

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**

**APOPTOSE EM CÉLULA DE ADENOCARCINOMA  
DE MAMA HUMANO COMO METODOLOGIA DE  
TRIAGEM DE EXTRATOS CITOTÓXICOS DE  
PLANTAS AMAZÔNICAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Patologia Ambiental e  
Experimental da Universidade Paulista –  
UNIP, para obtenção do título de Mestre  
em Patologia Ambiental e Experimental.

**MICHELLE SANCHEZ CORREIA AGUIAR**

**SÃO PAULO**

**2017**

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**

**APOTOSE EM CÉLULA DE ADENOCARCINOMA  
DE MAMA HUMANO COMO METODOLOGIA DE  
TRIAGEM DE EXTRATOS CITOTÓXICOS DE  
PLANTAS AMAZÔNICAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Barbosa Suffredini

**MICHELLE SANCHEZ CORREIA AGUIAR**

**SÃO PAULO**

**2017**

**MICHELLE SANCHEZ CORREIA AGUIAR**

**APOTOSE EM CÉLULA DE ADENOCARCINOMA  
DE MAMA HUMANO COMO METODOLOGIA DE  
TRIAGEM DE EXTRATOS CITOTÓXICOS DE  
PLANTAS AMAZÔNICAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Barbosa Suffredini  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Prof. Dr. Renato Correa Viana Casarin  
Universidade de Campinas – UNICAMP

\_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup>. Fabiana Toshie de Camargo Konno  
Universidade Paulista – UNIP

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter conseguido concluir esta etapa tão importante em minha vida. Gratidão. Agradeço aos meus pais, Verenice Sanchez e Antonio Miguel Freitas Correia, por todo apoio, educação e compreensão em todos os momentos da minha vida, pelo exemplo de humildade e gratidão. Sem vocês, nada seria possível. Muito Obrigada!

Agradeço ao meu esposo, Marcelo Aguiar Campos de Oliveira, por toda paciência, apoio, compreensão e por ter enfrentado junto a mim cada momento durante o desenvolvimento da minha dissertação e não ter, por nenhum segundo, me deixado desistir.

Agradeço à minha irmã, Rafaela Alquimim de S. Pessoa Tunu, por todo apoio e por todas as palavras de incentivo desde o início da minha jornada acadêmica, sempre ao meu lado e vibrando comigo por cada conquista pessoal e profissional.

Agradeço à minha orientadora, Profª Drª Ivana Barbosa Suffredini, por todos os ensinamentos, pela amizade, pela disponibilidade, atenção, paciência, dedicação, profissionalismo e por ter acreditado e confiado em mim desde o início. Muito obrigada!

Agradeço à Profª Drª Elizabeth Cristina Hurtado, à Profª Drª Anuska Alvares, à Drª Fabiana Toshie Konno e ao Sérgio Alexandre Frana por toda colaboração e apoio durante o desenvolvimento da minha dissertação.

Agradeço ao Prof. Dr. Renato Casarin, por todo incentivo, ensinamentos e por ser um exemplo de profissional e de pessoa para mim.

Agradeço à toda equipe do Programa de Pós-graduação em Odontologia, pela compreensão e incentivo para que eu pudesse desenvolver minha dissertação.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial à Suzana, Cleide, Luciane Dalboni, Fabiana Rodrigues, Fabiana Toshie, Juan Justino, Eliana Chiurco, Renata Iovine, Elza, Euzira e Sr. Osvaldo, que compartilharam momentos únicos comigo, não só durante o Mestrado, mas durante todos esses anos de UNIP.

Agradeço a Unip, pela concessão da bolsa de estudos para que eu pudesse, enfim, concretizar mais uma etapa da minha vida acadêmica.

Muito obrigada!!!

## RESUMO

O câncer de mama é o tipo de neoplasia mais frequente na população mundial feminina. A resistência de células tumorais à apoptose é uma característica essencial para o desenvolvimento do câncer. Apoptose, morte celular programada, está ligada a vários mecanismos de controle de crescimento celular. O presente trabalho tem como objetivo avaliar apoptose em célula de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, tratadas com extratos vegetais citotóxicos. Os 114 extratos foram testados na concentração de 100 µg/mL por 24 h, bem como a curcumina (25 µM / 24h), substância indutora de apoptose usada como referência. A porcentagem de apoptose observada para curcumina foi de 13,4% e foi considerada seletiva. A apoptose foi analisada utilizando o ensaio com anexina V e 7-AAD, por citometria de fluxo. Os extratos selecionados na triagem foram N30, N80, N144, N172, N178, N238, N246, N321, N284, N719, N934, N1062, N1068, N1091 e N1093. Estes extratos foram testados em 6h, 12h e 24h, nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/m. O percentual médio de apoptose dos extratos selecionados no tempo de 24 horas na concentração de 100 µg/mL foi de 58,92% - N238, 33,3% - N1091, 29,63% - N172, 28,93% - N178, 21,33% - N284, 21,19% - N30, 20,98% - N1062, 20,85% - N321, 20,63% - N144, 19,30% - N1068, 16,70% - N719, 16,01% - N934, 14,03% - N246, 13,64% - N80 e 13,07% - N1093. Pode-se concluir que os 15 extratos selecionados induzem apoptose nas células MCF-7 e os percentuais de apoptose são maiores quando comparados à curcumina, que apresentou 13,4 % de apoptose nos mesmos parâmetros. Os resultados obtidos mostram que os extratos selecionados possuem um percentual apoptótico superior em relação ao da curcumina, o que sugere um alto potencial como fontes de produtos naturais indutores de apoptose.

**Palavras-chave:** câncer de mama, extratos de plantas, produtos naturais, apoptose, citometria de fluxo, anexina V, 7-AAD, curcumina.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer type in women's world population. The resistance of tumor cells to apoptosis is an essential feature for the development of cancer. Apoptosis, programmed cell death, is linked to several cellular growth control mechanisms. The present study aims to assess apoptosis in human breast adenocarcinoma cell MCF-7, treated with cytotoxic plant extracts. The 114 extracts were tested at a concentration of 100 $\mu$ g/mL by 24h as well as curcumin (25 $\mu$ M/24h), apoptosis-inducing substance used as reference. The percentage of apoptosis observed for curcumin (13.4%) was considered selective. Apoptosis was analyzed using the test with annexin V and 7-AAD, by flow cytometry. The extracts selected in the screening were N30, N80, N144, N172, N178, N238, N246, N321, N284 N719, N934, N1062, N1068, N1091 and N1093. These extracts were tested in 6h, 12h and 24h, at concentrations of 50  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL and 200  $\mu$ g/m, the average percentage of apoptosis of selected extracts in 24 hour time on concentration of 100 $\mu$ g/mL was 58.92% - N238, N1091- 33,30%, 29.63%-N172, 28.93%-N178 21.33%,-N284, 21.19%-N30, 20.98%-N1062, 20.85%-N321, 20.63%-N144, 19.30%-N1068, 16.70% - N719, N934 – 16,01%, 14.03%-N246, 13.64%,-N80 and 13,07%-N1093. In conclusion, the 15 selected extracts induced apoptosis in MCF-7 cells and the percentage of apoptosis are higher when compared to curcumin. The present findings suggest that the 15 extracts are a high potential source of pro-apoptotic natural products.

**Keywords:** breast cancer, plant extracts, natural products, apoptosis, flow cytometry, Annexin V, 7-AAD, curcumin.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	5
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	11
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	12
<b>3.1 Objetivos Gerais.....</b>	12
<b>3.2 Objetivos Específicos.....</b>	12
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	13
<b>4.1 Coleta do Material Vegetal.....</b>	13
<b>4.2 Obtenção dos Extratos.....</b>	16
4.2.1 Preparo da curcumina e dos extratos vegetais.....	16
<b>4.3 Cultura Celular.....</b>	16
<b>4.4 Citometria de Fluxo.....</b>	17
4.4.1 Preparo das amostras e ensaio de Citometria de Fluxo.....	17
<b>4.5 Delineamento Experimental.....</b>	18
<b>4.6 Análise Estatística.....</b>	18
<b>5 RESULTADOS.....</b>	19
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	47
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	55
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	56
<b>ANEXO.....</b>	62



## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento desordenado de células em qualquer tipo de tecido. Essas células, por sua vez, sofrem mutações em seu DNA e adquirem características específicas de alta resistência aos sinais de homeostase, dificultando seu tratamento (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Esses sinais de resistência incluem sinalizações onde a célula não reconhece os fatores de inibição de crescimento sendo resistente à morte celular permitindo a imortalidade replicativa, indução de angiogênese e ativação de invasão tecidual e metástase. Essas características promovem uma instabilidade no genoma ocasionando diversas alterações no DNA e contribuindo com o crescimento desordenado dessas células. Contudo, as células tumorais são capazes de reprogramar seu metabolismo e escapar da ação imunológica do organismo. As células tumorais também possuem outro nível de complexidade conseguindo recrutar células normais que contribuem no desenvolvimento do seu “microambiente tumoral”, o que dificulta ainda mais o desenvolvimento de novos meios de tratamentos contra o câncer (HANAHAN & WEINBERG, 2010).

