo do óleo do açai e, diferentes células humanas, avaliando citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade da *Euterpe oleracea*. Para o estudo foram utilizadas células HepG2 (hepatoma) e leucócitos humanos. Não houve efeito citotóxico dos extratos nas linhagens utilizadas. Os autores descrevem que diferentes doses e composições dos extratos podem justificar a ausência de atividade citotóxica. Além disso, o extrato não evidenciou dano ao DNA, porém não demonstrou efeito quimiopreventivo.

Por fim, Dias et al (2014) avaliaram potencial efeito pró-apoptótico de polifenóis derivados do açai em células HT-29 e SW-480 derivadas de adenocarcinoma colorretal. Os resultados mostraram que o extrato polifenólico do açai nas concentrações de 5 a 20 mg/L) inibiu o crescimento de células SW-480 e HT-29, com maior redução nas células SW-480, reduzindo também a produção de ROS. Os mecanismos envolvidos na inibição do crescimento de células SW-480 pelo extrato polifenólico de açai incluíram downregulation do fator de transcrição NF-kB, molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e

molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1). Além disso, proteínas de especificidade pró-cancerígenas (Sp) foram reguladas negativamente, assim como Bcl-2, fator de crescimento endotelial vascular e survivina. Isso foi acompanhado pela ativação da via proapoptótica mitocondrial envolvendo aumento do citocromo c, clivagem da caspase-3 e diminuição da PARP-1.

3.4. Radicais livres de oxigênio (ROS) e Câncer

Níveis elevados de ROS são um dos *hallmarks* do câncer. As células cancerosas intrinsecamente têm níveis aumentados de ROS por várias razões, incluindo alterações genéticas, aumento da proliferação celular e metabolismo celular alterado (KUMARI et al, 2018; SCHIEBER, CHANDEL, 2014).

Biologicamente, níveis elevados de ROS promovem o desenvolvimento e progressão do tumor; entretanto, acima de um limiar citotóxico, o estresse oxidativo induzido por ROS pode resultar em apoptose ou senescência das células cancerígenas (SHAH; ROGOFF, 2021). A radioterapia e muitas formas de quimioterapia convencional exercem seus efeitos anticancerígenos ao promover o acúmulo de ROS para causar estresse oxidativo citotóxico (Figura 5) (PANIERI;SANTORO, 2016)

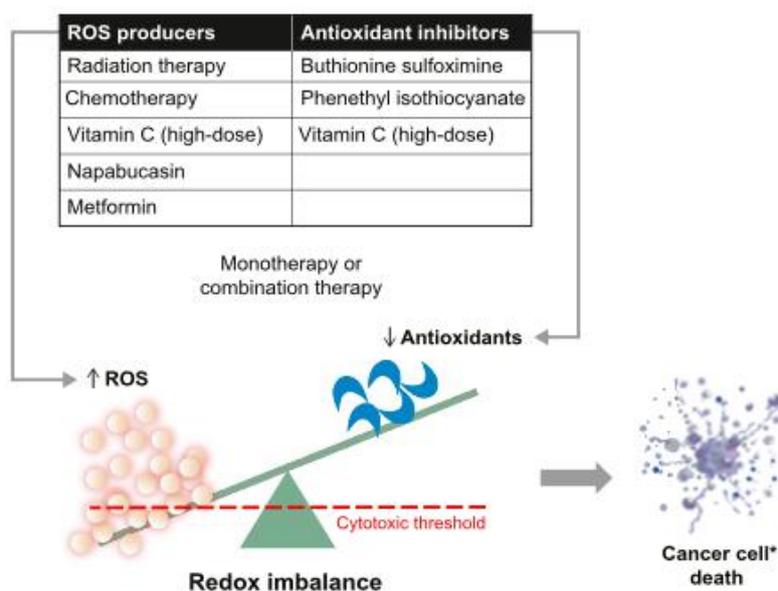


Figura 5. Estratégias para alterar a homeostase redox. Redox, redução-oxidação; ROS, espécies reativas de oxigênio.

Fonte: Shah e Rogoff, 2021

3.5. ROS e apoptose

Níveis celulares excessivos de ROS causam danos a proteínas, ácidos nucléicos, lipídios, membranas e organelas, o que pode levar à indução mecanismos de morte celular, como apoptose (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016)

As mitocôndrias desempenham um papel importante no início da apoptose e são consideradas tanto uma fonte como alvo de ROS. Níveis aumentados de ROS mitocondriais podem iniciar a apoptose intrínseca levando à liberação de citocromo c no citoplasma (SIMON et al, 2000). No citosol, o citocromo c acopla o fator de ativação da protease apoptótica-1 (APAF1), seguido pela formação de um apoptossomo, que ativa a caspase-9. A caspase-9, uma peça-chave na via intrínseca, então ativa as caspases 3, 6 e 7, resultando na clivagem de proteínas celulares e morte celular por apoptose (OW et al, 2008).

Também existem ligações entre ROS e a via extrínseca de apoptose. ROS pode ativar receptores de morte transmembrana, incluindo Fas ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL-R1/2) e receptor 1 do fator de necrose tumoral. A ativação de receptores de morte transmembrana recruta as proteínas adaptadoras, proteína associada ao Fas com domínio de morte (FADD) e procaspase-8 e -10, à superfície citoplasmática para formar complexos de sinalização indutores de morte (DISCs), desencadeando subsequentemente a ativação de caspase-8 e -10 que podem ativar diretamente caspases efetoras e desencadear a apoptose. Caspase-8 e -10 também clivam Bid para produzir Bid truncado (tBid), que se transloca para a mitocôndria, bloqueia a atividade antiapoptótica de Bcl-2 e Bcl-XL e ativa Bax e Bak (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016) (Figura 6A).

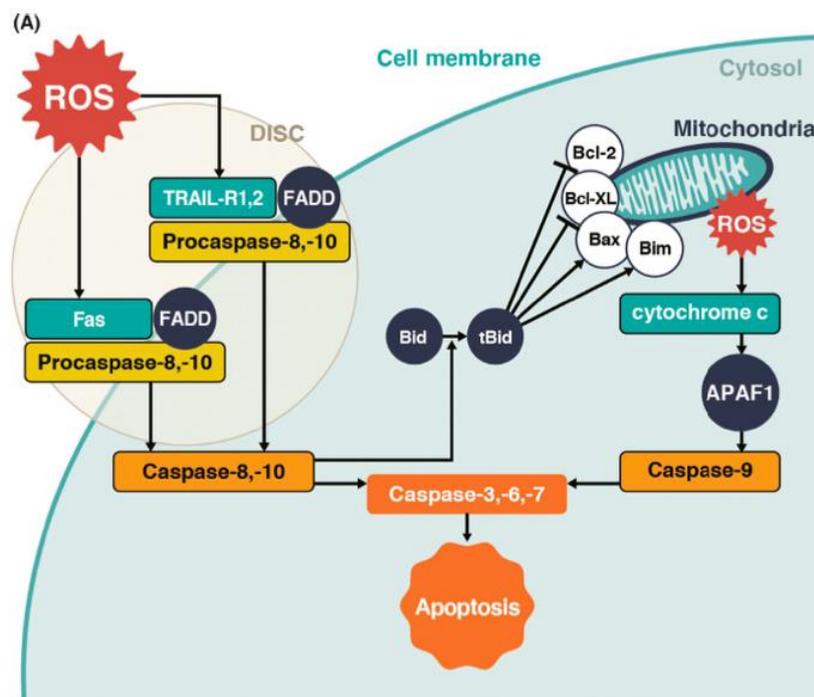


Figura 6a. ROS e morte celular por apoptose.
Adaptado de Nakamura e Takada (2021)

3.6. ROS e autofagia

A autofagia é um mecanismo de autodigestão destinado a reciclar componentes celulares e organelas danificadas em resposta a diversas condições estressoras (FILOMENI et al, 2015). Nas células tumorais, a autofagia desempenha papéis duplos na promoção e supressão do tumor (YUN; LEE, 2018).

A interação estreita entre ROS e autofagia é refletida de 2 maneiras: a indução de autofagia por estresse oxidativo e a redução de ROS por autofagia (LI et al, 2015).

A indução de autofagia após a carência de nutrientes requer a produção de peróxido de hidrogênio que oxida proteína relacionado à autofagia (ATG) 4. Das proteínas ATG, o ATG4 é a única protease que regula a autofagia pelo processamento e desconjugação do ATG8 (MARUYAMA; NODA, 2017). A modificação da oxidação inativa principalmente a atividade de delipidação do ATG4, levando ao aumento da formação de autofagossomos associados à cadeia leve 3 (SCHERZ-SHOVAL et al, 2007; POILLET-PEREZ et al, 2015)

Além da acima, que é considerado um mecanismo direto, também pode ocorrer uma indução indireta de autofagia por EROs. A proteína quinase ativada

por adenosina monofosfato (AMP) (MAPK), que pode inibir a atividade do alvo mamífero da rapamicina (mTOR), é ativada por ROS e leva à indução de autofagia (EMERLING et al, 2009) (Figura 6b)

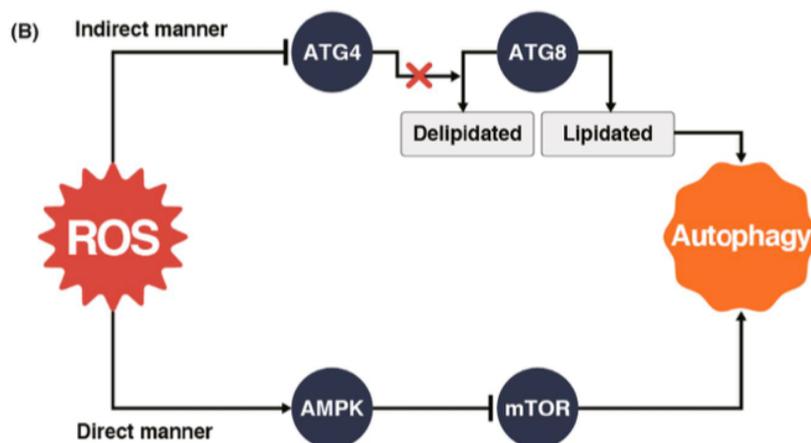


Figura 6b. ROS e morte celular por autofagia.

Adaptado de Nakamura e Takada (2021)

3.7. Papel da Anexina A2 na tumorigênese

As anexinas são uma família de proteínas multifuncionais, ligantes de fosfolípidos de forma dependente de íons Ca^{2+} .

Existem dois critérios para ser uma proteína Anexina. O primeiro é a capacidade de se ligar a fosfolípidos com carga negativa de maneira dependente do cálcio. A segunda é a contenção estrutural de uma repetição de anexina, um segmento de 70 resíduos de aminoácidos. As proteínas de anexina compreendem quatro ou oito repetições de anexina e um disco de α -hélice (GERKE;MOSS, 2002). Essas dobras permitem que a anexina se mova intracelularmente entre o citosol lipofóbico e o compartimento da membrana lipofílica de maneira dependente de cálcio (DEORA et al, 2004).

As proteínas anexina consistem em três domínios: um divergente NH₂-terminal, um C-terminal e um domínio preservado que forma o núcleo da proteína (GERKE;MOSS, 2002; WANG;LIN, 2014). Para a Anexina A2, o terminal NH₂ atua como um sítio de ligação para S100A10 e ativador de plasminogênio tecidual (t-Pa). O núcleo liga-se ao cálcio e à membrana celular. O terminal C contém o sítio de ligação para F-actina (FILIPENKO;WAISMAN, 2001), heparina (KASSAM et al, 1997) e plasminogênio (HAJJAR et al, 2004). Os substratos da

Anexina A2 revelam sua função como proteína de transporte intercelular, interagente na divisão e migração celular e principal interagente na produção de plasmina.

A proteína Anexina A2 tem sido investigada como marcador prognóstico devido à sua ampla apresentação em várias formas de câncer. Deleção do gene da Anexina A2 (ANXA2), demonstrou diminuir a síntese de DNA e a proliferação celular, sugerindo que a Anexina A2 é um fator na divisão celular (CHIANG et al, 1999).

A anexina A2 é superexpressa em carcinoma renal de células claras, câncer de mama, cervical, colorretal, endometrial, gástrico, carcinoma hepatocelular, câncer de pulmão, ovário, adenocarcinoma do ducto pancreático, glioblastoma, carcinoma urotelial, leucemia linfoblástica aguda, leucemia promielocítica aguda leucemia e mieloma múltiplo (SPIJKERS-HAGELSTEIN et al, 2013; GOPALAKRISHNAPILLAI et al, 2015; YANG et al, 2012; OHNO et al, 2012; SHARMA et al, 2006; JIN et al, 2012; CHOI et al, 2016; XIU et al, 2016; TRISTANTE et al, 2015; DENG et al, 2015; ZHANG et al, 2012; GAO et al, 2013; MOHAMMAD et al, 2008; WANG et al, 2012; PI et al, 2016).

A regulação negativa da anexina A2 é relatada no carcinoma de células escamosas esofágicas (FENG et al, 2012; LI et al, 2012). Ambos, aumento e redução da regulação de Anexina A2 foram sugeridos como marcadores prognósticos para pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas oral (RODRIGO TAPIA et al, 2007) e câncer de próstata (YEE et al, 2007; DING et al, 2010; SMITHERMAN et al, 2002).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área da pesquisa

Os frutos utilizados nessa pesquisa foram coletados no Parque da Juçara em São Luís, Maranhão, Latitude: -2.53073, Longitude: -44.3068 2° 31' 51" Sul, 44° 18' 24" Oeste (IBGE, 2010).

O exemplar de açaí utilizado já foi identificado e está depositado no Herbário Rosa Mochel do Núcleo de Estudos Biológicos da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), sob laudo de número 30 e depositado no World International Property Organization sob o registro no PI0418614-1.

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Sistema de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN) sob o código AF1ABAE.

4.2. Obtenção do extrato hidroalcoólico e do óleo da semente de *Euterpe oleracea* Mart

Os frutos do açaí foram coletados e acondicionados sob refrigeração a -20°C. Inicialmente, as amostras foram descongeladas e separados em três porções: casca, semente e fruto total. A extração seguiu a metodologia descrita por Soares de Moura et al. (2011) e Soares de Moura et al. (2012).

Para obtenção do extrato hidroalcoólico, 360g de açaí foram utilizados. Os frutos foram lavados e fervidos em água destilada. Posteriormente triturados e homogeneizados em etanol. Os extratos foram então armazenados sob proteção da luz por 10 dias. Após essa etapa, foram filtrados, concentrados e em seguida, liofilizados. Os extratos foram mantidos a -20 °C até o dia de uso (SOARES DE MOURA et al., 2011; SOARES DE MOURA et al., 2012).

Para o óleo, 360 gramas de sementes trituradas de *Euterpe oleracea* Mart foram utilizados. A extração do óleo foi realizada utilizando extrator Soxhlet (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D´ARCE, 2009). O solvente usado no processo foi o n-hexano e o tempo total de extração foi de 6 horas.

4.3. Cromatografia de Coluna Delgada (CCD)

Foram utilizados solventes grau analítico e grau cromatográfico. O adsorvente utilizado será celulose microcristalina (Avicel®) para cromatografia Merck102330-0500, cartucho C18 *stract Phenomenex*. As análises por cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatofolha de alumínio, sílica gel 60 F245, marca Merck 10005554.

Como fase móvel, utilizou-se a mistura de solventes: n-butanol: ácido acético glacial: água (40:10:50 v/v/v - fase superior). Após a eluição, o cromatograma do extrato da semente de açaí foi pulverizado com reagente de produtos naturais (NP/PEG) e observado sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 e 365 nm. Além disso, utilizou-se como fase móvel: tolueno – acetato de etila 93:7. Após a eluição, o cromatograma do óleo e do extrato da semente de açaí foi pulverizado com DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazly).

4.4. Análise do extrato de açaí por espectrometria de massas (LC M/S-M/S)

Extratos brutos de semente, polpa e fruto total de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) foram suspensos em 2 mL de MeOH para HPLC e centrifugados a 13000 rpm por 5 minutos. 100 µL da solução sobrenadante foram filtrados a 0,22 µm e diluídos em 900 µL de MeOH para HPLC.

As amostras foram analisadas usando um espectrômetro de massa LC Agilent 1200 acoplado ao Agilent iFunnel 6550 Q-ToF LC / MS. A ionização por eletropulverização foi operada em modo positivo. A tensão do fragmentador e as energias de colisão foram selecionadas seguindo as condições operacionais de acordo com cada análise durante as infusões. Até 5 precursores por ciclo foram selecionados. Fase estacionária: coluna Thermo Scientific Accucore C18 2,6 µm, 2,1 mm x 100 mm. Fase móvel: acetonitrila e ácido fórmico 0,1%. Taxa de fluxo: 0,2 mL min⁻¹. Fase orgânica no modo gradiente de 5% a 98% em 10 minutos, mantendo por 5 min, até 5% em 1,2 min e mantenha por 4,8 min. Tempo total de execução: 21 min. Volume de injeção: 2 µL.

O software Agilent Mass Hunter foi usado para processar os espectros.

4.4.1 MS/MS Molecular Networking

Uma rede molecular para *E. oleracea* Mart. foi criada usando o fluxo de trabalho no GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) (<http://gnps.ucsd.edu>). Os dados foram filtrados removendo todos os picos de MS/MS dentro de +/- 17 Da do precursor m/z. Os espectros de massa foram filtrados escolhendo apenas os 6 picos superiores na janela de +/- 50 Da em todo o espectro.

Os dados foram então agrupados com MS-Cluster com uma tolerância de massa parental de 2,0 Da e uma tolerância de íon de fragmento de 0,5 Da para criar espectros de consenso, com pelo menos 2 espectros em cada cluster. Os espectros foram pesquisados no banco de dados do GNPS, de forma semelhante aos dados de entrada. Os espectros obtidos e os disponíveis na biblioteca precisavam ter pelo menos 6 picos correspondentes e pontuação >0,7.

Os espectros de MS/MS foram visualizados com Cytoscape v.3.7.1 (The Cytoscape Consortium, New York, NY, USA).

4.5 Esterificação do Óleo

O óleo bruto de *Euterpe oleracea* Mart foi analisado sob a forma de ésteres metílicos, preparados de acordo com Hartman e Lago (1973) adaptado de Lima (2007).

Pesou-se 100mg do óleo para análise. Foi adicionado 4mL de hidróxido de sódio em metanol a 0,5mol/L. A mistura foi aquecida para dissolução das micelas de gordura e posteriormente resfriados em água corrente. Posteriormente, adicionou-se 5mL de uma solução de cloreto de amônio, dissolvidos em 30 mL de metanol e 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, sob agitação. Após essa etapa, uma solução saturada de cloreto de sódio foi adicionada e o tubo foi agitado durante 30 segundos. Por fim, adicionou-se 5 mL de hexano, e o tubo foi agitado em Vortex por 30 segundos e deixado em repouso para separação das fases e análise cromatográfica.

4.5.1 Análise do óleo por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS)

A identificação dos ácidos graxos foi realizada através do Cromatógrafo a gás (CG-2010) acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM QP2010 Plus) (Shimadzu), usando uma coluna capilar ZB-FFAP (30m x 0,25mm x 0,25µm).

Os parâmetros do CG-MS foram os seguintes:

Fluxo de gás de arraste: 30cm/sec;

Fluxo da Coluna: 1,0 mL/min;

Temperatura do forno: 120°C por 2 min;

Rampa de aquecimento: 10°C/min até 180°C por 5 min e 5 °C /min até 230°C, permanecendo até 25min;

Temperatura do injetor: 200° C

Temperatura da fonte de íons: 250 °C

Modo de injeção: Split com razão de 50.

A quantificação dos ácidos graxos foi realizada por normalização das áreas dos picos, e a identificação dos ésteres provenientes dos ácidos graxos que compõem o óleo foi feita através da biblioteca do equipamento NIST08 (National Institute of Standards and Technology).

4.6 Avaliação da atividade antioxidante por DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazily)

Para o ensaio de DPPH, alíquotas de extrato e óleo da semente de açaí foram misturadas a 2,5 mL de solução metanólica de DPPH (0,06 mM) e deixadas reagir por meia hora, no escuro. As medidas foram realizadas em 515 nm com a aplicação de um espectrofotômetro Turner® 340 (Barnstead / Thermolyne, Dubuque, IA, EUA). A análise foi realizada em triplicata e medido o declínio na concentração de absorvância do radical DPPH causado pelas amostras. Os resultados são expressos em % de redução do radical de acordo com esta equação.

Equação 1: Atividade antioxidante (%) = $[1 - (\text{absorbância da amostra} / \text{absorbância de controle}) \times 100$.

Uma amostra em branco foi preparada usando etanol. A curva padrão Trolox foi fornecida como controle positivo.

4.7. Linhagens celulares

As linhagens celulares Caco-2, HCT-116 e HT-29, derivadas de adenocarcinoma de cólon humano, MCF-7, derivada de adenocarcinoma mamário humano, HeLa, derivada de adenocarcinoma de cérvix uterina, NCI-H460, derivada de adenocarcinoma de pulmão tipo não pequenas células e GM (fibroblastos humanos) foram cultivados em meio Dulbecco's modificado (DMEM) (Invitrogen) suplementado com antibiótico: penicilina G (60 mg/L) e estreptomicina (100 mg/L) e soro fetal bovino (10%), a 37 °C e 5% de CO₂.

As linhagens CACO-2, HCT-116 e HT-29 foram gentilmente cedidas pelo Instituto Nacional de Câncer. As células NCI-H460 foram cedidas pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) e as linhagens MCF-7 e GM são provenientes da ATCC.

4.8. Tratamentos com o extrato e óleo da semente de *Euterpe oleracea Mart*

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®) na concentração de 0,1 g/mL (soluções-estoque). Células cultivadas (1x10⁴ células/mL) foram tratadas com 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/mL de extrato e 0,25, 2,5, 25 e 100 µg/mL óleo de semente de açaí por 24, 48 e 72h. Células GM (1x10⁴ células/mL) foram tratadas com 7,8 a 1000 µg/mL de extrato e óleo de semente de açaí por 24h. Seis poços foram incluídos para controle (meio DMEM).

4.9. Ensaio de Viabilidade Celular – MTT

Para a realização do ensaio de viabilidade celular (MTT), as células foram separadas, tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e posteriormente aliquotadas em uma densidade de inoculação de 1×10^4 células/ml, utilizando placas de 96 poços na presença ou não do extrato e do óleo nas diferentes concentrações. Após 24 e 48 horas de tratamento, 200 µl de meio novo foi aliquotado, sendo adicionado 10 µl de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) para quantificação de células com viabilidade celular.

As células foram reincubadas em estufa de CO₂ por 3 horas, em ambiente protegido da luz. Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 1200 rpm, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 100 µl de DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados a cada poço. A leitura foi realizada no Spectra Max 190® (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) com comprimento de onda de 538 nm (SILVA, 2014).

Diante dos resultados iniciais e para avaliar o mecanismo de ação do óleo da semente de açaí, as células CACO-2, HCT-116 e HT-29 foram pré-tratadas com n-acetilcisteína, conhecido antioxidante, nas doses de 2,5, 5 e 10mM por 2h antes do tratamento com o óleo da semente de açaí. As células foram quantificadas usando azul de Tripán para avaliar a porcentagem de células viáveis e posteriormente foi realizado ensaio de viabilidade celular com MTT.

4.10 Ensaio Clonogênico

Células MCF-7 (7×10^2 células/mL) foram tratadas com 10 e 15 µg/mL de extrato de semente de açaí e cultivadas por 15 dias em placas de 12 poços para determinar os efeitos do tratamento sobre o potencial clonogênico das células. As colônias formadas foram fixadas com etanol (200 µL) por 10 min, coradas com uma solução de cristal violeta (0,05% de violeta de cristal e 20% de etanol) por 10 min, lavadas duas vezes com água destilada e solubilizadas com ácido acético 33%. A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro Spectra Max 190® (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) com comprimento de onda de 595 nm.

4.11. Avaliação da morfologia celular por microscopia de luz invertida, *Time-lapse* e microscopia eletrônica

Para análise da morfologia celular, as células foram cultivadas em placas de 12 poços na presença ou não do extrato e óleo por 24 e 48 horas.

A morfologia das células foi analisada por microscopia de luz utilizando um microscópio invertido Axio Observer Z1 equipado com uma câmara AxioCam HRc Ver.3 e a aquisição das imagens com o software Axiovision Release 4.8.1 (Carl Zeiss Inc., Alemanha).

As amostras tratadas com o extrato foram examinadas no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) da Universidade Estadual de Campinas, utilizando o Microscópio de Fluorescência Invertido APOPTOME para Time-Lapse (Carl Zeiss AG, Alemanha) equipado com um 5X, Objetivo de contraste de fase 0,15 NA, uma incubadora de estágio personalizado capaz de abrigar até quatro placas de Petri de 35 mm e software *in vitro* 3.2 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD). Cada experimento foi repetido em triplicata, resultando em um total de 48 sequências de imagens (12 sequências de imagens de microscopia em tempo real- tempo de contraste de fase por grupo de tratamento). As imagens foram adquiridas com uma frequência de 5 minutos ao longo de 24 horas. As imagens do microscópio eram de 1392 × 1040 pixels com uma resolução de 1,3 µm/pixel.

Para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET) as células foram inicialmente cultivadas em garrafas pequenas de 25 cm² e tratadas com o extrato da semente de açaí (25 µg/mL) por 24h.

Após o tratamento, as células foram lavadas três vezes em PBS e fixadas por 24h em fixador Karnovsky. As células foram novamente lavadas em tampão fosfato de Sorensen e posteriormente fixadas com tetróxido de ósmio.. A pós-fixação foi realizada com uma solução de tetróxido de ósmio 1% por 1-2h em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e lavadas novamente com tampão fosfato de Sorensen. Após nova centrifugação, foi iniciada a desidratação das amostras em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), por 5 minutos em cada solução. A infiltração foi iniciada com a incubação das amostras em solução de resina Dr. SPURR e acetona 100% (1:1) overnight. Posteriormente, as amostras foram

incubadas em resina pura por 6 horas e incluídas em formas para polimerização em estufa a 60-70°C por 48 horas (SILVA, 2014)

Os cortes ultrafinos (70nm) foram realizados no ultramicrotomo Leica-Reichert Ultracut (Wetzlar, Germany). A contrastação foi feita em acetato de uranila 4% e citrato de chumbo.

A observação foi feita no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 906 (Oberkochen, Germany) no Centro de Microscopia e Imagem da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP).

4.12. Determinação de caspases 3 e 7 ativas por Citometria de Fluxo

Para avaliar os mecanismos de morte induzidos pelo extrato da semente do açaí, as células apoptóticas foram marcadas com o kit de ensaio Vybrant® FAM Caspase 3 e 7 (Molecular Probes, OR) de acordo com as instruções do fabricante. Células MCF-7 foram tratadas com 25 e 250 µg/mL de extrato de semente de açaí por 6 e 24h. Depois disso, as células foram colhidas e ressuspensas a uma concentração de 1×10^6 células/mL em meio de cultura fresco.

Alíquotas (300 µl) de suspensões de células foram transferidas para tubos de fluxo e 10 µl de uma solução de marcação de inibidor fluorescente de caspase (FLICA) foram adicionados a cada tubo, exceto para o controle negativo. As células foram incubadas por 1h a 37°C, lavadas duas vezes e ressuspensas em 400 µl de tampão de lavagem. Foi adicionado iodeto de propídio (PI) e os tubos foram incubados por 5–10 min em gelo antes da análise com citômetro de fluxo FACSCalibur (Beckton Dickinson). Canais de fluorescência - 1 e fluorescência - 3 foram usados para detectar os sinais que chegam de FLICA e PI, respectivamente.

As células marcadas com Vybrant FAM Caspase-3 and-7 Assay Kit foram analisadas por citometria de fluxo (2000 eventos) usando 488 nm de excitação e a detecção de fluorescência foi realizada a 530 nm para o marcador Alexa Fluor® (sinal FAM) e a 650-670 nm para o corante Texas Red® (sinal de iodeto de propídio). As células que não foram expostas ao kit foram utilizadas como controle para determinar a autofluorescência sob as mesmas condições.

4.13 Ensaio com Anexina – V

Para esse ensaio de morte celular, foram utilizadas as linhagens CACO-2, HCT-116 e HT-29 (1×10^5 células/mL) tratadas com 25 $\mu\text{g/mL}$ de óleo da semente de açaí.

A apoptose foi analisada usando o ensaio de coloração de Anexina V/PI para detectar células apoptóticas precoces, tardias e células vivas; as células foram lavadas em PBS gelado e ressuspensas em 100 μL de tampão de ligação de Anexina V (0,1 M HEPES/NaOH (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl_2) contendo Anexina V-FITC e PI (1 $\mu\text{g/mL}$) por 15 minutos. As amostras foram analisadas com citômetro de fluxo FACSCalibur e software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA).

A excitação foi realizada por um laser de argônio a 488 nm e a detecção de fluorescência foi realizada a 650-670 nm (PI) e 670 nm (7-AAD) (2000 eventos).

4.14. Ciclo celular

Para este ensaio, foram utilizadas as linhagens CACO-2, HCT-116 e HT-29. Foram utilizadas placas de 6 poços para esse ensaio. Foram inoculados 1000 μL por compartimento (1×10^5 céls/mL). Após 24h de incubação, as células foram tratadas com 25 $\mu\text{g/mL}$ do óleo da semente de açaí em triplicata.

Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, lavadas uma vez com PBS gelado e depois coradas com 75 μM de iodeto de propídio (PI) por 10 min em um tampão contendo 3,4 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM NaCl, 0,2% Triton X-100, e 3500 U/L RNase. O conteúdo de DNA foi examinado coletando 10.000 eventos para análises de ciclo celular e sub-G1 usando um citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Transduction Labs, Lexington, KY) e software Mod Fit LT.

A excitação foi realizada por um laser de argônio de operação a 488 nm e a detecção de fluorescência foi realizada a 650-670 nm (PI).

4.15. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo (DAF-2DA)

Para medir os níveis de ROS, as células MCF-7 foram tratadas com 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de semente de açaí por 6 e 24h e depois lavadas duas vezes com PBS. As células foram então marcadas com 10 μM de diacetato de 4,5-diaminofluoresceína-2 (DAF-2DA, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) por 20 min em temperatura ambiente no escuro.

A fluorescência verde emitida pelo DAF-2DA foi registrada em 515 nm usando um citômetro de fluxo (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), e 10.000 eventos foram contados por amostra (EOM et al., 2015).

4.16. Laranja de Acridina

Laranja de acridina (AO) é um corante lisotrópico que se acumula em organelas ácidas de uma maneira dependente do pH e é comumente usado para identificar organelas vesiculares ácidas (AVOs) (KANZAWA *et al.*, 2003).

As células MCF-7 com ou sem 25 µg/mL de extrato de semente de açaí foram semeadas em placas de fundo de vidro de 3 cm por 24 horas e expostas ao meio de coloração laranja de acridina (1 µg/mL em meio completo) por 45 min. Todos os processos de tratamento foram realizados evitando a iluminação ambiental. As placas foram imediatamente embrulhadas em papel alumínio e submetidos a imagens fluorescentes.

A porcentagem de células vermelhas (organelas vesiculares ácidas) positivas foi calculada em 5 fotos de cada condição e os resultados são apresentados no histograma inferior.

As amostras foram examinadas no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) da Universidade Estadual de Campinas, utilizando o microscópio de fluorescência invertida APOTOME (Carl Zeiss AG, Alemanha) equipado com fonte de luz fluorescente de 130 W. O bloco de filtro foi usado contendo um filtro de excitação passa-banda de 465 a 495 nm, espelho dicróico de 505 nm e filtro de barreira de passagem longa de 590 nm.

4.17. Extração total de proteínas e Western Blotting

O western blotting foi realizado conforme descrito por Albuquerque-Xavier et al. (2012). Inicialmente as células foram tratadas por 12 horas com o óleo da semente de açaí e posteriormente, o conteúdo protéico extraído. O lisado total das células foi obtido através da incubação das células com tampão de lise (1% Triton X-100, 0.5% deoxicolato de sódio, 0.2% SDS, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 10mM HEPES (pH 7.4) contendo 20mM NaF, 1mM ortovanadato e coquetel inibidor de protease (diluição 1:100) por 30 min a 4°C. Após centrifugação 10,000g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi removido e armazenado a -20°C até posterior utilização.

O conteúdo proteico foi avaliado com um kit comercial BCA (BioRad, Hercules, CA, USA). As proteínas (40µg/ml) foram separadas eletroforéticamente por SDS-PAGE em géis de 13% e transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad) por 1h a 10V. As amostras foram mantidas em tampão de bloqueio com leite desnatado a 5% por 60 min. A membrana foi incubada overnight a 4°C com anticorpo anti-LC3B (1:1500), anti-Bax (1:250), Anti-Bcl-2 (1:1500), Anti-anexina A2 total e fosforilada (1:1400). Posteriormente, a membrana foi lavada em tampão TBS-T e incubada por 60 min com anticorpo secundário conjugado a peroxidase.

A reatividade das proteínas estudadas foi determinada por kit comercial de quimioluminescência (Amersham Biosciences GE, Buckinghamshire, UK).

4.18 Docking Molecular

4.18.1 Obtenção da estrutura tridimensional da Anexina A2 e construção dos ligantes

A estrutura tridimensional da Anexina A2 (ANXA2) foi obtida no servidor online *Protein Data Bank* (www.rcsb.org), sob o código 2HYU, e consiste na proteína complexada com um tetra-sacarídeo derivado da heparina (SHAO et al., 2006) (Figura 7). Essa estrutura tridimensional foi utilizada para os estudos de modelagem molecular das interações entre a ANXA2 e as moléculas dos ácidos graxos mais prevalentes no óleo da semente de açaí.



Figura 7. Estrutura tridimensional da Anexina A2 (estrutura secundária mostrada em verde) complexada com um derivado da heparina (em azul) (Protein Data Bank, código 2HYU).

As estruturas tridimensionais dos cinco ácidos graxos investigados nesse trabalho foram construídas utilizando-se o programa Spartan 08 (HEHRE;

DEPPMEIER; KLUNZINGER, 1999) com o método semiempírico PM3 (STEWART, 2004) para minimização da energia da estrutura. As cargas parciais dos átomos dos ácidos graxos foi calculada pelo método Natural Population Analysis (REED; WEINSTOCK; WEINHOLD, 1985). Em seguida, as estruturas tridimensionais foram exportadas para o programa Molego Virtual Docker (MVD[®]) para condução dos estudos de ancoramento molecular.

4.18.2 Ancoramento molecular no MVD[®]

Com o objetivo de verificar a região preferencial da proteína para ancoramento dos cinco ácidos graxos em estudo (ácido láurico, ácido linoleico, ácido mirístico, ácido oleico e ácido palmítico), todos esses ligantes foram submetidos a uma corrida com retorno das cem melhores poses por ligante. O espaço esférico de busca foi definido de maneira a englobar toda a proteína de modo a se verificar a(s) região(es) com o maior número de poses.

Em seguida, mais corridas de ancoramento molecular foram conduzidas, desta vez restringindo-se o espaço de busca às duas regiões que concentraram um maior número de poses na simulação anterior de ancoramento molecular. Assim, dois novos espaços de busca foram definidos para as simulações seguintes de ancoramento de maneira a se restringir o ancoramento dos ligantes a essas duas regiões preferenciais.

Para cada um dos dois espaços de busca citados acima, foram conduzidas seis corridas de ancoramento molecular com retorno das trinta melhores poses por corrida. Essas poses foram analisadas quanto à sua pontuação Moldock, que é um indicativo da energia de interação proteína-ligante e também quanto à própria posição de cada ligante na superfície da proteína. Em seguida, a pose cada ligante julgada mais representativa, e estável em cada espaço de busca, foi levada para simulações de dinâmica molecular (DM), totalizando, portanto, dez poses, sendo duas por ligante.

4.19 Dinâmica molecular (DM)

Os arquivos dos ligantes e das proteínas formadoras de cada complexo proteína-ligante foram exportados nos formatos *.mol2* (ligantes) e *.pdb* (proteína). Cada ligante foi então submetido aos programas Open Babel (O'BOYLE et al., 2011) e *Antechamber Python Parser Interface* (ACPYPE) (SOUSA DA SILVA; VRANKEN, 2012) para geração dos arquivos de coordenadas (extensão *.gro*) e de topologia (extensão *.itp*) a serem reconhecidos

pelo campo de força OPLS/AA (JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996; KAMINSKI et al., 2001).

Os arquivos de coordenadas (extensão *.gro*) e de topologia (extensão *.top*) da proteína foram gerados com a rotina *pdb2gmx* do GROMACS 2019.4 (ABRAHAM et al., 2015; PRONK et al., 2013), selecionando-se o campo de força OPLS/AA (JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996; KAMINSKI et al., 2001) para geração dos parâmetros. Este campo de força foi escolhido por ter apresentado diversos resultados concordantes com dados experimentais existentes para simulações de biomoléculas em fase condensada (LEACH, 2001), sendo, portanto, considerado adequado para o estudo do comportamento dinâmico da ANXA2 em fase aquosa.

Em seguida, um arquivo de coordenadas do sistema proteína-ligante foi formado pela adição das coordenadas de cada ligante ao arquivo de coordenadas da proteína. Analogamente, o arquivo de topologia da proteína foi alterado de modo a incluir o arquivo correspondente do ligante.

Cada sistema proteína-ligante foi então centrado em uma caixa cúbica de volume 929 nm^3 , com distância mínima entre o soluto e a parede da caixa de $1,5 \text{ nm}$, contendo em torno de 28.000 moléculas de água do tipo TIP3P (JORGENSEN et al., 1983) sob condições periódicas de fronteira (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990). A partir desta configuração inicial, o sistema foi relaxado pela condução de duas etapas de minimização de energia de 100 ps cada.

A primeira etapa ocorreu com restrição de posição da proteína e do ligante, com a finalidade de acomodar as moléculas de água ao redor do complexo. Em seguida foi conduzida uma segunda etapa de minimização de energia sem restrição de posição, para se atingir um mínimo local da superfície de energia de potencial. As duas etapas de minimização de energia foram feitas utilizando-se o algoritmo *steepest descent* com critério de convergência de $100,0 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$. Em seguida, conduziram-se duas etapas de equilibração, de 100 ps cada, com o intuito de se levar o sistema para as condições de temperatura igual a 310 K e pressão igual a 1 bar , simulando condições fisiológicas. A primeira equilibração ocorreu a temperatura e volume constantes (conjunto NVT) e a segunda ocorreu a temperatura e pressão constantes (conjunto NPT). A estabilidade da temperatura e da pressão foram mantidas usando-se,

respectivamente, o termostato *Velocity-rescale* (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007) e o método de acoplamento de pressão de Parrinello-Rahman (PARRINELLO; RAHMAN, 1981).

Por fim, a etapa de produção da simulação de DM, consistindo em uma simulação de 50 ns, foi conduzida a 310 K e 1 bar, usando tempo de integração de 2 fs e um limite de corte de 1,2 nm para interações de VDW de curto alcance e interações eletrostáticas. As coordenadas do complexo e os dados de energia foram armazenadas a cada 10 ps para possibilitar a posterior análise temporal de propriedades como energia total, desvio da raiz quadrática média (DRMQ) e número médio de ligações hidrogênio. As análises foram realizadas por meio dos programas Xmgrace 5.1.25 (TURNER, 2005) e Visual Molecular Dynamics 1.9.3 (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

Experimentos *in vivo*

4.20 Avaliação da atividade antitumoral do extrato da semente de açaí (*Euterpe oleracea*) *in vivo*

4.20.1 Local de experimentação

Os procedimentos experimentais foram realizados no Biotério Setorial da Pós-graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

A eutanásia e análise do tumor, bem como a coleta de sangue, plasma e dissecação dos órgãos analisados ocorreram no Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer (LIAC) da UFMA sob supervisão da Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo-Santos.

As células de tumor de Ehrlich utilizadas nessa pesquisa foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento do Laboratório de Imunofisiologia da UFMA.

4.20.2 Animais e aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão sob o número 23115.024027/2020-64 (ANEXO 1).

Foram utilizados 66 camundongos Swiss machos, com peso variando entre 35-50g com 90-120 dias de idade, obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão e mantidos no biotério setorial do prédio da Pós-Graduação do CCBS. Os animais foram adaptados no período de 7 dias, mantidos em ambiente com controle de temperatura e umidade, ciclo claro/escuro de 12h, com água e ração *ad libitum*.

4.20.3 Inoculação do tumor e tratamento dos animais

As células tumorais de Ehrlich foram mantidas na forma ascítica, até 20 passagens, por passagens peritoneais em camundongos Swiss machos por transplante semanal de 5×10^5 células tumorais/animal em PBS (pelo menos, dois animais por semana). Para o teste, as células foram preparadas na densidade de $2,5 \times 10^6$ células ($60 \mu\text{L}$ /animal) em PBS após avaliação da viabilidade celular com azul de tripan na câmara de Neubauer. As células foram inoculadas no dorso.

O experimento foi conduzido de acordo com Kleeb et al.(1997) com algumas modificações, sendo utilizados camundongos da linhagem swiss (n=8-9/grupo).