O câncer de mama acomete mulheres em todo o mundo e 70% das mortes ocorrem em populações femininas de países com média e baixa renda. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), no Brasil, em 2010, 49.240 novos casos de câncer de mama seriam diagnosticados, sendo que a maior incidência seria na região Sul, com 127.7 casos a cada 100 mil mulheres (LEE *et al.*, 2012). No Brasil, a taxa de incidência do câncer de mama está em uma faixa intermediária em relação ao restante do mundo. A doença está relacionada ao processo de urbanização, o que leva mulheres em situação socioeconômica mais elevada, e que vivem nas grandes cidades, a apresentarem maior risco da doença do que as que vivem nos ambientes rurais, demonstrando uma relação com o estilo de vida da população feminina (KLUTHCOVSKY *et al.*, 2014 ).

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais comum entre as mulheres (INCA, 2016), embora, mesmo sendo raro, ocorra também em homens. Os protocolos terapêuticos são baseados em quimioterapia, radioterapia e/ou cirurgia (LIEDKE *et al.*, 2013). Quando selecionadas, a quimioterapia e a radioterapia desencadeiam importantes efeitos colaterais, incluindo a fragilização do sistema imunológico do paciente, uma vez que os fármacos quimioterápicos antitumorais utilizados são muito agressivos. Dependendo do nível de desenvolvimento do tumor, há a necessidade de doses ainda mais elevadas de medicamentos para que o tecido alvo seja atingido. Porém,

independentemente da dose e do protocolo antitumoral utilizado, o aparecimento de efeitos colaterais é inevitável pois, de um modo geral, os quimioterápicos agem no ciclo mitótico ou em sítios-alvo proteicos, podendo ocorrer em maior quantidade nas células tumorais, mas que também ocorrem nas células normais, ocasionando sua morte e deixando o indivíduo debilitado. A busca por novos tratamentos alternativos tem como objetivo a tentativa de minimizar esses efeitos negativos dos fármacos já utilizados como terapias provocam em pacientes com câncer e a natureza tem sido uma fonte de extrema importância e muito promissora (CHAVOSHI *et al.*, 2017). (CHAVOSHI *et al.*, 2017).

Cada vez mais a ciência investe em pesquisas com produtos naturais com o objetivo de encontrar novas formas para o tratamento de neoplasias (NEWMAN & CRAGG, 2016). A natureza é uma fonte extremamente importante de compostos químicos. A busca por novos produtos naturais com atividade antineoplásica levou à identificação de paclitaxel, docetaxel e os alcalóides de vinca, que já são utilizados em terapias contra o câncer (SUFFREDINI *et al.*, 2007) e agem no ciclo mitótico inibindo o crescimento das células tumorais (NOBILI *et al.*, 2009). A introdução de novos compostos terapêuticos ativos provenientes da natureza, no tratamento contra o câncer, representa uma importante evolução para a pesquisa e também para as pessoas com neoplasias.

A biodiversidade brasileira tem sido um recurso de extrema importância para a pesquisa de novas alternativas terapêuticas. Aproximadamente 20% da biodiversidade mundial pode ser encontrada em território brasileiro, destacando-se a Amazônia e a Mata Atlântica. Devido a essa grande biodiversidade e ao fato de que 60% de todos os medicamentos são provenientes de fontes naturais (NEWMAN & CRAGG, 2016) os extratos de plantas da Amazônia têm sido triados para a realização de ensaios *in vitro* para descoberta de agentes citotóxicos contra doenças como o câncer de próstata e o câncer de mama (SUFFREDINI *et al.*, 2006 a; SUFFREDINI *et al.*, 2007).

Estudos realizados a partir de plantas coletadas da Amazônia e da Mata Atlântica têm apresentado resultados positivos. Através dos ensaios *in vitro*, os extratos dessas plantas apresentaram atividade antitumoral. Agentes citotóxicos contra células do câncer de próstata da linhagem PC-3 foram encontrados em 17 extratos de plantas (SUFFREDINI *et al.*, 2006) e também foi evidenciada atividade citotóxica e de letalidade celular na linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano, por 11 extratos de plantas (SUFFREDINI *et al.*, 2007).

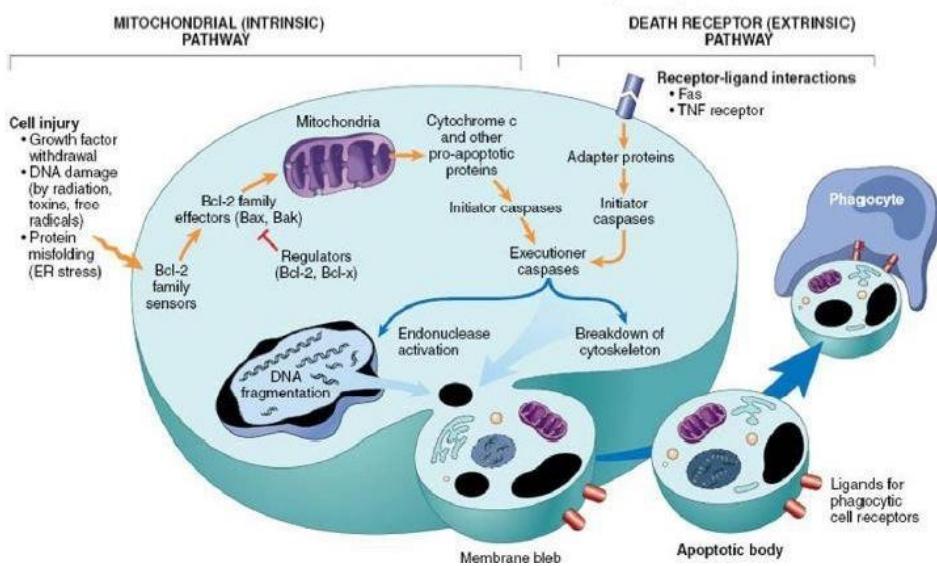
Em pesquisas com plantas do cerrado brasileiro, extratos de plantas de espécies das famílias Anacardiaceae, Annonaceae, Apocynaceae, Clusiaceae e Flacourtiaceae

foram testadas *in vitro* e apresentaram citotoxicidade contra linhagens de células de carcinoma uterino humano, de melanoma e de células tumorais cerebrais (MESQUITA *et al.*, 2009). Estudo *in vitro* com extratos de plantas amazônicas apresentou citotoxicidade contra linhagem de células tumorais de mama, o que sugere o aprofundamento de testes e ensaios com produtos naturais (SUFFREDINI *et al.*, 2007). Um ensaio de avaliação antiproliferativa e de indução de apoptose com extrato de folhas de *Ziziphus spina christi* (Rhamnaceae) em células tumorais de adenocarcinoma humano MCF-7 mostrou eficácia do tratamento em menor concentração do extrato, o que evidenciou a interrupção do ciclo celular na fase G1/S, bem como induziu à apoptose das células após o período de 48 horas de tratamento. Os resultados sugerem que a apoptose celular ocorreu de uma forma intrínseca mitocondrial independente, pois não houve alterações na expressão dos genes Bcl-2 e Bax (FARMANI *et al.*, 2016). Outro estudo feito com extrato de folhas de *Eugenia aquea* (Myrtaceae) para verificar a atividade antitumoral de um de seus compostos ativos resultou na inibição do crescimento celular da linhagem MCF-7 de adenocarcinoma humano e também em indução de apoptose nas células através da expressão da proteína polimerase poli (PARP), que está relacionada à morte celular programada (SUBARNAS *et al.*, 2015).

Apoptose é o tipo de morte celular programada na qual há a degradação de todos os componentes intracelulares sem extravasamento para o meio extracelular, uma vez que não há o rompimento da membrana celular, e portanto se mantém a homeostase/equilíbrio do tecido (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

A apoptose é um modo distinto de morte celular responsável pela eliminação de células em tecidos normais, como na embriogênese, e que também ocorre em contextos patológicos específicos. Caracteriza-se pela compactação e marginação da cromatina nuclear, condensação do citoplasma e a convolução dos contornos nucleares e celulares. Em uma fase posterior, os fragmentos de núcleo e as protuberâncias que se formam na superfície da célula separam-se em corpos apoptóticos que são fagocitados pelas células próximas (fagócitos) e degradados nos lisossomos (KERR *et al.*, 2012). Duas grandes vias de sinalização controlam a iniciação da apoptose em mamíferos: a via extrínseca, que envolve receptores de morte celular de membrana, através de ligantes de TNF (fator de necrose tumoral) e consequentemente ativação da caspase 8, e a via intrínseca, que está relacionada à interrupção do funcionamento mitocondrial pelos membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, o que leva à liberação do citocromo c, promovendo a ativação da caspase 9 (LEBLANC *et al.*, 2002; GREEN, 2005).

**Figura 1.** Via intrínseca e extrínseca de apoptose.



Fonte: <https://www.elsevier.com/books/robbins-basic-pathology/kumar/978-1-4377-1781-5>

A figura 1 mostra os mecanismos de apoptose descrevendo as duas vias distintas de indução e regulação de apoptose, mas que levam à ativação de caspases. Na via intrínseca, as proteínas da família Bcl-2 regulam a permeabilidade da membrana mitocondrial causando desequilíbrio e o escape de substâncias que ativam, principalmente, a caspase 9. Na via extrínseca, receptores (TNF, FAS) de membrana plasmática se ligam à proteínas que formam um complexo de "sinalização de morte celular" ativando, principalmente, a caspase 8.

Já a necrose é o tipo de morte celular onde todo o material que está dentro da célula é expulso para o meio extracelular pelo rompimento de sua membrana causando um desequilíbrio do tecido e das regiões adjacentes e levando a uma morte celular danosa para o tecido, uma vez que desencadeia o processo inflamatório desencadeado pela liberação do material intracelular. O desenvolvimento da necrose está associado ao acúmulo irregular de cromatina, inchaço das organelas e perturbação das membranas. As membranas se desintegram, mas a célula normalmente retém sua forma até que sejam removidas por fagócitos mononucleares. Grupos de células contíguas e a presença de um

exsudato inflamatório geralmente fornecem evidências confirmatórias de morte celular por necrose (KERR *et al.*, 2012).

Muitos dos mecanismos de controle de crescimento celular estão ligados à apoptose. A proliferação excessiva ou o crescimento em locais inadequados induzem à morte por apoptose nessas células (IGNEY & KRAMMER, 2002). As células tumorais, em geral, podem proliferar além dessas restrições, o que limita o crescimento de tecido normal. Assim, a resistência de células tumorais à apoptose é uma característica essencial para o desenvolvimento do câncer (HANAHAN & WEINBERG, 2000). As células tumorais são resistentes aos sinais de morte, pois são capazes de inativar e/ou silenciar diversos receptores celulares, o que proporciona a proliferação e crescimento desordenado dessas células (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

A maioria dos fármacos utilizados em tratamentos antitumorais causam efeitos secundários graves, pois geram um dano excessivo em células normais (SUBARNAS *et al.*, 2015). Conforme estudos já realizados, encontramos um alto potencial em produtos naturais como novas alternativas de terapias contra o câncer (ROCHA *et al.*, 2001). A curcumina, composto extraído da cúrcuma (*Curcuma longa*), tem sido amplamente estudada por apresentar efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e também antitumorais (KOOHPAR *et al.*, 2015; RAMSEWAK *et al.*, 2000), pois apresentam ações antiproliferativas, tanto isoladamente como em conjunto com outros compostos, induzindo células tumorais à apoptose. Porém, o mecanismo exato pelo qual a curcumina exerce seus efeitos apoptóticos em células de câncer de mama ainda não está evidenciado (LV *et al.*, 2014), embora algumas propostas tenham sido sugeridas.

Um estudo recente em células MCF-7 de mama evidenciou que a curcumina age através da via intrínseca mitocondrial pelo aumento dos níveis de EROs (espécies reativas de oxigênio), que são subprodutos do processo oxidativo celular normal. e tem sido sugerido seu envolvimento na regulação da iniciação da sinalização apoptótica. O aumento de EROs induz a despolarização da membrana mitocondrial, o que leva ao aumento dos níveis de moléculas pró-apoptóticas (REUTER *et al.*, 2008). A curcumina regula proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 e subregula duas proteínas anti-apoptóticas, a própria Bcl-2 e a Bcl-xL em células tumorais de mama (LUO *et al.*, 2016; REUTER *et al.*, 2008). Além da curcumina, estudo com extrato de planta iraniana sugeriu que a apoptose seja iniciada pela via intrínseca em células MCF-7. O extrato de *Scrophularia variegata* (Scrophulariaceae) apresentou citotoxicidade contra células tumorais de mama humano induzindo apoptose nas células MCF-7 via intrínseca pelo

aumento da atividade das caspase 3 e 9, sugerindo envolvimento mitocondrial para sinalização apoptótica (AZADMEHR *et al.*, 2015). Essas respostas positivas de toxicidade contra células tumorais de mama, cada vez mais, sugerem novas alternativas de terapia para a medicina (YADAV *et al.*, 2015). Em vista do exposto, o presente trabalho avaliou extratos vegetais que apresentaram atividade citotóxica contra células de adenocarcinoma humano quanto à indução de apoptose.

## 2 JUSTIFICATIVA

A biodiversidade brasileira apresenta um grande potencial para a descoberta de novos compostos naturais que apresentem atividade antitumoral. Pesquisas demonstram que diversos extratos de plantas apresentam atividade antitumoral contra células de câncer de mama, e estudos sobre a descoberta de seu mecanismo de evasão da apoptose em células tumorais têm sido cada vez mais ampliados com o objetivo de alcançar novas terapias e/ou tratamentos preventivos (SUFFREDINI *et al.*, 2006a; SUFFREDINI *et al.* 2007). Com a análise dos extratos citotóxicos para células MCF-7, pretende-se encontrar aqueles com maior percentual apoptótico que, dessa forma, possam sugerir um potencial como antitumoral natural.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

Estudar a morte de células tumorais de mama humano MCF-7 pela ação de extratos vegetais citotóxicos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Selecionar extratos vegetais que induzem a morte celular por apoptose.
- Verificar a indução de apoptose dos extratos selecionados em função do tempo e da concentração de extrato.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta do material vegetal

As espécies vegetais foram coletadas em regiões próximas a Manaus (AM) sob licença do Ministério do Meio Ambiente, IBAMA, de número 12A/2008. O material vegetal fresco a ser utilizado para a obtenção dos extratos foi encaminhado para o Laboratório de Extração da UNIP, onde foi limpo retirando-se contaminantes (fragmentos de outros órgãos, poeira, areia, inseto, etc.), seco em estufa com circulação de ar a 40°C. Em seguida, foi moído em moinho de martelo (Holmes 201 X), o qual está localizado dentro de uma capela com sucção de ar. A planta, já processada, foi armazenada em um saco plástico e identificada. A técnica utilizada para obtenção do extrato foi descrita por YOUNES *et al.* (2014). Durante a coleta do material ainda foi retirada uma amostra dos órgãos aéreos de cada espécie coletada contendo ramos com folhas, flores e/ou frutos, denominados de exsicatas, que foram depositados como material testemunho e registrados no Herbário UNIP, onde foram identificados pelo Dr. Mateus Luís Barradas Paciencia, curador do Herbário (imagens 1 e 2).

Imagen 1 – Exsicata N238 – *Vismia schultesii* (Clusiaceae).



Imagen1: Herbário UNIP - Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade - NPBio

Imagen 2 – Exsicata N1091 – *Guatteria riparia* (Annonaceae).



Imagen 2: Herbário UNIP - Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade - NPBio

## 4.2 Obtenção dos Extratos

O material pulverizado foi extraído em percolador de vidro, no qual o pó da planta foi colocado em contato com diclorometano/metanol 1:1 (v/v), em quantidade suficiente para cobrir todo o pó. O material permaneceu em maceração por 24 horas e em seguida foi drenado para um balão de fundo chato com a ajuda de uma bomba de vácuo. O extrato bruto orgânico assim obtido foi concentrado em rota-evaporador até retirada total do solvente orgânico. Com o mesmo material vegetal realizou-se a maceração em água, que foi liofilizado. Os extratos secos foram registrados e armazenados em câmara fria a –20°C (vinte graus celsius negativos).

### 4.2.1 Preparo da curcumina e dos extratos vegetais

A curcumina (Sigma) foi utilizada como substância indutora de apoptose de referência para os ensaios. A concentração estoque de curcumina foi de 10 mM (LV *et al.*, 2014). As concentrações finais de curcumina nas placas de 24 poços dos ensaios de 6h, 12h e 24h foram de 12,5 µM, 25 µM e 50 µM.

A concentração estoque dos extratos vegetais foi de 40 mg/mL. Os extratos vegetais orgânicos foram diluídos em dimetilsulfóxido 50% (DMSO 50%). Os extratos vegetais aquosos foram diluídos em água grau Milli-Q. As concentrações finais dos extratos nas placas de 24 poços dos ensaios de 6h, 12h e 24h foram de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL.

## 4.3 Cultura Celular

A linhagem de célula tumoral MCF-7 (receptor estrogênico positivo de adenocarcinoma de mama) foi cultivada em frascos de cultura de tecidos (Costar), suplementado com meio RPMI-1640 (Lonza), acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cambras), 1% de glutamina (Sigma) e sulfato de gentamicina 1% (Hypolabor), e foi mantida em uma incubadora (Thermo Fisher) a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade relativa. As células foram submetidas a passagens semanais (tripsina-EDTA, Cambras). As densidades das células foram obtidas através de uma câmara de contagem celular utilizando o método de exclusão por azul de Tripan. Os testes foram realizados em placas de 24 poços com uma densidade de 1,5 x 10<sup>4</sup> células por poço e foram cultivadas

por 24h para atingir a confluência de 100%, cerca de  $3,0 \times 10^5$  células por poço, e posteriormente o extrato foi adicionado.

#### 4.4 Citometria de Fluxo

Por citometria de fluxo foi realizado ensaio para identificar o tipo e o percentual de morte das células MCF-7. Utilizando o ensaio de apoptose anexina V e 7-AAD (Becton Dickinson – BD) foi detectado apoptose inicial (Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>-</sup>), apoptose tardia/necrose (Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>) e necrose (Anexina<sup>-</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>). As células vivas não apresentam positividade para ambos marcadores. Para calibração e validação dos marcadores, utilizou-se células MCF-7 mortas pelo calor marcadas somente com Anexina V, somente com 7-AAD ou duplo marcadas (Anexina V e 7-AAD) (anexo 1). Técnica realizada utilizando-se o template disponibilizado pelo fabricante (Becton Dickinson – BD) para Anexina V conjugada a ficoeritrina (PE) e 7-AAD. Aquisição de 30 segundos para cada amostra.