O tratamento no grupo preventivo foi iniciado 30 dias antes da inoculação do tumor e mantido por 15 dias após indução e no grupo terapêutico iniciado após 24h da indução e mantido por 15 dias (CUNHA et al, 2019). Após os tratamentos, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico (cetamina + xilazina) e o tumor removido, pesado, fotografado e aliqotado para análises histológicas e histoquímicas. Foi determinado o peso relativo tumoral, que é a diferença entre o peso tumoral dividido pelo peso corporal.

Os animais foram separados aleatoriamente em 8 grupos (n=8/9/grupo) conforme o Quadro 1. Os grupos preventivo e terapêutico na dose de 1000mg/kg tiveram 9 animais/grupo.

Quadro 1. Divisão dos grupos experimentais

Grupos	Tratamento	Tumor
Controle negativo (CTL-)	Salina	Com indução tumoral
Controle positivo (CTL+)	Ciclofosfamida 25mg/kg	Com indução tumoral
Grupo preventivo com extrato 100mg/Kg	Extrato 100mg/kg	Com indução tumoral
Grupo preventivo com extrato 300mg/Kg	Extrato 300mg/kg	Com indução tumoral
Grupo preventivo com extrato 1000mg/Kg	Extrato 1000mg/kg	Com indução tumoral
Grupo terapêutico com extrato 100mg/Kg	Extrato 100mg/kg	Com indução tumoral
Grupo terapêutico com extrato 300mg/Kg	Extrato 300mg/kg	Com indução tumoral
Grupo terapêutico com extrato 1000mg/Kg	Extrato 1000mg/kg	Com indução tumoral

4.20.4 Procedimentos experimentais

Os animais dos grupos veículo e experimental foram tratados por via oral por gavagem e os do grupo ciclofosfamida foram tratados por via intraperitoneal diária durante o período descrito para cada grupo.

Os parâmetros clínicos (locomoção, comportamento, aspecto da pelagem e cianose) foram avaliados a cada dia de tratamento e o peso corporal

e o consumo de ração foram avaliados a cada 2 dias antes da indução tumoral e diariamente após indução tumoral.

No 16º dia após a anestesia, amostras de sangue (300 µL, em eppendorfs contendo EDTA 10%, 1 gota/tubo) foram coletadas de cada animal por punção cardíaca. Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com uma mistura de 120 mg/kg de ketamina e 150 mg/kg de xilasina.

O sangue foi utilizado para avaliação de parâmetros hematológicos e o plasma para quantificação de citocinas.

As necropsias foram realizadas em cada camundongo para avaliar a toxicidade grosseira para alguns órgãos (rins e fígado) e para remover a massa tumoral. O peso relativo do tumor (RTW) foi calculado como o peso do tumor dividido pelo peso corporal final. O peso do fígado e do rim também foram analisados de forma absoluta e relativa.

4.20.5 Avaliação da celularidade nos órgãos linfoides

O baço foi retirado após eutanásia e pesado. Após, células do baço e da medula óssea foram analisadas para avaliação dos efeitos do tratamento com extrato da semente de açaí.

Para contagem das células do baço, o órgão foi retirado após eutanásia, triturado e macerado em 3mL de PBS. Para análise da medula óssea, o fêmur foi retirado e perfundido com 1mL de PBS para obtenção das células.

As células foram contadas em câmara de Neubauer, sendo retirados 90 µL das suspensões celulares e adicionados 10 µL de cristal violeta (FIALHO, 2011).

4.20.6 Quantificação de citocinas

A quantificação das citocinas interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-17a (IL-17a), MCP-1, interferon-γ (IFN-γ), fator de necrose tumoral (TNF) foi realizada por citometria

de fluxo com o equipamento FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), utilizando o kit de citocinas BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante.

4.20.7 Avaliação histopatológica e imunohistoquímica

As análises histopatológicas e imunohistoquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisa René Rachou, sob supervisão do Prof. Dr. Marcelo Pascoal Xavier.

As amostras de rim, fígado e dos tumores induzidos foram fixadas em formaldeído a 10% tamponado (pH=7.0) e incluídas em blocos de parafina. Foram obtidos cortes histológicos com 5 µm de espessura, que foram corados com hematoxilina e eosina e analisados através de microscópio óptico.

As seguintes variáveis foram analisadas:

TT	Tamanho do tumor	Maior diâmetro em milímetro (mm)
IP	Índice proliferativo	Número de mitoses por 10 campos de grande aumento (mitoses/10CGA)
N	Necrose Infiltrado	Proporção ou percentual de necrose em relação ao tumor viável (%)
IIP	inflamatório peritumoral	Intensidade do infiltrado inflamatório (0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; e 3 = acentuado)
AH	Arquitetura histológica	Alteração na arquitetura histológica (0 = ausente; 1 = presente)
MX	Metástases	Presença de metástases (0 = ausente; 1 = presente)

Os mesmos tecidos utilizados na análise histopatológica foram utilizados para as imunomarcações. Foram obtidos cortes com 5µm de espessura. A recuperação antigênica foi em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C em micro-ondas ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H₂O₂ (0,3% em metanol) com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina do soro bovino (BSA) 3%, em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente.

Os anticorpos primários utilizados foram anti-anexina A2 e anti-Bax (Cell Signaling Technology) de acordo com as instruções do fabricante (Bersudsky et

al., 2014; Fang et al., 2013). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB), contra-corados com Hematoxilina de Harris e avaliados no fotomicroscópio Zeiss Axiophot (Zeiss, Munique, Alemanha).

4.21 Análise Estatística

Para análise estatística, foi realizado o teste de variância de uma ou duas vias (one-way ou two-way ANOVA), seguido pelos pós-testes de Dunnett's Tukey's ou Sidak's, de acordo com o tipo de análise. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O programa utilizado para realização da análise estatística foi o GraphPad Prism versão 8.4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

5. RESULTADOS

5.1 Cromatografia de Coluna Delgada (CCD)

A cromatografia de coluna delgada evidenciou uma expressiva quantidade de compostos que foram posteriormente analisados por LC MS/MS (Figura 8). Na Fig 8A evidencia-se a presença de flavonoides no extrato e na Fig 8B evidencia-se a presença de ácidos graxos.

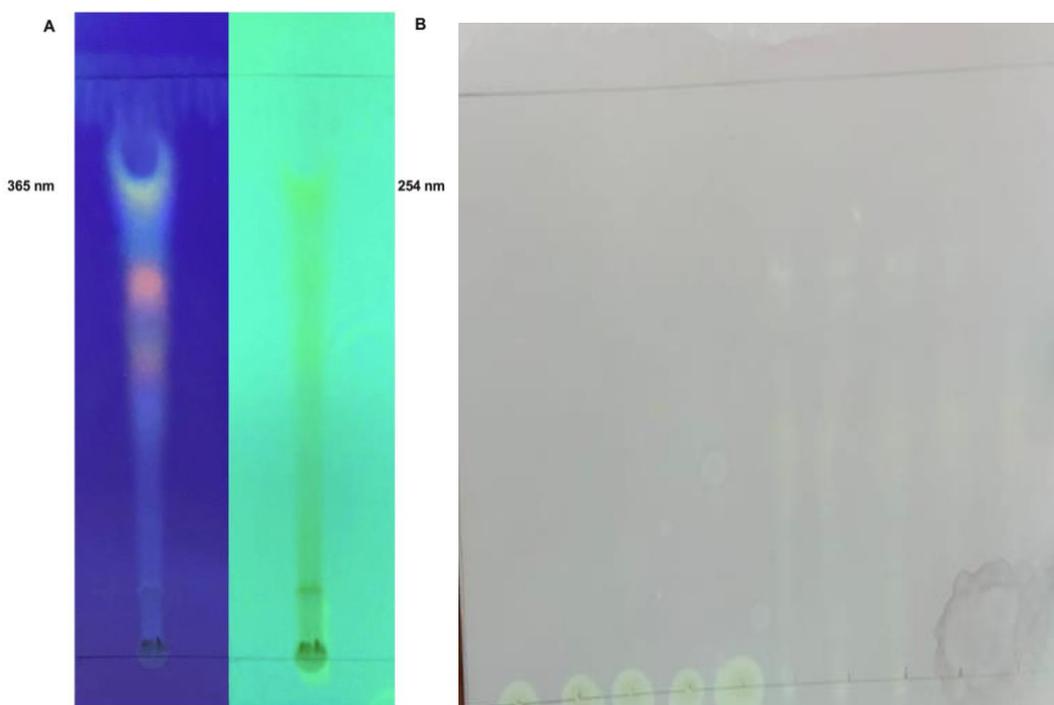


Figura 8. Cromatografia em camada delgada do extrato hidroalcoólico da semente de açaí a 365 e 254 nm (a) utilizando o revelador NP/PEG e do óleo e extrato da semente de açaí utilizando o revelador DPPH (b).

5.2 Composição Química do Extrato (LC M/S-M/S)

Para os extratos de *Euterpe oleracea* Mart., a rede molecular identificou 15 compostos, especialmente flavonoides e antocianinas. Os compostos principais foram: (-) - epicatequina (1), cianidina 3-glucosídeo (2), procianidina B2 (3), kaempferol-3-O-rutinosídeo (4), nobiletina (5), dihidrokaempferol (6), diosmetina (7), 3-O-metilquercetina ou isorhamnetina (8) isoorientina (9), genisteína-8-C-glicosídeo (10) e apigenina 6,8-digalactosídeo (11) (Figura 9).

As estruturas químicas representativas de cada composto são evidenciadas na Tabela 1.

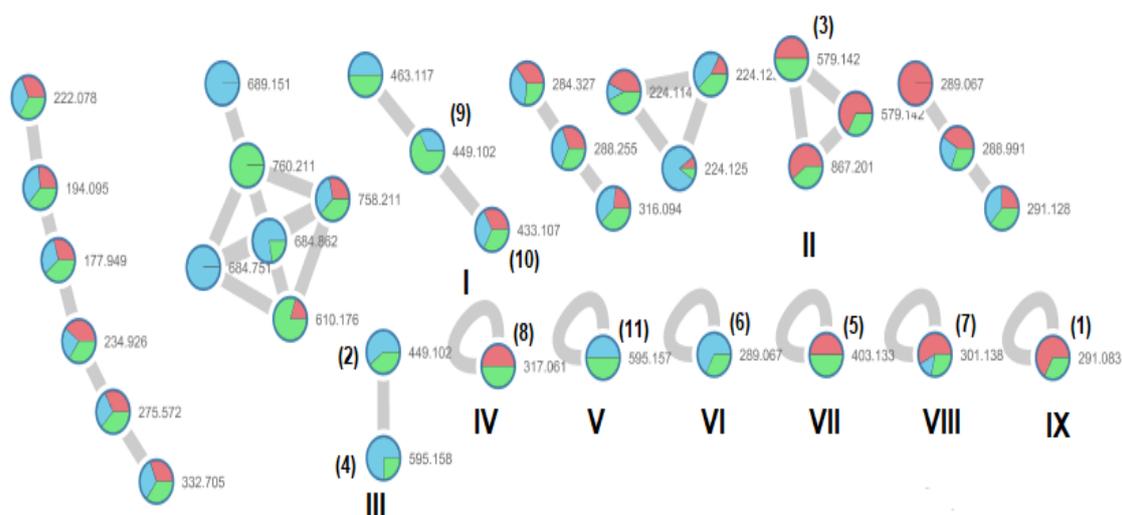
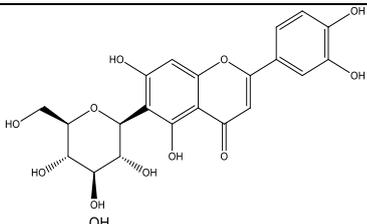
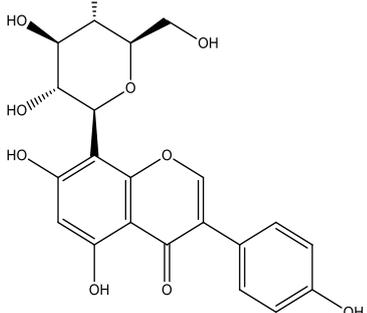
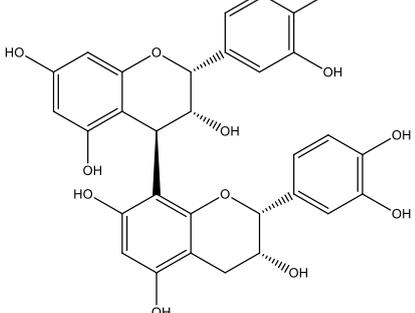
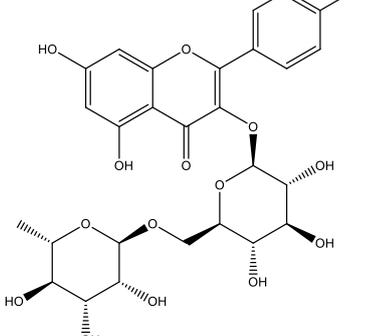
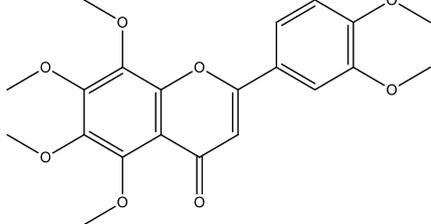


Figura 9. Zoom na análise MS/MS dos extratos de sementes, polpas e frutos totais de *E. oleracea* Mart. As cores indicadas na legenda correspondem aos diferentes extratos (vermelho: semente; azul: polpa e verde: fruto total). Os nós em negrito circundados por linhas azuis representam os compostos com ocorrências na biblioteca do GNPS.

Tabela 1. Identificação de compostos químicos do extrato de açaí por LC-ESI-MS.

Composto	Estrutura	m/z calculada	m/z observada	Erro (ppm)	Partes do açaí
1		291.0863	291.0848	-5.15	Semente e fruto total
2		449.1078	449.1056	-4.89	Polpa e fruto total
3		579.1497	579.1481	-2.76	Semente e fruto total
4		595.1657	595.1628	-4.87	Polpa e fruto total
5		403.1387	403.1371	-3.96	Semente e fruto total

6		289.0707	289.0695	-4.15	Polpa e fruto total
7		301.0707	301.0695	-3.98	Semente e fruto total
8		317.0656	317.0643	-4.10	Semente e fruto total
9		449.1078	449.1060	-4.00	Polpa e fruto total
10		433.1129	433.1110	-4.38	Semente, polpa e fruto total
11		595.1657	595.1632	-4.20	Polpa e fruto total

5.3 Composição Química do Óleo (GC-M/S)

Em 360 gramas da semente obteve-se um rendimento de aproximadamente 5,6% em peso seco de óleo. Evidenciou-se 49,3% de ácidos graxos saturados e 50,7% de ácidos graxos insaturados, sendo 29,7% monoinsaturados e 20,8% poli-insaturados.

Os percentuais de ésteres são demonstrados no perfil cromatográfico do óleo na tabela 2 e na figura 10. Observa-se que os ésteres metílicos majoritários são provenientes dos ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), linoleico (C18: 2) e oleico (C18: 1), sendo que o último apresentou um maior percentual.

Tabela 2. Ésteres provenientes dos ácidos graxos existentes no óleo da semente da *Euterpe oleracea* Mart.

Ácido graxo	Picos	Cadeia carbônica	% de área Tempo de retenção (min)	Tr (min)
Ácido cáprico	01	C10:0	0,13	3,429
Ácido láurico	02	C12:0	8,9	5,407
Ácido mirístico	03	C14:0	18,03	7,508
Ácido palmítico	04	C16:0	16,61	9,845
Ácido palmitoleico	05	C16:1	0,58	10,206
Ácido esteárico C18:0	06	C18:0	1,81	13,765
Ácido oleico	07	C18:1	26,94	14,228
Ácido (isômero)	08	C18:1	2,21	14,348
Ácido linoleico	09	C18:2	19,92	15,223
Ácido linolênico	10	C18:3	0,62	16,538
Ácido nanodecenóico	11	C19:0	0,21	17,985
Ácido eicosenoico	12	C20:0	0,35	18,326
Ácido mirístico	13	C14:0	1,75	19,134
Ácido behenico	14	C22:0	0,43	21,586
Ácido eicosatrienóico	15	C23:0	0,22	21,904
Ácido palmítico	16	C16:0	0,88	22,649
Ácido tricosanotrienóico	17	C23:0	0,22	23,212

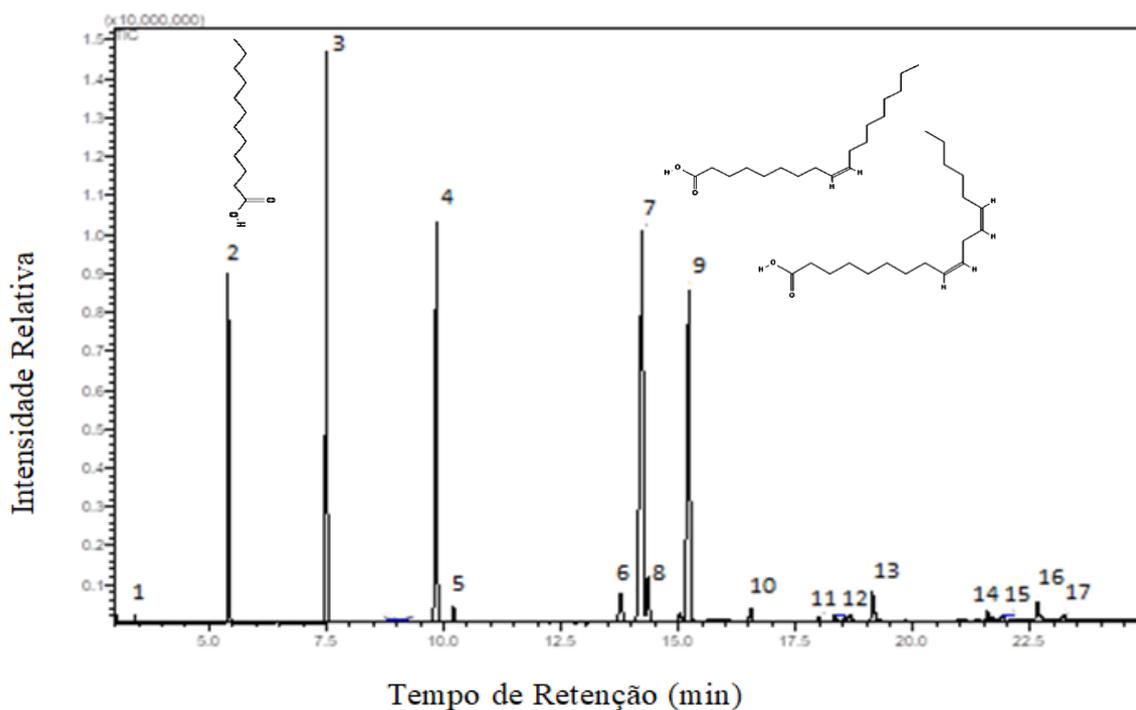


Figura 10. Cromatograma dos ésteres provenientes dos ácidos graxos do óleo da semente da *Euterpe oleracea* Mart.

5.4 Atividade Antioxidante - DPPH

A atividade antioxidante do extrato da semente de açaí (%) aumentou proporcionalmente com a concentração do extrato, atingindo 86,8% da atividade antioxidante máxima na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. O valor de EC₅₀ (concentração necessária para atingir 50% da atividade antioxidante) foi de 61,8 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 11A).

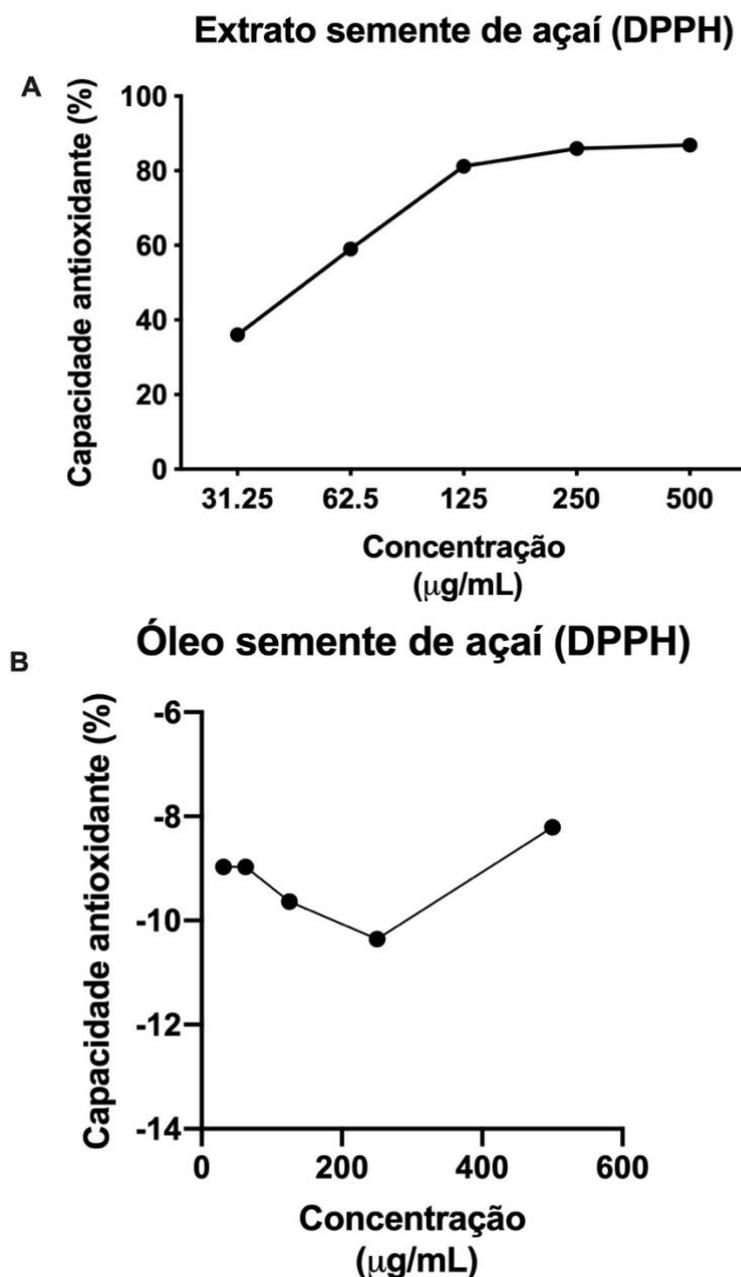


Figura 11. Determinação da atividade sequestrante do radical DPPH do extrato (A) e óleo (B) da semente de açaí. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5.5 Triagem Farmacológica – Ensaio de Viabilidade Celular com MTT

O efeito citotóxico do extrato e do óleo da semente de *E. oleracea* Mart. foi analisado através do ensaio de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em cinco linhagens celulares derivadas de tumores humanos: CACO-2, HCT-116, HeLa, MCF-7 e NCI-H460.

Os efeitos do tratamento com o extrato e óleo da semente de açaí na viabilidade das células foram distintos dependendo do tipo celular.

Para as linhagens de adenocarcinoma colorretal humano CACO-2 e HCT-116 (Figuras 12A e B e 13A e B, respectivamente) houve redução da viabilidade celular a partir de 24h em todas as concentrações testadas tanto do extrato quanto do óleo da semente de açaí.

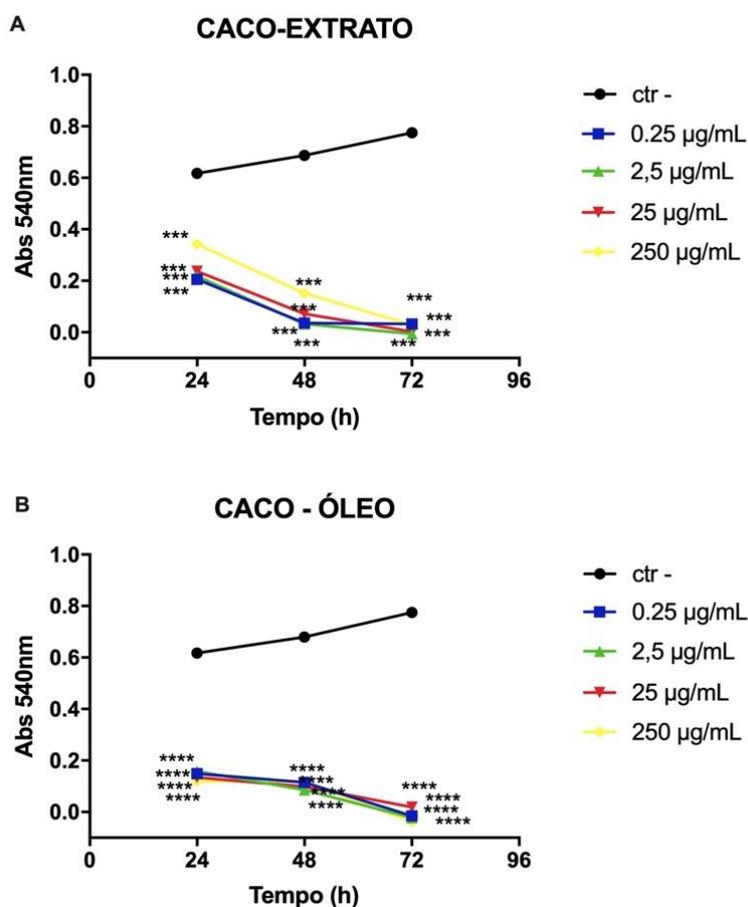


Figura 12. Avaliação da citotoxicidade do extrato (A) e óleo (B) da semente de açaí em linhagem de adenocarcinoma colorretal humano CACO-2 através do ensaio de viabilidade com MTT. ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0.05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$

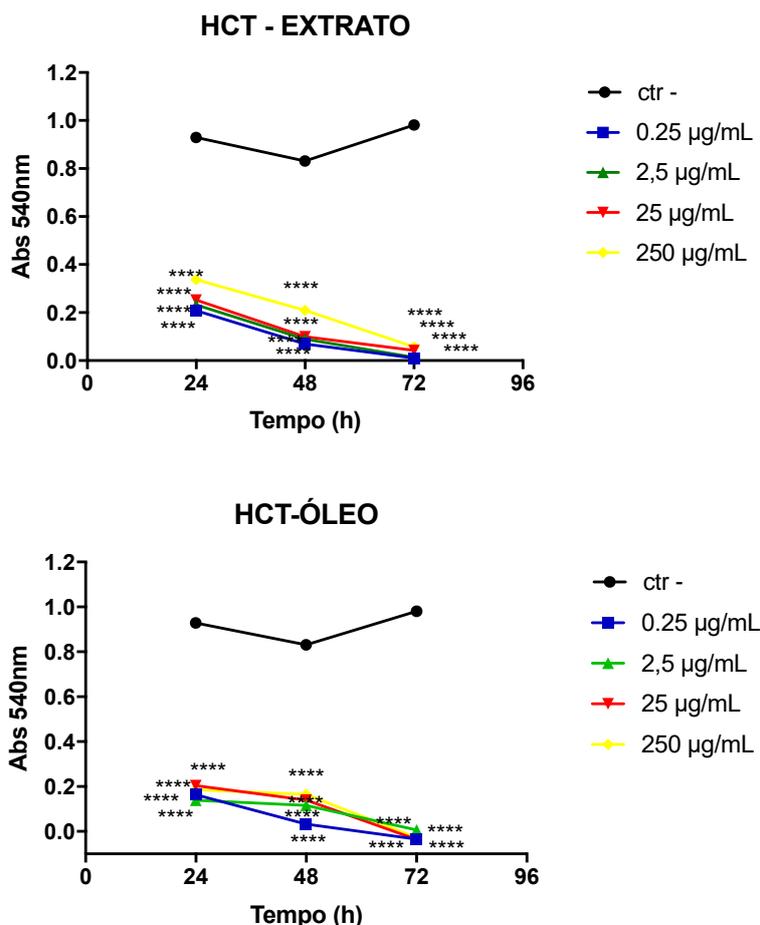


Figura 13. Avaliação da citotoxicidade do extrato (A) e óleo (B) da semente de açai em linhagem de adenocarcinoma colorretal humano HCT-116 através do ensaio de viabilidade com MTT. ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0.05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$

Para a linhagem CACO-2, na concentração de 0,25 µg/ml, o extrato foi mais efetivo em 48h de tratamento ($p < 0,001$) (Figura 14A). Na concentração de 2,5 µg/ml, o óleo foi mais citotóxico que o extrato em 24h, porém em 48h, o extrato apresentou maior potencial de redução da viabilidade celular quando comparado ao óleo ($p < 0,001$) (Figura 14B). Na concentração de 25 µg/ml, o óleo da semente de açai foi mais citotóxico que o óleo em 24 e 48h. Em 72h, o extrato foi mais citotóxico que o óleo (Figura 14C). Na concentração de 250 µg/ml, o óleo foi mais citotóxico que o óleo em 24h. Nos demais tempos avaliados, não houve diferença estatística (Figura 14D).

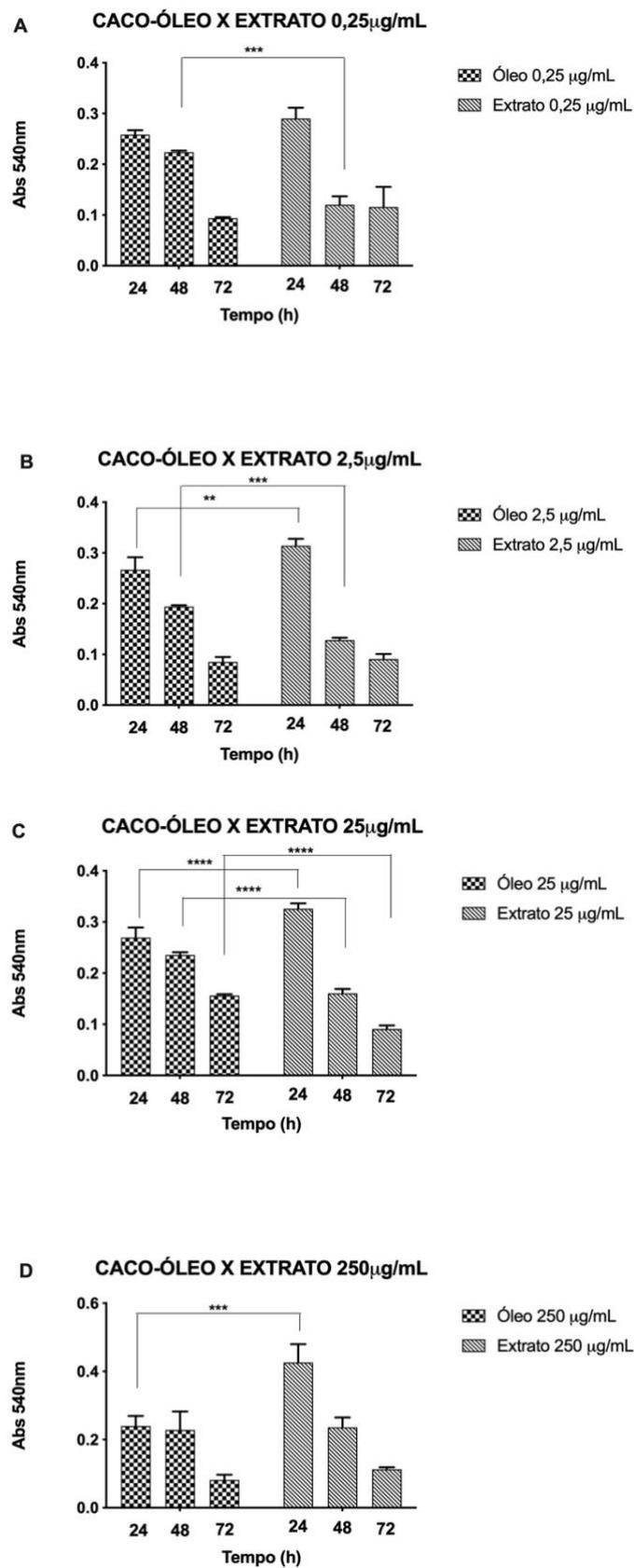


Figura 14. Comparação de citotoxicidade em linhagem de adenocarcinoma colorretal CACO-2 do óleo e extrato da semente de açai em 24, 48 e 72h após tratamento com diferentes concentrações: 0,25 (A), 2,5 (B), 25 (C) e 250 µg/ml (D). ANOVA, pós-teste Sidak's ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Para a linhagem HCT-116, na concentração de 0,25 $\mu\text{g/ml}$, não houve diferença estatisticamente significativa entre óleo e extrato (Figura 15A). Na concentração de 2,5 $\mu\text{g/ml}$, o óleo foi mais citotóxico que o extrato em 24h ($p<0,01$), porém em 48h, o extrato foi mais efetivo ($p<0,001$) (Figura 15B). Na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$, o extrato da semente de açaí foi mais citotóxico que o óleo em 48 e 72h ($p<0,05$) (Figura 15C). Na concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$, o óleo foi mais citotóxico que o extrato em 24h ($p<0,05$). Nos demais tempos avaliados, não houve diferença estatística (Figura 15D).

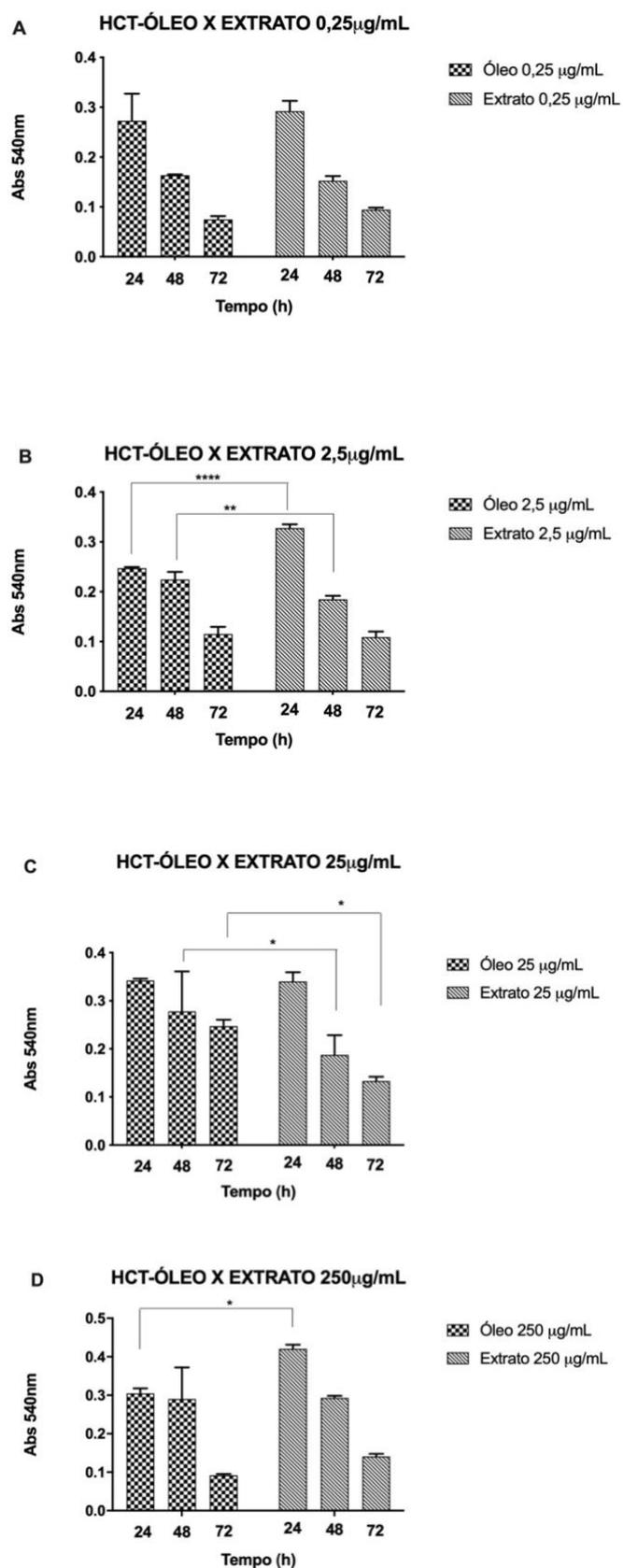


Figura 15. Comparação de citotoxicidade em linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT-116 do óleo e extrato da semente de açai em 24, 48 e 72h após tratamento com diferentes concentrações: 0,25 (A), 2,5 (B), 25 (C) e 250 µg/ml (D). ANOVA, pós-teste Sidak's * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Para a linhagem de adenocarcinoma cervical HeLa, também houve redução da viabilidade celular após tratamento com o extrato e óleo da semente de açaí. Entretanto, observa-se tendência de proliferação celular nas concentrações de 0,25, 2,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ do extrato e em todas as concentrações testadas do óleo (Figuras 16A e B).

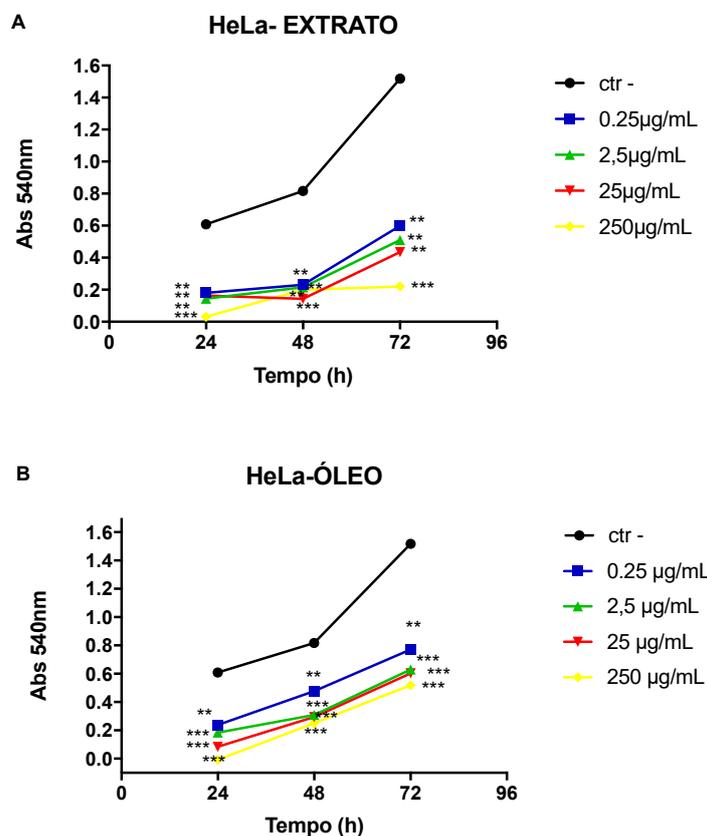


Figura 16. Avaliação da citotoxicidade do extrato (A) e óleo (B) da semente de açaí em linhagem de adenocarcinoma cervical HeLa através do ensaio de viabilidade com MTT. ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$

Para a linhagem HeLa, na concentração de 0,25 $\mu\text{g/ml}$, o óleo foi mais citotóxico que o extrato em 24h ($p < 0,01$) (Figura 17A). Na concentração de 2,5 $\mu\text{g/ml}$, não houve diferença estatisticamente significativa entre óleo e extrato. (Figura 17B). Na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$, o óleo da semente de açaí foi mais citotóxico que o extrato em 24 e 48h ($p < 0,0001$) (Figura 17C). Na concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$, o óleo foi mais citotóxico que o extrato em 24 e 48h ($p < 0,0001$). (Figura 17D).

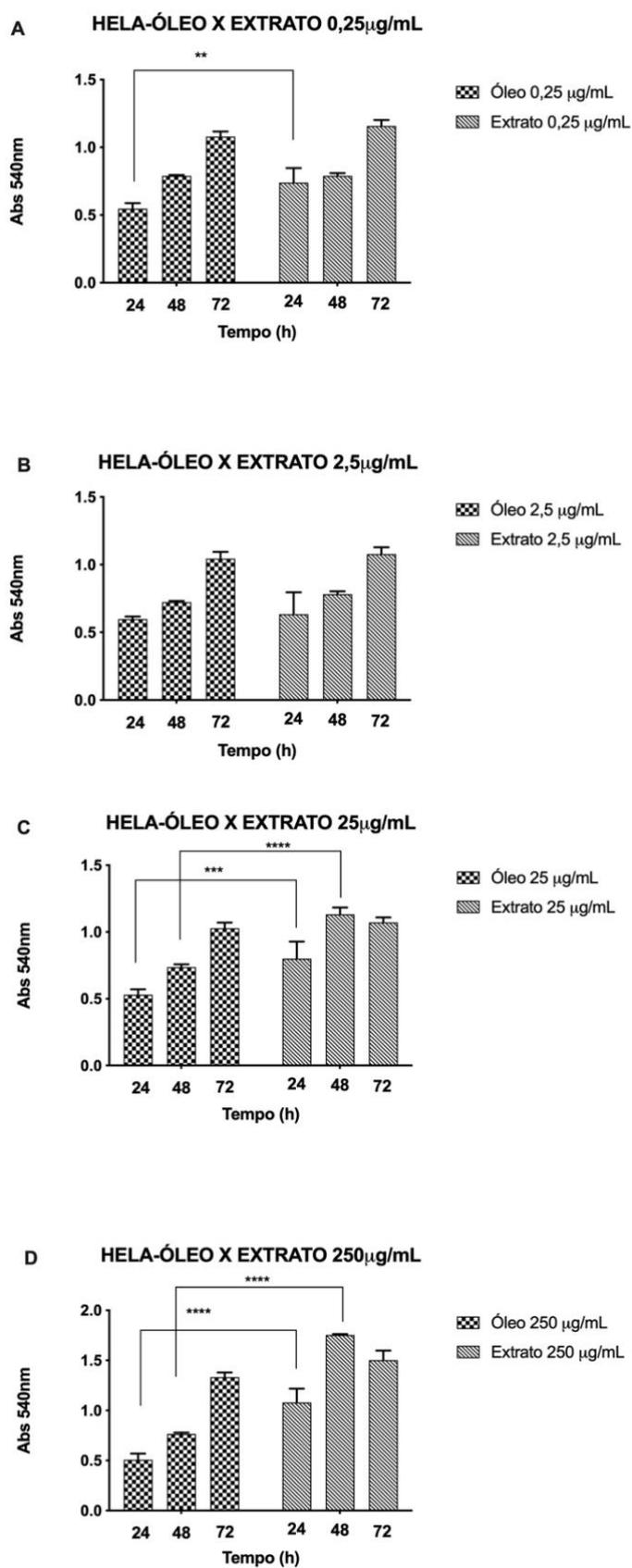


Figura 17. Comparação de citotoxicidade em linhagem de adenocarcinoma cervical HeLa do óleo e extrato da semente de açai em 24, 48 e 72h após tratamento com diferentes concentrações: 0,25 (A), 2,5 (B), 25 (C) e 250 µg/ml (D). ANOVA, pós-teste Sidak's ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$.