##### 4.4.1 Preparo das amostras e ensaio de Citometria

O sobrenadante de cada poço foi coletado em um tubo de fundo cônico de 15 mL. Cada poço foi lavado com 100  $\mu$ L de PBS (Dulbeco) e todo conteúdo foi adicionado ao sobrenadante do tubo inicial. Um volume de 250 $\mu$ L de tripsina foi adicionado em cada poço e a placa armazenada em estufa a 37°C por 10 minutos para soltura das células; posteriormente 100  $\mu$ L de meio de cultura suplementado com 5% SFB foi adicionado em cada poço para neutralização da tripsina. O conteúdo de cada poço foi adicionado em seu respectivo tubo. Finalizada a coleta, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. Após a centrifugação, o *pellet* formado foi lavado 1x com 500 $\mu$ L de PBS gelado, centrifugado novamente a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspensão em 100  $\mu$ L de tampão de ligação (“Annexin V Binding Buffer” - Becton Dickinson – BD) 1x diluído (1:10) e foi adicionado 1  $\mu$ L de Anexina V e 1  $\mu$ L de 7-AAD em cada tubo. Os tubos foram homogeneizados e incubados por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro. Após 15 minutos, todo o conteúdo foi colocado em um novo tubo com filtro (*cell-strainer cap* 12x75 mm, malha de 35 $\mu$ m – Corning) e foi adicionado mais 100  $\mu$ L do tampão de ligação 1xdiluído para análise em citometria de fluxo. A análise de todas as amostras foi feita

dentro do período de 1 hora conforme padrões estabelecidos pelo fabricante (Becton Dickinson – BD). As amostras foram adquiridas e analisadas em *software C6 Sampler BD Accuri*.

#### **4.5 Delineamento Experimental**

Os experimentos foram realizados em duas etapas. Primeiramente, 114 extratos vegetais citotóxicos contra células MCF-7 foram testados em uma concentração de 100 µg/mL por 24 h, no modelo de verificação de ocorrência de apoptose/necrose. A curcumina foi utilizada como substância indutora de apoptose de referência a uma concentração de 25 µM, por 24 h. A porcentagem de apoptose obtida para a curcumina foi considerada seletiva para o ensaio de triagem em 24 h. Na segunda etapa, os extratos selecionados foram testados nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL, por 6 h, 12 h e 24 h, e a curcumina nas concentrações de 12,5 µM, 25 µM e 50 µM, nos mesmos tempos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os dados referem-se a média de três experimentos independentes (média +/- desvio padrão).

#### **4.6 Análise Estatística**

Os testes foram realizados em triplicata e os dados expressam a média de três experimentos independentes (média +/- desvio padrão). Utilizou-se o teste paramétrico ANOVA de duas vias para os cálculos estatísticos, considerando tempo e concentração como as duas variáveis e diferenças significativas entre as médias ao nível de  $\alpha < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

As informações botânicas dos extratos das plantas coletadas na Amazônia e utilizadas para o desenvolvimento desse trabalho encontram-se na tabela 1 (número do extrato, concentração inibitória 50% (CI50), data da coleta, família, espécie e órgãos utilizados para preparo do extrato bruto).

**Tabela 1.** Dados botânicos e de coleta das plantas amazônicas utilizadas para se obter os extratos vegetais que apresentaram efeito citotóxico contra a linhagem MCF-7 de adenocarcinoma humano. Os extratos brutos orgânicos possuem números ímpares e os aquosos possuem números pares.

Extrato	Identificação de coleta	CI50 µg/L	Data da coleta	Família	Espécie	Órgão
30	PSC	187	7,86	31-05-1997	Clusiaceae	<i>Calophyllum brasiliense</i>
33	PSC	97	13,30	20-10-1997	Leg-Mimosoideae	<i>Zygia trunciflora</i>
43	PSC	272	5,336	08-08-1997	Chrysobalanaceae	<i>Licania</i> sp.
47	PSC	113	8,785	18-04-1997	Caryocaraceae	<i>Caryocar microcarpum</i>
48	PSC	113	69,76	18-04-1997	Caryocaraceae	<i>Caryocar microcarpum</i>
55	PSC	396	36,75	10-08-1997	Leg-Caesalpinoideae	<i>Macrolobium multijugum</i>
57	PSC	387	22,37	16-08-1997	Polygonaceae	<i>Ruprechtia</i> sp.
58	PSC	387	27,02	16-08-1997	Polygonaceae	<i>Ruprechtia</i> sp.
59	PSC	380	40,59	16-08-1997	Leg-Faboideae	<i>Dalbergia</i> sp.
61	PSC	390	27,84	10-08-1997	Melastomataceae	<i>Tococa</i> sp.
63	PSC	98	41,39	10-07-1997	Clusiaceae	<i>Vismia guianensis</i>
64	PSC	98	32,53	10-07-1997	Clusiaceae	<i>Vismia guianensis</i>
65	PSC	143	46,9	19-04-1997	Leg-Faboideae	<i>Acosmium</i> sp.
70	PSC	103	45,03	18-04-1997	Trigoniaceae	<i>Trigonia</i> cf. <i>sericea</i>
76	PSC	306	21,57	15-08-1997	Rhabdodendraceae	<i>Rhabdodendron amazonicum</i>
77	PSC	386	20,19	16-08-1997	Malpighiaceae	<i>Byrsonima</i> sp.
78	PSC	386	15,49	16-08-1997	Malpighiaceae	<i>Byrsonima</i> sp.
79	PSC	386	36,58	16-08-1997	Malpighiaceae	<i>Byrsonima</i> sp.
80	PSC	386	6,593	16-08-1997	Malpighiaceae	<i>Byrsonima</i> sp.
83	PSC	408	17,46	12-04-1997	Olacaceae	<i>Chaunochiton loranthoides</i>
85	PSC	407	63,96	12-04-1997	Euphorbiaceae	<i>Phyllanthus attenuatus</i>

CA = Caule; OA = Órgãos aéreos; FO= folhas; FL = flores.

Continuação da Tabela 1.

Extrato	Identificação de coleta	CI50 µg/mL	Data da coleta	Família	Espécie	Órgão	
92	PSC	88	40,27	03-02-1997	Euphorbiaceae	<i>Piranhea trifoliata</i>	FO
98	PSC	136	61,04	19-04-1997	Apocynaceae	<i>Microplumeria anomala</i>	FO
101	PSC	150	25,11	19-04-1997	Apocynaceae	<i>Himatanthus attenuatus</i>	CA
110	PSC	81	10,35	18-01-1997	Euphorbiaceae	<i>Mabea nítida</i>	FR
120	PSC	150	20,76	19-04-1997	Apocynaceae	<i>Himatanthus attenuatus</i>	FO
127	PSC	136	17,91	19-04-1997	Apocynaceae	<i>Microplumeria anomala</i>	CA
129	IBS	10	16,21	25-06-1998	Apocynaceae	<i>Malouetia tamaquarina</i>	OA
130	IBS	10	15,44	25-06-1998	Apocynaceae	<i>Malouetia tamaquarina</i>	OA
143	PSC	187	41,61	31-05-1997	Clusiaceae	<i>Calophyllum brasiliense</i>	FO
144	PSC	187	74,35	31-05-1997	Clusiaceae	<i>Calophyllum brasiliense</i>	FO
171	IBS	6	57,83	25-06-1998	Leg-Caesalpinoideae	<i>Macrolobium multijugum</i>	FO
172	IBS	6	27,15	25-06-1998	Leg-Caesalpinoideae	<i>Macrolobium multijugum</i>	FO
178	PSC	92	29,35	18-11-1997	Meliaceae	<i>Trichilia cf. pleeana</i>	OA
201	AAO	3291	12,23	20-04-1998	Clusiaceae	<i>Vismia schultesii</i>	FO e CA
202	AAO	3291	10,64	20-04-1998	Clusiaceae	<i>Vismia schultesii</i>	FO e CA
205	IBS	26	102,4	27-06-1998	Leg-Caesalpinoideae	<i>Hymenaea courbaril</i>	CA
209	AAO	3275	49,78	18-04-1998	Clusiaceae	<i>Haploclathra paniculata</i>	FO
210	AAO	3275	2,708	18-04-1998	Clusiaceae	<i>Haploclathra paniculata</i>	FO
236	PSC	199	31,94	31-05-1997	Euphorbiaceae	<i>Amanoa cf.gracillima</i>	FO
237	AAO	3291	27,43	20-04-1998	Clusiaceae	<i>Vismia schultesii</i>	CA
238	AAO	3291	21,97	20-04-1998	Clusiaceae	<i>Vismia schultesii</i>	CA
245	IBS	11	38,58	25-06-1998	Rubiaceae		OA
246	IBS	11	32,22	25-06-1998	Rubiaceae		OA
261	PSC	271	20,83	08-08-1997	Connaraceae	<i>Connarus cf. perrottetii</i>	CA
284	PSC	80	15,64	08-07-1997	Violaceae	<i>Amphirrhox longifolia</i>	OA
285	PSC	147	1,571	19-04-1997	Simaroubaceae	<i>Simaba guianensis</i>	CA
321	PSC	414	57,5	12-04-1997	Myrtaceae	<i>Psidium densicomum</i>	FO e FL
351	IBS	9	30,46	25-06-1998	Leg-Mimosoideae	<i>Stryphnodendron pulcherrimum</i>	CA
363	PSC	122	21,79	18-04-1997	Polygonaceae	<i>Cimeria sp.</i>	ao
383	PSC	199	8,704	31-05-1997	Euphorbiaceae	<i>Amanoa cf.gracillima</i>	CA

CA = Caule; OA = Órgãos aéreos; FO= folhas; FL = flores

Continuação da Tabela 1.

Extrato	Identificação de coleta	CI50 µg/mL	Data da coleta	Família	Espécie	Órgão	
384	PSC	199	64,23	31-05-1997	Euphorbiaceae	<i>Amanoa cf.gracillima</i>	CA
385	PSC	86	56,12	03-02-1997	Euphorbiaceae	<i>Croton cuneatus</i>	ao
397	PSC	82	17,35	19-01-1997	Leg-Faboideae	<i>Dioclea violacea</i>	CA
475	PSC	93	51,51	09-10-1997	Rubiaceae	<i>Amaioua</i> sp.	CA
495	AAO	3318	24,22	11-09-1998	Malpighiaceae	<i>Banisteriopsis</i> sp.	FO e CA
505	PSC	79	86,33	08-06-1997	Lecythidaceae	<i>Gustavia augusta</i>	CA
514	PSC	79	66,43	08-06-1997	Lecythidaceae	<i>Gustavia augusta</i>	FO
523	AAO	3308	69,44	10-09-1998	Rubiaceae	<i>Duroia</i> sp.	FO
524	AAO	3308	9,93	10-09-1998	Rubiaceae	<i>Duroia</i> sp.	FO
565	AAO	3294	37,37	09-09-1998	Polygonaceae	<i>Triplaris surinamensis</i>	FL
577	PSC	401	29,29	10-08-1997	Vochysiaceae	<i>Ruizterania retusa</i>	RA
621	AAO	3295	57,09	09-09-1998	Flacourtiaceae	<i>Laetia cobymbulosa</i>	CA
625	AAO	3357	16,85	22-01-1999	Clusiaceae	<i>Clusia</i> sp.	CA
635	AAO	3373	79,22	25-01-1999	Apocynaceae	<i>Macoubea sprucei</i>	CA
641	AAO	3368	25,53	24-01-1999	Myristicaceae	<i>Virola theiodora</i>	CS
685	AAO	3363	44,96	23-01-1999	Rubiaceae	<i>Genipa</i> sp.	FR
690	AAO	3353	40,35	22-01-1999	Leg-Mimosoideae	<i>Abarema cf. jupunba</i>	CA
707	AAO	3400	25,09	03-04-1999	Apocynaceae	<i>Forsteronia acouci</i>	FO e CA
712	AAO	3379	26,25	02-04-1999	Combretaceae	<i>Buchenavia</i> sp.	FO e CA
716	AAO	3389	35,95	02-04-1999	Rubiaceae	<i>Calycophyllum</i> sp.	OA
719	AAO	3383	3,642	02-04-1999	Flacourtiaceae	<i>Laetia suaveolens</i>	FO e CA
729	AAO	3396	24,26	03-04-1999	Apocynaceae	<i>Himatanthus attenuatus</i>	CA
733	AAO	3395	50,65	02-04-1999	Apocynaceae	<i>Malouetia tamaquarina</i>	OA
735	AAO	3393	40,24	02-04-1999	Apocynaceae	<i>Microplumeria anomala</i>	FO
809	PSC	147	8,054	19-04-1997	Simaroubaceae	<i>Simaba guianensis</i>	OA
863	AAO	3478	31,76	30-09-1999	Malpighiaceae	<i>Byrsonima cf. duckeana</i>	OA
871	AAO	3499	54,78	22-10-1999	Linaceae	<i>Roucheria punctata</i>	CA
873	AAO	3469	38,59	27-08-1999	Malpighiaceae	<i>Stigmaphyllum arenicola</i>	OA
882	AAO	3488	18,04	01-10-1999	Rubiaceae	<i>Pagamea coriacea</i>	CA
909	AAO	3510	53,79	25-11-1999	Apocynaceae	<i>Ambelania acida</i>	FO
913	AAO	3509	18,7	25-11-1999	Annonaceae	<i>Guatteria cf. meliodora</i>	OA

CA = Caule; OA = Órgãos aéreos; FO= folhas; FL = flores.

Continuação da Tabela 1.

Extrato	Identificação de coleta	CI50 µg/mL	Data da coleta	Família	Espécie	Órgão
934	AAO 3470	56,06	27-08-1999	Flacourtiaceae	<i>Xylosma psedosalzmanii</i>	CA
956	AAO 3507	34,52	25-11-1999	Rubiaceae	<i>Palicourea cf.marcgravii</i>	CA
966	AAO 3495	11,49	22-10-1999	Rubiaceae	<i>Palicourea longiflora</i>	OA
979	AAO 3536	48,86	23-01-2000	Annonaceae	<i>Xylopia plowmanii</i>	FO
981	AAO 3524	61,34	22-01-2000	Euphorbiaceae	<i>Amanoa cf.gracillima</i>	OA
999	AAO 3532	54,13	23-01-2000	Clusiaceae	<i>Tovomita brasiliensis</i>	FO
1005	AAO 3534	30,29	23-01-2000	Clusiaceae	<i>Clusia spathulaefolia</i>	OA
1041	AAO 3520	34,4	22-01-2000	Annonaceae	<i>Guatteria riparia</i>	CA
1051	AAO 3536	89,92	23-01-2000	Annonaceae	<i>Xylopia plowmanii</i>	CA
1053	AAO 3578	105,4	25-02-2000	Rubiaceae		CA
1054	AAO 3578	110,2	25-02-2000	Rubiaceae		CA
1062	AAO 3583	39,92	25-02-2000	Rubiaceae	<i>Duroia</i> sp.	CA
1067	AAO 3551	62,53	25-02-2000	Clusiaceae	<i>Clusia spathulaefolia</i>	CA
1068	AAO 3551	27,83	25-02-2000	Clusiaceae	<i>Clusia spathulaefolia</i>	CA
1089	AAO 3589	14,49	26-03-2000	Annonaceae	<i>Guatteria schomburgkiana</i>	CA
1091	AAO 3562	4,51	25-02-2000	Annonaceae	<i>Guatteria riparia</i>	FO
1093	AAO 3562	78,61	25-02-2000	Annonaceae	<i>Guatteria riparia</i>	CA
1095	AAO 3532	41,66	23-01-2000	Clusiaceae	<i>Tovomita brasiliensis</i>	CA
1099	AAO 3580	20,73	25-02-2000	Rubiaceae	<i>Psychotria</i> sp.	CA
1107	AAO 3577	48,05	25-02-2000	Annonaceae	<i>Annona hypoglauca</i>	OA
1109	AAO 3577	5,22	25-02-2000	Annonaceae	<i>Annona hypoglauca</i>	CA
1121	AAO 3542	49,46	24-01-2000	Rubiaceae	<i>Palicourea grandifolia</i>	OA
1128	AAO 3538	9,02	24-02-2000	Bignoniaceae	<i>Distinctella magnoliifolia</i>	OA
1129	AAO 3580	92,72	25-02-2000	Rubiaceae	<i>Psychotria</i> sp.	OA
1164	AAO 3563	8,30	25-02-2000	Passifloraceae	<i>Passiflora acuminata</i>	OA
1225	AAO 3704	34,48	09-08-2001	Leg-Faboideae	<i>Ormosia coarctata</i>	OA
1226	AAO 3704	30,17	09-08-2001	Leg-Faboideae	<i>Ormosia coarctata</i>	OA
1257	AAO 3717	47,11	10-08-2001	Rubiaceae	<i>Palicourea guianensis</i>	OA
1279	AAO 3701	31,90	09-08-2001	Connaraceae	<i>Pseudoconnarus macrophyllus</i>	OA
1287	AAO 3719	61,64	11-08-2001	Rubiaceae	<i>Pagamea cf. puberula</i>	OA
1289	AAO 3702	25,24	09-08-2001	Malpighiaceae	<i>Byrsinima incarnata</i>	CA

CA = Caule; OA = Órgãos aéreos; FO= folhas; FL = flores.

Após a padronização e validação dos controles (Anexo 1), foi possível determinar o percentual de morte por apoptose (Anexina <sup>+</sup> / 7-AAD <sup>-</sup>), por necrose (Anexina <sup>-</sup> / 7-AAD <sup>+</sup>),

células mortas com dupla marcação (apoptose tardia e necrose, Anexina <sup>+</sup> / 7-AA-D <sup>+</sup>) e células vivas, conforme mostra a tabela 2.

**Tabela 2** – Resultados da análise por citometria de fluxo com marcação de anexina V e 7AAD dos 114 extratos citotóxicos em células MCF-7 em 24 horas de tratamento na concentração de 100 µg/mL. Seleção dos extratos com valor igual ou maior à média da substância referência de apoptose, curcumina, observada em 24 horas de tratamento na concentração de 25 µM.