Na linhagem celular MCF-7, o extrato da semente de açaí reduziu significativamente a viabilidade das células a partir de 24h. Nas concentrações de 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$, o extrato causou um efeito citotóxico a partir de 24h ($p < 0,05$) que aumentou após 72h de tratamento quando comparado ao controle (Figura 18A). O óleo da semente do açaí também apresentou efeito citotóxico na linhagem MCF-7 a partir de 24h, porém, observa-se tendência de proliferação celular em 48 e 72h nas concentrações de 0,25, 2,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 18B). Apenas na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ manteve-se a tendência de redução da viabilidade celular.

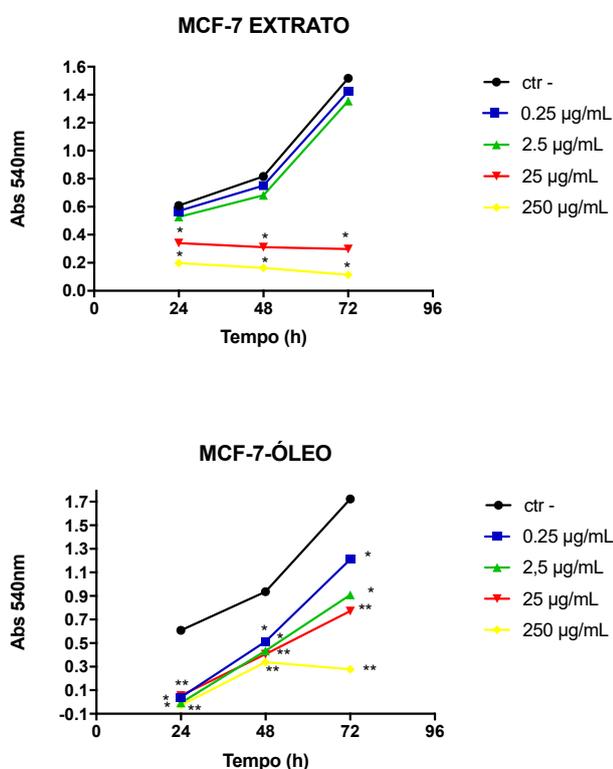


Figura 18. Avaliação da citotoxicidade do extrato (A) e óleo (B) da semente de açaí em linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7 através do ensaio de viabilidade com MTT. ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$

Para a linhagem MCF-7, na concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$, não houve diferença estatisticamente significativa entre óleo e extrato (Figura 19A). Na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$, o extrato mais citotóxico que o óleo em 72h ($p < 0,001$) (Figura 19B). Na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, o extrato da semente de açaí foi mais citotóxico que o óleo em 48 e 72h ($p < 0,0001$) (Figura 19C). Na

concentração de 250 µg/ml, o óleo foi mais citotóxico que o extrato em 48 e 72h ($p < 0,0001$) (Figura 19D).

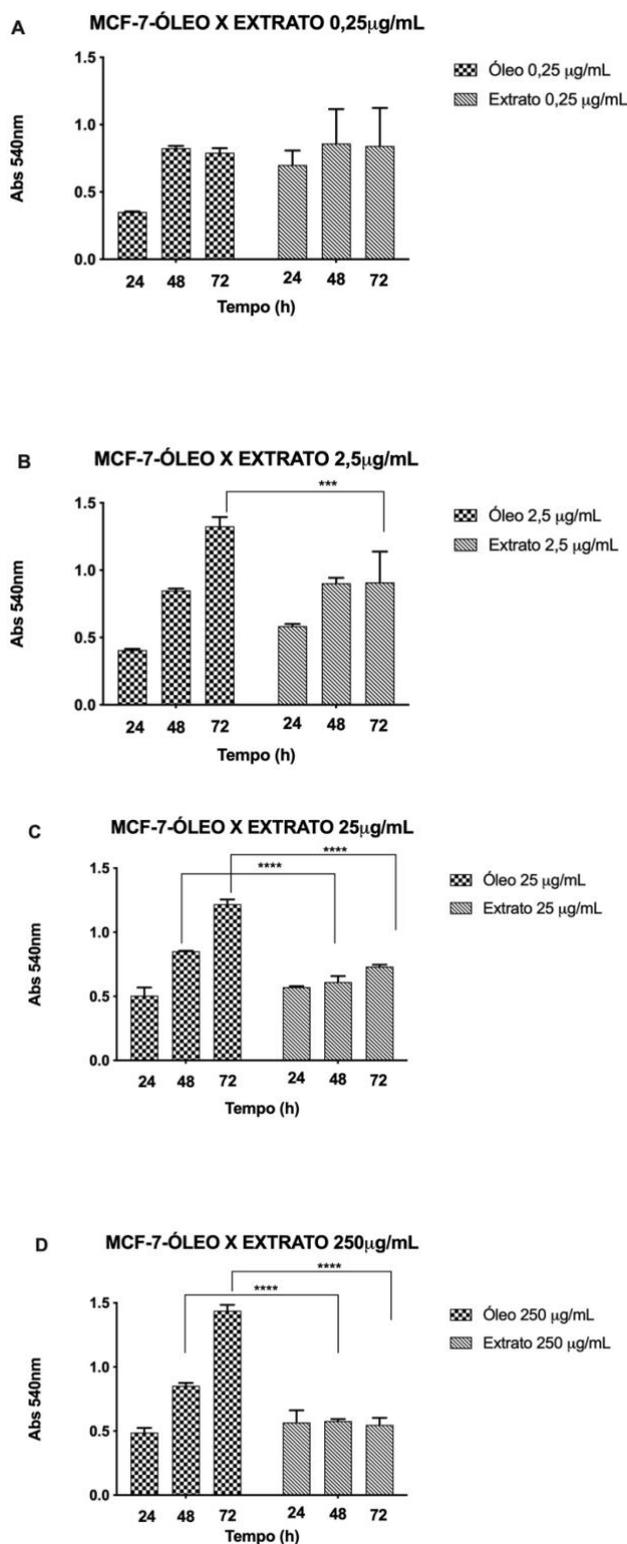


Figura 19. Comparação de citotoxicidade em linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7 do óleo e extrato da semente de açai em 24, 48 e 72h após tratamento com diferentes concentrações: 0,25 (A), 2,5 (B), 25 (C) e 250 µg/ml (D). ANOVA, pós-teste Sidak's ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$.

Para a linhagem de adenocarcinoma pulmão subtipo não pequenas células NCI-H460, também houve redução da viabilidade celular após tratamento com o extrato e óleo da semente de açaí. Entretanto, observa-se tendência de proliferação celular nas concentrações de 0,25, 2,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ do extrato (Figura 20A). O óleo demonstrou atividade citotóxica em todas as concentrações testadas, sendo significativo para 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$, de forma tempo-dependente (Figura 20B).

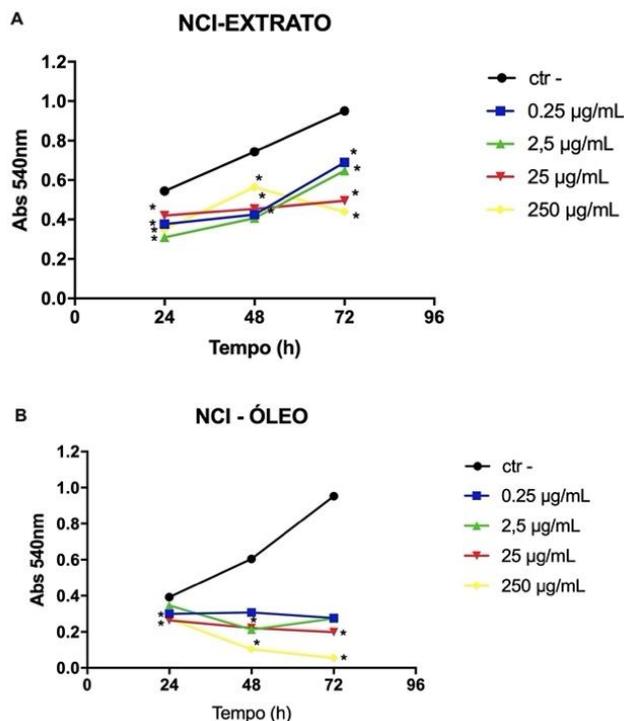


Figura 20. Avaliação da citotoxicidade do extrato (A) e óleo (B) da semente de açaí em linhagem de adenocarcinoma de pulmão NCI-H460 através do ensaio de viabilidade com MTT. ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$

Para a linhagem NCI-H460, na concentração de 0,25 $\mu\text{g/ml}$, o extrato foi mais citotóxico que o óleo em 72h ($p < 0,001$) (Figura 21A). Na concentração de 2,5 $\mu\text{g/ml}$, o extrato foi mais citotóxico que o óleo em 72h ($p < 0,05$) (Figura 21B). Na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$, o óleo da semente de açaí foi mais citotóxico que o extrato em todos os tempos analisados (Figura 21C). Na concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$, o óleo foi mais citotóxico que o extrato em todos os tempos analisados ($p < 0,0001$) (Figura 21D).

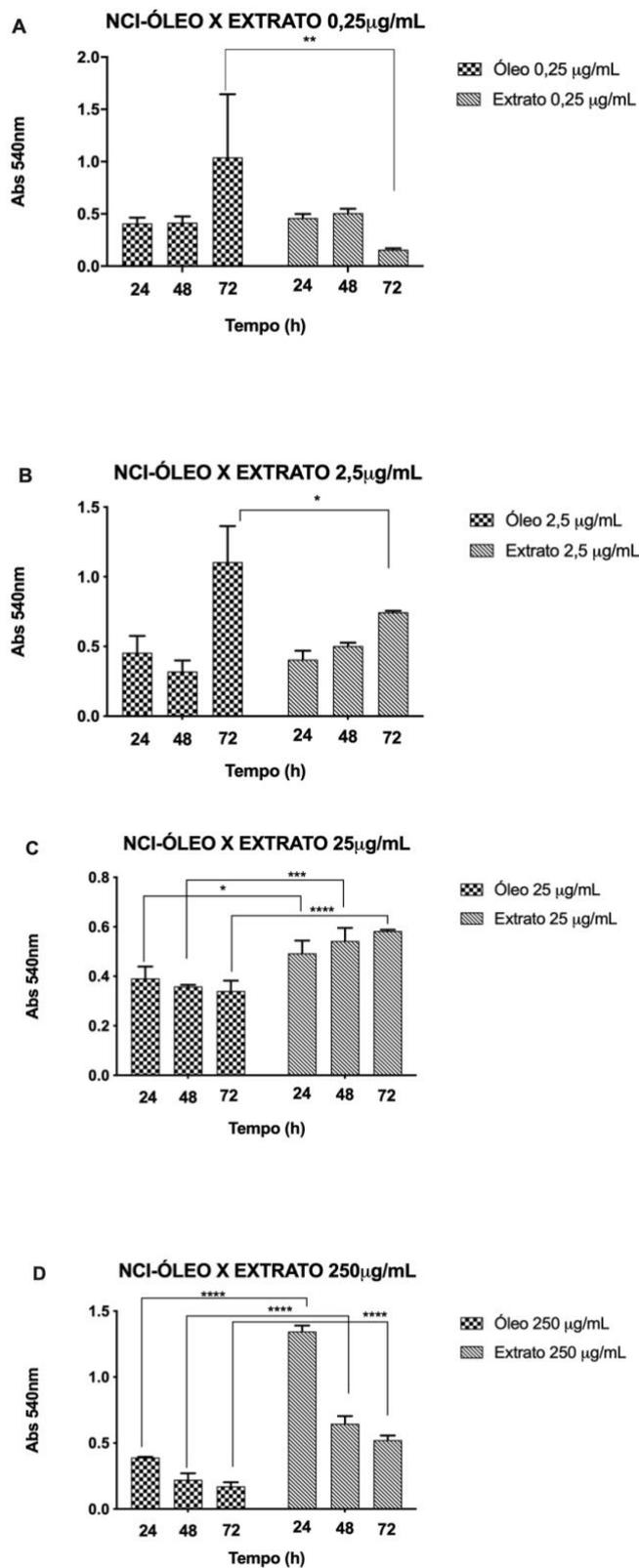


Figura 21. Comparação de citotoxicidade em linhagem de adenocarcinoma de pulmão NCI-H460 do óleo e extrato da semente de açai em 24, 48 e 72h após tratamento com diferentes concentrações: 0,25 (A), 2,5 (B), 25 (C) e 250 µg/ml (D). ANOVA, pós-teste Sidak's * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Em células derivadas de fibroblasto humano (células GM), o extrato da semente de açaí foi avaliado em diferentes concentrações (7 a 1000 $\mu\text{g/mL}$). O extrato mostrou redução da viabilidade celular apenas em 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 22A). O óleo reduziu a viabilidade celular a partir de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 22B).

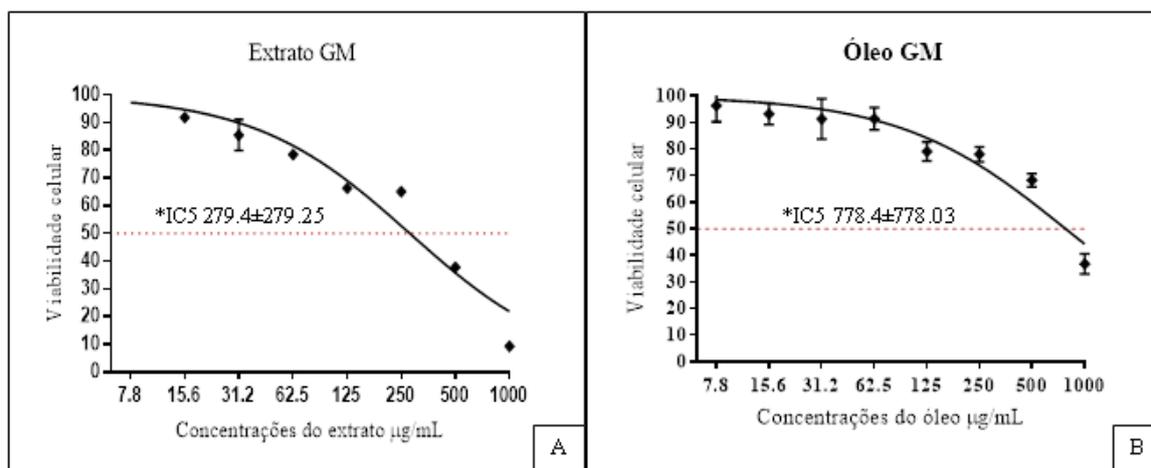


Figura 22. Avaliação da citotoxicidade do extrato (A) e óleo (B) da semente do açaí em linhagem de fibroblasto humano (GM) durante 24h através do ensaio de viabilidade com MTT. O extrato reduziu a viabilidade celular a partir de 500 $\mu\text{g/mL}$ e o óleo reduziu a viabilidade celular apenas a partir de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

A partir dos resultados da triagem farmacológica, a linhagem MCF-7 foi selecionada para prosseguimento dos ensaios de mecanismos de morte celular após tratamento com o extrato da semente de açaí e as linhagens de adenocarcinoma colorretal CACO-2, HCT-116 e HT-29 foram selecionadas para prosseguimento dos ensaios com o óleo da semente de açaí

5.6. Experimentos realizados na linhagem MCF-7 com o extrato hidroalcoólico da semente de açaí

5.6.1 Ensaio Clonogênico

Com o objetivo de avaliar a redução da viabilidade celular da linhagem MCF-7 após o tratamento com extrato de semente de açaí, foi realizado ensaio clonogênico.

Os resultados do ensaio mostraram que o tratamento com açaí reduziu de forma significativa a formação de novas colônias celulares quando comparado ao controle nas concentrações de 10 ($p < 0,05$) e 15 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$) (Figuras 23A e B).

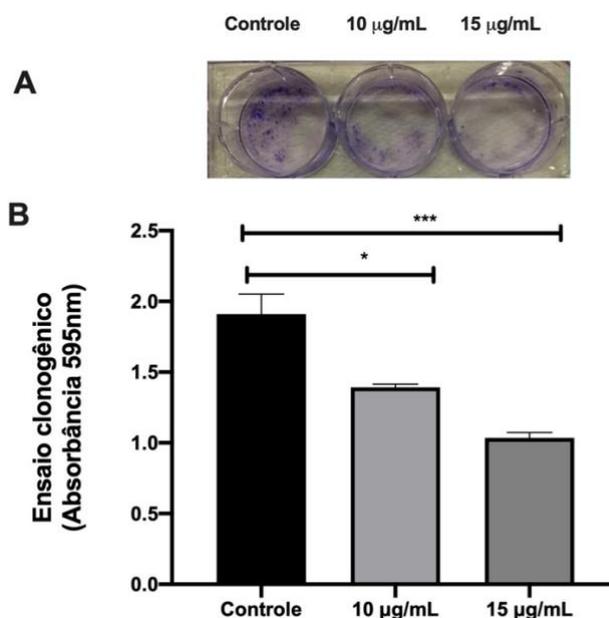


Figura 23 (A, B). Quantificação de colônias da linhagem celular MCF-7 de câncer de mama tratada com extrato de semente de açaí realizada após 15 dias de cultivo. Os dados foram obtidos como valores de absorvância de 595 nm. One-way ANOVA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.6.2 Time-lapse

Os efeitos do extrato da semente de açaí sobre as características morfológicas das células MCF-7 foram investigados por microscopia *time lapse*. A microscopia mostrou uma diminuição na densidade celular nas células MCF-7 tratadas com açaí (25 $\mu\text{g/mL}$), bem como arredondamento e encolhimento celular, blebs de membrana e lise celular com aparente perda de conteúdo citoplasmático a partir de 6h de tratamento (Figura 24).

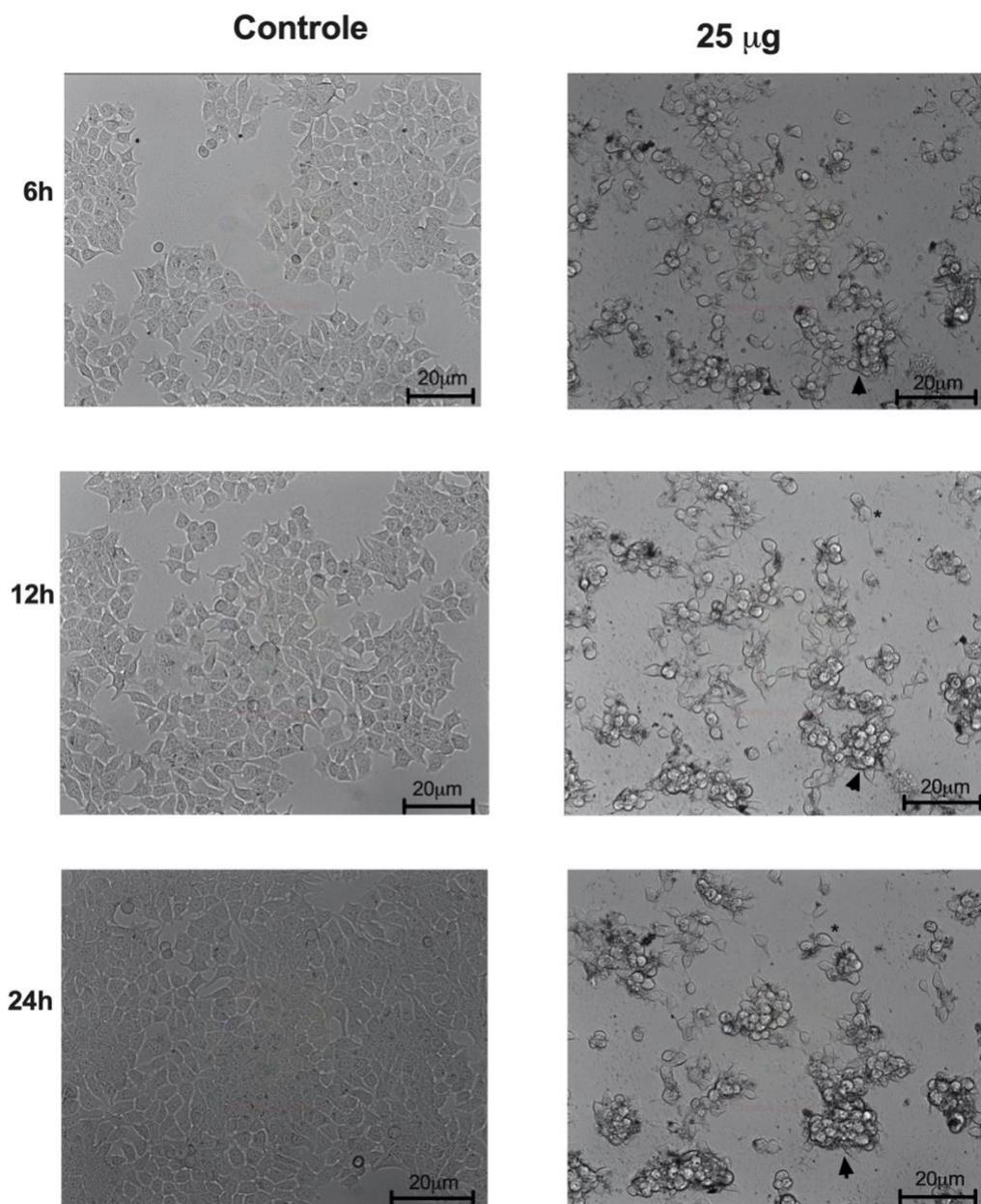


Figura 24. Análise da morfologia por microscopia *time lapse* de células MCF-7 tratadas com extrato de semente de açaí (25 µg/mL). O extrato da semente causou alterações nas células MCF-7, como redução das células, formação de bolhas na membrana (seta) e lise celular (asterisco).

5.6.3 Caspase 3/7

A fim de avaliar os mecanismos de morte celular na linhagem MCF-7, foi realizado o ensaio das caspases 3 e 7. O tratamento com 25 e 250 µg/mL não mostrou aumento na porcentagem de células apoptóticas após 6 e 24h de tratamento (Figura 25 A, B).

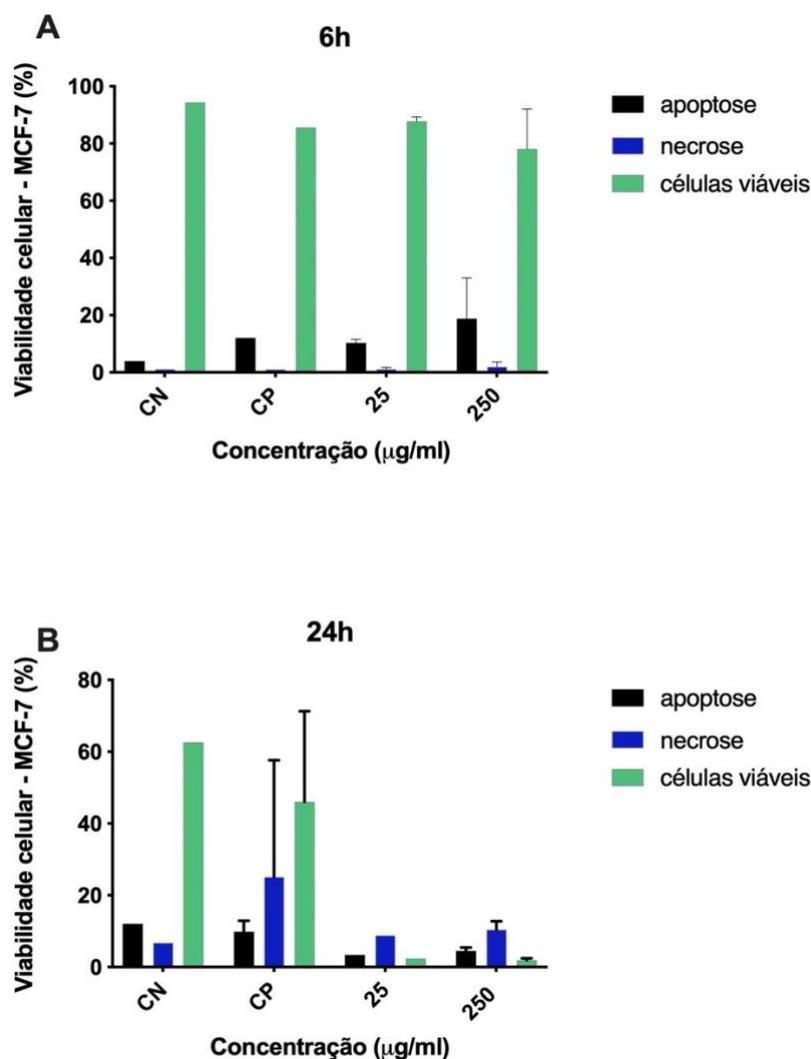


Figura 25 (A, B). Detecção de caspases ativas 3-7 após tratamento com extrato da semente de açai. O extrato da semente não causou apoptose nas células MCF-7. O ensaio das caspases 3 e 7 demonstrou que o extrato da semente não aumentou a atividade dessas caspases quando comparado às células controle após 6h (a) e 24h (b) de tratamento. CN: células com DMEM; CP: DMSO (100 µ). Two-way ANOVA, pós-teste de Tukey.

5.6.4 Indução de autofagia e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio

Considerando que não houve indução de apoptose por aumento da expressão das caspases 3/7 e para avaliar outro mecanismo de morte celular na linhagem MCF-7, foi realizado o ensaio da laranja de acridina por imunofluorescência para avaliar autofagia.

O tratamento com 25 µg/mL de extrato de semente de açai causou aumento nos compartimentos ácidos, como lisossomas ou autofagolisossomas, evidenciado por aumento das vesículas vermelho brilhante ou laranja-vermelho após excitação com luz azul (Figura 26).

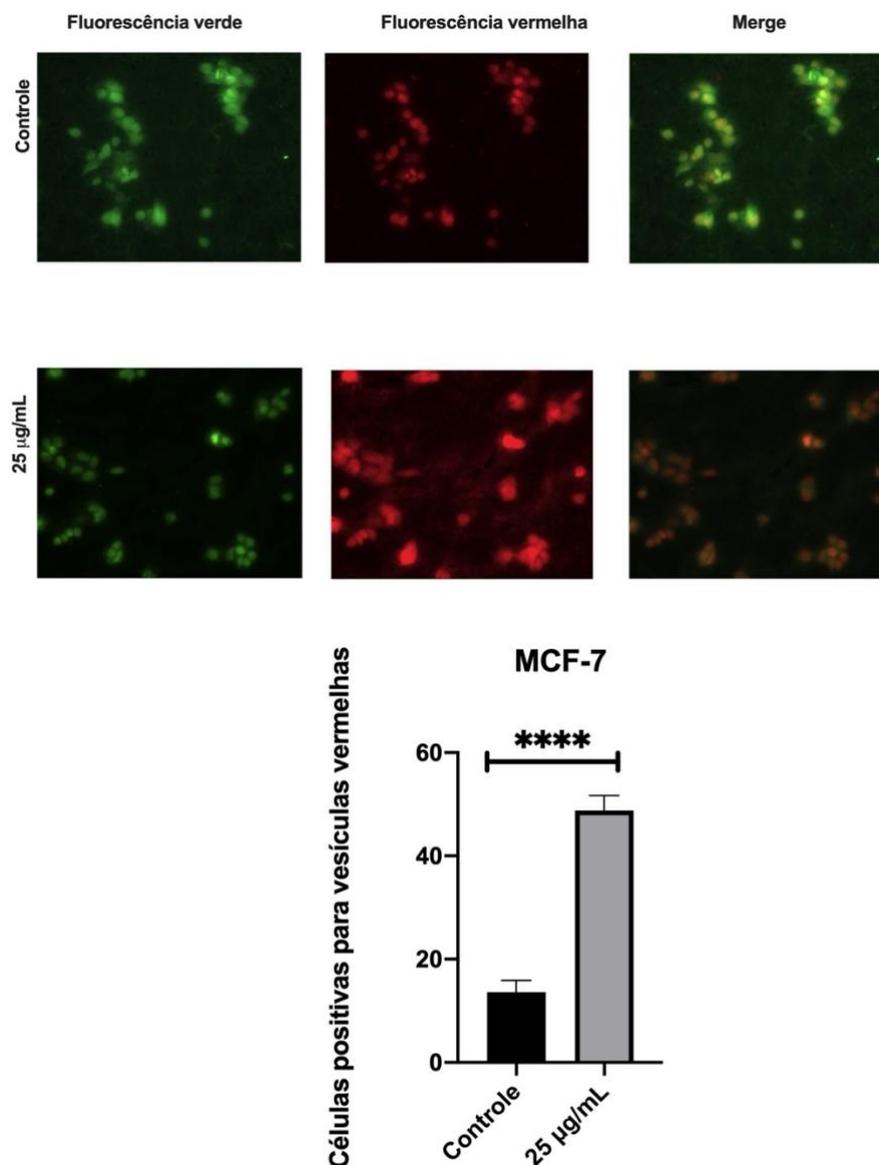


Figura 26. Avaliação da expressão de organelas vesiculares ácidas e marcação com laranja de acridina após tratamento com extrato da semente de açai. Houve um aumento de organelas vesiculares ácidas (AVOs) marcadas com laranja-acridina (AO), coradas com vermelho fluorescente positivo após tratamento com extrato de semente de açai. Os experimentos foram realizados em triplicata. **** $p < 0,0001$. (Teste T não pareado (barras de escala, 50 μm)).

Considerando que a autofagia é o mecanismo de morte de linhagens celulares tratadas com açai MCF-7, usamos o indicador DAF-2DA-NO fluorescente específico permeável a células para avaliar se havia aumento na quantificação de espécies reativas de oxigênio e se o aumento na expressão de radicais livres seria o mecanismo indutor de autofagia.

O tratamento com 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de semente de açai causou um aumento na produção de ROS após 6h quando comparado às células

controle, sugerindo a indução de autofagia pelo aumento de ROS nas células tratadas com açai (Figura 27).

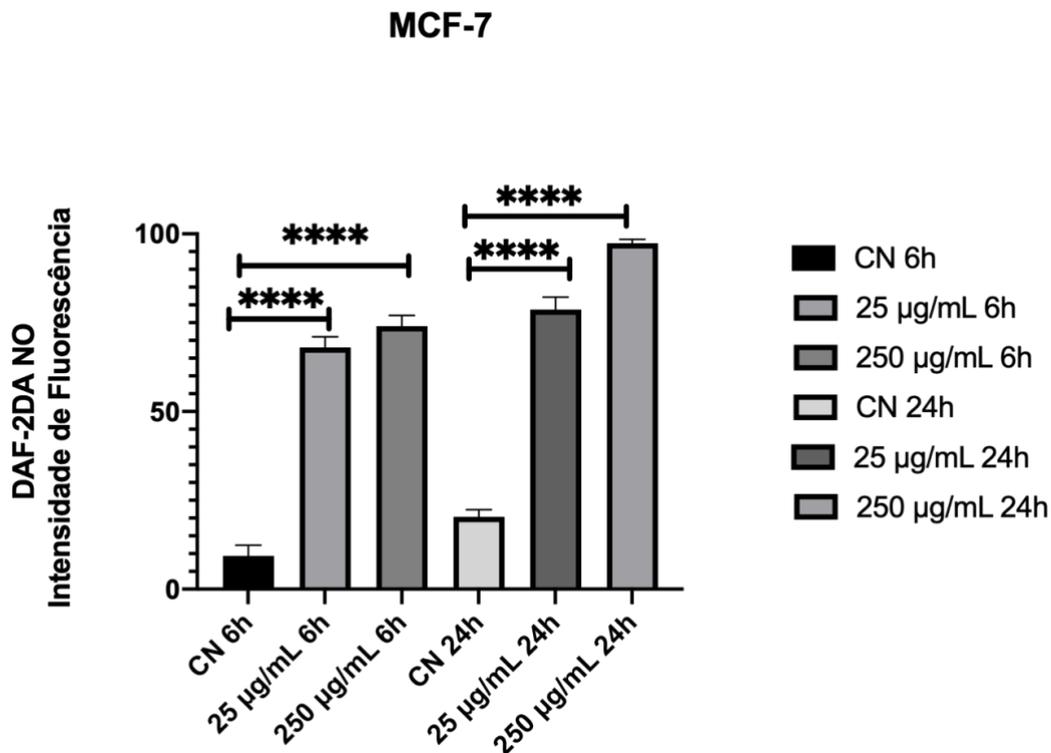


Figura 27. Efeito do extrato nos níveis de óxido nítrico (NO) expressos como diferença percentual de fluorescência na linhagem celular de câncer de mama MCF-7 (1×10^5 céls/mL) usando DAF-2DA ($10 \mu\text{M}$) incubado por 30 minutos. Dados representativos de experimentos em triplicata. Valores expressos como média \pm s.p.m. Two-way ANOVA, pós-teste de Tukey. **** $p < 0,0001$. CN: controle negativo.

Para análise detalhada da morfologia nuclear e outras organelas, foi realizada análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Células controle apresentavam membrana plasmática e núcleo íntegros assim como a presença de vesículas secretórias no citoplasma (Figura 28A). Após tratamento com $25 \mu\text{g/mL}$ do extrato por 24h, observou-se o surgimento de vesículas contendo conteúdo eletrodense, sugestivas de vesículas autofágicas e o aumento no número de mitocôndrias comparada ao controle. Observou-se redução do volume celular, alterações estruturais na membrana plasmática, no núcleo e no nucléolo, caracterizando a morte celular por autofagia. O aumento no número de mitocôndrias corrobora os dados previamente apresentados de aumento na expressão de ROS. (Figura 28B).

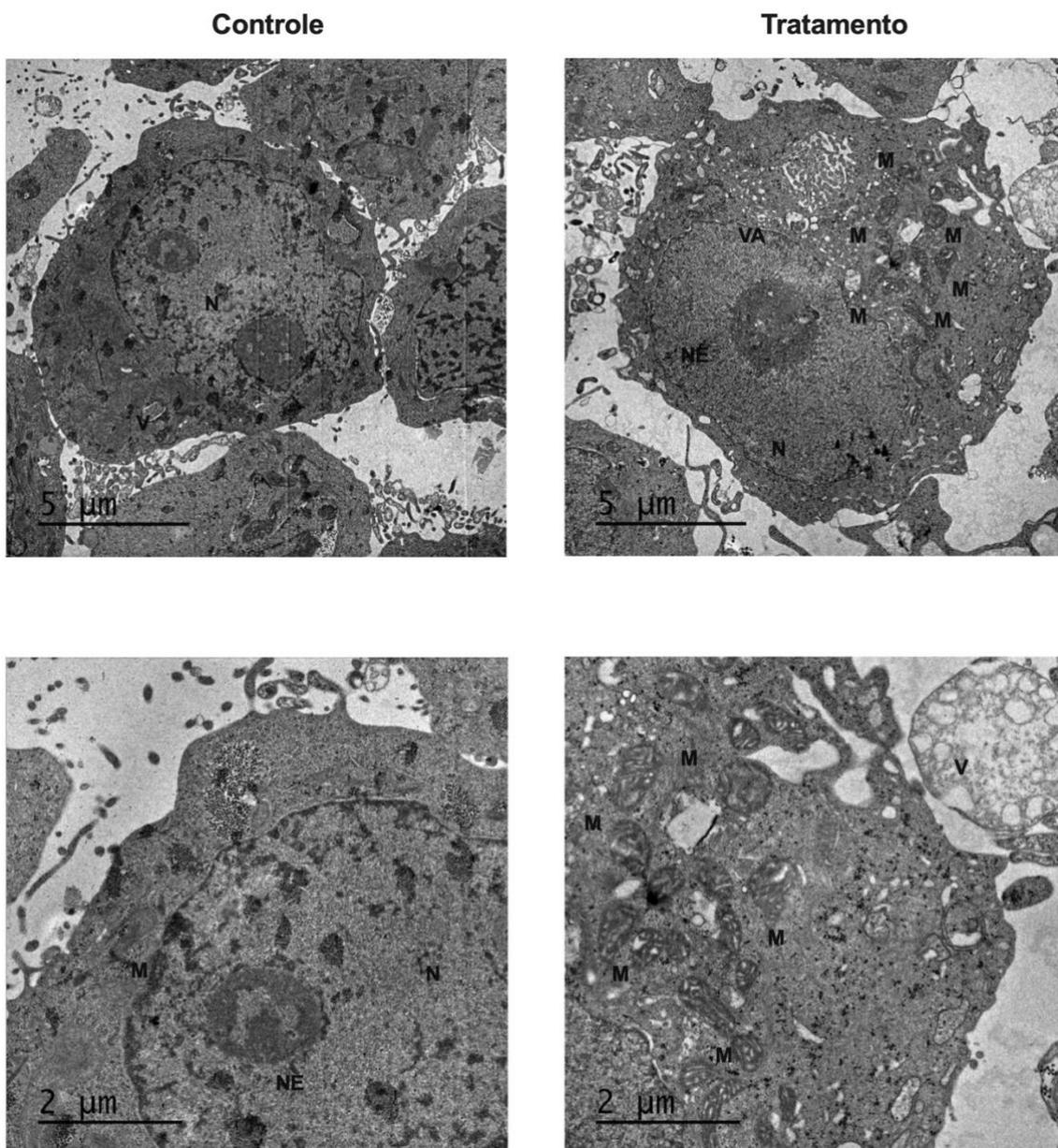


Figura 28. Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão das células MCF-7 após tratamento com o extrato da semente de açaí. Células controle apresentavam membrana plasmática e núcleo íntegros assim como a presença de vesículas secretórias no citoplasma (A).. Após tratamento com 25 µg/ml do extrato do por 24 horas, observou-se o surgimento de corpos eletrondensos no citoplasma assim como a presença de vesículas autofágicas, além de aumento do número de mitocôndrias (B). N= núcleo, NE= nucléolo, M= mitocôndria, V= vesícula, VA= vesícula autofágica.

5.7 Experimentos Realizados nas linhagens de adenocarcinoma colorretal (CACO-2, HT-29 e HCT-116)

Os experimentos realizados com o óleo nas linhagens de adenocarcinoma colorretal foram realizados em parceria com o Programa de Oncobiologia Celular e Molecular, Grupo de Estrutura e Dinâmica Celular do Instituto Nacional de Câncer – RJ, sob supervisão do Dr. José Andrés Morgado Díaz.

5.7.1 Ensaio de Viabilidade Celular – MTT

O efeito citotóxico do óleo da semente de *E. oleracea* Mart. foi analisado através do ensaio de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em três linhagens celulares derivadas de adenocarcinoma colorretal: CACO-2, HCT-116 e HT-29 nas concentrações 0,25, 2,5, 25 e 100 µg/mL.

Para as linhagens de adenocarcinoma colorretal humano CACO-2 e HCT-116 (Figuras 29 e 30) houve redução da viabilidade celular a partir de 24h nas concentrações de 25 e 100 µg/mL. Para a linhagem HT-29, houve redução da viabilidade celular apenas na concentração de 100 µg/mL (Figura 31).

O IC50 foi calculado após 24h de tratamento com óleo de semente de açaí. A linhagem mais sensível foi a HCT-116 com IC50 de 11,8 µg/mL e a mais resistente foi a HT-29 com IC50 de 51,2 µg/mL (Figura 32).

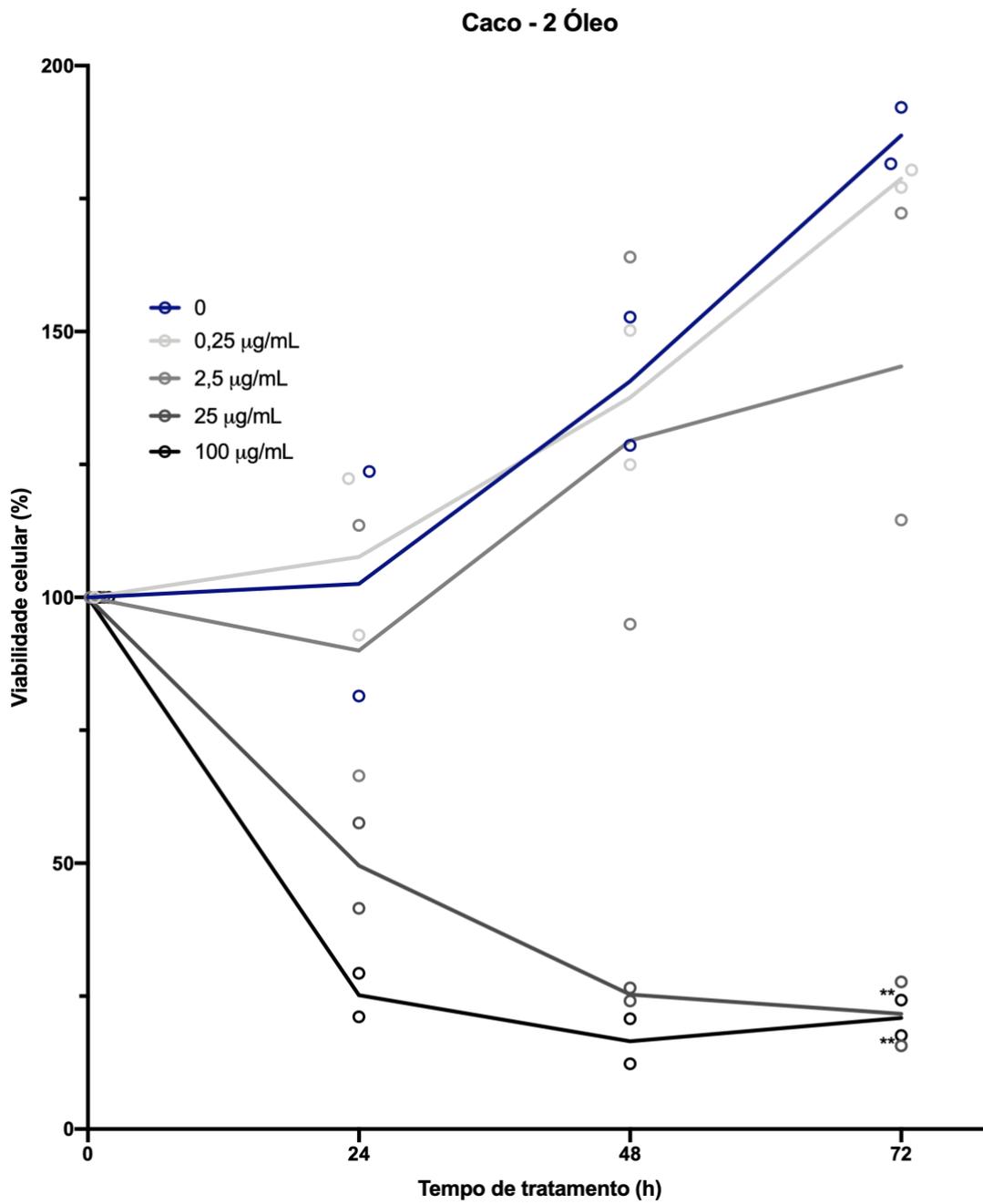


Figura 29. Avaliação da citotoxicidade do óleo da semente de açai em linhagem de adenocarcinoma colorretal CACO-2 através do ensaio de viabilidade com MTT. ANOVA, pós-teste de Tukey's. **p<0,01

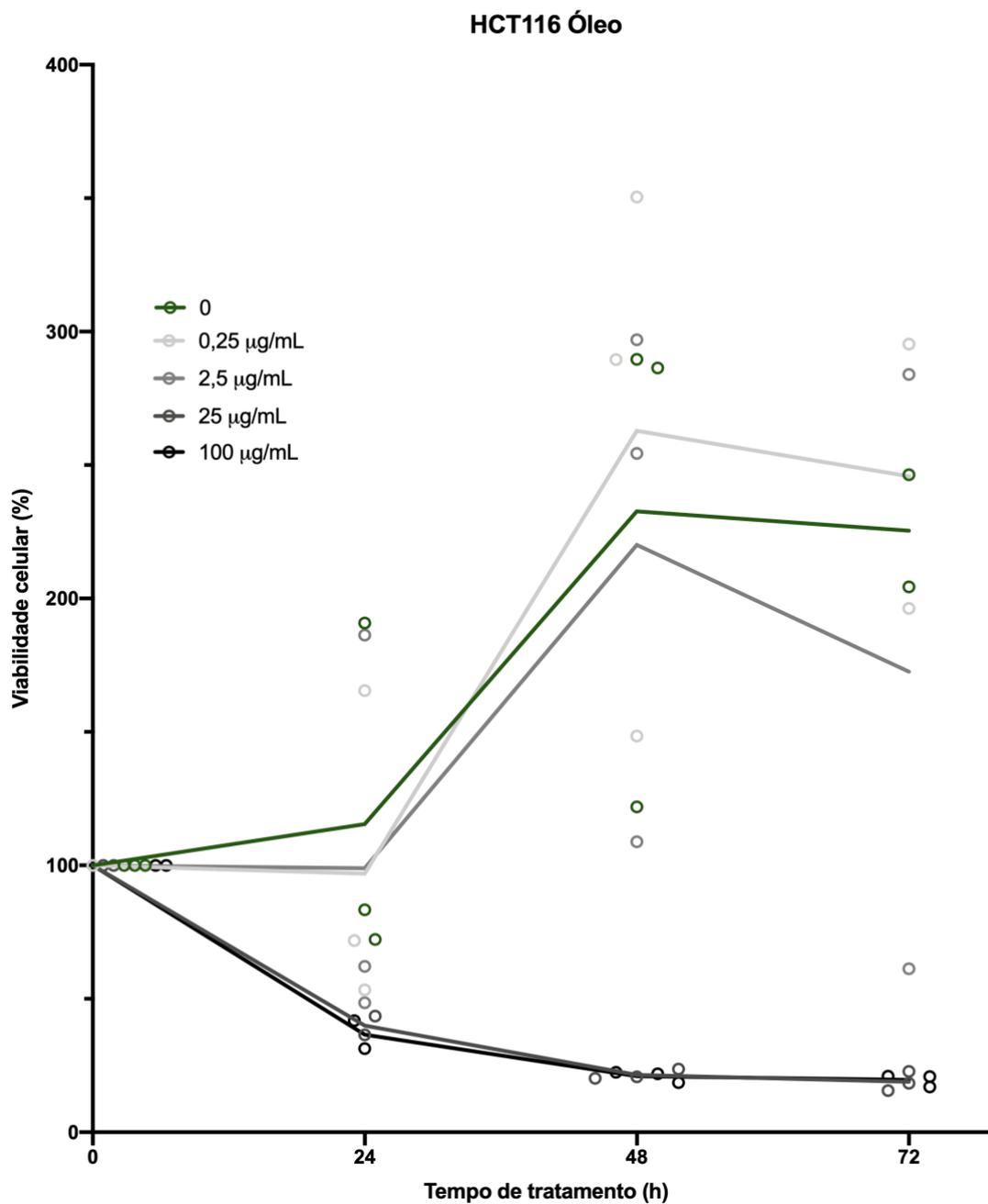


Figura 30. Avaliação da citotoxicidade do óleo da semente de açai em linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT-116 através do ensaio de viabilidade com MTT. ANOVA, pós-teste de Tukey's.

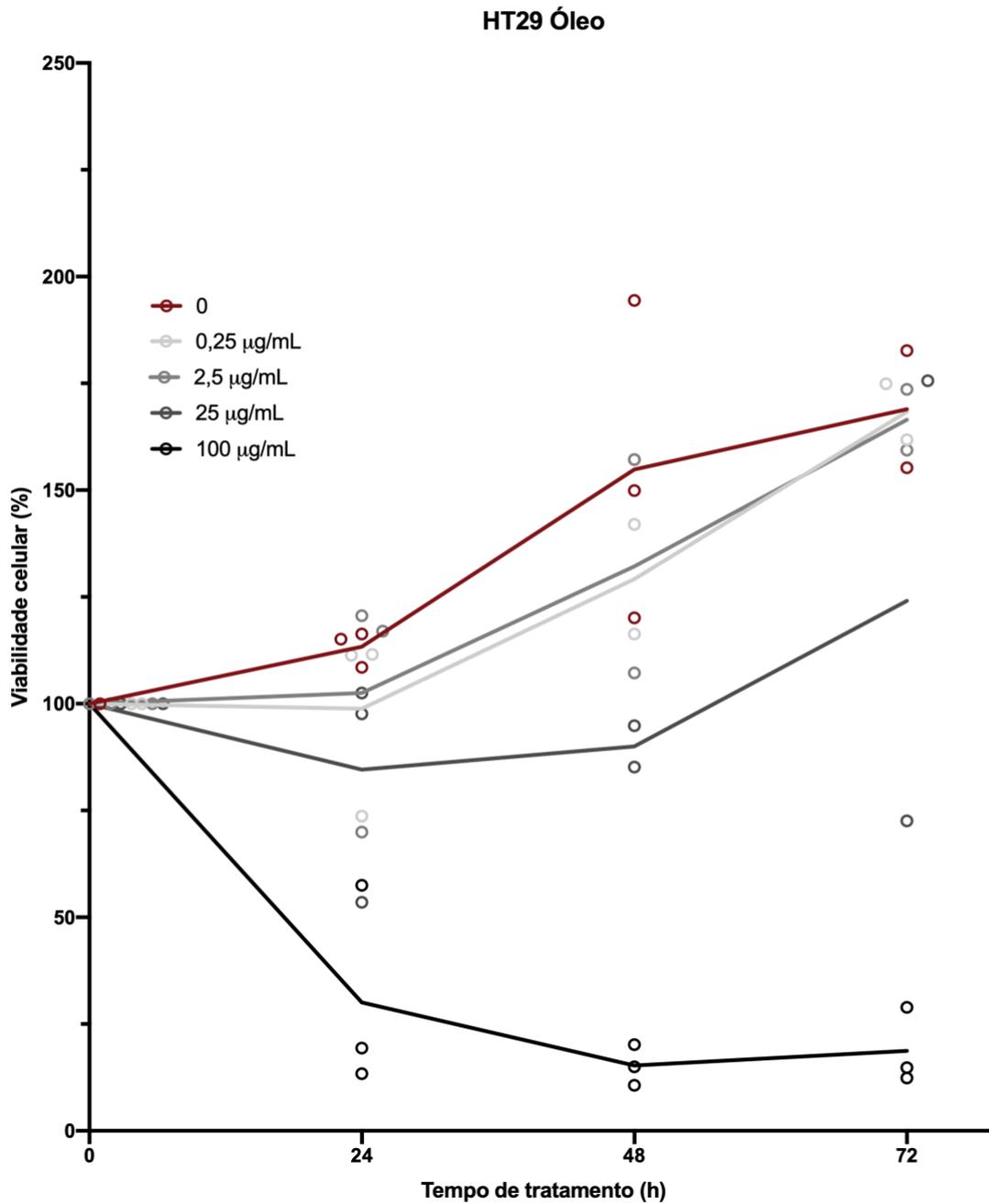


Figura 31. Avaliação da citotoxicidade do óleo da semente de açai em linhagem de adenocarcinoma colorretal HT-29 através do ensaio de viabilidade com MTT. ANOVA, pós-teste de Tukey's.

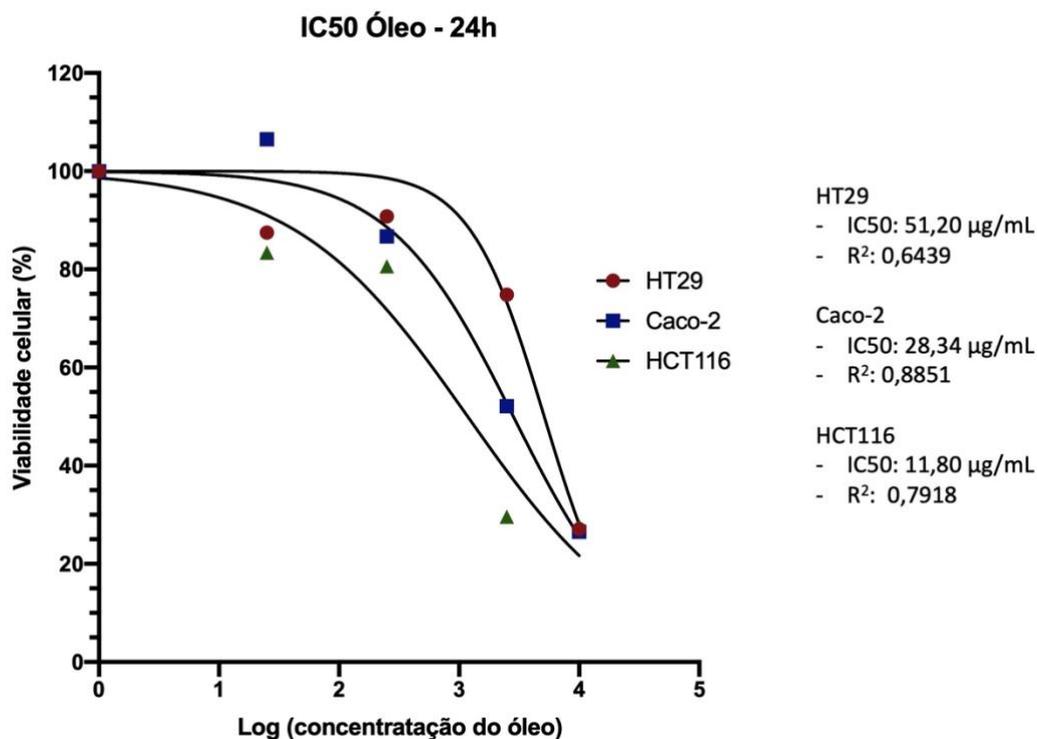


Figura 32. IC50 da concentração do óleo nas linhagens de adenocarcinoma colorretal: HT-29, CACO-2 e HCT-116 após 24h de tratamento.

Para avaliar se a redução da viabilidade celular ocorria por aumento de radicais livres, inicialmente foi realizada avaliação da viabilidade celular com contagem manual das células mortas e vivas após tratamento com o óleo da semente de açaí e nas células pré-tratadas por 2h com 5mM de n-acetilcisteína (NAC).

Para a linhagem CACO-2, as células pré-tratadas com NAC apresentaram um discreto aumento na porcentagem de células vivas quando comparadas às células tratadas com óleo nas concentrações de 25 e 100 µg/mL (Figura 33A). Para a linhagem HCT-116, houve um aumento na sobrevivência de células quando pré-tratadas com NAC + óleo 25 µg/mL. Para a concentração de 100 µg/mL não houve aumento quando pré-tratadas com NAC, pois essa concentração é citotóxica para essa linhagem (Figura 33B). Para a linhagem HT-29, houve um aumento significativo da sobrevivência das células tumorais quando pré-tratadas com NAC + óleo 100 µg/mL (Figura 33C).

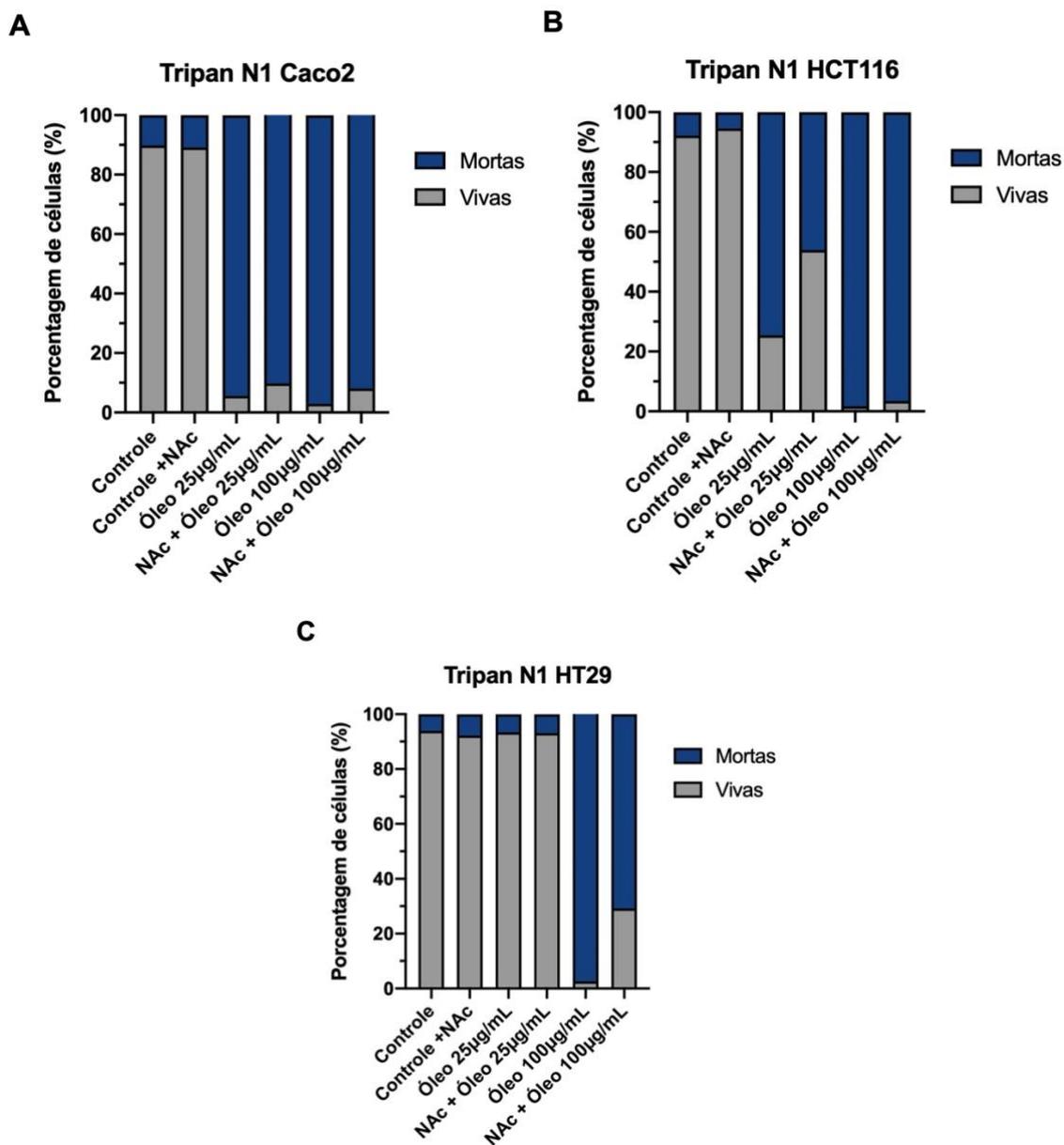


Figura 33. Avaliação da porcentagem de células mortas e vivas após tratamento com óleo da semente de açaí nas concentrações de 25 e 100 µg/mL e pré-tratadas com N-acetilcisteína na concentração de 5 mM 2h antes do tratamento com óleo. CACO-2 (A), HCT-116 (B) e HT-29 (C). ANOVA, pós-teste de Sidak's.

Para confirmação dos resultados obtidos com a quantificação de células mortas e vivas com a coloração azul de Tripan, foi realizado ensaio de viabilidade celular com MTT. As três linhagens foram pré-tratadas com NAC nas concentrações de 2,5 5 e 10 mM por 2h e, em seguida, tratadas com óleo da semente de açaí nas concentrações de 25 e 50 µg/mL por 24h.

Para a linhagem CACO-2, o pré-tratamento com NAC não aumentou a viabilidade celular de forma significativa nas três concentrações analisadas

quando comparados ao tratamento com óleo da semente de açaí nas concentrações testadas (Figura 34).

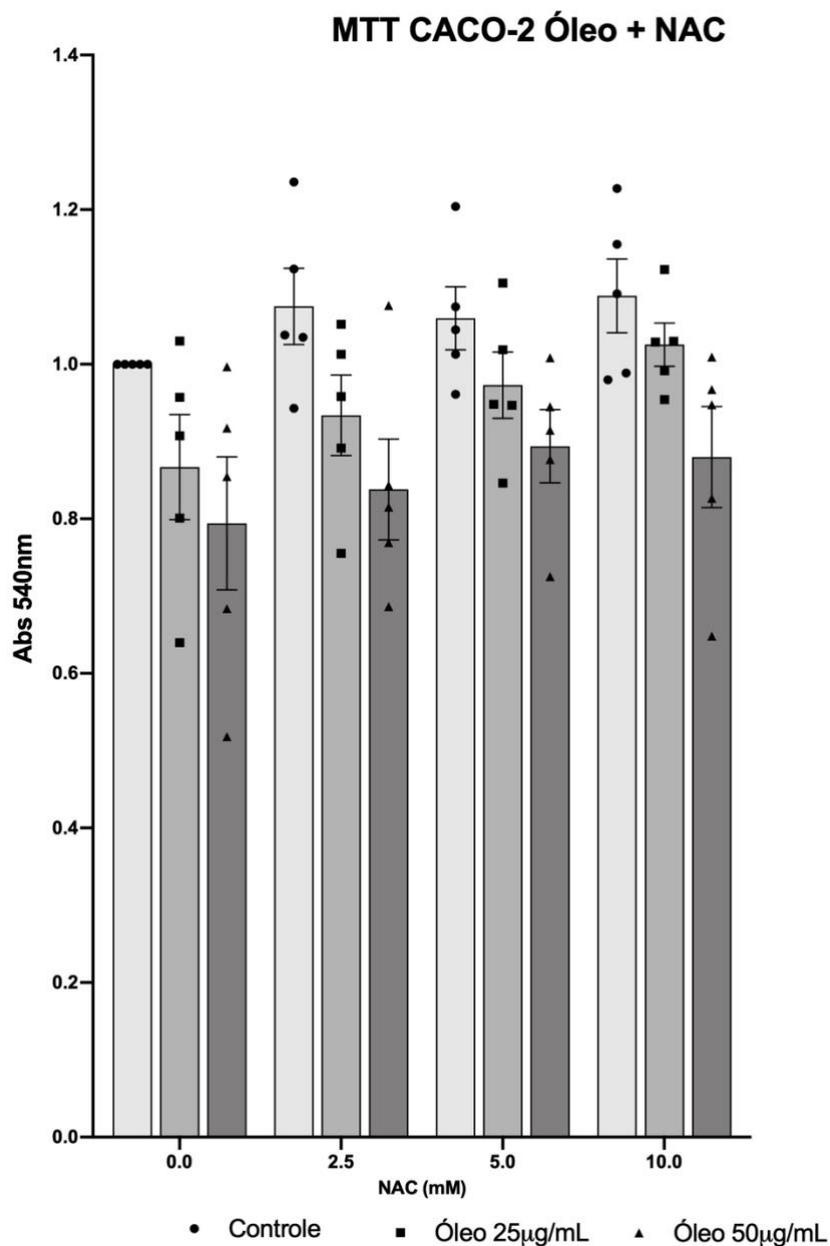


Figura 34. Avaliação da viabilidade celular da linhagem CACO-2 tratada com óleo da semente de açaí e pré-tratadas com NAC nas concentrações 2,5, 5 e 10mM através do ensaio de viabilidade com MTT. ANOVA, pós-teste de Dunnett's.

Para a linhagem HCT-116 o pré-tratamento com NAC nas concentrações não aumentou significativamente a viabilidade celular quando comparadas ao controle (Figura 35).

MTT HCT-116 Óleo + NAC

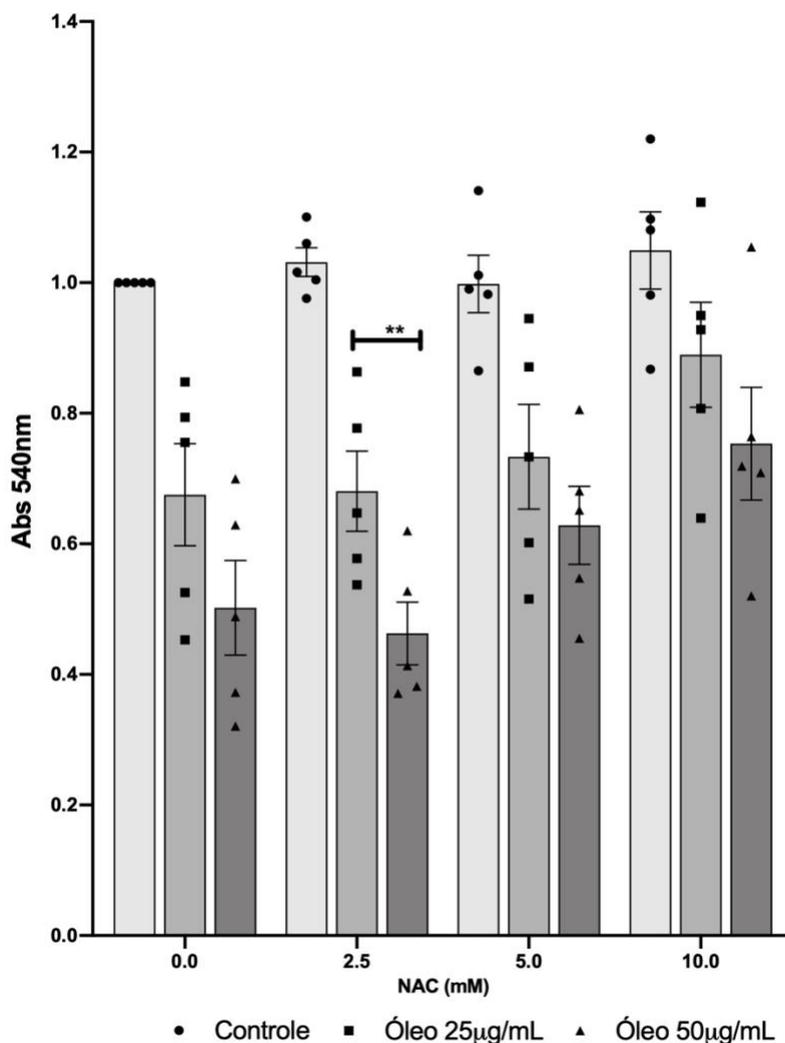


Figura 35. Avaliação da viabilidade celular da linhagem HCT-116 tratada com óleo da semente de açaí e pré-tratadas com NAC nas concentrações 2,5, 5 e 10mM através do ensaio de viabilidade com MTT. ANOVA, pós-teste de Dunnett's. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$

Para a linhagem HT-29, o pré-tratamento com NAC nas concentrações de 5 e 10 mM aumentou significativamente a viabilidade celular quando comparadas ao controle (óleo 50 µg/mL) ($p < 0,01$) (Figura 36).

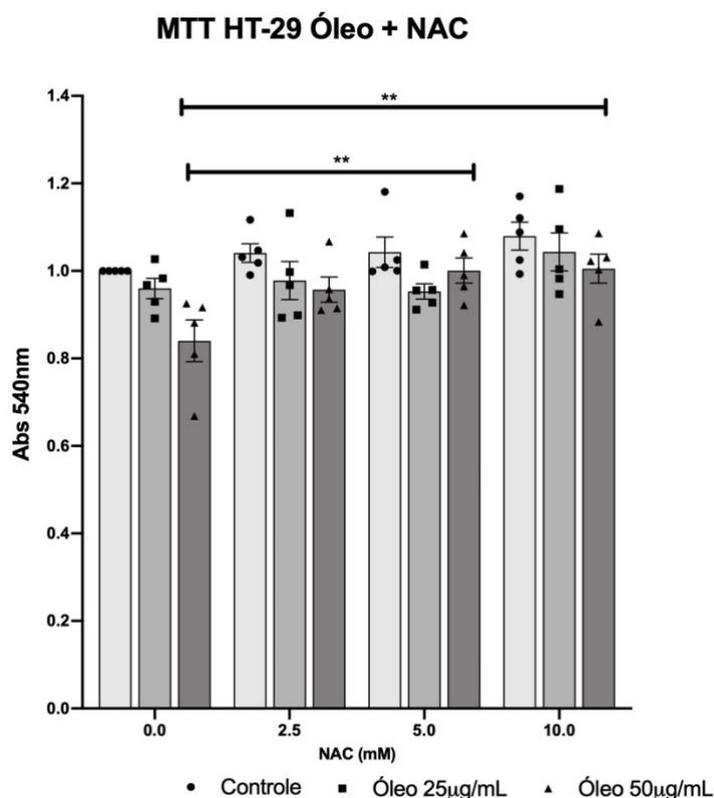


Figura 36. Avaliação da viabilidade celular da linhagem HT-29 tratada com óleo da semente de açaí e pré-tratadas com NAC nas concentrações 2,5, 5 e 10mM através do ensaio de viabilidade com MTT. ANOVA, pós-teste de Dunnett's. ** $p < 0,01$

5.7.2 Análise morfológica por microscopia de luz invertida

Para avaliar as alterações morfológicas induzidas pelo óleo da semente de açaí, realizou-se análise por microscopia de luz invertida após tratamento com 25 e 100 µg/mL por 24, 48 e 72h.

O óleo da semente de açaí induziu drásticas alterações morfológicas na linhagem CACO-2, tais como arredondamento celular, diminuição do volume celular e aparente lise (Figura 37A).

O óleo da semente de açaí também induziu alterações na morfologia das células na linhagem HCT-116, como diminuição do tamanho e perda do conteúdo intracitoplasmático (Figura 37B).

O óleo da semente de açaí não causou alterações morfológicas na linhagem HT-29 (Figura 37C).

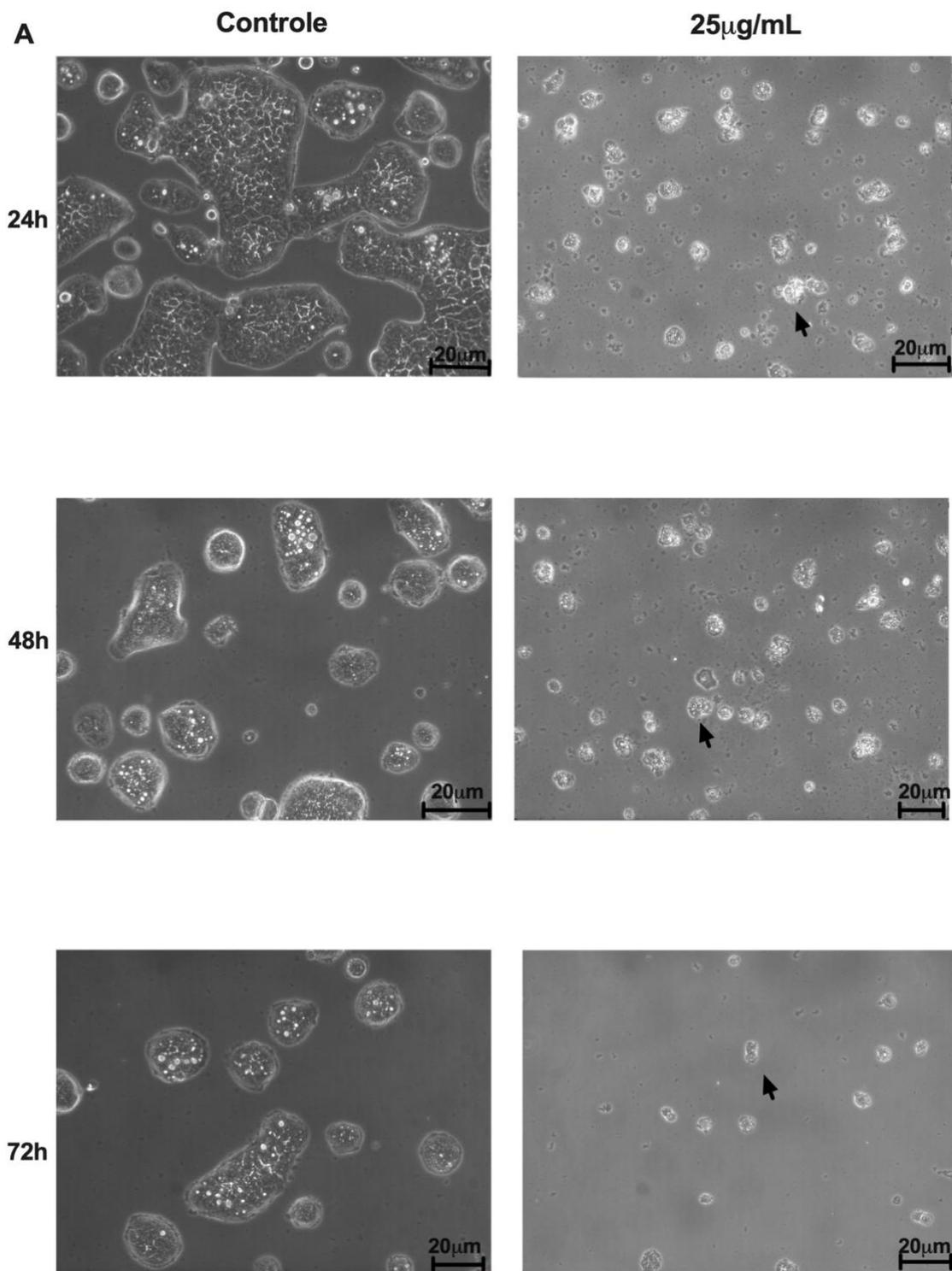


Figura 37A. Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos do óleo da semente de açaí na linhagem celular CACO-2. O óleo causou modificações significativas na concentração de 25 μ g/ml, tais como arredondamento celular, diminuição do volume celular e aparente lise, com perda do conteúdo intracitoplasmático (seta).

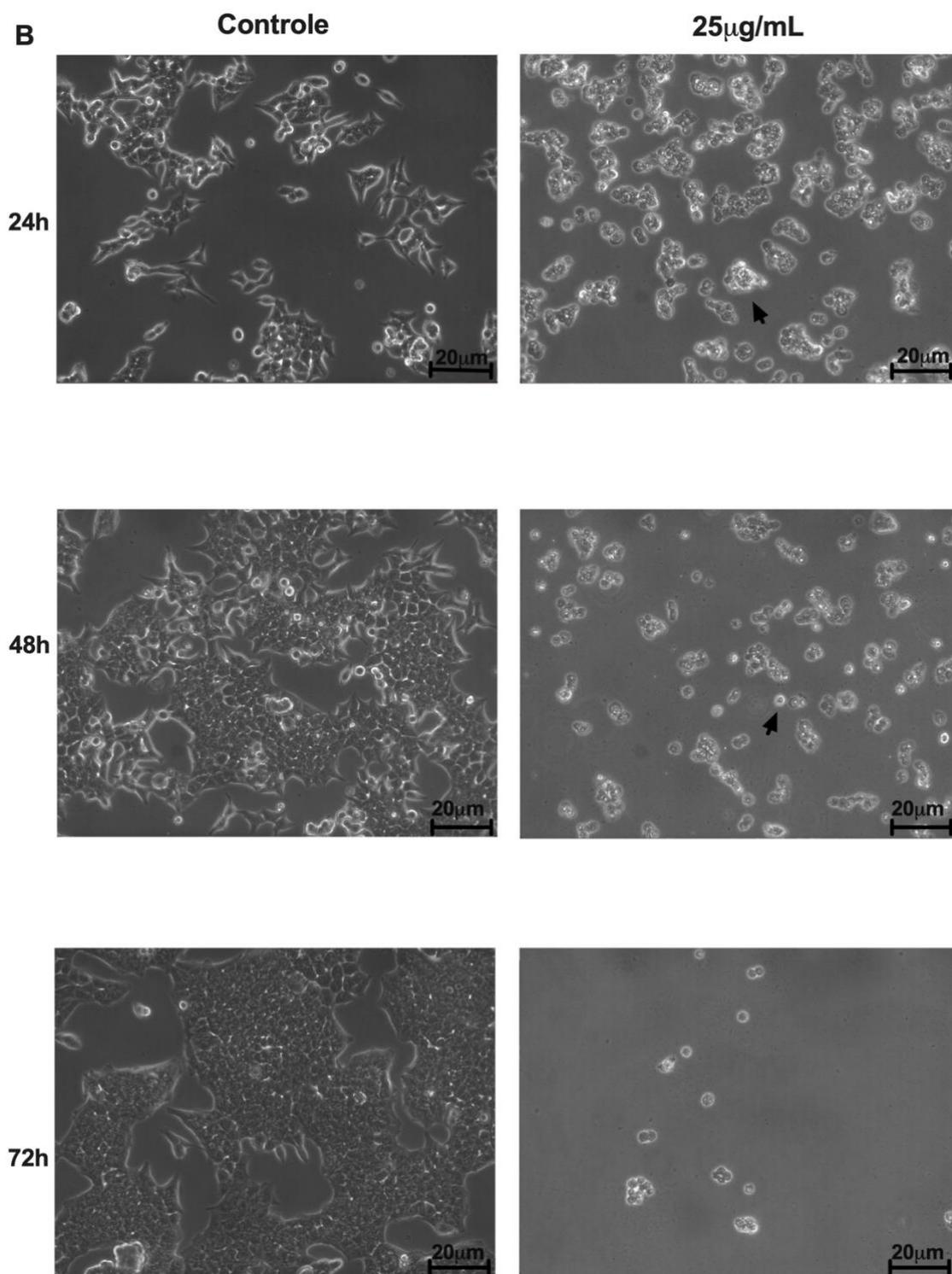


Figura 37B. Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos do óleo da semente de açaí na linhagem celular HCT-116. O óleo causou modificações significativas na concentração de 25 μ g/ml, tais como diminuição do tamanho e perda do conteúdo intracitoplasmático (seta).

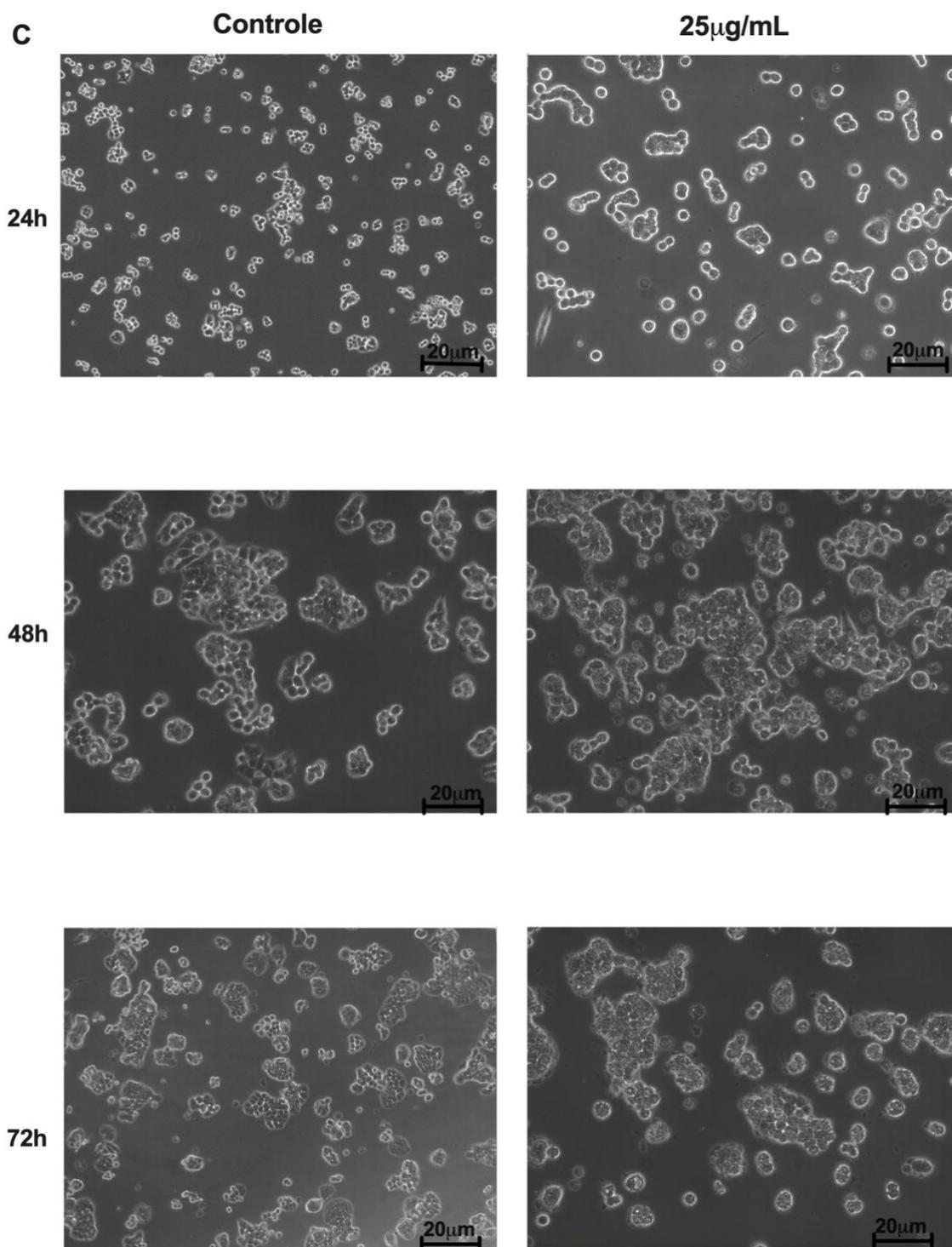


Figura 37C. Análise morfológica por microscopia de luz dos efeitos citotóxicos do óleo da semente de açaí na linhagem celular HT-29. O óleo não causou modificações significativas na concentração de 25 μ g/ml.