Extratos	7-AAD	Anexina + 7-AAD	Células Vivas	Células Apoptóticas
<b>CURCUMINA</b>	5,44%	65,55%	15,60%	13,40%
<b>N 30</b>	21,49%	35,72%	21,60%	21,19%
<b>N33</b>	52,07%	17,66%	24,51%	5,76%
<b>N43</b>	89,61%	4,05%	5,77%	0,57%
<b>N47</b>	71,44%	26,22%	1,83%	0,51%
<b>N59</b>	64,08%	23,63%	11,84%	0,45%
<b>N61</b>	45,40%	45,09%	9,06%	0,44%
<b>N63</b>	26,28%	12,11%	57,53%	4,08%
<b>N64</b>	18,16%	40,56%	31,92%	9,36%
<b>N48</b>	4,55%	66,66%	23,54%	5,26%
<b>N55</b>	36,86%	44,34%	12,23%	6,56%
<b>N57</b>	82,62%	12,18%	4,16%	1,04%
<b>N58</b>	14,65%	28,35%	51,06%	5,93%
<b>N65</b>	86,42%	11,27%	2,25%	0,06%
<b>N70</b>	9,50%	23,13%	63,56%	3,80%
<b>N76</b>	13,51%	46,94%	35,07%	4,47%
<b>N77</b>	30,09%	3,32%	63,00%	3,60%
<b>N78</b>	33,21%	15,12%	39,78%	11,89%
<b>N79</b>	56,52%	41,11%	1,54%	0,83%
<b>N80</b>	22,77%	46,52%	17,07%	13,64%
<b>N83</b>	86,82%	6,37%	5,99%	0,82%
<b>N85</b>	61,84%	27,81%	9,37%	0,98%
<b>N92</b>	14,58%	15,62%	65,53%	4,27%
<b>N98</b>	7,79%	23,04%	60,57%	8,60%

Continuação da Tabela 2.

Extratos	7-AAD	Anexina + 7-AAD	Células Vivas	Células Apoptóticas
<b>N101</b>	40,50%	15,05%	41,60%	2,85%
<b>N110</b>	12,69%	9,66%	71,88%	5,78%
<b>N120</b>	6,20%	19,55%	68,54%	5,70%
<b>N127</b>	50,44%	14,86%	30,64%	4,07%
<b>N129</b>	61,79%	9,61%	26,62%	1,98%
<b>N130</b>	15,35%	7,15%	69,91%	7,60%
<b>N143</b>	73,32%	21,56%	3,04%	2,08%
<b>N144</b>	17,85%	32,84%	28,68%	<b>20,63%</b>
<b>N171</b>	44,71%	37,82%	7,38%	10,09%
<b>N172</b>	12,18%	14,22%	43,97%	<b>29,63%</b>
<b>N178</b>	18,95%	23,82%	28,31%	<b>28,93%</b>
<b>N201</b>	64,11%	5,51%	28,41%	1,97%
<b>N202</b>	5,77%	19,84%	62,18%	12,21%
<b>N205</b>	83,86%	14,09%	1,84%	0,21%
<b>N209</b>	82,82%	15,18%	1,71%	0,29%
<b>N210</b>	15,12%	18,58%	62,94%	3,35%
<b>N236</b>	35,69%	13,21%	48,55%	2,55%
<b>N237</b>	65,19%	2,94%	31,02%	0,85%
<b>N238</b>	6,42%	25,42%	9,23%	<b>58,93%</b>
<b>N245</b>	95,53%	3,21%	0,96%	0,30%
<b>N246</b>	31,29%	24,65%	30,04%	<b>14,03%</b>
<b>N261</b>	15,89%	2,26%	77,16%	4,70%
<b>N284</b>	3,93%	22,65%	52,09%	<b>21,33%</b>
<b>N285</b>	37,50%	28,28%	28,23%	5,99%
<b>N321</b>	11,86%	30,13%	37,16%	<b>20,85%</b>
<b>N351</b>	36,93%	26,35%	31,98%	4,74%
<b>N363</b>	79,68%	11,54%	3,47%	5,32%
<b>N383</b>	19,93%	8,18%	67,91%	3,98%
<b>N384</b>	13,65%	16,72%	65,83%	3,81%
<b>N385</b>	53,14%	22,73%	22,95%	1,18%

Continuação da Tabela 2.

Extratos	7-AAD	Anexina + 7-AAD	Células Vivas	Células Apoptóticas
<b>N397</b>	53,55%	6,37%	35,07%	5,01%
<b>N475</b>	76,19%	10,80%	12,18%	0,83%
<b>N495</b>	87,07%	8,37%	2,71%	1,86%
<b>N505</b>	43,18%	43,67%	5,41%	7,74%
<b>N514</b>	14,86%	21,94%	59,25%	3,95%
<b>N523</b>	54,43%	24,08%	19,52%	1,97%
<b>N524</b>	24,29%	23,21%	43,96%	8,54%
<b>N565</b>	80,74%	8,89%	6,63%	3,74%
<b>N577</b>	20,28%	21,56%	46,89%	11,27%
<b>N621</b>	59,30%	38,16%	1,49%	1,06%
<b>N625</b>	72,55%	8,53%	15,68%	3,24%
<b>N635</b>	18,34%	9,53%	69,35%	2,78%
<b>N641</b>	44,94%	5,08%	46,01%	3,96%
<b>N685</b>	41,50%	30,07%	27,20%	1,22%
<b>N690</b>	42,72%	31,55%	24,10%	1,63%
<b>N695</b>	90,26%	7,81%	1,52%	0,41%
<b>N707</b>	59,79%	27,86%	7,09%	5,26%
<b>N712</b>	13,61%	17,68%	66,20%	2,52%
<b>N716</b>	15,77%	26,11%	54,32%	3,80%
<b>N719</b>	28,78%	39,97%	14,55%	<b>16,70%</b>
<b>N729</b>	61,98%	7,02%	28,54%	2,46%
<b>N733</b>	86,34%	6,37%	6,83%	0,46%
<b>N735</b>	43,69%	33,34%	22,16%	0,81%
<b>N809</b>	36,03%	48,67%	13,23%	2,07%
<b>N863</b>	95,89%	2,76%	1,09%	0,26%
<b>N871</b>	17,00%	0,12%	82,57%	0,30%
<b>N873</b>	88,49%	2,01%	8,87%	0,62%
<b>N882</b>	13,24%	19,44%	61,52%	5,80%
<b>N909</b>	97,65%	0,99%	1,21%	0,15%
<b>N913</b>	83,92%	5,72%	4,68%	5,68%
<b>N934</b>	8,03%	29,51%	46,45%	<b>16,01%</b>

Continuação da Tabela 2.

Extratos	7-AAD	Anexina + 7-AAD	Células Vivas	Células Apoptóticas
<b>N956</b>	6,37%	34,68%	49,62%	9,33%
<b>N966</b>	7,85%	32,24%	51,23%	8,68%
<b>N979</b>	95,27%	3,44%	0,41%	0,89%
<b>N981</b>	60,35%	27,90%	10,19%	1,56%
<b>N999</b>	45,22%	40,44%	12,38%	1,96%
<b>N1005</b>	41,25%	3,11%	54,20%	1,44%
<b>N1041</b>	50,37%	3,96%	43,52%	2,15%
<b>N1051</b>	15,93%	0,53%	83,18%	0,35%
<b>N1053</b>	40,98%	54,59%	67,96%	36,47%
<b>N1054</b>	26,66%	65,25%	5,16%	2,92%
<b>N1062</b>	8,97%	7,89%	62,16%	<b>20,98%</b>
<b>N1067</b>	81,92%	1,35%	16,54%	0,19%
<b>N1068</b>	22,55%	19,68%	38,47%	<b>19,30%</b>
<b>N1089</b>	47,62%	2,94%	47,86%	1,58%
<b>N1091</b>	13,20%	42,74%	10,76%	<b>33,30%</b>
<b>N1093</b>	22,20%	23,44%	41,30%	<b>13,07%</b>
<b>N1095</b>	23,56%	2,21%	69,46%	4,77%
<b>N1099</b>	48,68%	23,21%	27,17%	0,95%
<b>N1107</b>	90,15%	5,57%	2,95%	1,33%
<b>N1109</b>	17,93%	4,64%	72,84%	4,59%
<b>N1121</b>	71,03%	27,71%	1,20%	0,07%
<b>N1128</b>	8,99%	18,55%	60,70%	11,45%
<b>N1129</b>	40,26%	28,40%	31,25%	0,08%
<b>N1164</b>	17,83%	27,95%	49,52%	4,71%
<b>N1225</b>	79,89%	18,27%	1,18%	0,65%
<b>N1226</b>	5,02%	51,36%	32,89%	10,37%
<b>N1257</b>	82,37%	13,03%	2,33%	2,27%
<b>N1279</b>	86,74%	12,06%	0,91%	0,30%
<b>N1287</b>	73,06%	21,42%	4,88%	0,64%
<b>N1289</b>	21,29%	0,79%	76,50%	1,42%

Verde: composto fenólico indutor de apoptose usado como referência para seleção dos extratos; vermelho: extratos selecionados, com percentual de apoptose maior ou igual à referência.