5.7.3 Ensaio de apoptose - Anexina V

Para avaliar os mecanismos de morte celular, realizou-se o ensaio Anexina V para detecção de apoptose.

A Figura 38 demonstra que o tratamento com 25 $\mu\text{g/ml}$ do óleo da semente de açaí aumentou o percentual de células em estágio inicial e tardio de apoptose nas linhagens CACO-2 (Figura 38A e D) e HCT-116 (Figura 38B e D). Não houve indução de apoptose para a linhagem HT-29 na concentração analisada (Figura 38C e D).

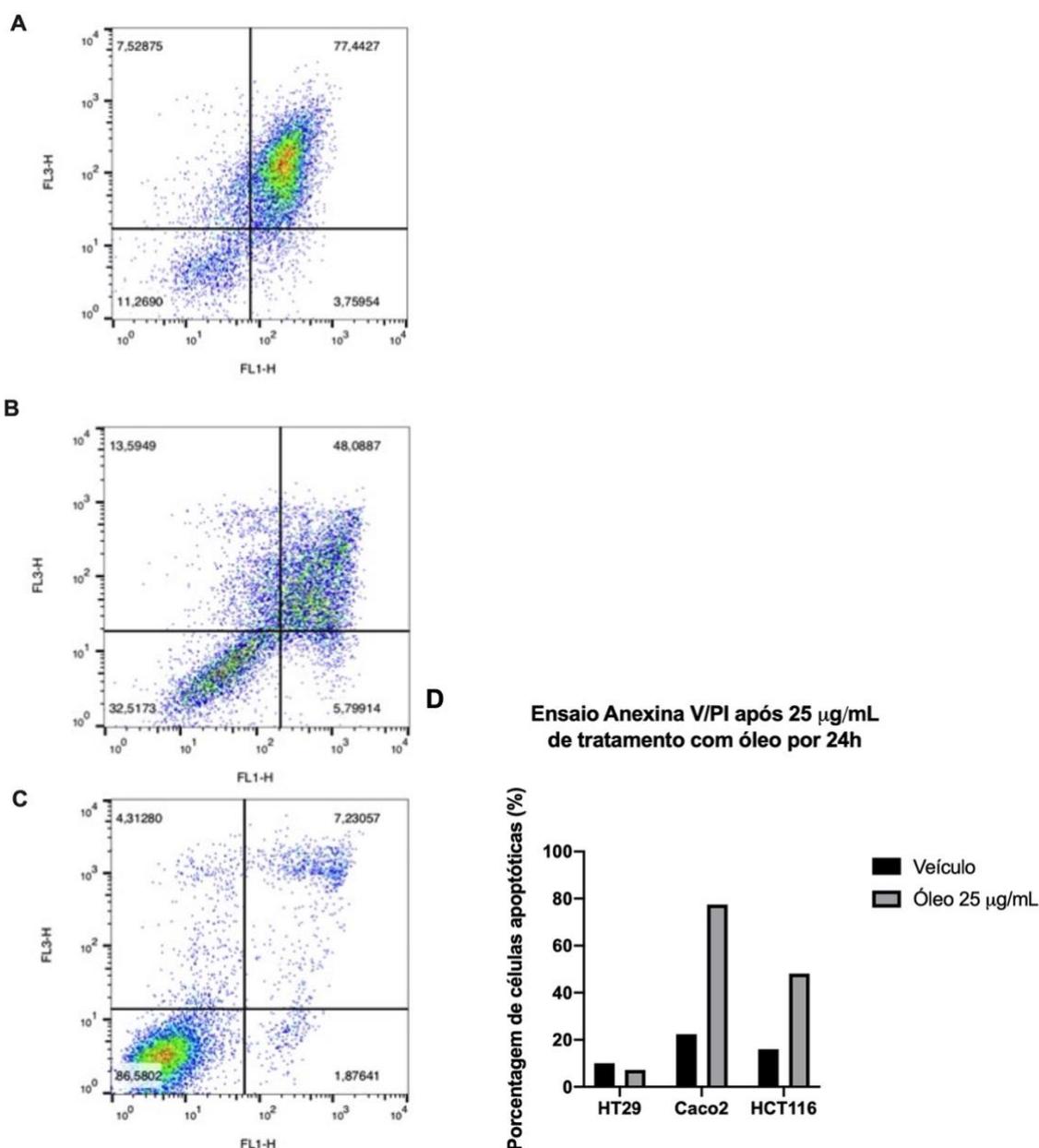


Figura 38. Porcentagem de células em apoptose após tratamento com 25 $\mu\text{g/ml}$ de óleo da semente do açaí. A: CACO-2; B: HCT-116; C: HT-29.

5.7.4 Ciclo Celular

Com os resultados de redução da viabilidade celular e aumento de apoptose nas linhagens CACO-2 e HCT-116, surgiu a hipótese que o óleo pudesse interferir em alguma etapa do ciclo celular. Para avaliar essa hipótese, as células foram tratadas com 25 µg/ml de óleo da semente do açaí por 24h e quantificadas nas fases G1, S e G2/M (Figura 39).

O tratamento com óleo da semente de açaí aumentou o número de células na fase S da linhagem CACO-2 (de 32,3 para 61,5%) (Figura 39A e B).

O tratamento com óleo da semente de açaí aumentou o número de células na fase G0/G1 da linhagem HT-29 (de 47,9 para 56,7%), o que pode sugerir fragmentação do DNA (Figura 40A e B).

Não foi possível analisar o ciclo celular na linhagem HCT-116 pois a maioria das células estava morta após o tratamento.

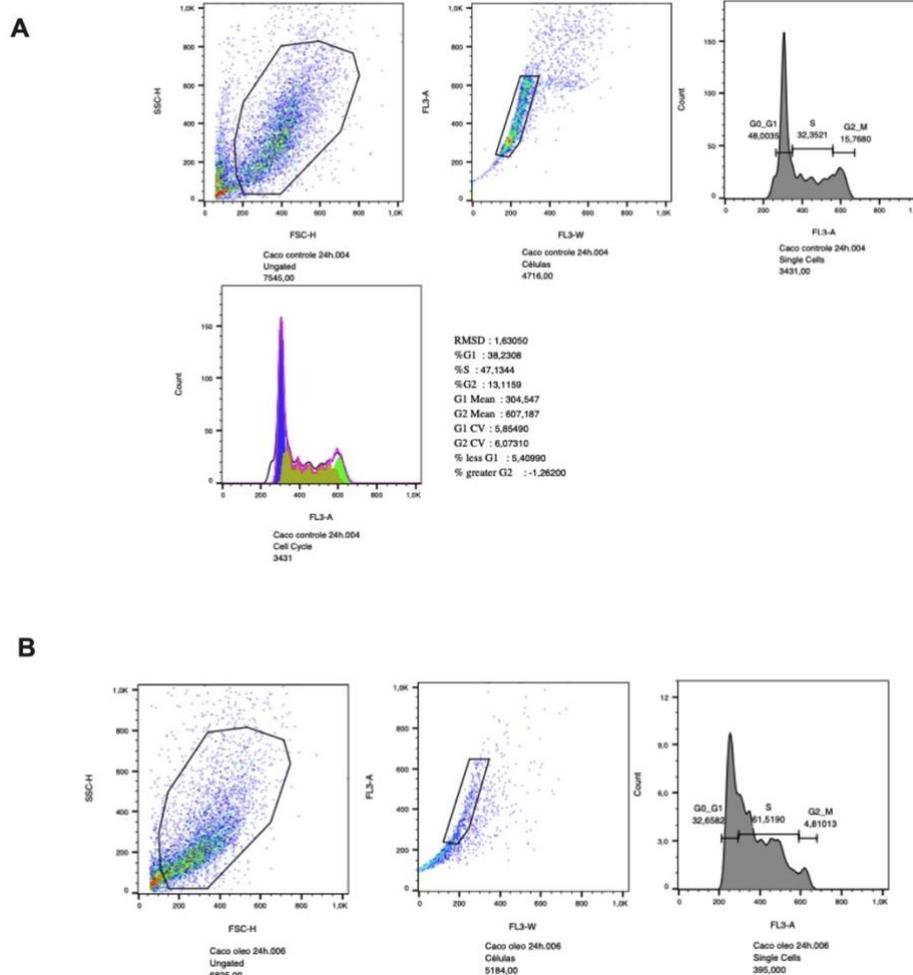


Figura 39. Histogramas representativos do conteúdo de DNA em células CACO-2. A: controle; B: óleo.

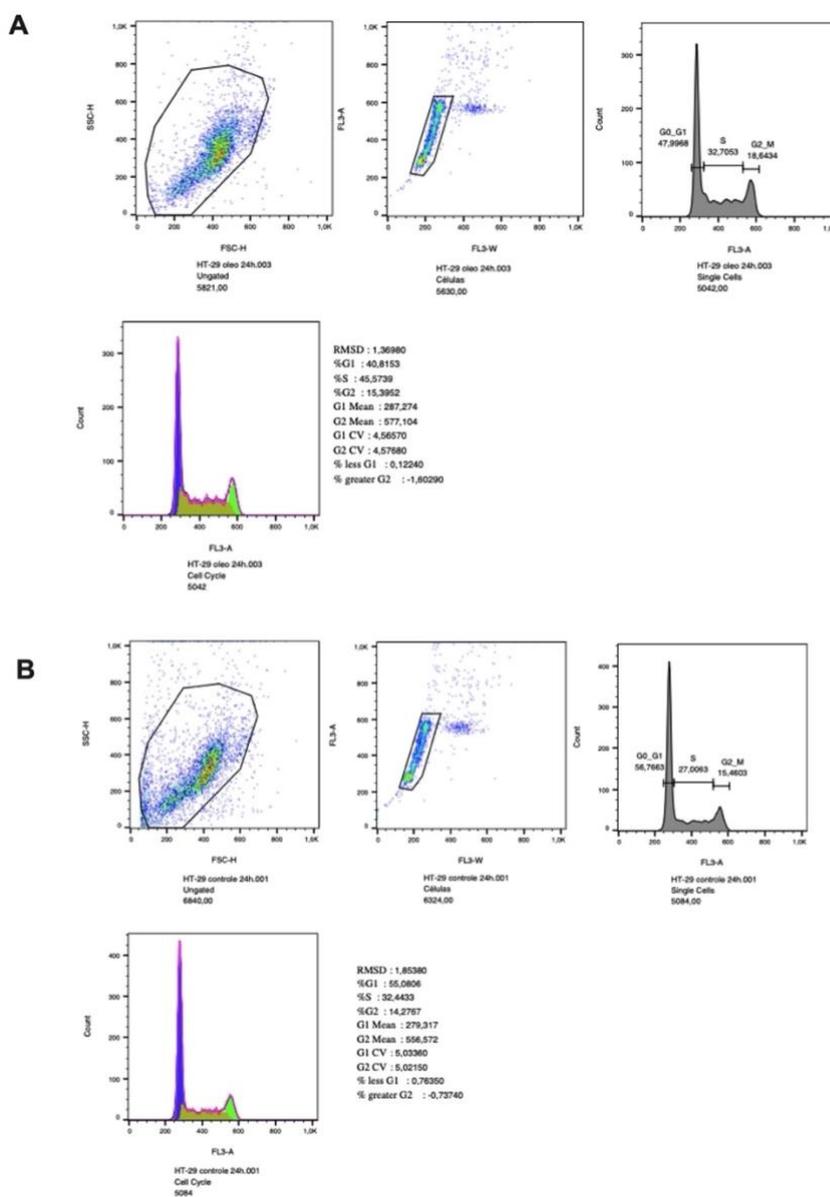


Figura 40. Histogramas representativos do conteúdo de DNA em células HT-29. A: controle; B: óleo.

5.7.5 Western Blotting

A partir dos resultados obtidos de viabilidade celular, apoptose e ciclo celular, foi analisada a expressão de proteínas através do western blotting.

Para fins de confirmação da ocorrência de autofagia, foi analisada a expressão da proteína LC3-B II através da técnica de Western Blotting. Durante a autofagia, a proteína LC3B-I é convertida em LC3B-II, sendo, portanto, a

quantidade de LC3B-II relacionada ao número de autofagossomas (BARTH; GLICK, MACLEOD, 2010).

Além disso, foi analisada a expressão da anexina A2 nas células de adenocarcinoma colorretal.

As anexinas são uma família de proteínas de ligação a fosfolípidios dependentes de cálcio, envolvidas no tráfego e organização da membrana. A anexina A2 (ANXA2), uma das doze anexinas humanas tem sido associada a uma variedade de tumores incluindo câncer colorretal (CRC) (RANKIN et al, 2013; LIU et al, 2015)

Estudos preliminares do Grupo de Biologia Estrutural do INCA demonstraram maior expressão de ANXA2 na linhagem HT-29, o que poderia justificar a maior resistência dessa linhagem ao óleo da semente de açaí (ROCHA et al, 2018).

O padrão seguido durante a técnica foi representativo de quatro experimentos independentes na seguinte ordem: controle, óleo do açaí 25 µg/ml, óleo de açaí 25 µg/ml + 5mM de n-acetilcisteína e 5mM n-acetilcisteína nas linhagens celulares de adenocarcinoma colorretal humano na sequência HT-29, CACO-2 e HCT-116. Foi utilizado GAPDH como controle da concentração proteica.

Foi observado aumento da expressão da proteína LC3-B após 24 horas de tratamento das células CACO-2 e HCT-116 com o óleo da semente de açaí. Evidencia-se também menor expressão de LC3-B quando as células foram pré-tratadas com NAC (Figura 41).

Na figura 42, evidencia-se a expressão da anexina total e fosfo após os tratamentos. As bandas embaixo da anexina são indicativas de apoptose. A célula cliva a ANXA2 formando uma forma truncada. A linhagem CACO-2 apresentou mais isoformas, o que corroborou com o ensaio de apoptose com anexina V (Figura 42).

Ordem: controle (HT, CACO, HCT); óleo (HT, CACO, HCT); óleo + NAC (HT, CACO, HCT); NAC (HT, CACO, HCT)

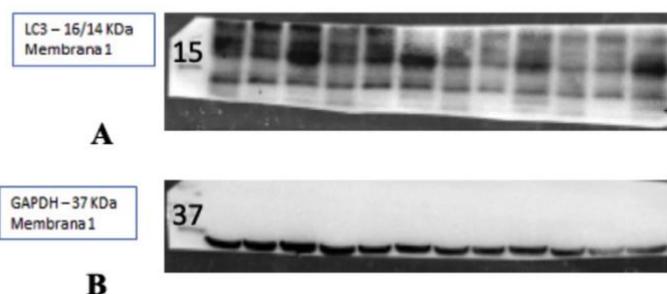


Figura 41. Análise da expressão da proteína LC3-B II através da técnica de Western Blotting. Foi observado aumento da expressão da proteína LC3-B após 24 horas de tratamento das células CACO-2 e HCT-116 com o óleo do caroço de açaí. Quando as células foram pré-tratadas com NAC, houve diminuição da expressão de LC3-B. A proteína GAPDH foi utilizada como controle de concentração protéica.

Ordem: controle (HT, CACO, HCT); óleo (HT, CACO, HCT); óleo + NAC (HT, CACO, HCT); NAC (HT, CACO, HCT)

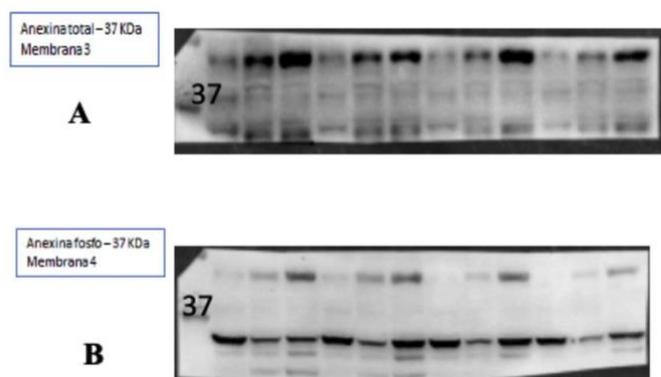


Figura 42. Análise da expressão da proteína Anexina A2 total e fosforilada através da técnica de Western Blotting.

5.7.6 Docking Molecular

Considerando os dados obtidos nos ensaios biológicos *in vitro*, foi verificado se os ácidos graxos principais componentes do óleo da semente de açaí interagem com a ANXA2.

5.7.6.1 Ancoramento molecular no MVD®

O espaço de busca englobando toda a ANXA2 utilizado na primeira corrida de ancoramento molecular, consistiu em uma esfera de raio igual a 46 Å e centro localizado nas coordenadas: $x = -11,99$; $y = 1,01$ e $z = 214,91$. Foi observado que os cinco ácidos graxos estudados tiveram um maior número de

poses nas mesmas duas regiões (Figura 43), o que já era esperado devido à similaridade estrutural entre eles.

Então, foram definidos os seguintes espaços de busca: uma esfera de raio igual a 20 Å e coordenadas $x = -10,04$; $y = -7,17$ e $z = 224,46$ (região 1 na Figura 43 – região observada como sendo a preferencial para complexação dos cinco ligantes); e uma segunda região com raio igual a 20 Å e centro localizado nas coordenadas: $x = -5,62$; $y = -14,21$ e $z = 198,75$ (região 2 na figura 43), que englobava a região N-terminal da ANXA2 e também parte da superfície da ANXA2 próxima à região N-terminal.

É interessante ressaltar que esta última região descrita, além de ter se mostrado favorável para a complexação dos ligantes de estudo, é onde a proteína S100A10 se liga à ANXA2, formando um heterotetrâmero contendo duas unidades de ANXA2 e duas unidades de S100A10 (BHARADWAJ et al., 2013). Há indícios de que esse heterotetrâmero possa ter um papel no desenvolvimento e multiplicação de células cancerosas (BHARADWAJ et al., 2013; CHRISTENSEN et al., 2018; MADUREIRA et al., 2012), portanto a interação favorável de ácidos graxos na região onde a S100A10 se liga na ANXA2 poderia impedir a formação do heterotetrâmero citado e, assim, diminuir o ritmo de multiplicação de células cancerosas.

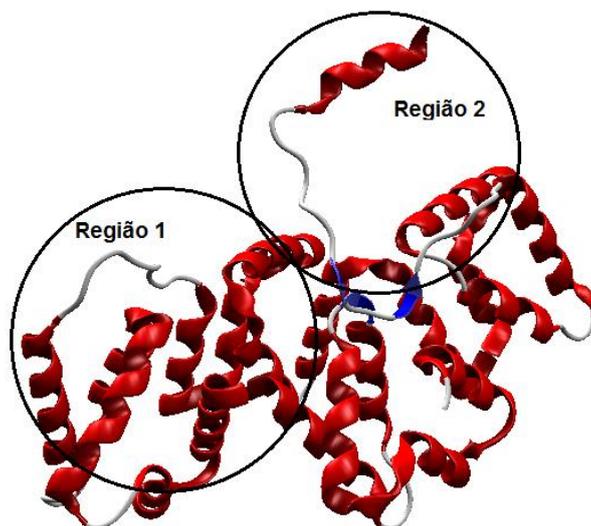


Figura 43. Regiões preferenciais da ANXA2 para complexação dos cinco ácidos graxos.

Para cada uma das duas regiões mostradas na Figura 43, foi eleita uma pose de cada ácido graxo para a etapa subsequente de dinâmica molecular (DM). A escolha da pose levou em consideração a pontuação Moldock mais

negativa, indicando a menor energia e, portanto, maior estabilidade do complexo formado entre a pose e a proteína, e, também se a pose era representativa daquele ligante, ou seja, se havia muitas outras poses similares a ela, fato que indica a maior probabilidade de o ligante de fato adotar aquela conformação ao se complexar com a ANXA2 em testes *in vitro*.

Os valores de energia de ancoramento obtidos para as poses selecionadas, assim como os resíduos observados em ligações hidrogênio, são listados na Tabela 3, enquanto as respectivas poses estão ilustradas na Figura 44. Na Tabela 3 é possível observar que todas as poses apresentaram valores de energia bastante negativos, variando de -84 a -112 Kcal/mol. Esse resultado sugere que os ácidos graxos têm bastante afinidade pela proteína e são capazes de complexar nas respectivas regiões.

É interessante notar que as duas poses selecionadas do ácido mirístico são muito parecidas. A diferença expressiva entre elas é o fato de que uma das poses tem a extremidade carboxílica voltada para fora da proteína e a outra, para dentro. As duas poses estão praticamente na mesma região da proteína porque existe uma pequena sobreposição entre os dois espaços de busca utilizados para as simulações de ancoramento molecular.

Tabela 3. Valores de energia e resíduos de interação das melhores poses de cada ácido nas duas regiões.

Ligante	Região de ancoramento da pose	Pontuação MolDock (kcal mol ⁻¹)	Resíduos interagindo com a pose por ligação de hidrogênio
Ácido Láurico	Região 1	-99,42	Arg179
Ácido Láurico	Região 2	-84,21	Asn65, Arg68, Ser296
Ácido Mirístico	Região 1	-94,63	Asn65, Arg68
Ácido Mirístico	Região 2	-88,14	Ser22, Lys302
Ácido Palmítico	Região 1	-93,35	Asp187, His224, Lys227
Ácido Palmítico	Região 2	-99,54	Asn65
Ácido Oleico	Região 1	-111,42	Arg178
Ácido Oleico	Região 2	-97,39	Ala29
Ácido Linoleico	Região 1	-105,94	Arg179
Ácido Linoleico	Região 2	-112,26	Asn65, Arg68, Ser296

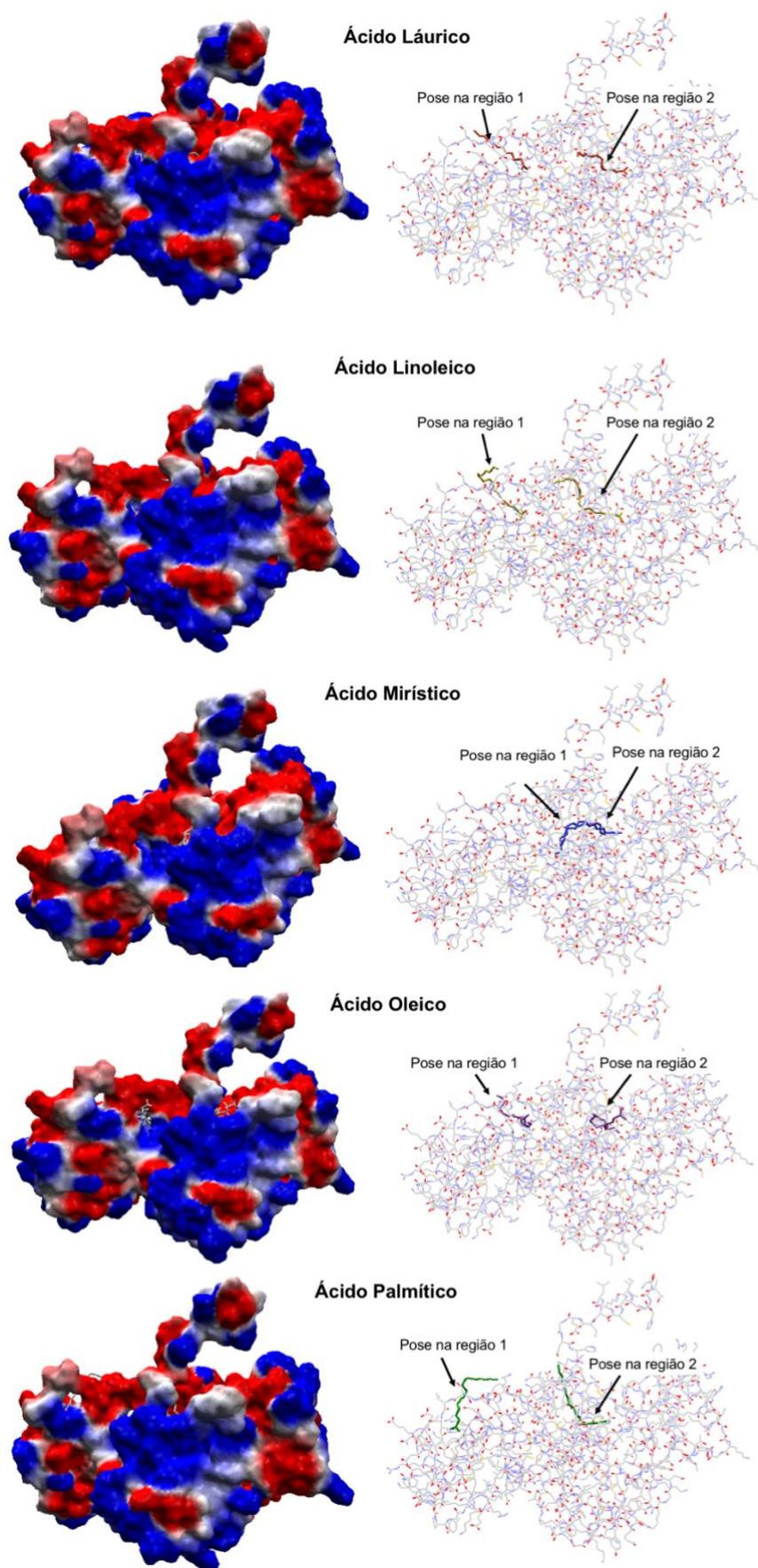


Figura 44. Poses selecionadas de cada ligante para simulações de DM.

5.7.6.2 Simulações de DM

Cada uma das poses previstas por ancoramento molecular e mostradas na Figura 44 foi submetida a simulação de DM para avaliação de seu comportamento e estabilidade ao longo do tempo de 50 ns. Observou-se que, embora as duas poses estudadas de cada ligante tenham tido resultados similares de DM, as poses localizadas na região 2 da Figura 36, ou seja, mais próximas do domínio N-terminal da proteína, eram, de maneira geral, mais estáveis.

A Figura 45 mostra os valores de energia total (média e desvio padrão) dos sistemas formados por ANXA2 e cada ligante submetido às simulações de DM. Como pode ser visto todos os complexos apresentaram energia abaixo de $-9,5 \times 10^5 \text{ kJ mol}^{-1}$ e baixos valores de desvio padrão, ou seja, todos os complexos apresentaram estabilidade satisfatória durante o tempo de simulação, corroborando com os resultados dos estudos de ancoramento.

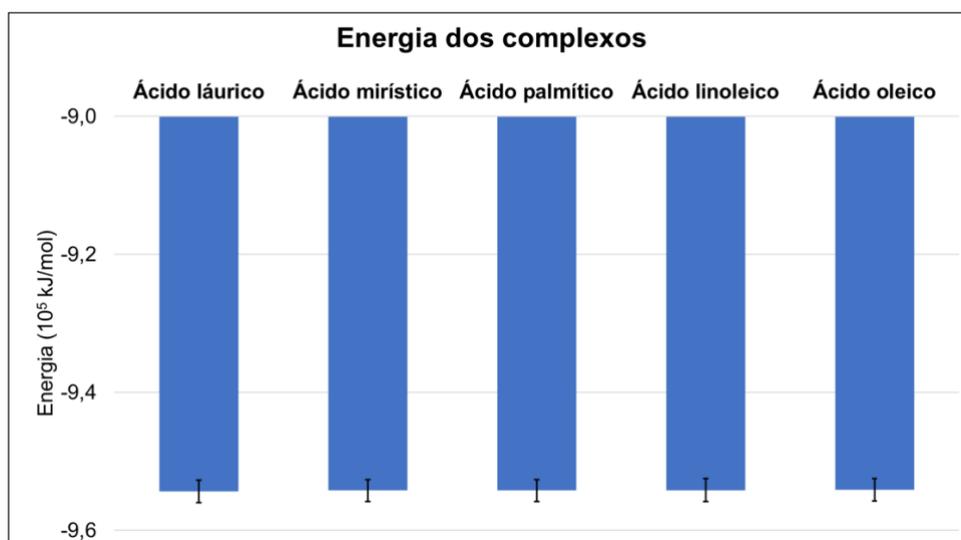


Figura 45. Média e desvio padrão da energia dos complexos ANXA2-ligante ao longo do tempo de DM.

Também foram analisados os valores de desvio da raiz média quadrática (DRMQ) da ANXA2 e do ligante em cada complexo durante os 50 ns de simulação representados na Figura 46 em função do tempo, e na Figura 47 sob a forma de gráfico de barras.

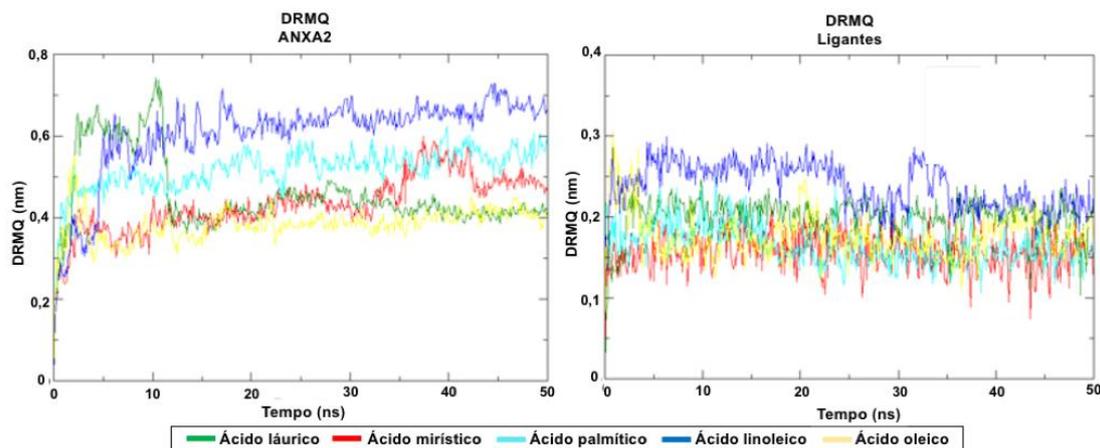


Figura 46. DRMQ dos ligantes e da ANXA2 em cada complexo.

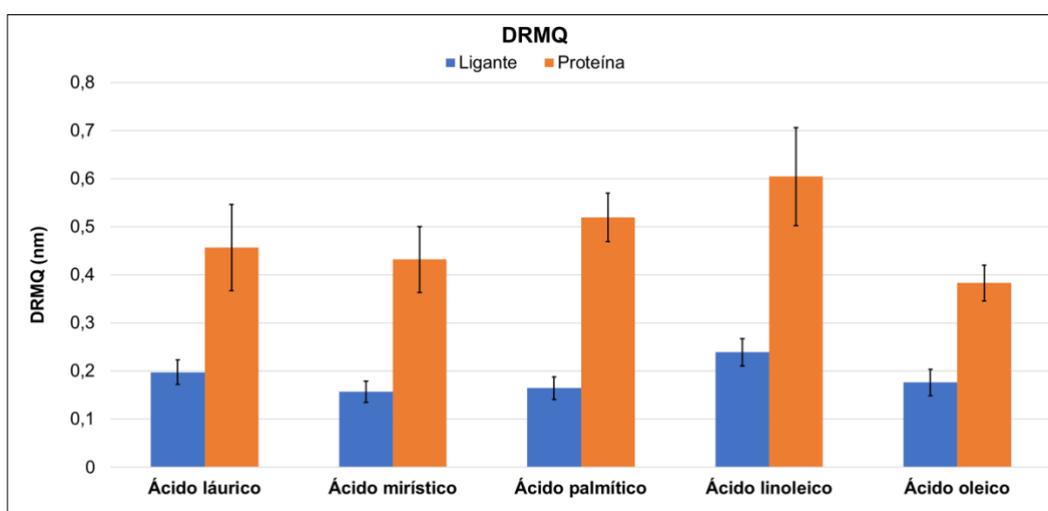


Figura 47. Média e desvio padrão dos valores de DRMQ dos complexos proteína-ligante.

Os valores de DRMQ da ANXA2 em todos os complexos foram mais altos que os respectivos valores de DRMQ dos ligantes durante o tempo de simulação de 50 ns, o que era esperado devido ao tamanho da proteína e sua consequente mobilidade. Os cinco ligantes apresentaram valores de DRMQ em torno de 0,2 nm, valores bastante baixos e que indicam a boa estabilidade desses ligantes quando complexados com a ANXA2.

O complexo formado por ANXA2 e ácido linoleico foi o que apresentou os maiores valores médios de DRMQ da proteína e do ligante (Figura 47), indicando que, dentre os compostos estudados, este seria o menos promissor para formar um complexo estável e, portanto, duradouro, com a ANXA2.

Foram examinadas também as ligações hidrogênio formadas entre cada um dos cinco ácidos graxos e a ANXA2 durante o tempo de simulação de DM. Os resultados estão apresentados na Figura 48.

Como pode ser visto os ligantes não formam ligações hidrogênio muito numerosas com aminoácidos da ANXA2, o que era esperado dado que os ligantes são ácidos graxos que só possuem 1 átomo de oxigênio na molécula capaz de estabelecer ligações hidrogênio. Mesmo assim, este fator não impediu que os cinco ligantes tenham formados complexos estáveis com a ANXA2, sendo capazes de permanecer interagindo com essa proteína durante todo o tempo de DM. Três dos cinco ligantes, os ácidos láurico, palmítico e linoleico, estabeleceram ligações hidrogênio com os mesmos aminoácidos: Asn65 e Arg68, indicando uma possível importância desses aminoácidos na estabilidade dos complexos formados.

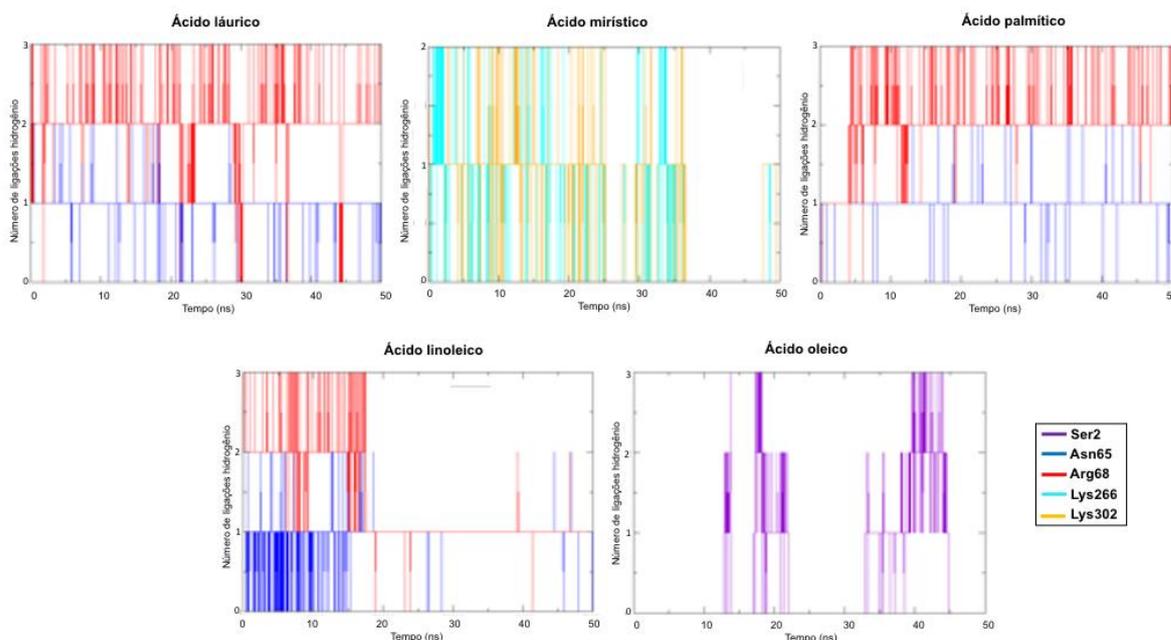


Figura 48. Ligações hidrogênio entre ANXA2 e os durante a DM.

5.8 Experimentos *in vivo* – Tumor sólido de Ehrlich

5.8.1 Avaliação do efeito do extrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart. no desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich

No dia 0 foi feito inóculo do tumor de Ehrlich no dorso dos animais, seguido do tratamento intraperitoneal com Ciclofosfamida 25mg/kg (CTL+), PBS oral (CTL -) e extratos nas concentrações de 100, 300 e 1000mg/kg em esquemas preventivos e de intervenção após 24h da indução durante 15 dias.

A figura 49 representa a cinética do volume médio do tumor ao longo do tratamento de 15 dias. A partir do sexto dia houve redução do volume tumoral de forma significativa no grupo preventivo 1000mg/kg quando comparado ao controle negativo.

Quando se comparou o peso do tumor, observou-se que o grupo que recebeu extrato da semente de açaí na dose de 1000mg/kg de forma preventiva teve uma redução significativa do tumor quando comparado ao controle negativo ($p=0,01$) (Figura 50A). Não houve diferença entre os grupos quando se analisou o peso relativo do tumor (Figura 50B).

Desenvolvimento do tumor

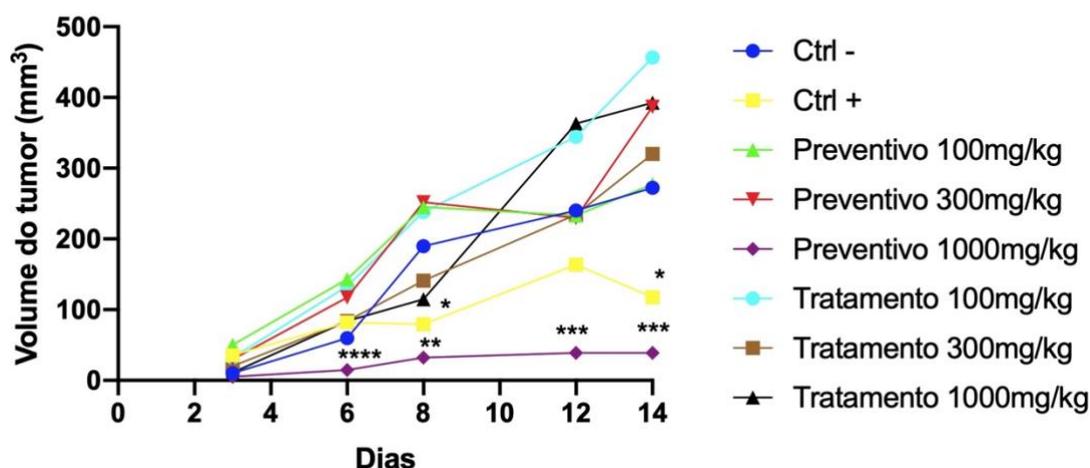


Figura 49. Efeito do extrato da semente de açaí no desenvolvimento do tumor de Ehrlich. A partir do sexto dia houve redução do volume tumoral de forma significativa no grupo preventivo 1000mg/kg quando comparado ao controle negativo. Valores foram expressos como média \pm erro padrão. One-way ANOVA, pós-teste de Sidak's. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

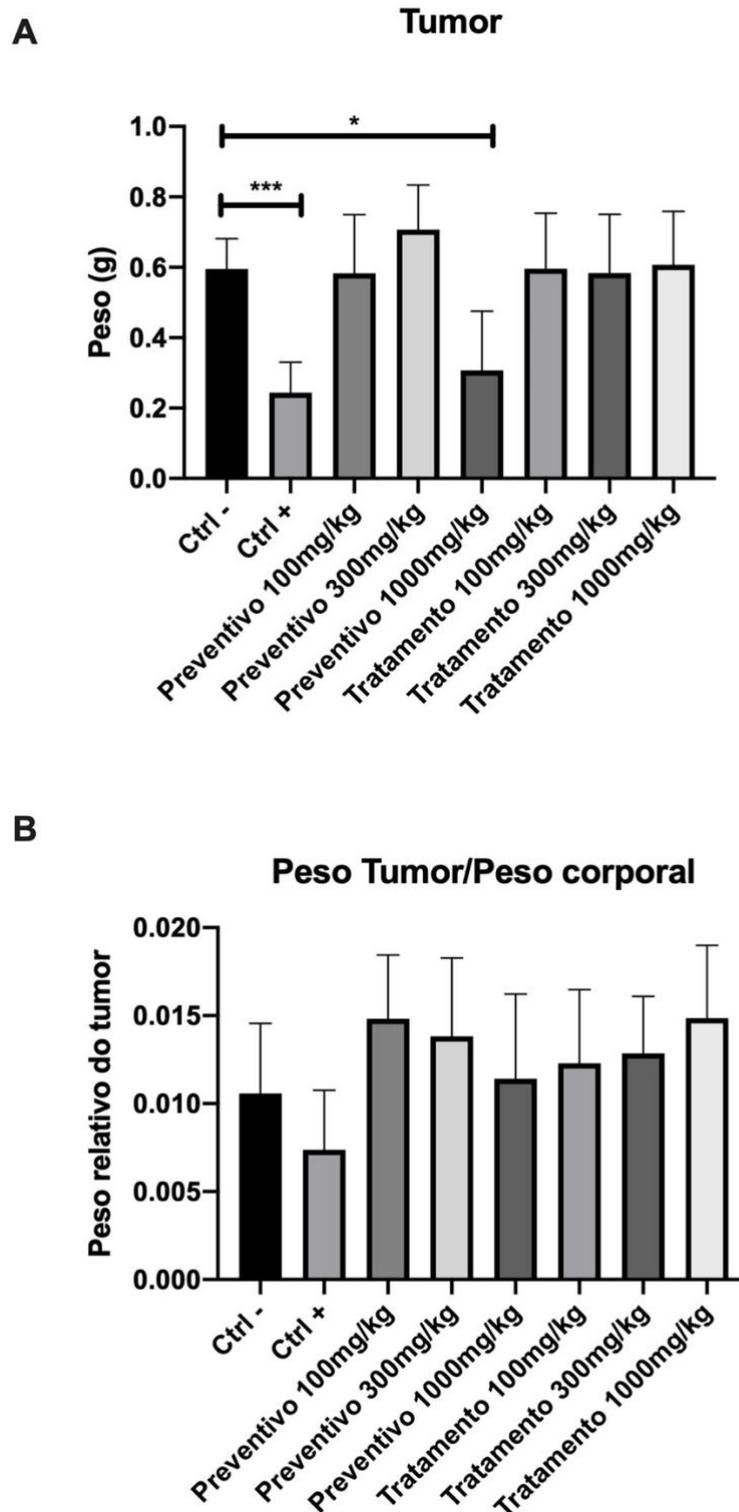


Figura 50. Efeito do extrato da semente de açaí no peso absoluto (A) e relativo (B) do do tumor de Ehrlich. Houve redução significativa do peso do tumor no grupo preventivo 1000mg/kg quando comparado ao controle negativo. Valores foram expressos como média \pm erro padrão. One-way ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0.05$

5.8.2 Avaliação do efeito do extrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart. no peso dos animais

Na avaliação do peso dos animais, houve variação negativa do peso corporal ao final do tratamento apenas no grupo que recebeu ciclofosfamida (Figura 51A).

Na avaliação da variação de peso ao longo do tratamento, não ocorreu variação significativa do peso dos animais após a indução tumoral na maioria dos grupos tratados (Figura 51B).

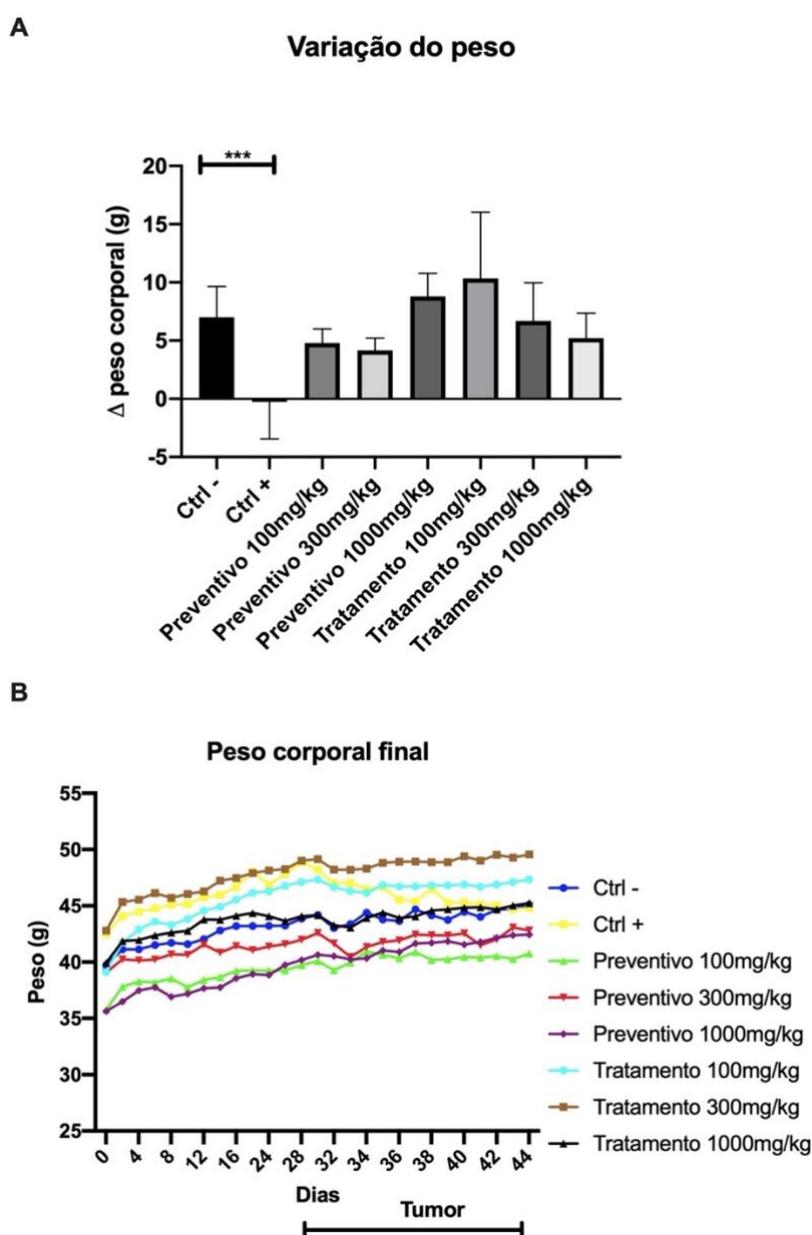


Figura 51. Efeito do extrato da semente de açaí na variação do peso dos animais ao final do tratamento (A) e cinética do peso ao longo do tratamento (B). Houve redução significativa do peso dos animais apenas no grupo que recebeu ciclofosfamida. One-way ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

5.8.3 Avaliação do efeito do extrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart. no peso dos órgãos

Alguns órgãos foram pesados e observados macroscopicamente para possíveis sinais de toxicidade do tratamento ganho de peso (Figura 52). Em comparação com o grupo controle, o baço dos animais tratados com ciclofosfamida apresentou redução do peso ($p=0,01$) (Figura 52A). Não houve diferença estatisticamente significativa no peso absoluto e relativo do fígado (Figuras 52B e C) nem no peso absoluto e relativo do rim (Figura 52D e E).

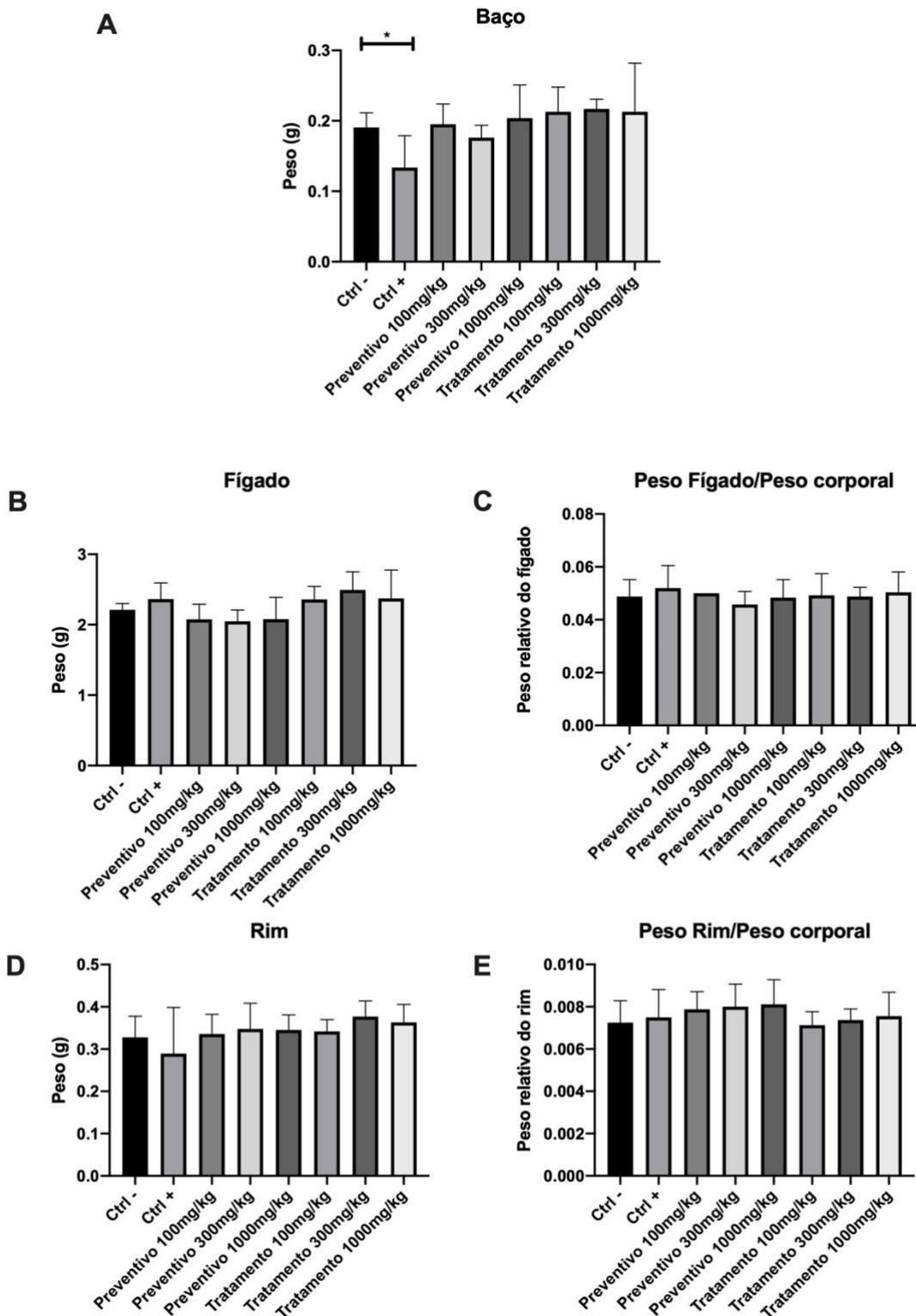
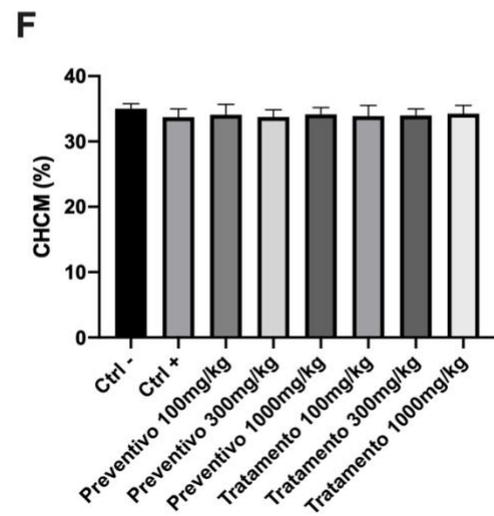
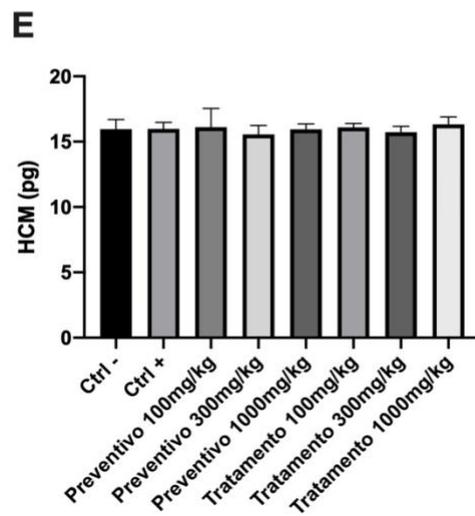
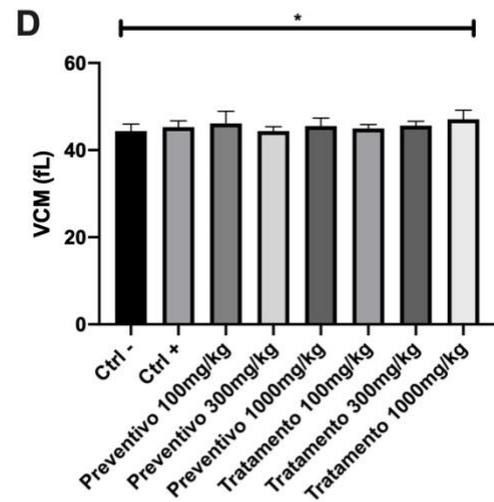
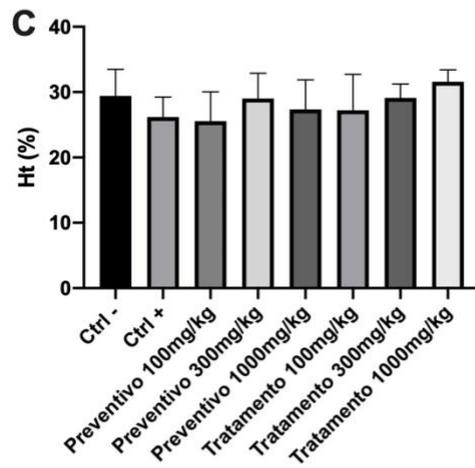
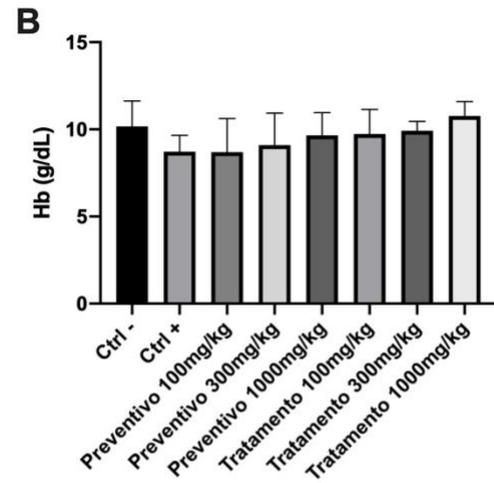
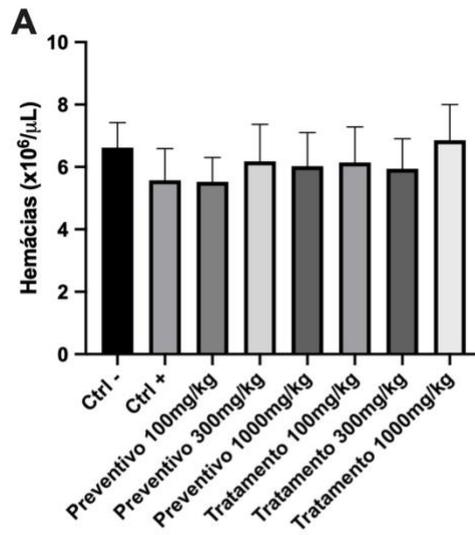


Figura 52. Efeito do extrato da semente de açaí na variação do peso dos órgãos: baço (A), fígado (B e C) e rim (D e E). Houve redução do peso do baço no grupo que recebeu ciclofosfamida e aumento do peso do fígado no grupo tratamento 300mg/kg. One-way ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

5.8.4 Avaliação do efeito do extrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart. em parâmetros hematológicos

Não houve alterações significativas dos valores hematimétricos (hemácias, hemoglobina, hematócrito, HCM, CHCM) entre os grupos (Figuras 53A-C, E e F). Apenas para o VCM, o grupo tratamento 1000mg/kg apresentou aumento discreto quando comparado ao controle negativo (Figura 53D)

Houve redução significativa do número de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos entre o grupo tratado com ciclofosfamida (Figuras 53G-I), devido ao efeito citotóxico desse quimioterápico.



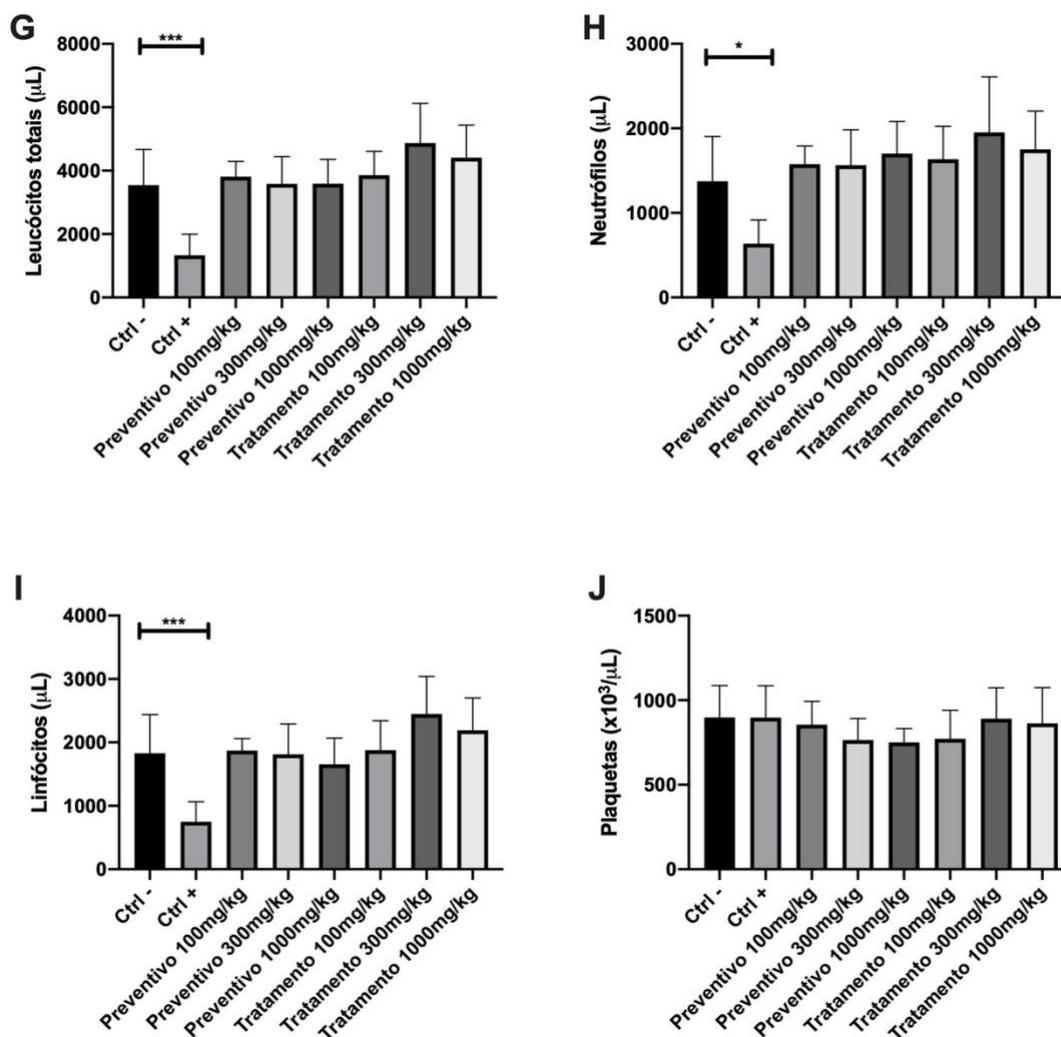


Figura 53. Efeito do extrato da semente de açaí nos valores hematimétricos, contagem de leucócitos e plaquetas. Resultados expressos como média + desvio-padrão. (A) hemácias, (B) hemoglobina, (C) hematócrito, (D) VCM (volume corpuscular médio), (E) HCM (hemoglobina corpuscular média), (F) CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), (G) leucócitos totais, (H) neutrófilos, (I) linfócitos e (J) plaquetas. One-way ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

5.8.5 Avaliação da celularidade dos órgãos linfóides

Na avaliação da celularidade dos órgãos linfóides: baço e medula óssea, houve redução significativa da quantidade de células no baço no grupo tratado com ciclofosfamida quando comparado ao controle. Houve aumento da celularidade do baço no grupo preventivo 1000mg/kg quando comparado ao controle negativo (Figura 54A). Quanto à celularidade da medula, houve aumento nos grupos tratamento 300mg/kg e 1000mg/kg quando comparados ao controle negativo (Figura 54B).

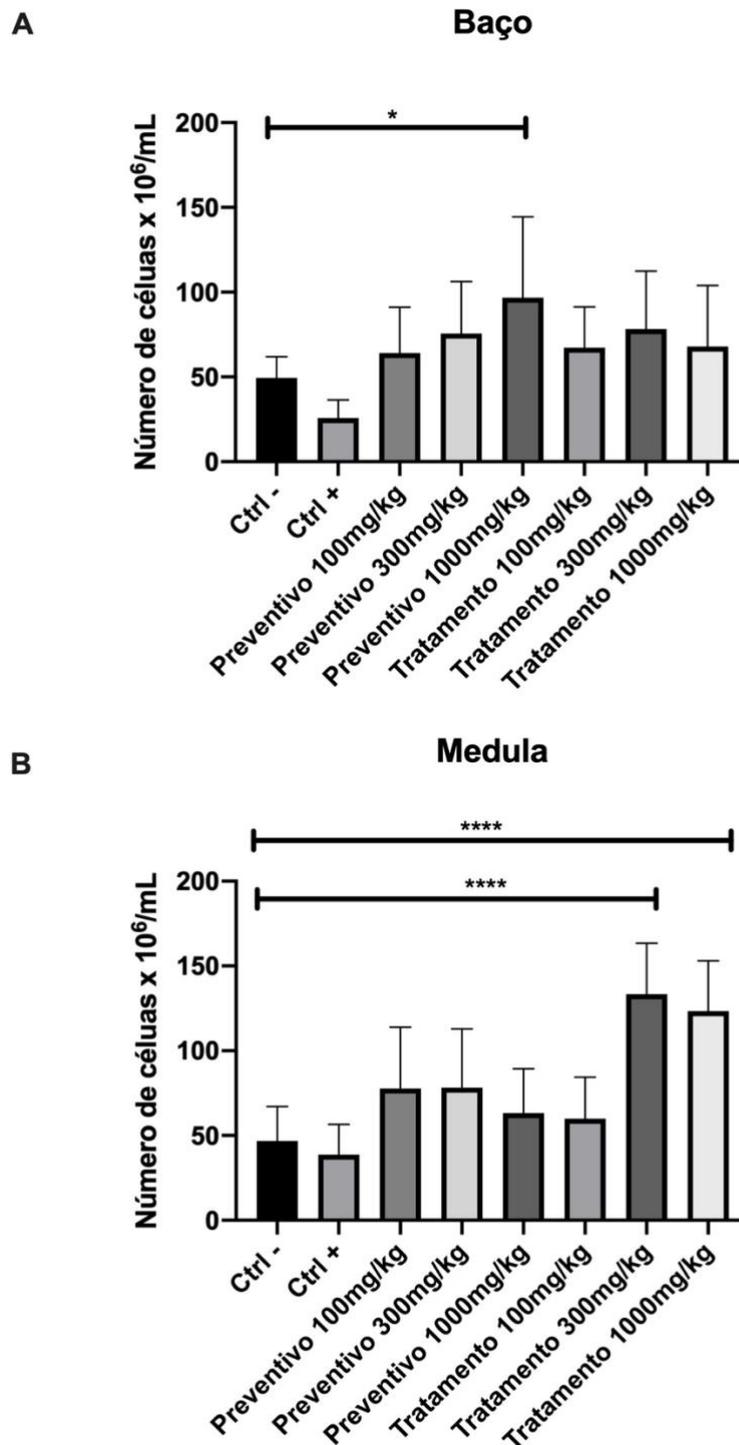


Figura 54. Efeito do extrato da semente de açaí na celularidade do baço (A) e da medula óssea (B). One-way ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

5.8.6 Efeito do extrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart. sobre as citocinas inflamatórias

Dentre as citocinas testadas, não houve expressão de IL-12p70, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e INF- γ . Houve um aumento da concentração de TNF nos grupos tratados com o extrato nos grupos preventivo 100mg/kg e 1000mg/kg (Figura 55A). Para a MCP-1, houve um aumento significativo da expressão no grupo controle positivo ($p=0.0004$) e no grupo preventivo 100mg/kg quando comparado ao controle negativo ($p=0.01$) (Figura 55B).

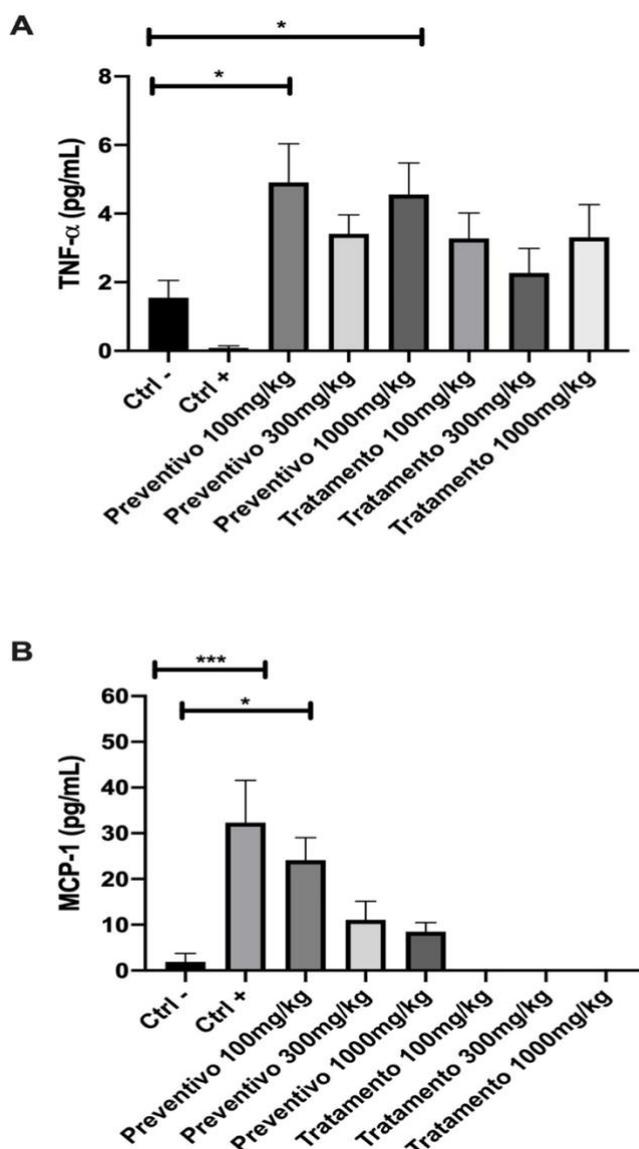


Figura 55. Efeito do extrato da semente de açaí na expressão de citocinas TNF (A) e MCP-1 (B). One-way ANOVA, pós-teste de Dunnett's. $*p<0.05$.

5.8.7. Avaliação histopatológica após tratamento com extrato da semente de açaí

A análise histopatológica mostrou a presença de massas tumorais no dorso dos animais dos grupos com tumor sólido de Ehrlich (Figura 56).

As massas tumorais apresentavam alta celularidade, algumas com pronunciada vacuolização citoplasmática, além de acentuado pleomorfismo nuclear e nucléolos proeminentes infiltrando o tecido conjuntivo subcutâneo. Nenhum dos grupos apresentou metástase.

O grupo preventivo na dose de 1000mg/kg reduziu significativamente o tamanho do tumor. A amostra apresentou menor índice proliferativo (1) e também apresentou necrose em 95% da amostra em comparação ao controle negativo (Figura 56E).

As análises histopatológicas do fígado e rim não evidenciaram alterações nos diferentes grupos tratados. Não houve evidência de toxicidade do extrato nem presença de invasão tumoral nesses órgãos. (Figuras 57 e 58).

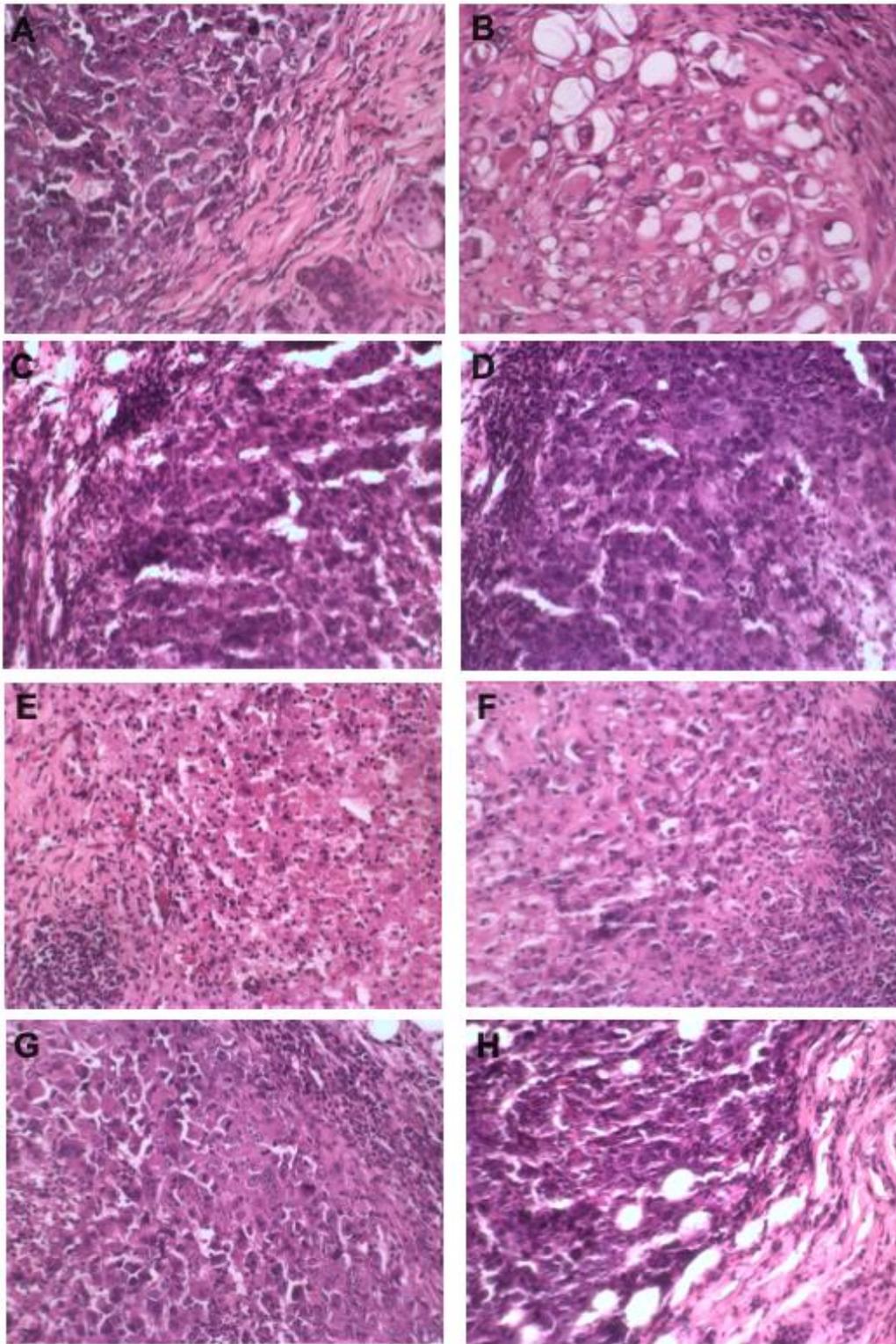


Figura 56. Análise histopatológica em tumor sólido de Ehrlich. Apresentam-se os grupos controle negativo (A), controle positivo (B), grupos preventivos nas doses de 100 (C), 300 (D) e 1000mg/kg (D) e de intervenção nas doses de 100 (F), 300 (G) e 1000mg/kg (H). Aumento de 40x

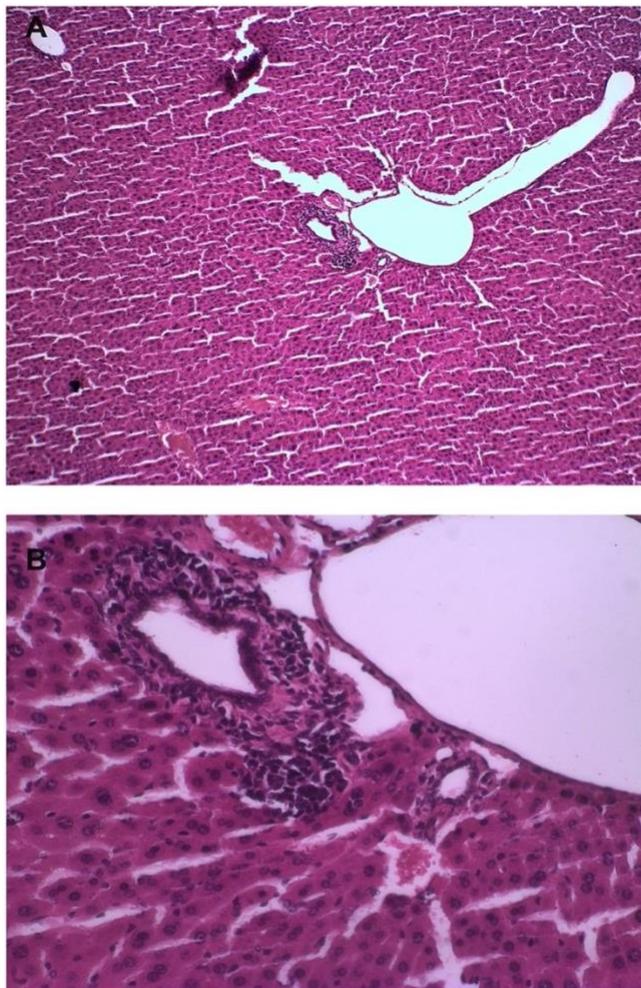


Figura 57 (A e B) Fotomicrografias de fígado apresentando arquitetura lobular preservada e tratos portais discretamente alargados. Observa-se a presença de infiltrado inflamatório linfocitário portal. Não foram observados sinais de neoplasia (H&E x10 e x40)

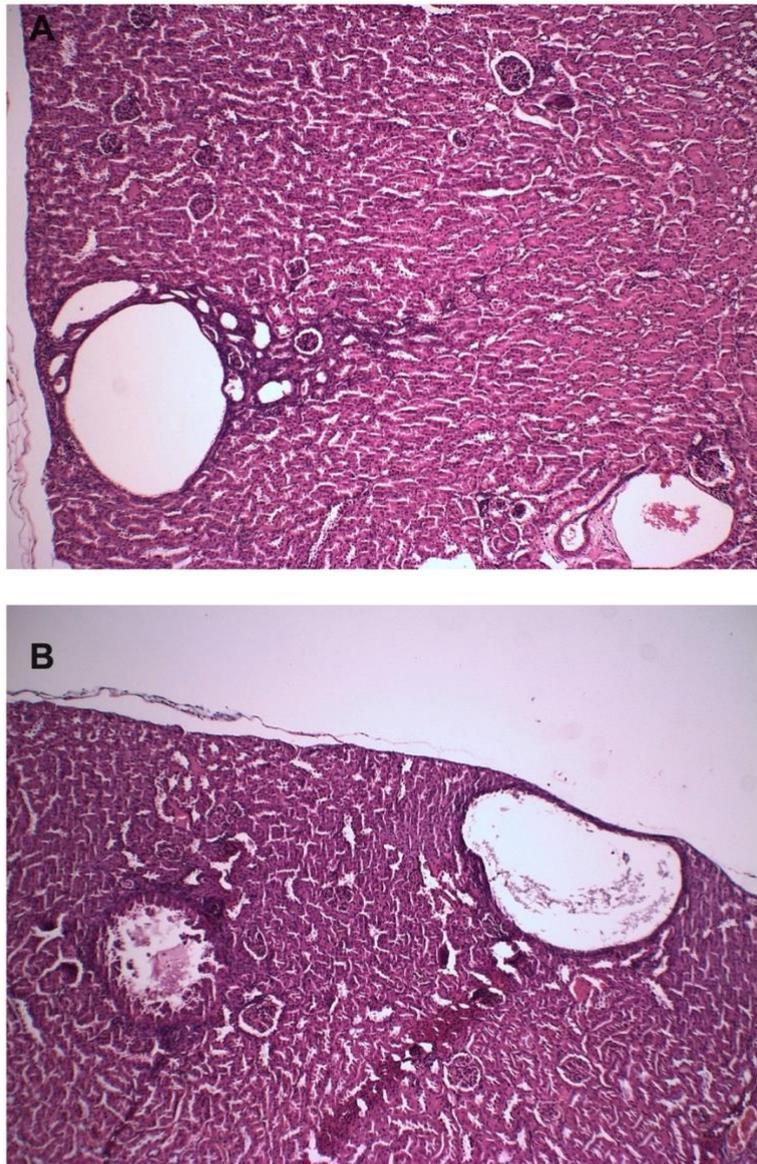


Figura 58 (A e B) Fotomicrografias de rim apresentando arquiteturas cortical e medular preservadas, com glomérulos e túbulos viáveis. Observam-se pequenos cistos epiteliais simples na camada cortical. Não foram observados sinais de neoplasia (H&E x10)

5.8.8. Imunohistoquímica

Foram analisados os tecidos tumorais quanto à imunomarcção com anticorpos anti-anexina e anti-Bax.

Não foi observado imunorreatividade dos dois anticorpos primários nas amostras de tecidos tumorais tratadas com extrato da semente de açaí (Figuras 59 e 60).

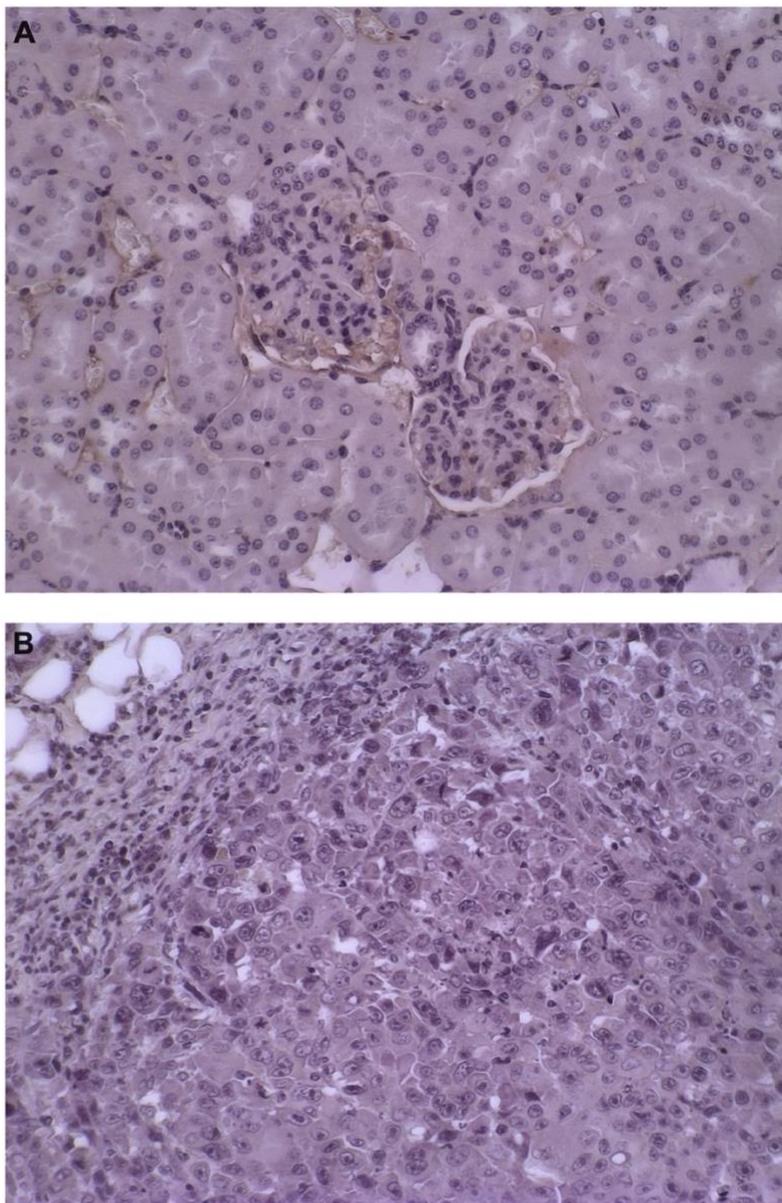


Figura 59. Imunomarcção com anticorpo primário anti-anexina. (A) Controle, 40x, (B) Tumor de Ehrlich, 40x. Não houve imunorreatividade nas amostras tumorais tratadas com extrato da semente de açaí.