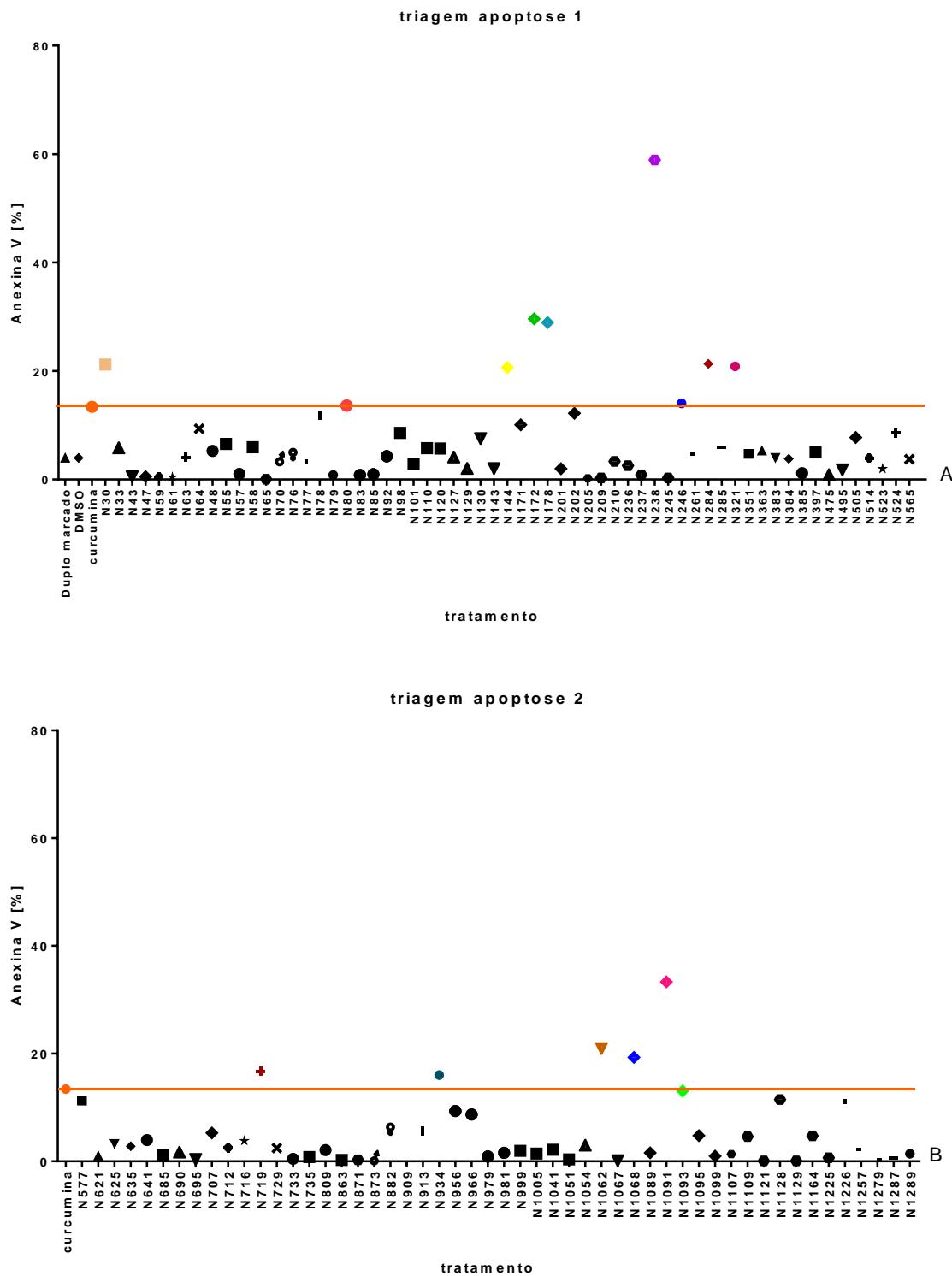
A tabela 3 mostra a relação dos extratos vegetais citotóxicos que foram selecionados no modelo de indução de apoptose utilizado, e compila os dados botânicos.

**Tabela 3** Extratos selecionados após triagem. Número do extrato, família, espécie, órgão, CI 50 e média de células apoptóticas.

Extrato	Família	Espécie	Órgão	CI 50 µg/mL	Média de células apoptóticas
<b>N30</b>	Clusiaceae	<i>Calophyllum brasiliense</i>	CA	7,86	<b>21,19%</b>
<b>N80</b>	Malpighiaceae	<i>Byrsonima</i> sp.	OA	6,593	<b>13,64%</b>
<b>N144</b>	Clusiaceae	<i>Calophyllum brasiliense</i>	FO	74,35	<b>20,63%</b>
<b>N172</b>	Leg-Caesalpinoideae	<i>Macrolobium multijugum</i>	FO	27,15	<b>29,63%</b>
<b>N178</b>	Meliaceae	<i>Trichilia cf. Pleeana</i>	OA	29,35	<b>28,93%</b>
<b>N238</b>	Clusiaceae	<i>Vismia schultesii</i>	CA	21,97	<b>58,93%</b>
<b>N246</b>	Rubiaceae		OA	32,22	<b>14,03%</b>
<b>N284</b>	Violaceae	<i>Amphirrhox longifolia</i>	OA	15,64	<b>21,33%</b>
<b>N321</b>	Myrtaceae	<i>Psidium densicomum</i>	FO e FL	57,5	<b>20,85%</b>
<b>N719</b>	Flacourtiaceae	<i>Laetia suaveolens</i>	FO E CA	3,642	<b>16,70%</b>
<b>N934</b>	Flacourtiaceae	<i>Xylosma psedosalzmanii</i>	CA	56,06	<b>16,01%</b>
<b>N1062</b>	Rubiaceae	<i>Duroia</i> sp.	CA	39,92	<b>20,98%</b>
<b>N1068</b>	Clusiaceae	<i>Clusia spathulaefolia</i>	CA	27,83	<b>19,30%</b>
<b>N1091</b>	Annonaceae	<i>Guatteria riparia</i>	FO	4,51	<b>33,30%</b>
<b>N1093</b>	Annonaceae	<i>Guatteria riparia</i>	CA	78,61	<b>13,07%</b>

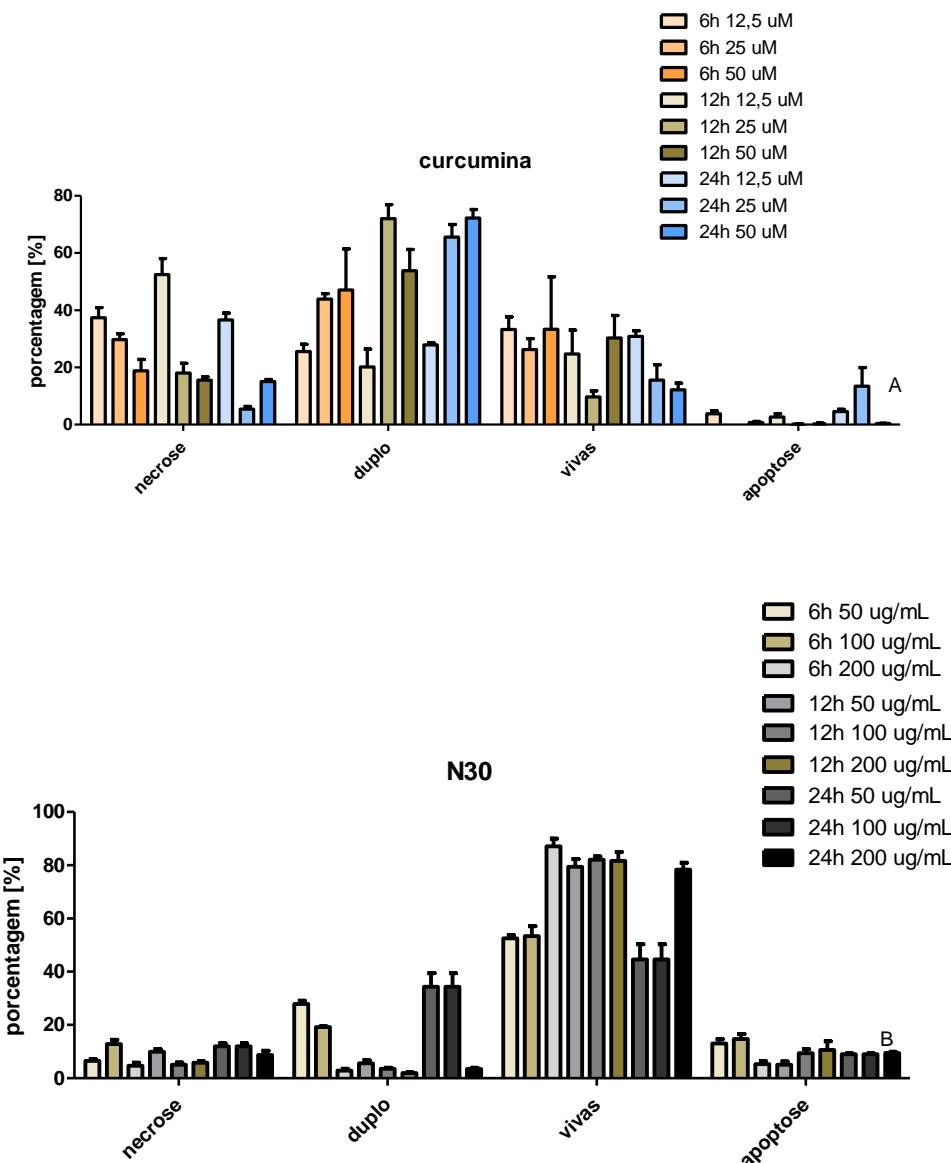
CA = Caule; OA = Órgãos aéreos; FO= folhas; FL = flores