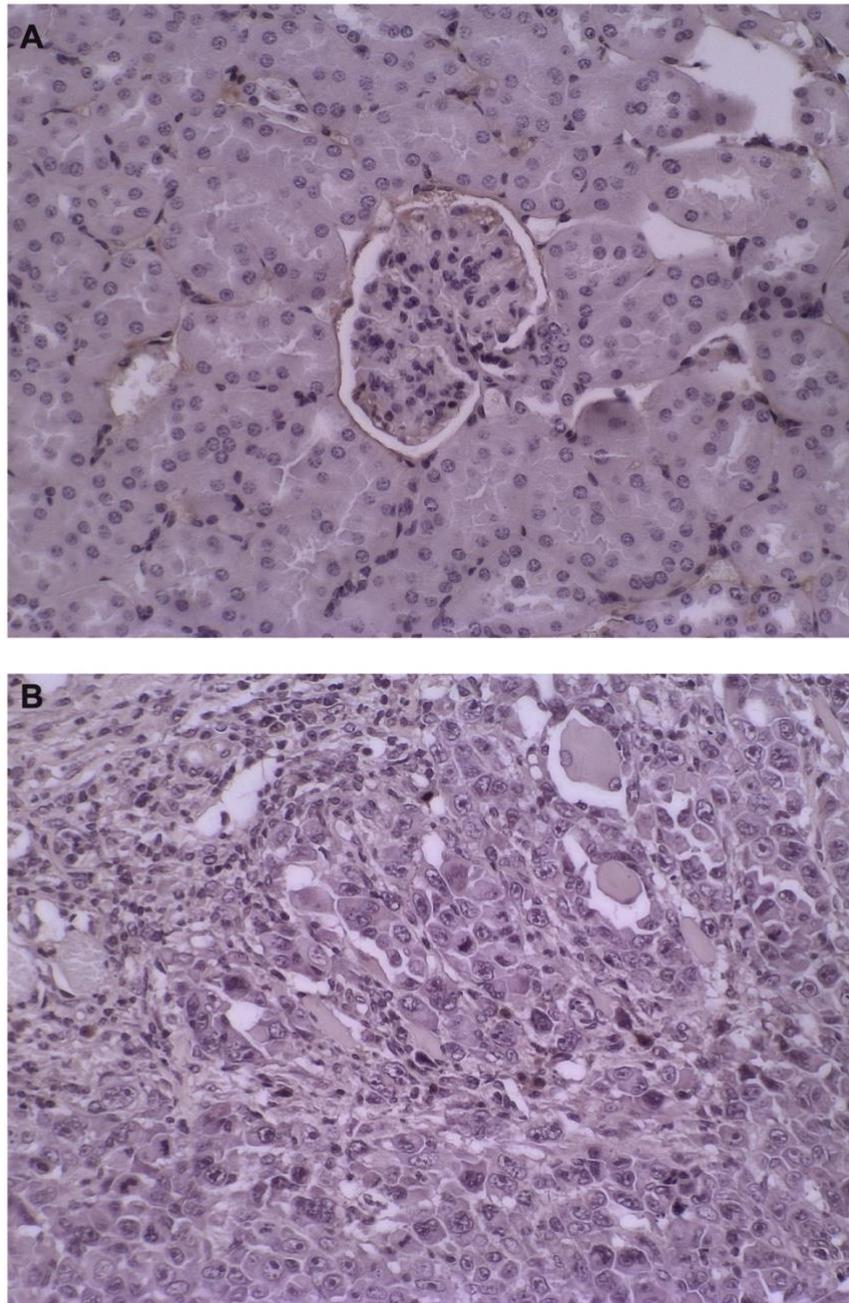


Figura 60. Imunomarcacão com anticorpo primário anti-Bax (A) Controle, 40x, (B) Tumor de Ehrlich, 40x. Não houve imunorreatividade nas amostras tumorais tratadas com extrato da semente de açai.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou os efeitos citotóxicos do extrato hidroalcoólico e óleo bruto da semente de açaí em modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer. Trata-se de um trabalho relevante considerando o uso farmacológico de um subproduto do açaí, habitualmente descartado, com vistas à obtenção de um fármaco bioativo.

Os compostos químicos identificados pelo GNPS eram principalmente flavonóides e antocianinas. Cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo foram relatados como as principais antocianinas (LICHTENTHALER *et al.*, 2005; GALLORI *et al.*, 2004).

Os principais flavonóides encontrados no açaí foram a quercetina, a orientina e seus derivados, bem como as proantocianidinas (LICHTENTHALER *et al.*, 2005; PACHECO-PALENCIA *et al.*, 2009). Orientina, homoorientina, vitexina, luteolina, crioseriol, quercetina e diidrokaempferol também foram identificados nos frutos de açaí (GALLORI *et al.*, 2004; HEINRICH *et al.*, 2011).

Este é o primeiro relato da presença de nobiletina e genisteína-8-C-glicosídeo no açaí (*Euterpe oleracea* Mart.).

Nobiletina (NOB) aumenta a geração de ROS por estimular a disfunção mitocondrial através da diminuição do potencial da membrana mitocondrial, levando à ativação da autofagia (ZHANG *et al.*, 2020). Em células de câncer de ovário, NOB tem como alvo a autofagia para estimular a parada do ciclo celular e a apoptose. Através da regulação positiva da via de sinalização Akt, o NOB inibe a autofagia para sensibilizar as células cancerígenas para a apoptose. A autofagia funciona como um mecanismo pró-sobrevivência, e sua inibição por NOB desencadeia a via intrínseca de apoptose através da indução de caspase-9, caspase-3 e PARP (JIANG *et al.*, 2018)

Em células de adenocarcinoma de mama (MCF-7), NOB não induziu apoptose, porém alteração no ciclo celular para a fase G1 (SURICHAN *et al.*, 2012; MOON *et al.*, 2013).

A eficácia do NOB no tratamento do câncer de cólon está relacionada ao seu impacto na viabilidade e sobrevivência das células cancerígenas. Um metabólito do NOB, conhecido como 4-DMN, e a atorvastatina são capazes de suprimir a malignidade do câncer de cólon através da estimulação da apoptose e da parada do ciclo celular (WU *et al.*, 2018). Desta forma, NOB aumenta a

expressão de p21, enquanto reduz os níveis de CDK2, CDK4, ciclina D e ciclina E (WU et al, 2017).

A genisteína apresenta várias propriedades farmacológicas, incluindo propriedades antioxidantes, principalmente pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes. Também tem inúmeras implicações clínicas no tratamento e prevenção de doenças como diabetes, doenças cardiovasculares, câncer e osteoporose (KALAISELVAN et al., 2010). A genisteína foi relatada na exibição de propriedade antiangiogênese pela regulação do fator de crescimento endotelial vascular 165 e metaloprotease-2 e 9 da matriz em linhagens celulares de câncer de bexiga humano (SU et al., 2005).

Em relação à genisteína, revisão publicada em 2020 reúne vários efeitos da genisteína em modelo experimental de câncer de mama, pelo fato de sua molécula ter semelhança estrutural com o estradiol. A genisteína induz a parada do ciclo celular, possui propriedades antimetastáticas e, em última análise, afeta o crescimento das células do câncer de mama por múltiplos mecanismos. Os efeitos antiproliferativos ou anticrescimento mediados pela genisteína são geralmente observados em concentrações mais elevadas. Essas vias de sinalização envolvem a diminuição de NF- κ B, HIF-1 α , VEGF e um aumento do supressor tumoral p21 (MUKUND et al, 2020)

O extrato da semente de açaí reduziu a viabilidade celular em linhagem de câncer de mama MCF-7. Ensaio clonogênico também mostrou que o extrato da semente de açaí reduziu drasticamente a formação de novas colônias.

Para avaliar a morte celular, utilizamos o ensaio morfológico e o ensaio da caspase 3/7. O tratamento com extrato de semente de açaí não causou apoptose e não houve diferença entre a atividade da caspase 3 e da caspase 7 das células controle e tratadas. No entanto, o ensaio de laranja de acridina foi realizado e o tratamento com 25 μ g/mL de extrato de semente de açaí causou aumento nos componentes ácidos, como lisossomas ou autofagolisossomos, sugerindo morte celular por autofagia.

Silva et al (2014) avaliaram o potencial citotóxico do extrato de semente, casca e polpa de açaí e relataram que o extrato de semente foi o mais eficaz contra a linhagem celular cancerígena MCF-7. Os autores relataram que o extrato da semente de açaí induziu a morte celular por autofagia usando 20 e 40 μ g/mL, resultados semelhantes aos obtidos nesse trabalho.

A fim de avaliar como o extrato da semente de açaí induziu a autofagia, realizamos o ensaio DAF-2A. O tratamento com 25 e 250 µg/mL de extrato de semente de açaí causou um aumento na produção de ROS após 6h quando comparado às células controle, sugerindo a indução de autofagia pelo aumento de ROS em células tratadas com extrato de açaí.

O papel da autofagia em células MCF-7 ainda não está claro. Um estudo envolveu o aumento da autofagia pró-apoptótica para induzir a morte celular (KIM *et al.*, 2015) e o outro envolve a regulação positiva da resistência aos medicamentos pró-sobrevivência (SUN *et al.*, 2011).

O efeito de indução de autofagia do açaí pode ser atribuído à sua alta concentração de polifenóis e flavonóides. A genisteína, de *Lupinus luteus*, induziu a morte celular autofágica e foi considerada por atuar através da modulação de enzimas antioxidantes e vias de sinalização apoptótica em células de câncer de mama (PRIETSCH *et al.*, 2014; ZAVA, DUWE, 1997). A rotlerina, um polifenol natural de *Mallotus philippinensis*, foi capaz de desencadear a morte celular autofágica em células MCF-7 por cascatas de sinalização não canônicas (TORRICELLI *et al.*, 2012). Foi relatado que o resveratrol, um polifenol abundantemente encontrado em muitos alimentos vegetais, inibe o crescimento de células-tronco do câncer de mama por meio da indução de autofagia e da supressão da via de sinalização WNT/b-Catenina (FU *et al.*, 2014).

Os flavonóides presentes em muitas plantas estão associados à atividade antioxidante e podem proteger as células do estresse oxidativo. Por outro lado, os efeitos pró-oxidativos e citotoxicidade de flavonóides, possivelmente devido à geração de ROS, incluindo H₂O₂ e indução de apoptose, foram relatados (KUNTZ *et al.*, 1999; HALLIWELL *et al.*, 2000; MIURA *et al.*, 1998).

Em relação ao óleo da semente de açaí, os ácidos graxos principais foram: ácido mirístico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico e ácido láurico. Nossos resultados mostram que o óleo fixo extraído da semente do açaí é composto por 49,27% de ácidos graxos saturados e 50,73% de ácidos graxos insaturados, sendo 29,73% monoinsaturados e 20,85% poli-insaturados.

Mantovani, Fernandes e Menezes (2003) descreveram um predomínio de ácidos graxos insaturados, principalmente ácido oleico, seguido pelo ácido palmitoleico em menor grau.

Ácido γ -linolênico, ácido linoleico, ácido palmítico e ácido oleico foram os principais constituintes descritos por Mulabagal e Calderón (2012). Resultados semelhantes foram descritos por Yuyama et al. (2011) e Nascimento et al. (2008).

O óleo da semente de açaí induziu apoptose e alterações morfológicas nas linhagens CACO-2 e HCT-116. Para investigar os mecanismos associados à morte celular e o envolvimento de EROs, as células foram pré-tratadas com NAC, havendo aumento da viabilidade celular quando pré-tratadas com antioxidante, sugerindo o envolvimento de ROS no processo de morte celular.

Óleo essencial de *Myrica gale* L., uma planta nativa do Canadá usada na medicina tradicional, tem fortes efeitos citotóxicos em linhagens celulares de câncer de pulmão humano (A549) e cólon (DLD-1) (SYLVESTRE et al, 2005) e o óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. e *Psidium guajava* L., plantas medicinais tailandesas, inibem a proliferação de linhagens celulares de leucemia murina (P388) e carcinoma epidermoide de boca, respectivamente (MANOSROI et al, 2006). Além disso, um estudo recente demonstra que o óleo essencial de pinheiro inibe o crescimento e induz a apoptose em células de carcinoma hepático humano por regulação negativa da expressão de Bcl-2 e atividade da telomerase (WEI et al, 2008). O tratamento de células YD-8 (câncer oral) com óleo essencial de folhas de *P. densiflora* inibiu fortemente a proliferação e sobrevivência e induziu apoptose. O tratamento com levou à geração de ROS, ativação de caspase-9, clivagem de PARP, regulação negativa de Bcl-2 e fosforilação de ERK-1/2 e JNK-1/2 em células YD-8 (JEONG-RANG et al, 2011).

Monge-Fuentes et al. (2017), utilizando óleo de açaí em nanoemulsão verificou fototoxicidade em células de melanoma, com redução da viabilidade celular após o tratamento. Além disso, a morfologia das células B16F10 apresentou perda de volume celular, presença de corpos apoptóticos e perda de adesão celular. No ensaio com Anexina V e PI, a morte celular ocorreu por apoptose/necrose tardia, sugerindo efeito fotossensibilizador com redução da proliferação de células de melanoma.

O óleo de açaí contém 3,4 vezes mais ácido fenólico e 2-14 vezes menos flavanol monomérico e dimérico em comparação com o extrato de polpa. Além disso, tanto o extrato quanto o óleo promoveram aumento na produção de

espécies reativas de oxigênio (ROS) em baixas concentrações (PACHECO-PALENCIA et al., 2008).

Marques et al. (2017) estudaram o óleo de açaí e diferentes células humanas, avaliando a citotoxicidade, genotoxicidade e antígenotoxicidade de *Euterpe oleracea*. Para o estudo, foram utilizadas células HepG2 (hepatoma) e leucócitos humanos. Não houve efeito citotóxico nas cepas utilizadas.

Finalmente, Dias et al. (2014) avaliaram o potencial efeito pró-apoptótico de polifenóis derivados do açaí em células HT-29 e SW-480 de adenocarcinoma colorretal. Os resultados mostraram que o extrato polifenólico de açaí em concentrações de 5 a 20 mg/L) inibiu o crescimento das células SW-480 e HT-29, com maiores reduções para as células SW-480, reduzindo também a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Houve aumento da expressão da LC3-B nas células tratadas com o óleo da semente de e redução da expressão da LC3-B quando pré-tratadas com NAC.

Na avaliação da expressão da anexina nas células tratadas com óleo da semente de açaí, as bandas embaixo da anexina foram indicativas de apoptose. A célula cliva a ANXA2 formando uma forma truncada. A linhagem CACO-2 apresentou mais isoformas, o que corroborou com o ensaio de apoptose com anexina.

Em relação ao docking molecular e dinâmica molecular, os cinco ácidos graxos estudados apresentaram resultados bastante satisfatórios nas simulações computacionais, que sugerem a formação de complexos estáveis com a ANXA2. Adicionalmente, os referidos ácidos graxos se ligam preferencialmente próximos à região N-terminal da ANXA2, o que é bastante promissor dado que a complexação da ANXA2 com a S100A10, ocorre nesta região e o tetrâmero formado parece desempenhar funções no crescimento e proliferação de células cancerosas. Assim, os resultados desse estudo teórico sugerem que os ácidos graxos estudados têm um forte potencial de impedirem a formação desse tetrâmero e, conseqüentemente, contribuirão para a interrupção da proliferação das células cancerosas.

A anexina A2 é altamente expressa em linhagens celulares de câncer colorretal (CRC), tanto no nível de microrna quanto como proteína (XIU et al, 2016). A expressão de Anexina A2 mostrou induzir mudanças significativas na microestrutura das células (XING et al, 2013). A Anexina A2 regulada

positivamente promove a proliferação, migração e invasão de células CRC *in vitro* causadas pelas alterações na microestrutura (XIU et al, 2016).

Em estudos que investigaram a Anexina A2 usando imunohistoquímica, a alta expressão de Anexina A2 foi significativamente correlacionada com o tamanho do tumor, tumores pouco diferenciados, profundidade de invasão e estágio TNM (EMOTO et al, 2001). A anexina A2 demonstrou ser um fator independente de mau prognóstico em pacientes com CCR (EMOTO et al, 2001). A anexina A2 na membrana celular é uma característica de tumores com alta invasividade. Essa capacidade de invadir o tecido mostra como a Anexina A2 pode afetar a metástase linfonodal (TRISTANTE et al, 2015; YANG et al, 2013). A anexina A2 também se mostrou importante para o efeito de progastrinas e gastrinas, mediando parcialmente o efeito de fatores de crescimento em células de câncer de cólon (SINGH et a, 2007).

Anexina colabora com diferentes proteínas como plasminogênio, S100A10 e HE4. Pode ser a interação complexa entre esses agentes e a Anexina A2 que desempenha um papel no seu potencial maligno. A ativação por fosforilação parece desempenhar um papel na carcinogênese e até certo ponto a Anexina A2 parece ser regulada pela Anexina A5. Isso acentua a necessidade de investigar os padrões de expressão de diferentes anexinas dentro das diferentes formas de câncer. A regulamentação e colaboração em andamento da Anexina A2 pode ser a base para seu potencial maligno e pode ser o foco para uma investigação mais aprofundada no direcionamento do tratamento para anexinas e plasminogênio, proteínas S100 e HE4 (CRISTENSEN et al, 2017).

Com isso, os efeitos *in vitro* do óleo da semente de açaí em diminuir a expressão da anexina em células de adenocarcinoma colorretal e o resultado do docking molecular sugerem um efeito promissor desse produto natural em modular a regulação de anexina e diminuir, portanto, seus efeitos proliferativos a nível celular.

Considerando os resultados do estudo *in vivo*, a administração do extrato da semente de açaí na dose de 1000mg/kg em esquema preventivo (30 dias antes da indução do tumor) reduziu o volume tumoral e o peso do tumor se comparado ao controle negativo (solução salina). Considerando a cinética de desenvolvimento tumoral, o extrato na maior dose testada conseguiu diminuir o volume tumoral desde os primeiros dias de indução do tumor até o término do

experimento (15 dias), com resultados estatisticamente significativos se comparados ao controle positivo (ciclofosfamida). Além disso, a administração do extrato exerceu efeitos imunomodulatórios, aumentando a expressão do TNF- α e reduzindo a expressão de MCP-1. Além disso, o extrato não demonstrou ser tóxico nas análises histológicas do rim e fígado.

O efeito anti-inflamatório do açaí é uma de suas atividades farmacológicas mais relatadas na literatura. Machado et al (2019) observaram uma redução na ativação de células da linha de macrófagos murino RAW 264.7 induzida pelo tratamento com um extrato hidroalcoólico de açaí, devido a uma diminuição da ativação do receptor tipo nod 3 (NLRP3). Em outro estudo, Poulouse et al (2012) utilizando células microgliais murinas BV-2, observaram que a proteína quinase p38 ativada por mitógeno (p38-MAPK) e o fator de transcrição NF- κ B tiveram suas atividades atenuadas pelo extrato, que regulou a produção de óxido nítrico independente de Ca²⁺ sintase (iNOS), bem como a ativação da ciclo-oxigenase 2 (COX -2). Zhou et al. também relataram que o extrato reduziu a inflamação mediada pela interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e fator de crescimento transformador- β (TGF- β) e reduziu a expressão induzida pelo álcool de fator nuclear NF- κ B e CD68 em hepatócitos de ratos Wistar.

O presente trabalho foi o primeiro estudo a descrever a presença da nobiletina e da genisteína-8-c-glicosídeo no açaí, além de evidenciar os efeitos do óleo bruto da semente de açaí em células de adenocarcinoma colorretal, sugerindo um potencial efeito da regulação da anexina A2 nesse mecanismo. A administração preventiva do extrato da semente de açaí também mostrou resultados promissores em modelo experimental de Ehrlich. Além disso, o trabalho tem relevância por trabalhar com um subproduto do açaí, a semente, habitualmente descartada, contribuindo para a redução do lixo gerado pelo consumo da polpa do açaí.

Como limitações, consideramos que o trabalho foi realizado apenas com extrato e óleo bruto da semente, sem isolamento de compostos, considerando que os efeitos do açaí são de toda a composição, de forma sinérgica. Estudos com óleo da semente de açaí serão realizados em modelo experimental de colite/câncer colorretal para avaliar os efeitos *in vivo*.

7. CONCLUSÕES

Considerando os resultados até então obtidos, o extrato e óleo da semente de açaí são produtos fitoquímicos promissores para o desenvolvimento de compostos fármaco-ativos com efeito antitumoral.

O extrato da semente de açaí apresentou resultados significativos em modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer de mama, com a modulação de espécies reativas de oxigênio e da inflamação e indução de autofagia.

O óleo da semente de açaí demonstrou efeitos significativos em células de adenocarcinoma colorretal, com potencial modulação da Anexina A2 e indução de autofagia.

O uso da semente, produto habitualmente descartado, também contribuirá para o desenvolvimento sustentável e para o estímulo da economia verde das comunidades tradicionais, especialmente das regiões Norte e Nordeste.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M.J.; MURTOLO, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J.C.; HESS, B.; LINDAH, E. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 19–25, 2015.
- AGAWA, S.; SAKAKIBARA, H.; IWATA, R.; SHIMOI, K.; HERGESHEIMER, A.; KUMAZAWA, S. Anthocyanins in mesocarp/epicarp and endocarp of fresh açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and their antioxidant activities and bioavailability. **Food Sci. Technol. Res.** v.17, n. p. 327–334, 2011
- ALBUQUERQUE-XAVIER, A.C.; BASTOS, L.G.; DE FREITAS, J.C JR.; LEVE, F.; DE SOUZA, W.F.; DE ARAUJO, W.M., WANDERLEY, J.L., TANAKA, M.N.; DE SOUZA, W.; MORGADO-DÍAZ, J.A. Blockade of irradiation-induced autophagosome formation impairs proliferation but does not enhance cell death in HCT-116 human colorectal carcinoma cells. **Int J Oncol**, v. 40, n4, p-1267-76, 2012.
- ALESSANDRA-PERINI, J.; PERINI, J.A.; RODRIGUES-BAPTISTA, K.C.; DE MOURA, R.S.; JUNIOR, A.P.; DOS SANTOS, T.A. *Euterpe oleracea* extract inhibits tumorigenesis effect of the chemical carcinogen DMBA in breast experimental cancer. **BMC Complement Altern Med**, v.2, n.18, p.116, 2018
- ALESSANDRA-PERINI, J., RODRIGUES-BAPTISTA, K.C., MACHADO, D.E., NASCIUTTI, L.E., PERINI, J.A. Anticancer potential, molecular mechanisms and toxicity of *Euterpe oleracea* extract (açai): A systematic review. **PLoS One**, v. 13, n.7, e0200101, 2018.
- BALOGH, T.S. Uso cosmético de extratos glicólicos: avaliação da atividade antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor. Dissertação (Mestrado em Fármaco e medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2011. 267 f.

BENATTI, L.P. Inovação nas técnicas de acabamento decorativo em sementes ornamentais brasileiras: design aplicado a produtos com perfil sustentável. Dissertação (Mestrado em Design) - Programa de Pós-Graduação em Design, Universidade do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013. 146 f.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, [S. l.], v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984.

BERSUDSKY, M.; LUSKI, L.; FISHMAN, D.; WHITE, R.M.; ZIV-SOKOLOVSKAYA, N.; Dotan, S.; Rider, P.; et al. Non-redundant properties of IL-1 α and IL-1 β during acute colon inflammation in mice. **Gut**. 2014 Apr;63(4):598-609

BHARADWAJ, A.; BYDOUN, M.; HOLLOWAY, R.; WAISMAN, D. **Annexin A2 heterotetramer: Structure and function**. [s.l: s.n.]. v. 14, n.3, p. 6259-6305, 2013.

BOBBIO, F.O.; DRUZZIAN, J.I.; ABRAO, P.A.; BOBBIO, P.A.; FADELLI, S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). **Cienc. Tecnol. Aliment**, v.20, p.388–390, 2000

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva– Rio de Janeiro: Inca, 2019.

BRAUN, E.; GILMER, J.; MAYES, H.B.; MOBLEY, D. L.; MONROE, J.I.; PRASAD, S; ZUCKERMAN, D.M. Best Practices for Foundations in Molecular Simulations [Article v1.0]. **Living Journal of Computational Molecular Science**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 1–28, 2019.

BRIAN, M.B. Ethnobotany of the Chacobo Indians and their Palms Advanced in Economic Botany, **The New York Botanic Garden: New York**, 1988.

BROOKS, B. R. et al. CHARMM: The Biomolecular simulation Program. **J. Comp. Chem.**, [S. l.], v. 30, p. 1545–1615, 2009.

BRUM, A.A.S.; ARRUDA, L.F de.; BISMARA, M.A.; REGITANO-D´A.R.C.E. Métodos De Extração e Qualidade da Fração Lipídica de Matérias-Primas de Origem Vegetal e Animal; **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 4, 849-854, 2009.

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, [S. l.], v. 126, n. 1, 2007.

CALZAVARA, B.B.G. As possibilidades do açazeiro no estuário amazônico. (Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 5). Belém: FCAP. 103p, 1972.

CASE, D. A. et al. **Amber**. San Francisco University of California, 2020.

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

COTE, B.; CARLSON, L.J.; RAO, D.A.; ALANI, A.W.G. Combinatorial resveratrol and quercetin polymeric micelles mitigate doxorubicin induced cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo*. **J. Control. Release**, v.213, p.128–133, 2015

CHAMBERLIN, S.R.; BLUCHER, A.; WU, G.; SHINTO, L.; CHOONOO, G.; KULESZ-MARTIN, M.; MCWEENEY, S. Natural Product Target Network Reveals Potential for Cancer Combination Therapies. **Front. Pharmacol.** 10:557, 2019

CHENG, Y. T.; YANG, C. C.; SHYUR, L.F. Phytomedicine-modulating oxidative stress and the tumor microenvironment for cancer therapy. **Pharmacol. Res**, v. 114, p. 128–143, 2016.

CHIANG, Y.; RIZZINO, A.; SIBENALLER, Z.A.; WOLD, M.S.; VISHWANATHA,

J.K. Specific down-regulation of annexin II expression in human cells interferes with cell proliferation. **Mol Cell Biochem**. 1999 Sep;199(1-2):139-47.

CHIN, Y.W.; CHAI, H.B.; KELLER, W.J.; KINGHORN, A.D. Lignans and other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (Açaí) with antioxidant and cytoprotective activities. **J. Agric. Food Chem**, v.56, p.7759–7764, 2008.

CHOI, Y.J.; CHOI, Y.J.; KIM, N.; NAM, R.H.; LEE, S.; LEE, H.S., et al. Açaí berries inhibit colon tumorigenesis in azoxymethane/dextran sulfate sodium-treated mice. **Gut Liver**. v.11, n.2, p. 243-52, 2017.

CHOI, C.H., CHUNG, J.Y., CHUNG, E.J., SEARS, J.D., LEE, J.W., BAE, D.S., HEWITT, S.M. Prognostic significance of annexin A2 and annexin A4 expression in patients with cervical cancer. **BMC Cancer**, 16: 448, 2016

CORDOVA-FRAGA, T., DE ARAUJO, D.B., SANCHEZ, T.A., ELIAS, J.JR, CARNEIRO, A.A., BRANDT-OLIVEIRA, R., et al. *Euterpe oleracea* (Açaí) as an alternative oral contrast agent in MRI of the gastrointestinal system: preliminary results. **Magn Reson Imaging**. 2004, v. 22, n.3, 389–393.

COSTA, P.A., BALLUS, C.A., TEIXEIRA, J., GODOY, H.T. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, 2010, 43, 1603–1606.

CRAGG, G.M, KINGSTON, D.G.I., NEWMAN, D.J. Anticancer Agents from Natural Products, ed .2. Boca Raton, CRC/Taylor & Francis, 2012.

CRAGG, G.M., PEZZUTO, J.M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. **Med Princ Pract** 2016;25(suppl 2):41–59

CRISTENSEN, M.V., HOGDALL, C.K., JOCHUMSEN, K.M., HOGDALL, E.V.S. Annexin A2 and cancer: A systematic review. **International Journal Of Oncology** 2018 52: 5-18

CUNHA, Ana Paula Simões da et al. Evaluation of the antioxidant potential of *Copaifera multijuga* in Ehrlich tumor-bearing mice. **Acta Amazonica [online]**. 2019, v. 49, n. 1, pp. 41-47. 4392201800672.

DARNET, S., SERRA, J.L., RODRIGUES, A.M.C., SILVA, L.H.M. A high performance liquid chromatography method to measure tocopherols in assai pulp (*Euterpe oleracea*). **Food Research International**, 2011, 44, 2107–2111.

DEL POZO-INSFRAN, D., BRENES, C.H., TALCOOT, S.T. Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **J. Agric. Food Chem**, 2004, 52, 1539–1545.

DENG, L., GAO, Y., LI, X., CAI, M., WANG, H., ZHUANG, H., TAN, M., LIU, S., HAO, Y., LIN, B. Expression and clinical significance of annexin A2 and human epididymis protein 4 in endometrial carcinoma. **J Exp Clin Cancer Res** 2015 34: 96.

DEORA, A.B., KREITZER, G., JACOVINA, A.T., HAJJAR, K.A. An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. **J Biol Chem** 2004 279: 43411-43418.

DIAS, A.L.S., ROZET, E., CHATAIGNÉ, G., OLIVEIRA, A.C., RABELO, C.A.S., HUBERT, P., et al. A rapid validated UHPLC-PDA method for anthocyanins quantification from *Euterpe oleracea* fruits. **Journal of Chromatography B**, 2012, 907, 108–116.

DIAS, M.M.D.S., NORATTO, G., MARTINO, H.S.D., ARBIZU, S., PELUZIO, M.D.C.G., TALCOTT, S., RAMOS, A.M., MERTENS-TALCOTT, S.U. Pro-apoptotic activities of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in human SW-480 colon cancer cells. **Nutr. Cancer**;66:1394–1405, 2014.

DING, T., YANG, L., WANG, Y., YUAN, J., CHEN, T., CAI, X. Down- regulation of annexin II in prostate cancer is associated with Gleason score, recurrence, metastasis and poor prognosis. **Mol Med Rep** 2010 3: 781-787.

DRAGOVIC-UZELAC, V., LEVAJ, B., MRKIC, V., BURSAC, D., BORAS, M. The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. **Food Chemistry**, 2007, 102, 966–975.

DURRANT, Jacob D.; MCCAMMON, J. Andrew. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC Biology**, [S. l.], v. 9, p. 71, 2011.

EMERLING, B.M., WEINBERG, F., SNYDER, C, et al. Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. **Free Radic Biol Med**. 2009;46:1386-1391.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). 2006. Sistema de Produção do Açaí. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/index.htm> Acesso em: 08 aug. 2018.

EMOTO, K., YAMADA, Y., SAWADA, H., FUJIMOTO, H., UENO, M., TAKAYAMA, T., KAMADA, K., NAITO, A., HIRAO, S., NAKAJIMA, Y. Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression: A prognostic marker in colorectal carcinoma. **Cancer** 2001 92: 1419-1426.

FANG, Y.T.; LI, C.F.; WANG, C.Y.; ANDERSON, R.; LIN, Y.S. Interferon- γ stimulates p11-dependent surface expression of annexin A2 in lung epithelial cells to enhance phagocytosis. **J Cell Physiol**. 2012 Jun;227(6):2775-87.

FENG, J.G., LIU, Q., QIN, X., GENG, Y.H., ZHENG, S.T., LIU, T., SHEYHIDIN, I., LU, X.M. Clinicopathological pattern and Annexin A2 and Cdc42 status in patients presenting with differentiation and lymphnode metastasis of esophageal squamous cell carcinomas. **Mol Biol** 2012 rep 39: 1267-1274

FILIPENKO, N.R., WAISMAN, D.M. The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. **J Biol Chem** 2001 276: 5310-5315.

FILOMENI, G., DE ZIO, D., CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. **Cell Death Differ.** 2015;22:377-388.

FONT QUER, P.I.O. Plantas Medicinales - El Dioscórides renovado. Ed. Botas Barcelona, 1995.

FOWLER, J.F. JR., WOOLERY-LLOYD, H., WALDORF, H., SAINI, R. Innovations in natural ingredients and their use in skin care. **J Drugs Dermatol.** 2010, 9(6 Suppl), S72–S81.

FRAGOSO, M.F., PRADO, M.G., BARBOSA, L., ROCHA, N.S., BARBISAN, L.F. Inhibition of mouse urinary bladder carcinogenesis by açai fruit (*Euterpe oleraceae* Martius) intake. **Plant Foods Hum Nutr.** 2012, 67, 3, 235-41

FRAGOSO, M.F., ROMUALDO, G.R., RIBEIRO, D.A., BARBISAN, L.F. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Food Chem Toxicol.** 2013, 58, 68-76

FRAGOSO, M.F., ROMUALDO, G.R., VANDERVEER, L.A., FRANCO-BARRAZA, J., CUKIERMAN, E., CLAPPER, M.L. Lyophilized açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart) attenuates colitis-associated colon carcinogenesis while its main anthocyanin has the potential to affect the motility of colon cancer cells. **Food Chem Toxicol.** Sep 6, 121, 237-245, 2018.

FREITAS, D.D.S., MORGADO-DÍAZ, J.A., GEHREN, A.S., VIDAL, F.C.B., FERNANDES, R.M.T., ROMÃO, W., et al. Cytotoxic analysis and chemical characterization of fractions of the hydroalcoholic extract of the *Euterpe oleracea* Mart. seed in the MCF-7 cell line. **J Pharm Pharmacol.** 69, 6,714-21, 2017.

FU, Y.J.; CHANG, H.; PENG, X.L.; BAI, Q.; YI, L.; ZHOU, Y., et al. Resveratrol inhibits breast cancer stem-like cells and induces autophagy via suppressing Wnt/beta-catenin signaling pathway. **PLoS One** 9(7), e102535, 2014

GALLORI, S., BILIA, A.R., BERGONZI, M.C., BARBOSA, W.L.R., VINCIERI, F.F. Polyphenolic constituents of anthocyanins from the açai fruit (*Euterpe oleracea*) Mart. **Cienc. Tecnol. Aliment.** 20, 388–390, 2004

GALOTTA, A.L.Q.A., BOAVENTURA, M.A.D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do Açai (*Euterpe precatoria* Mart, *Arecaceae*). **Quim. Nova**, 28, 4, 610-613, 2005.

GAO, H., YU, B. YAN, Y., SHEN, J., ZHAO, S., ZHU, J., QIN, W., GAO, Y. Correlation of expression levels of ANXA2, PGAM1, and CALR with glioma grade and prognosis. **J Neurosurg** 2013 118: 846-853.

GERKE, V., MOSS, S.E. Annexins: From structure to function. *Physiol Rev* 82 **2002** 331-371.

GIOIA, Dario; BERTAZZO, Martina; RECANATINI, Maurizio; MASETTI, Matteo; CAVALLI, Andrea. Dynamic Docking : A Paradigm Shift in Computational Drug Discovery. **Molecules**, [S. l.], v. 22, n. 2029, p. 1–21, 2017.

GOPALAKRISHNAPILLAI, A., KOLB, E.A., DHANAN, P., MASON, R.W., NAPPER, A., BARWE, S.P. Disruption of Annexin ii/p11 interaction suppresses leukemia cell Binding, homing and engraftment, and sensitizes the leukemia cells to chemotherapy. **PLoS One** 2015 10: e0140564.

GORDON, A., CRUZ, A.P.G., CABRAL, L.M.C., FREITAS, S.C DE., TAXI, C.M.A.D., DONANGELO, C.M., et al. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**. 2012, 133, 256–263.

GOULDING, M., SMITH, N.. Palms. Sentinels for Amazon Conservation.

Amazon Conservation Association & Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO, USA, p. 356, 2007

GRELAND, P., MORETTI, C., JACQUEMIN, H. Pharmacopées traditionnelles em Guyane. Institut Français de Recherche Scientifique Pour Le Développement en Cooperation. Collection MEMOIRES n° 108, 1987.

GRUCA, M., BLACH-OVERGAARD, A., BALSLEV, H. African palm ethno-medicine. **J. Ethnopharmacol.** 2015, 165, 227–237.

GRUZ, J., AYAZ, F.A., TORUN, H., STRNAD, M. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. **Food Chemistry**, 2011, 124, 271–277.

HAJJAR, K.A., JACOVINA, A.T., CHACKO, J. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator I. Identity with annexin II. **J Biol Chem** 1994 269: 21191-21197.

HALGREN, Thomas A. Merck Molecular Force Field. II. MMFF94 van der Waals and Electrostatic Parameters for Intermolecular Interactions. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 17, n. 5–6, p. 520–552, 1996.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; RAMALINGAM, J.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide: ubiquitous in cell culture and in vivo? **IUBMB Life**, 50, 251–257, 2000.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, Londres, v. 22, p. 475-477, 1973.

HARVEY, A. L., EDRADA-EBEL, R., AND QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nat. Rev. Drug Discov** 2015 14, 111–129

HEHRE, W. J.; DEPPMEIER, B. J.; KLUNZINGER, P. E. PC Spartan Pro

molecular modeling for desktop. **Chem. Eng. News**, [S. l.], v. 77, n. 17, p. 2, 1999.

HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) – a phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochem Lett**, 4, 1,10-21, 2011.

HEALTH REPORT, n.d. <http://www.health-report.co.uk/acai.htm> (accessed 21/08/2018).

HENDERSON, A. *The Palms of the Amazon*, University Press: Oxford, 1995

HERCULANO, F.E.B. *Produção industrial de cosméticos: o protagonismo da biodiversidade vegetal da Amazônia* 143 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

HOGAN, S., CHUNG, H., ZHANG, L., LI, J., LEE, Y., DAI, Y., ZOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**. 2010, 118, 208–214.

HOLDERNESS, J., SCHEPETKIN, I.A., FREEDMAN, B., KIRPOTINA, L.N., QUINN, M.T., HEDGES, J.F., JUTILA, M.A. Polysaccharides isolated from Acai fruit induce innate immune responses. **PLoS One**, 2011, 6(2), e17301.

HOLOHAN, C., VAN SCHAEYBROECK, S., LONGLEY, D. B., AND JOHNSTON, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nat. Rev. Cancer** 2013 13, 714–726.

HOUSMAN, G., BYLER, S., HEERBOTH, S., LAPINSKA, K., LONGACRE, M., SNYDER, N., et al. Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers (Basel)** 2014. 6, 1769–1792.

HU, J., ZHAO, J., KHAN, S.I., LIU, Q., ALI, Z., LI, X.C., et al. Antioxidant

neolignan and phenolic glucosides from the fruit of *Euterpe oleracea*.

Fitoterapia, 2014, 99, 178–183.

HUANG, S. Y., ZOU, X. Advances and challenges in Protein-ligand docking.

International Journal of Molecular Sciences, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 3016–3034, 2010.

HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. VMD: Visual

Molecular Dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, [S. l.], v. 13, p. 33–38, 1996.

IADEROZA, M., BALDINI, V.L., DRAETTA, I., BOVI, M.L.A. Anthocyanins from fruits of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and jucara (*Euterpe edulis* Mart.).

Trop. Sci. 32, 41–46, 1992.

IBGE. Produção da extração vegetal e da silvicultura: Belem - PA, Brasil, 2007.

Disponível em:

[http://www.ibge.gov.br/servidor_arquivos_est/default.php?caminho=/pub/Producao_Agricola/Producao_da_Extracao_Vegetal_e_da_Silvicultura_\[anual\]/2007](http://www.ibge.gov.br/servidor_arquivos_est/default.php?caminho=/pub/Producao_Agricola/Producao_da_Extracao_Vegetal_e_da_Silvicultura_[anual]/2007)

JENSEN, G.S., AGER, D.M., REDMAN, K.A., MITZNER, M.A., BENSON, K.F., SCHAUSS, A.G. Pain reduction and improvement in range of motion after daily consumption of an acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp-fortified polyphenolic-rich fruit and berry juice blend. **J Med Food**. 14(7–8), 702–711, 2011

JEONG-RANG, J., PARK, J.S., PARK, Y.K., CHAE, Y.Z., LEE, G.H., PARK, G.Y., JANG, B.C. *Pinus densiflora* leaf essential oil induces apoptosis via ROS generation and activation of caspases in YD-8 human oral cancer cells.

International Journal of Oncology 2012 40: 1238-1245

JIANG, Y.P.; GUO, H.; WANG, X. B. Nobiletin (NOB) suppresses autophagic degradation via over-expressing AKT pathway and enhances apoptosis in multidrug-resistant SKOV3/TAX ovarian cancer cells. *Biomed. Pharmacother.*

2018, 103, 29–37

JIN, L., SHEN, Q., DING, S., JIANG, W., JIANG, L., ZHU, X. Immuno-histochemical expression of Annexin A2 and S100A proteins in patients with bulky stage IB-IIA cervical cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. **Gynecol Oncol** 2012;126: 140-146, 2012.

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

JORGENSEN, W.L., CHANDRASEKHAR, J., MADURA, J.D., IMPEY, R.W., KLEIN, M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 926–935, 1983.

JORGENSEN, W.L., MAXWELL, D.S., TIRADO-RIVES, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 118, n. 45, p. 11225–11236, 1996.

KAMINSKI, G.A., FRIESNER, R.A., TIRADO-RIVES, J., JORGENSEN, W.L. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. **Journal of Physical Chemistry B**, [S. l.], v. 105, n. 28, p. 6474–6487, 2001.

KALAISELVAN, V., KALAIVANI, M., VIJAYAKUMAR, A., SURESH-KUMAR, K., VENKATESKUMAR, K. Current knowledge and future direction of research on soy isoflavones as a therapeutic agents. **Pharmacogn Rev.** 2010;4:111-7.

KANG, J., LI, Z.M., WU, T., JENSEN, G.S., SCHAUSS, A.G., WU, X. Antioxidant capacities of flavonoid compounds isolated from açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chem.** 2010, 122, 610–617.

KANG, J., XIE, C., LI, Z., NAGARAJAN, S., SCHAUSS, A.G., WU, T, et al. Flavonoids from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and antiinflammatory activities. **Food Chem**, 2011, 128, 152–7.

KANZAWA, T.; KONDO, Y.; ITO, H.; KONDO, S.; GERMANO, I. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. **Cancer Res**, 63, 2103–2108, 2003.

KASSAM, G., MANRO, A., BRAAT, C.E., LOUIE, P., FITZPATRICK, S.L., WAISMAN, D.M. Characterization of the heparin binding properties of annexin ii tetramer. **J Biol Chem** 1997 272: 15093-15100, 1997.

KORB, O., STÜTZLE, T., EXNER, T.E. Empirical scoring functions for advanced Protein-Ligand docking with PLANTS. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], v. 49, n. 1, p. 84–96, 2009.

KUMARI S, BADANA AK, MURANI MOHAN G, SHAILENDER G, MALLA R. Reactive oxygen species: A key constituent in cancer survival. **Biomark Insights** 2018;13:1177271918755391.

KUNTZ, L.; WENZEL, U.; DANIEL, H, Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **Eur. J. Nutr**, 38, 133–142, 1999.

LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. 2. ed. Harlow: Prentice Hall, 2001.

LI, L., TAN, J., MIAO, Y., LEI, P., ZHANG, Q. ROS and autophagy: interactions and molecular regulatory mechanisms. **Cell Mol Neurobiol**. 2015;35:615-621.

LI, X., ZHENG, S., LIU, Q., LIU, T., LIANG, M., GAO, X., LU, M., SHEYHIDIN, I., LU, X. Under-expression of annexin A2 is associated with Kazakh's esophageal squamous cell carcinoma. **Mol Carcinog** 2015 54: 779-788

LICHTENTHALER, R.; BELANDRINO, R.; MAIA, J.; PAPAANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Total antioxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (açai). **Int. J. Food Sci. Nutr**, 56 (1), 68–75, 2005.

- LIU, X., MA, D., JING, X., WANG, B., YANG, W., QIU, W. Overexpression of ANXA2 predicts adverse outcomes of patients with malignant tumors: a systematic review and meta- analysis. **Med Oncol** **32**, 392, 2015
- MACHADO, A.K., CADONÁ, F.C., ASSMANN, C.E., ANDREAZZA, A.C., DUARTE, M.M.M.F., DOS SANTOS BRANCO, C., ZHOU, X., SOUZA, D.V.D., RIBEIRO, E.E., DA CRUZ, I.B.M. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) has anti-inflammatory potential through NLRP3-inflammasome modulation. **J. Funct. Foods**. 2019;56:364–371
- MACÍA, M.J., ARMESILLA, P.J., CAMARA-LERET, R., PANIAGUA-ZAMBRANA, N., VILLALBA, S., BALSLEV, H., PARDO-DE-SANTAYANA, M. Palm uses in northwestern South America: a quantitative review. **Bot. Rev.** 2011, 77 (4), 462–570.
- MADUREIRA, P.A., O'CONNELL, P.A., SURETTE, A.P., MILLER, V.A., WAISMAN, D.M. The biochemistry and regulation of S100A10: A multifunctional plasminogen receptor involved in oncogenesis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [S. l.], v. 2012, 2012.
- MANOSROI, J., DHUMTANOM, P., MANOSROI. A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Lett** 2006 235: 114-120.
- MANTOVANI, I.S.B., FERNANDES, S.B.O., MENEZES, F.S. Constituintes apolares do fruto do açai (*Euterpe oleracea* M. - *Arecaceae*). **Rev. Bras. Farmacogn.** 13 (1), 41-2, 2003
- MARQUES, E.S., TSUBOY, M.S.F., CARVALHO, J.C.T., ROSA, P.C.P., PERAZZO, F.F., GAIVÃO, I.O.M., MAISTRO, E.L. First cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic assessment of *Euterpe oleracea* fruit oil (açai) in cultured human cells. **Genet Mol Res.** 17, 16(3), 2017.

MARUYAMA, T., NODA, N.N. Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition. **J Antibiot (Tokyo)** 2017;71:72-78.

MATHEUS, M.E., BESSA DE OLIVERIA FERNANDES, S., SILVEIRA, C.S., RODRIGUES, V.P., MENEZES, F., FERNANDES, P.D. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. **J Ethnopharmacol.** 2006, 107, 291–296.

MIURA, Y. H.; TOMITA, I.; WATANABE, T.; HIRAYAMA, T.; FUKUI, S. Active oxygen generation by flavonoids. **Biol. Pharm. Bull** 21, 93–96, 1998.

MOHAMMAD, H.S., KUROKOHCHI, K., YONEYAMA, H., TOKUDA, M., MORISHITA, A., JIAN, G., SHI, L., MUROTA, M., TANI, J., KATO, K., *et al*: Annexin A2 expression and phosphorylation are up-regulated in hepatocellular carcinoma. **Int J Oncol** 2008 33: 1157-1163.

MOON, J.Y., CHO, M., AHN, K.S., CHO, S.K. Nobiletin induces apoptosis and potentiates the effects of the anticancer drug 5-fluorouracil in p53-mutated SNU-16 human gastric cancer cells. **Nutr. Cancer** 2013, 65, 286–295.

MONGE-FUENTES, V., MUEHLMANN, L.A., LONGO, J.P., SILVA, J.R., FASCINELI, M.L., DE SOUZA, P., *et al*. Photodynamic therapy mediated by açai oil (*Euterpe oleracea* Martius) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. **J Photochem Photobiol.** 166, 301-10, 2017.

MOURÃO, L. História e natureza: do açai ao palmito. **Revista Territórios e Fronteiras**, Cuiabá, 2010, 3, 2, 74-96.

MULABAGAL, V., CALDERÓN, A.I. Liquid chromatography/mass spectrometry based fingerprinting analysis and mass profiling of *Euterpe oleracea* (açai) dietary supplement raw materials. **Food Chemistry.** 134, 1156–1164, 2012.

MUKUND, V. Genistein: Its Role in Breast Cancer Growth and Metastasis. **Curr Drug Metab.** 2020; 21(1):6-10

NAMBA, A.M., DA SILVA, V.B., DA SILVA, C.H.T.P. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecletica Química**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 13–24, 2008.

NASCIMENTO, R.J.S., COURIL, S., ANTONIASSI, R., FREITAS, S.P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 30, 498–502, 2008.

NEWMAN, D. J., AND CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **J. Nat. Prod** 2020, 83, 770–803

NORATTO, G.D., ANGEL-MORALES, G., TALCOTT, S.T., MERTENS-TALCOTT, S.U. Polyphenolics from açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) protect human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) from glucose- and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126. **J Agric Food Chem**. 2011, 59(14), 7999–8012.

O'BOYLE, NM.; BANCK, Michael; JAMES, Craig A.; MORLEY, Chris; VANDERMEERSCH, Tim; HUTCHISON, Geoffrey R. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, [S. l.], v. 3, n. 33, p. 1–14, 2011.

ODONNE, G., BERGER, F., STIEN, D., GRENAND, P., BOURDY, G. Treatment of leishmaniasis in the Oyapock basin (French Guiana): A K.A.P. survey and analysis of the evolution of phytotherapy knowledge amongst Wayapi Indians. **J Ethnopharmacol**. 2011 137(3), 1228–1239.

OHASHI, S.T., KAGEYAMA, P.Y. Variabilidade genética entre populações de açaizeiros (*Euterpe Oleracea* MART.) do estuário Amazônico. In: Jardim, M.A., Mourão, L., Grossmann, M. (Ed.). **Açaí: possibilidades e limites para o desenvolvimento sustentável no estuário amazônico**. Belém: Museu

Paraense Emílio Goeldi, 2004.

OHNO, Y., IZUMI, M., KAWAMURA, T., NISHIMURA, T., MUKAI, K., TACHIBANA, M. Annexin II represents metastatic potential in clear- cell renal cell carcinoma. **Br J Cancer** 2009 101: 287-294, 2009 .

OLIVEIRA, M.S.P., CARVALHO, J.E.U., NASCIMENTO, W.M.O., MÜLLER, C.H. **Cultivo do açaizeiro para produção de frutos**. Belém: EMBRAPA-CPATU. (Circular Técnica, 26), 2002

OW, Y.P., GREEN, D.R., HAO, Z., MAK, T.W. Cytochrome c: functions beyond respiration. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2008;9:532-542.

PACHECO-PALENCIA, L.A., HAWKEN, P., TALCOTT, S.T.. Juice matrix composition and ascorbic acid fortification effects on the phytochemical, antioxidant and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**. 2007a, 105 28-35.

PACHECO-PALENCIA, L.A., HAWKEN, P., TALCOTT, S.T. Phytochemical, antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) as effected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. **Food Research International**. 2007b, 40, 620-628.

PACHECO-PALENCIA, L.A., MERTENS-TALCOTT, S., TALCOTT, S.T. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56, 4631–4636, 2008.

PACHECO-PALENCIA, L.; DUNCAN, C.E.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chem**, 115, 1199–1205, 2009.

PACHECO-PALENCIA, L.A., TALCOTT, S.T. Chemical stability of açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and

externally added polyphenolic cofactors in model systems. **Food Chemistry**. 2010, 118, 17-25.

PANIERI, E., SANTORO, M.M. ROS homeostasis and metabolism: A dangerous liason in cancer cells. **Cell Death Dis** 2016;7:e2253.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, [S. I.], v. 52, n. 12, p. 7182–7190, 1981.

PEARSON, H. E., IIDA, M., ORBUCH, R. A., MCDANIEL, N. K., NICKEL, K. P., KIMPLE, R. J., et al. Overcoming resistance to cetuximab with honokiol, a small-molecule polyphenol. **Mol. Cancer Ther** 2017, 17, 204–214.

PHILLIPS, James C. et al. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. **J. Chem. Phys.**, [S. I.], v. 153, n. 044130, 2020.

PI, F., ZHANG, H., LI, H., THIVIYANATHAN, V., GORENSTEIN, D.G., SOOD, A.K., GUO, P. RNA nanoparticles harboring annexin A2 aptamer can target ovarian cancer for tumor-specific doxorubicin delivery. **Nanomedicine** 2016 13: 1183-1193.

POILLET-PEREZ, L., DESPOUY, G., DELAGE-MOURROUX, R., BOYER-GUITTAUT, M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. **Redox Biol**. 2015;4:184-192.

POULOSE, S.M.; FISHER, D.R.; LARSON, J.; BIELINSKI, D.F.; RIMANDO, A.M.; CAREY, A.N.; SCHAUSS, A.G.; Shukitt-Hale, B. Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. **J. Agric. Food Chem**. 2012, 60, 1084–1093.

PRANCE, G. H. **Árvores de Manaus**, INPA: Manaus, 1975

PRIETSCH, R.F.; MONTE, L.G.; DA SILVA, F.A.; BEIRA, F.T.; DEL PINO, F.A.B.; CAMPOS, V.F., et al. Genistein induces apoptosis and autophagy in human breast MCF-7 cells by modulating the expression of proapoptotic factors and oxidative stress enzymes. **Mol. Cell. Biochem**, 390(1-2), 235-242, 2014.

PRONK, S., PÁLL, S., SCHULZ, R., LARSSON P., BJELKMAR P., APOSTOLOV, R., et al. GROMACS 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 845–854, 2013.

RANKIN, C. R., HILGARTH, R.S., LEONI, G., KWON, M., DEN BESTE, K.A., PARKOS, C.A., NUSRAT, A. Annexin A2 regulates β 1 integrin internalization and intestinal epithelial cell migration. **J Biol Chem** 288, 15229–15239,

REDZA-DUTORDOIR, M., AVERILL-BATES, D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochim Biophys Acta**. 2016;1863:2977-2992.

REED, A.E., WEINSTOCK, R.B., WEINHOLD, F. Natural population analysis. **The Journal of Chemical Physics**, [S. l.], v. 83, n. 2, p. 735–746, 1985.

RIBEIRO, J.C., ANTUNES, L.M., AISSA, A.F., DARIN, J., VERA DE ROSSO, V., MERCADANTE, A.Z., BIANCHI, M. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart) on mice using erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Res**, 2010, 695, 22–28.

ROCHA, M.R., BARCELLOS-DE-SOUZA, P., SOUSA-SQUIAVINATO A.C., FERNANDES, P.V., DE OLIVEIRA, I.M., BORONI, M., MORGADO-DÍAZ, J.A. Annexin A2 overexpression associates with colorectal cancer invasiveness and TGF- β induced epithelial mesenchymal transition via Src/ANXA2/STAT3. **Scientific Reports** 2018) 8:11285

RODRIGO TAPIA, J.P., PENA ALONSO, E., GARCÍA-PEDRERO, J.M.,

FLORENTINO FRESNO, M., SUÁREZ NIETO, C., OWEN MORGAN, R., FERNÁNDEZ, M.P. Annexin A2 expression in head and neck squamous cell carcinoma. **Acta Otorrinolaringol Esp** 2007 58: 257-262.

RODRIGUES, R.B., LICHTENTHALER, R., ZIMMERMANN, B.F. PAPAGIANNPOULOS, M., FABRICIUS, H., MARX, F., et al. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **J Agric Food Chem**. 54, 4162–7, 2006.

ROJANO, B.A., VAHOS, I.C.Z., ARBELÁEZ, A.F.A., MARTÍNEZ, A.J.M., CORREA, F.B.C., CARVAJAL, L.G. Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto Liofilizado de Palma Naidi (Açaí Colombiano) (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**. 2011, 64, 6213–6220.

ROSSO, V.V., HILLBRAND, S., MONTILLA, E.C., BOBBIO, F.O., WINTERHALTER, P., MERCADANTE, A.Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA– MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**. 2008, 21, 291–299.

SANT'ANNA, C.M.R. Métodos de Modelagem Molecular para Estudo e Planejamento de Compostos Bioativos: Uma Introdução. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 49–57, 2009.

SCHAUSS, A.G., WU, X., PRIOR, R.L., OU, B., PATEL, D., HUANG, D, et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe Oleraceae* Mart. (Açaí). **J Agric Food Chem**. 54, 22, 8598-603, 2006a.

SCHAUSS, A.G., WU, X., PRIOR, R.L., OU, B., HUANG, D., OWENS, J., AGARWAL, A., JENSEN, G.S., HART, A.N., SHANBROM, E.. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (açai). **J. Agric. Food Chem**. 54 (22), 8604–8610, 2006b.

SCHERZ-SHOVAL, R., SHVETS, E., FASS, E., SHORER, H., GIL, L., ELAZAR, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. **EMBO J.** 2007;26:1749-1760.

SCHIEBER, M., CHANDEL, N.S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Curr Biol** 2014;24:R453–62.

SHAH, M.A., ROGOFF, H.A. Implications of reactive oxygen species on cancer formation and its treatment. **Seminars in Oncology** 48 (2021) 238–245

SHAO, Chenghua; ZHANG, Fuming; KEMP, Melissa M.; LINHARDT, Robert J.; WAISMAN, David M.; HEAD, James F.; SEATON, Barbara A. Crystallographic Analysis of Calcium-dependent Heparin Binding to Annexin A2. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 281, n. 42, p. 31689–31695, 2006.

SHARMA, M.R., KOLTOWSKI, L., OWNBEY, R.T., TUSZYNSKI, G.P., SHARMA, M.C. Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: Selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. **Exp Mol Pathol** 2006. 81: 146-156.

SILVA, D.F., VIDAL, F.C.B, SANTOS, D., COSTA, M.C.P, MORGADO-DÍAZ, J.A., NASCIMENTO, M.D.S.B., et al. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. **BMC Complement Altern Med.** 14, 175, 2014

SILVA, M.A.C.N, COSTA, J.H., PACHECO-FILL, T., RUIZ, A.L.T.G., VIDAL, F.C.B., BORGES, K.R.A., et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Extract Induces ROS Production and Cell Death in MCF-7 Breast Cancer Cell Line. **Molecules** . 2021 Jun 10;26(12):3546.

SIMON, H.U, HAJ-YEHIA, A., LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis.** 2000;5:415-418.

SINGH, P., WU, H., CLARK, C., OWLIA, A. Annexin ii binds progastrin and gastrin-like peptides, and mediates growth factor effects of autocrine and

exogenous gastrins on colon cancer and intestinal epithelial cells. **Oncogene** 2007 26: 425-440.

SMITHERMAN, A.B., MOHLER, J.L., MAYGARDEN, S.J., ORNSTEIN, D.K. Expression of annexin I, II and VII proteins in androgen stimulated and recurrent prostate cancer. **J Urol** 2004;171: 916-920.

SOARES DE MOURA R, PIRES KM, SANTOS FERREIRA T, LOPES AA, NESI RT, RESENDE AC, SOUSA PJ, DA SILVA AJ, PORTO LC, VALENCA SS. Addition of acai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. **Food Chem Toxicol.** 49(4):855-63. 2011.

SOARES DE MOURA R, DA COSTA GF, MOREIRA AS, QUEIROZ EF, MOREIRA DD, GARCIA-SOUZA EP, RESENDE AC, MOURA AS, TEIXEIRA MT. Vitis vinifera L. grape skin extract activates the insulin-signalling cascade and reduces hyperglycaemia in alloxan-induced diabetic mice. **J Pharm Pharmacol.** 2012 Feb;64(2):268-76.

SOUSA DA SILVA, Alan W.; VRANKEN, Wim F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface. **BMC Research Notes**, [S. l.], v. 5, p. 1–8, 2012. DOI: 10.1186/1756-0500-5-367.

SPIJKERS-HAGELSTEIN, J.A., MIMOSO PINHANÇOS, S., SCHNEIDER, P., PIETERS, R., STAM, R.W. Src kinase-induced phosphorylation of annexin A2 mediates glucocorticoid resistance in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia** 2013 27: 1063-1071.

STEWART, James J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods IV: Extension of MNDO, AM1 and PM3 to more main group elements. **Journal of Molecular Modeling**, 2004 [S. l.], v. 10, n. 2, p. 155–164.

STONER, G.D., WANG, L.S., SEGUIN, C., ROCHA, C., STONER, K., CHIU, S., et al. Multiple berry types prevent N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats. **Pharm Res.** 27, 6, 1138-45, 2010.

SU, S.J., YEH, T.M., CHUANG, W.J., HO, C.L., CHANG, K.L., CHENG, H.L., et al. The novel targets for anti-angiogenesis of genistein on human cancer cells. **Biochem Pharmacol.** 2005;69:307–18.

SUN, W.L.; CHEN, J.; WANG, Y.P.; ZHENG, H. Autophagy protects breast cancer cells from epirubicin-induced apoptosis and facilitates epirubicin-resistance development. **Autophagy** 7:1035–1044, 2011.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin.** 2021; : caac.21660

SURICHAN, S.; ANDROUTSOPOULOS, V.P.; SIFAKIS, S.; KOUTALA, E.; TSATSAKIS, A.; ARROO, R.R.; BOARDER, M.R. Bioactivation of the citrus flavonoid nobiletin by CYP1 enzymes in MCF7 breast adenocarcinoma cells. **Food Chem. Toxicol.** 2012, 50, 3320–3328.

SYLVESTRE, M., LEGAULT, J., DUFOUR, D., et al. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. **Phytomedicine** 2005.12: 299-304, 2005.

THOMSEN, René; CHRISTENSEN, Mikael H. MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 49, n. 11, p. 3315–3321, 2006.

TINOCO, A. C. **Açaí amazônico: novas perspectivas de negócio.** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental. 1 CD-ROM. Trabalho apresentado no Workshop Regional do Açaizeiro: pesquisa, produção e comercialização, Belém, PA, 2005

TORRICELLI, C.; SALVADORI, S.; VALACCHI, G.; SOUCEK, K.; SLABAKOVA, E.; MUSCETTOLA, M., et al. Alternative pathways of cancer cell death by rottlerin: apoptosis versus autophagy. **Evid- based Compl. Alt,**

980658, 2012.

TRAGANOS, F., DARZYNKIEWICZ, Z. Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocytes subpopulations. Vol. 41, pp. 185–194. **New York: Academic Press**, 1994

TRISTANTE, E., MARTÍNEZ, C.M., JIMÉNEZ, S., MORA, L., CARBALLO, F., MARTÍNEZ-LACACI, I., DE TORRE-MINGUELA, C. Association of a characteristic membrane pattern of annexin A2 with high invasiveness and nodal status in colon adenocarcinoma. **Transl Res** 2015 166: 196-206.

TURNER, P. J. **XMGRACE, Version 5.1.25**. Beaverton, OR Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, 2005.

UDANI, J.K., SINGH, B.B., SINGH, V.J., BARRETT, M.L. Effects of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. **Nutr J.** 10, 45, 2011.

VAN GUNSTEREN, W.F., BERENDSEN, H.J.C. Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry. **Angewandte Chemie International Edition in English**, [S. l.], v. 29, n. 9, p. 992–1023, 1990.

VANOMMESLAEGHE, K.; RAMAN, E. Prabhu; MACKERELL, A. D. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], v. 52, n. 12, p. 3155–3168, 2012.

VILLACHICA, H., CARVALHO, J.E.U. DE, MÜLLER, C.H., DIAZ, S.C., ALMANZA, M. **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia**. Lima: Tratado de Cooperación Amazonica. 367p, 1996 (TCA-SPT,44).

WANG, JUNMEI; WOLF, ROMAIN M.; CALDWELL, JAMES W.; KOLLMAN,

PETER A.; CASE, DAVID A. Development and testing of a general Amber force field. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 25, n. 9, p. 1157–1174, 2004.

WANG, Y.X., LV, H., LI, Z.X., LI, C., WU, X.Y. Effect of shRNA mediated down-regulation of Annexin A2 on biological behavior of human lung adenocarcinoma cells A549. **Pathol Oncol Res** 2012 18: 183-190.

WEI, F.X., LI, M.Y., SONG, Y.H, *et al.* Apoptosis and activity changes of telomerase induced by essential oil from pine needles in HepG2 cell line. **Zhong Yao Cai** 2008 31: 1197-1200, 2008.

WUX.;SONG,M.,QIU,P.;LI,F.;WANG,M.;ZHENG,J.;WANG,Q.;XU,F.;XIAO,H.Ametabolite of nobiletin, 4'-demethylnobiletin and atorvastatin synergistically inhibits human colon cancer cell growth by inducing G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis. **Food Funct.** 2018, 9, 87–95.

WU, X., SONG, M., QIU, P., RAKARIYATHAM, K., LI, F., GAO, Z., CAI, X., WANG, M., XU, F., ZHENG, J., *et al.* Synergistic chemopreventive effects of nobiletin and atorvastatin on colon carcinogenesis. **Carcinogenesis** 2017, 38, 455–464. [CrossRef]

XING, R., HE, H., HE, Y., FENG, Y., ZHANG, C., WU, H., SUN, M., YU, X., LIU, Y., SONG, X, *et al.* ANXA2 remodels the microstructures of caco2 cells. **Cell Mol Biol** 59 2013: (59 suppl): ol1848-54.

XIU, D., LIU, L., QIAO, F., YANG, H., CUI, L, LIU, G. Annexin A2 coordinates STAT3 to regulate the invasion and migration of colorectal cancer cells in vitro. **Gastroenterol Res Pract** 2016, 3521453

YAMAGUCHI, K.K.L., PEREIRA, L.F.R., LAMARÃO C.V., LIMA, E.S., DA VEIGA-JÚNIOR, V.F. Amazon açai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, 2015, 179, 137–151.

YANG, J., CHENG, T.T., WANG, L.N., CHEN, W., LI, X. The expression and clinical significance of Annexin ii in clear-cell renal cell carcinoma. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi** 2012 28: 59-62 (In Chinese).

YEE, D.S., NARULA, N., RAMZY, I., BOKER, J., AHLERING, T.E., SKARECKY, D.W., ORNSTEIN, D.K. Reduced annexin II protein expression in high- grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. **Arch Pathol Lab Med** 2007 131: 902-908.

YUN, C.W., LEE, S.H. The roles of autophagy in cancer. **Int J Mol Sci.** 2018;19:3466.

YUYAMA, L.K.O., AGUIAR, J.P.L., FILHO, D.F.S., YUYAMA, K., VAREJÃO, M.J., FÁVARO, D.I. T., et al. Physicochemical characterization of acai juice of *Euterpe precatoria* Mart. from different Amazonian ecosystems. **Acta Amazônica**, 41, 545–552, 2011.

ZHANG, Q., YE, Z., YANG, Q., HE, X., WANG, H., ZHAO, Z. Upregulated expression of annexin II is a prognostic marker for patients with gastric cancer. **World J Surg Oncol** 2012 10: 103.

ZHANG,R.;CHEN,J.;MAO,L.;GUO,Y.;HAO,Y.;DENG,Y.;HAN,X.;LI,Q.;LIAO,W.;YUAN,M. Nobiletin Triggers Reactive Oxygen Species-Mediated Pyroptosis through Regulating Autophagy in Ovarian Cancer Cells. **J. Agric. Food Chem.** 2020, 68, 1326–1336.

ZAVA, D.T.; DUWE, G. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. **Nutri. Cancer**, 27(1), 31-40, 1997.

ANEXOS

1. Carta de Aprovação do Projeto na Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA – UNICAMP e UFMA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO AÇAÍ (Euterpe oleracea Mart.) EM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE/CÂNCER COLORRETAL**, registrada com o nº **5464-1/2020**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho e Marcos Antonio Custódio Neto da Silva**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **20/02/2020**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	20/02/2020 a 31/07/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	20/02/2020 a 31/07/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	15
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	15 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	15
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	15 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	15
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	15 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	15
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	15 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	15
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	15 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	15
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	15 Machos
Origem:	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório - CEMIB/UNICAMP

Handwritten signature



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO AÇAÍ (Euterpe oleracea Mart.) EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR SÓLIDO DE ERLICH E TOXICIDADE CRÔNICA**, registrada com o nº **5465-1/2020**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho e Marcos Antonio Custódio Neto da Silva**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **20/02/2020**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	20/02/2020 a 31/07/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	20/02/2020 a 31/07/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / Balb/cJ
No. de animais:	12
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / Balb/cJ
No. de animais:	12
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / Balb/cJ
No. de animais:	12
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / Balb/cJ
No. de animais:	12
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / Balb/cJ
No. de animais:	10
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	5 Machos 5 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	5 Machos 5 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas

24



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CIAEP: 02.0341.2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO



CERTIFICADO (07/2021)

Certificamos que a proposta intitulada: "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA JUÇARA (*Euterpe oleracea* MART.) EM MODELOS IN VITRO E IN VIVO DE CÂNCER", Processo n. 23115.024027/2020-64, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria do Carmo Lacerda Barbosa, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 09/10/2020.

We certify that the proposal: "EVALUATION OF ANTITUMORAL ACTIVITY OF JUÇARA (*Euterpe oleracea* MART.) IN IN VITRO AND IN VIVO CANCER MODELS", Process n. 23115.024027/2020-64, under the responsibility of Prof. Dr. Maria do Carmo Lacerda Barbosa, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of 10/09/2020.

PROPOSTA

Finalidade: Pesquisa **Área:** Ciências da Saúde
Vigência: 17/03/2021 a 01/07/2022

ANIMAIS

Origem: Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão

Espécie: Camundongos **Sexo:** Machos **Idade:** 60 dias
Fêmeas **Peso:** 25 - 30g

AMOSTRA

141

05

Local do experimento: Biotério Setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão – CCBS/UFMA.

São Luís, 16 de março de 2021.

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA/UFMA

2. Autorização SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AF1ABAE

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AF1ABAE**
Usuário: **Marcos Antonio Custódio Neto da Silva**
CPF/CNPJ: **043.388.093-70**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

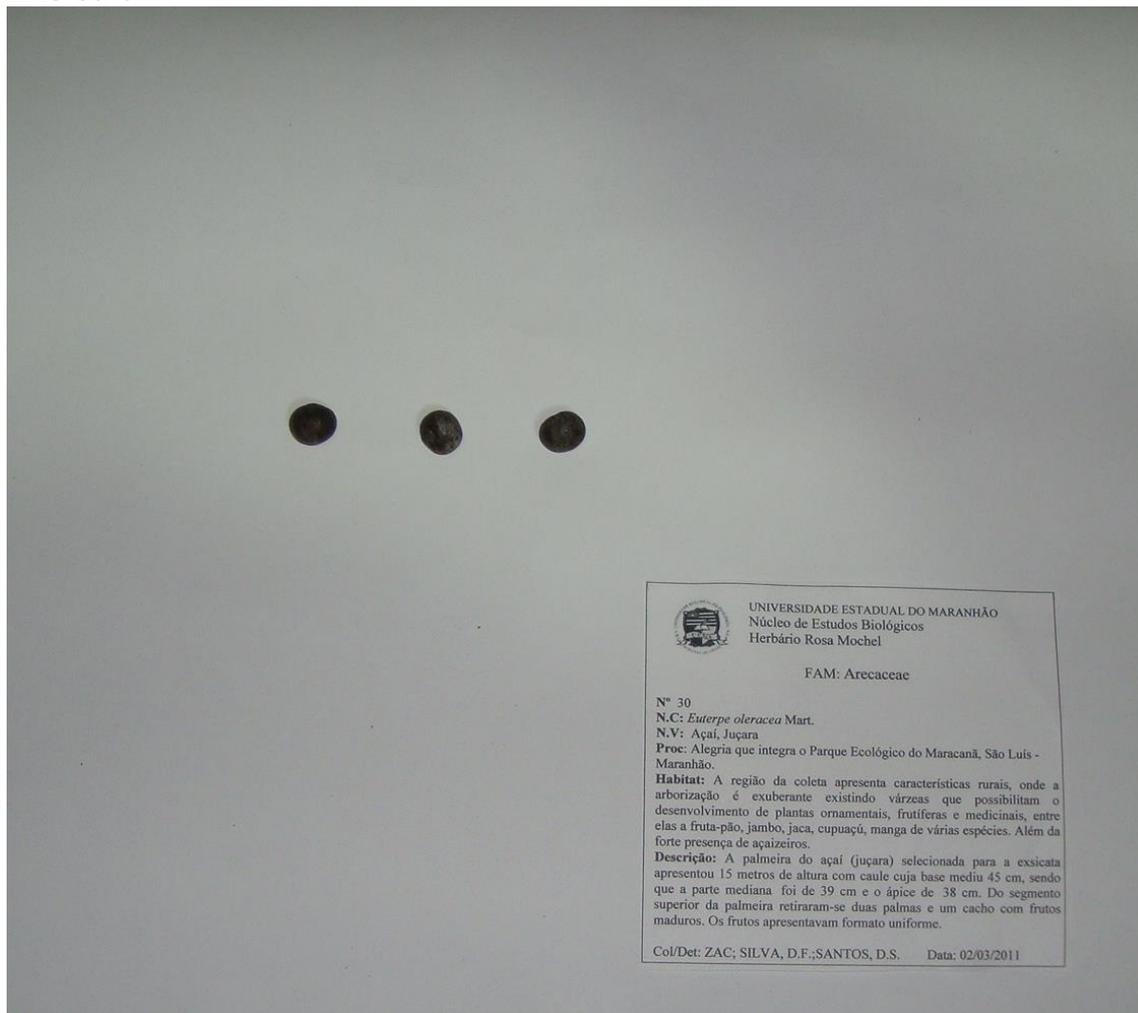
Espécie

Euterpe oleracea

Título da Atividade: **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA JUÇARA (Euterpe oleracea Mart.) EM MODELOS IN VITRO E IN VIVO DE CÂNCER**

Equipe

3. Exsicata



4. Primeiro artigo publicado – Current Traditional Medicine

Current Traditional Medicine



Year 2019

Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and anticancer activity of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart): a narrative review

Marcos Antonio Custódio Neto da Silva¹; Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento²; João Ernesto de Carvalho³

¹School of Medical Sciences, State University of Campinas (FCM-UNICAMP), Graduate Program in Medical Clinic, Campinas, São Paulo, Brazil; ²Department of Pathology, Graduate Program in Adult Health, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil; ³School of Pharmaceutical Sciences (FCF-UNICAMP), Graduate Program in Medical Clinic, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

*Corresponding Author details:

*Address correspondence to this author at the Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (FCM-UNICAMP), Programa de Pós-graduação em Clínica Médica, Campinas, São Paulo, Brasil; Tel: +55 (98) 32728535; E-mail: marcos_antonio456@hotmail.com



5. Segundo artigo publicado – The Scientific World Journal

Hindawi
The Scientific World Journal
Volume 2020, Article ID 5782485, 7 pages
<https://doi.org/10.1155/2020/5782485>



Research Article

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart) Consumption and Prevention of Chronic Diseases: Is There an Association? A Preliminary Study

Dulcelena Ferreira Silva,¹ Marcos Antonio Custódio Neto da Silva,²
Gabrielle Meirelles Rodrigues,³ Flávia Castello Branco Vidal,⁴
Maria do Carmo Lacerda Barbosa,⁵ Luciane Maria Oliveira Brito ,⁶
Geusa Felipa de Barros Bezerra,⁷ Walbert Edson Muniz Filho,⁸
Kátia Regina Assunção Borges,⁹ Ivone Garros Rosa,⁹ João Ernesto de Carvalho,¹⁰
and Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento ⁷

¹Morphology Department, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

²Post-Graduate Program in Internal Medicine, Medical Science School, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

³Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

⁴Morphology Department, Post-Graduate Program in Adult Health, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

⁵Medicine I Department, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

⁶Medicine III Department, Post-Graduate Program in Adult Health, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

⁷Pathology Department, Post-Graduate Program in Adult Health, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

⁸Pathology Department, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

⁹Pathology Department, Health and Environment Post-Graduate Program, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

¹⁰Pharmaceutical Science School, Post-Graduate Program in Internal Medicine, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

Correspondence should be addressed to Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento; cnsd_ma@uol.com.br

Received 17 December 2019; Revised 7 April 2020; Accepted 9 May 2020; Published 1 June 2020

Academic Editor: Elisabetta Baldi

Copyright © 2020 Dulcelena Ferreira Silva et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Flavonoids from a variety of fruits, including açaí, have beneficial antioxidant activity in several diseases, including cancer. Breast cancer is the second most prevalent cancer among Brazilian women. Studies have shown the action of flavonoids on neoplastic cells, as well as on diabetes and neurodegenerative and cardiovascular diseases. **Objective.** To analyze the relationship between the consumption of açaí and the presence of chronic diseases in women residing in the rural area of São Luís, Maranhão. **Methods.** A convenience sample of 150 women residing in the Maracanã neighborhood in São Luís, Maranhão, was used; the collected data included sociodemographic characteristics, habits, sexual and reproductive history, consumption of açaí, and history of cancer and other chronic diseases. The sample was divided into women who consumed açaí at least once a week (cases) and women who did not consume açaí (controls). Statistical analysis was performed to assess the relationships between those variables and the consumption of açaí. **Results.** A total of 141 women (94%) consumed açaí. Among these, 79.3% were aged between 20 and 50 years, 78.67% were farmers or housewives, 64.67% were Pardo (mixed race), 76.67% were nonsmokers, 70% were not receiving hormonal therapy, 40.67% had already undergone mammography, 28% had already undergone breast ultrasound, and 27.33% had a family history of cancer, with breast cancer being the second most prevalent cancer. There was a higher prevalence of hypertension among women who did not consume açaí than that among those who did; however, previous cancer, family history of cancer, heart disease, and diabetes were more prevalent among the consumers of açaí. There were no statistically significant relationships. **Conclusion.** Flavonoids are known to have a beneficial effect on some types of neoplastic cells and other diseases; therefore, larger studies are necessary to better evaluate the beneficial effects of consuming foods containing flavonoids on these diseases.

6. Terceiro artigo publicado – Molecules



Article

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Extract Induces ROS Production and Cell Death in MCF-7 Breast Cancer Cell Line

Marcos Antonio Custódio Neto da Silva ^{1,†}, Jonas Henrique Costa ^{2,†}, Taícia Pacheco-Fill ^{2,†}, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz ^{3,†}, Flávia Castello Branco Vidal ^{4,†}, Kátia Regina Assunção Borges ^{4,†}, Sulayne Janaina Araújo Guimarães ^{5,†}, Ana Paula Silva de Azevedo-Santos ^{5,†}, Kaio Eduardo Buglio ^{5,†}, Mary Ann Foglio ^{5,†}, Maria do Carmo Lacerda Barbosa ^{6,†}, Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento ^{4,*,†} and João Ernesto de Carvalho ^{3,*,†}



Citation: Silva, M.A.C.N.d.; Costa, J.H.; Pacheco-Fill, T.; Ruiz, A.L.T.G.; Vidal, F.C.B.; Borges, K.R.A.; Guimarães, S.J.A.; Azevedo-Santos, A.P.S.d.; Buglio, K.E.; Foglio, M.A.; et al. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Extract Induces ROS Production and Cell Death in MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Molecules* **2021**, *26*, 3546. <https://doi.org/10.3390/molecules26123546>

Academic Editors: Zhe-Sheng (Jason) Chen and Dong-Hua Yang

Received: 11 May 2021
Accepted: 7 June 2021
Published: 10 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Post-Graduate Program in Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, Universidade Estadual de Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, CEP, Campinas 13083-887, SP, Brazil; marcos_antonio456@hotmail.com
- ² Institute of Chemistry, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, Campinas 13083-970, SP, Brazil; j161206@dac.unicamp.br (J.H.C.); taicia@iqm.unicamp.br (T.P.F.)
- ³ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 13083-859, SP, Brazil; ana.ruiz@fci.unicamp.br (A.L.T.G.R.); kaioebuglio@gmail.com (K.E.B.); maryann.foglio@fci.unicamp.br (M.A.F.)
- ⁴ Post-Graduate Program in Adult Health, Department of Pathology, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luis 65080-805, MA, Brazil; flavidaly@yahoo.com.br (F.C.B.V.); kareborges@gmail.com (K.R.A.B.)
- ⁵ Post-Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luis 65080-805, MA, Brazil; sulaynebio@hotmail.com (S.J.A.G.); apsazevedo@yahoo.com.br (A.P.S.d.A.-S.)
- ⁶ Post-Graduate Program in Family Health, Department of Medicine I, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luis 65080-805, MA, Brazil; carminha13032009@hotmail.com
- * Correspondence: cmsd_ma@uol.com.br (M.d.D.S.B.N.); carvalho@fci.unicamp.br (J.E.d.C.)
- † These authors contributed equally to this work.

Abstract: *Euterpe oleracea* Mart. (açaí) is a native palm from the Amazon region. There are various chemical constituents of açaí with bioactive properties. This study aimed to evaluate the chemical composition and cytotoxic effects of açaí seed extract on breast cancer cell line (MCF-7). Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) was applied to identify chemical compounds present in açaí seed extract. LC-MS/MS and molecular networking were employed to detect the phenolic compounds of açaí. The antioxidant activity of açaí seed extract was measured by DPPH assay. MCF-7 breast cancer cell line viability was evaluated by MTT assay. Cell death was evaluated by flow cytometry and time-lapse microscopy. Autophagy was evaluated by orange acridin immunofluorescence assay. Reactive oxygen species (ROS) production was evaluated by DAF assay. From the molecular networking, fifteen compounds were identified, mainly phenolic compounds. The açaí seed extract showed cytotoxic effects against MCF-7, induced morphologic changes in the cell line by autophagy and increased the ROS production pathway. The present study suggests that açaí seed extract has a high cytotoxic capacity and may induce autophagy by increasing ROS production in breast cancer. Apart from its antioxidant activity, flavonoids with high radical scavenging activity present in açaí also generated NO (nitric oxide), contributing to its cytotoxic effect and autophagy induction.

Keywords: *Euterpe oleracea* Mart.; flavonoids; breast cancer; autophagy; reactive oxygen species; mass spectrometry

1. Introduction

Euterpe oleracea Mart., a native palm from the Amazon region, popularly known as açaí, açaí do Pará and juçara, is a multi-stem palm, with up to 25 stems per clump. The

7. Artigos submetidos (colocar print)

a) Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed oil exerts a cytotoxic role over colorectal cancer cells: role of Annexin A2 regulation and molecular docking

Journal of Traditional and Complementary Medicine (FI 4,22)

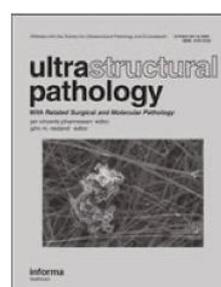
Journal of Traditional and Complementary Medicine
 Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed oil exerts a cytotoxic role over colorectal cancer cells: role of Annexin A2 regulation and molecular modeling
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	EJTCM-D-22-00751
Article Type:	Original article
Keywords:	Euterpe oleracea Mart; Polyphenols; Apoptosis; Autophagy; Annexin A2
Corresponding Author:	Marcos Antonio Custódio Neto da Silva, Ph.D Federal University of Maranhao Imperatriz, Maranhão BRAZIL
First Author:	Marcos Antonio Custódio Neto da Silva, Ph.D

b) Ultrastructural changes induced by açai seed extract in MCF-7 breast cancer cell line

Ultrastructural Pathology (FI 1,27)

Ultrastructural Pathology



Ultrastructural changes induced by açai (*Euterpe oleracea* Mart) in MCF-7 breast cancer cell line

Journal:	<i>Ultrastructural Pathology</i>
Manuscript ID	UUSP-2022-0079.R1
Manuscript Type:	Original Papers
Date Submitted by the Author:	14-Sep-2022

c) Preventive intake of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed extract reduces tumor size and ameliorates inflammation in Ehrlich mice model

Submetido à Revista Phytotherapy Research (FI 6,38)

Phytotherapy Research



Preventive intake of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed extract reduces tumor size and modulates inflammation in Ehrlich mice model

Journal:	<i>Phytotherapy Research</i>
Manuscript ID	PTR-22-2009
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	05-Oct-2022