**Figura 2** - Triagem dos 114 extratos em relação ao percentual de apoptose apresentado pela substância de referência indutora de apoptose, curcumina. (A) Extrato N30 ao extrato N565; (B) Extrato N577 ao extrato N1289;

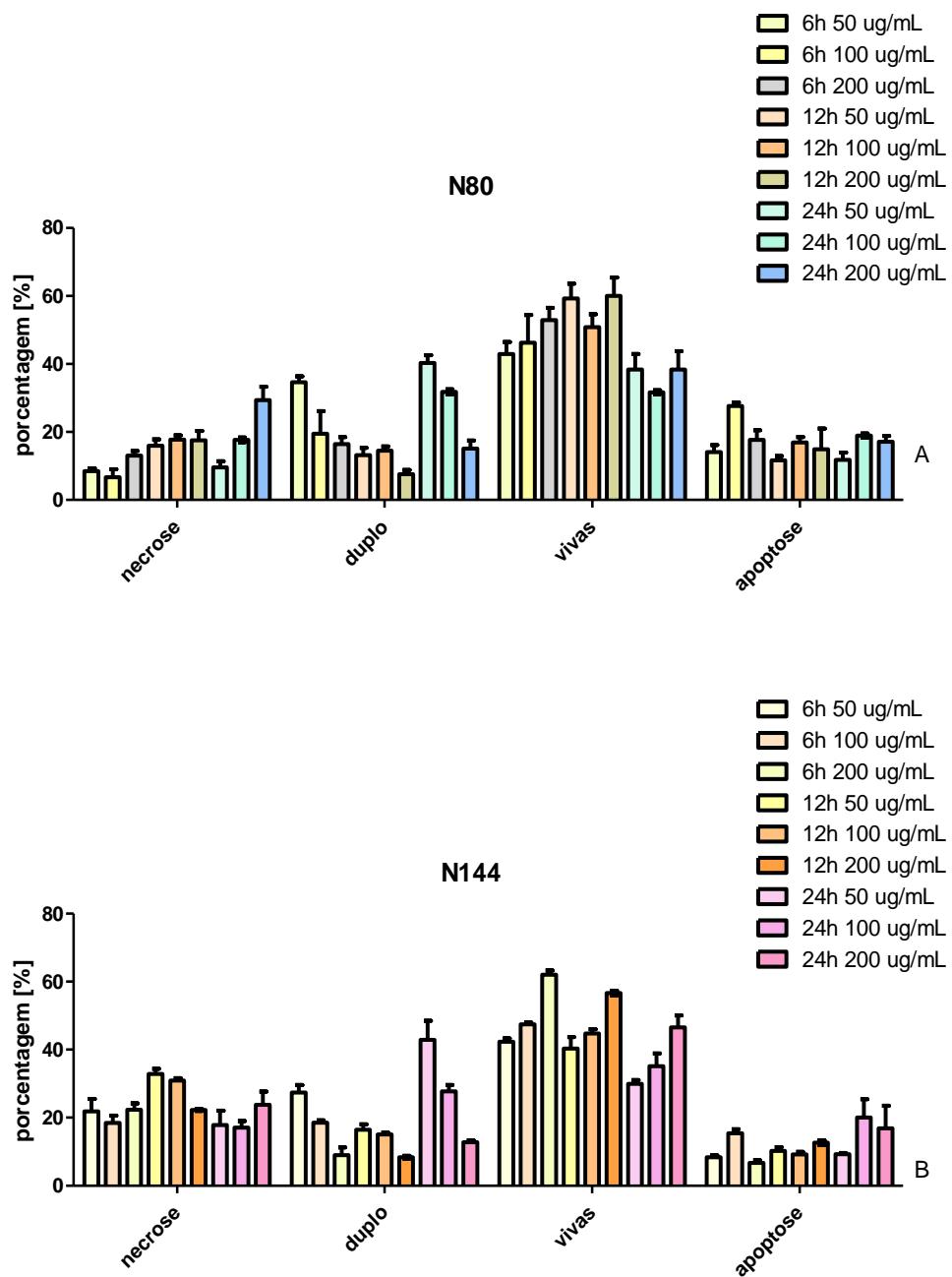


Todos os extratos que apresentaram percentual igual ou maior a 13,4% de apoptose (Figura 2) foram selecionados para novos testes a serem realizados com tempos de 6 horas, 12 horas e 24 horas, e em concentrações de 50  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL e 200  $\mu$ g/mL (Figuras 3 a 13).

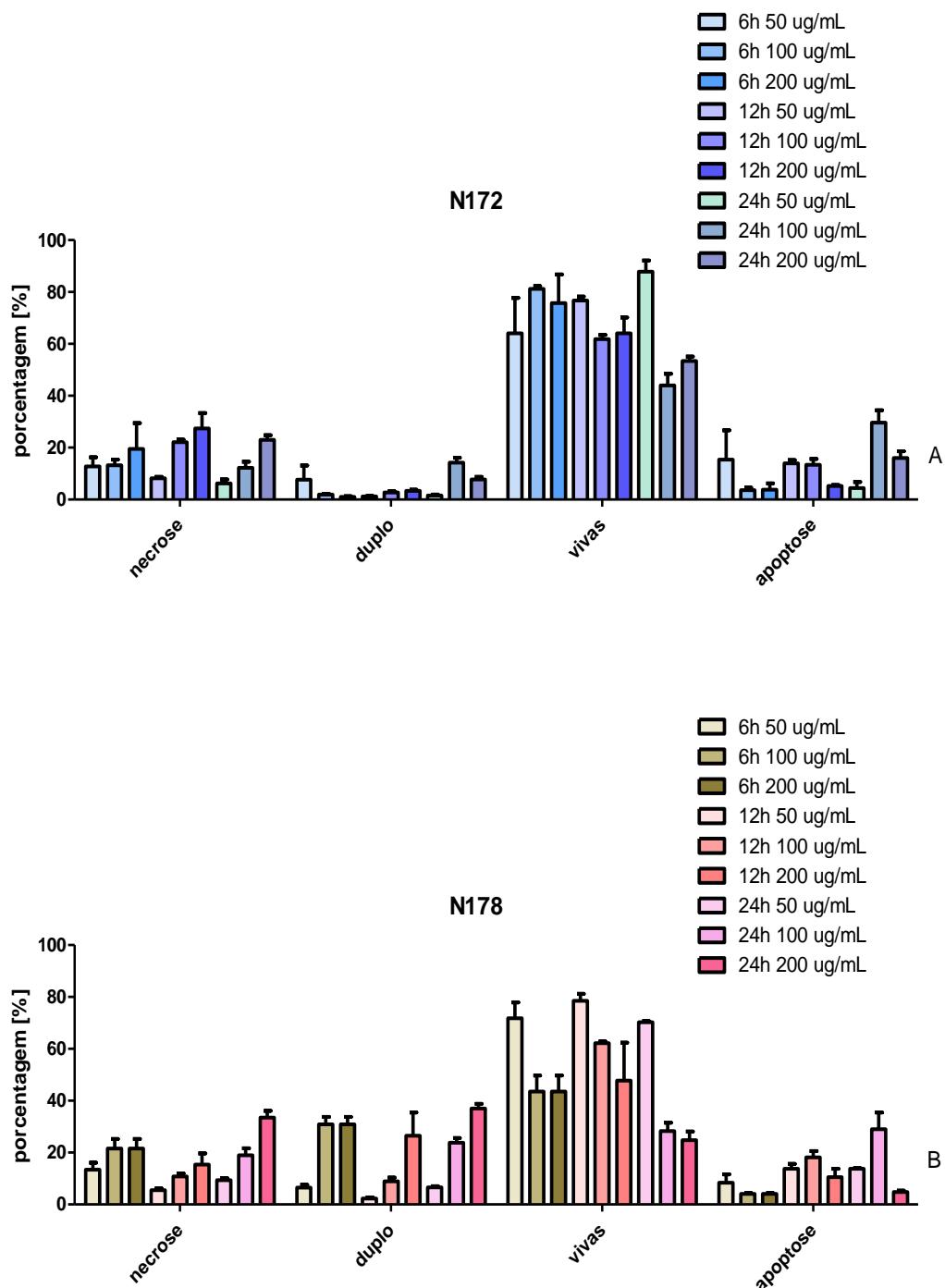
**Figura 3 –** Porcentagem de apoptose (Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>-</sup>), de células vivas, de células com dupla marcação (apoptose tardia e necrose Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>) e necrose (Anexina<sup>-</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>) nos tempos de 6 horas, 12 horas e 24 horas para curcumina nas concentrações de 12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M (A). Porcentagem de apoptose (Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>-</sup>), de células vivas, de células com dupla marcação (apoptose tardia e necrose Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>) e necrose (Anexina<sup>-</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>) nos tempos de 6 horas, 12 horas e 24 horas nas concentrações de 50  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL e 200  $\mu$ g/mL para o extrato selecionado N30 (B).



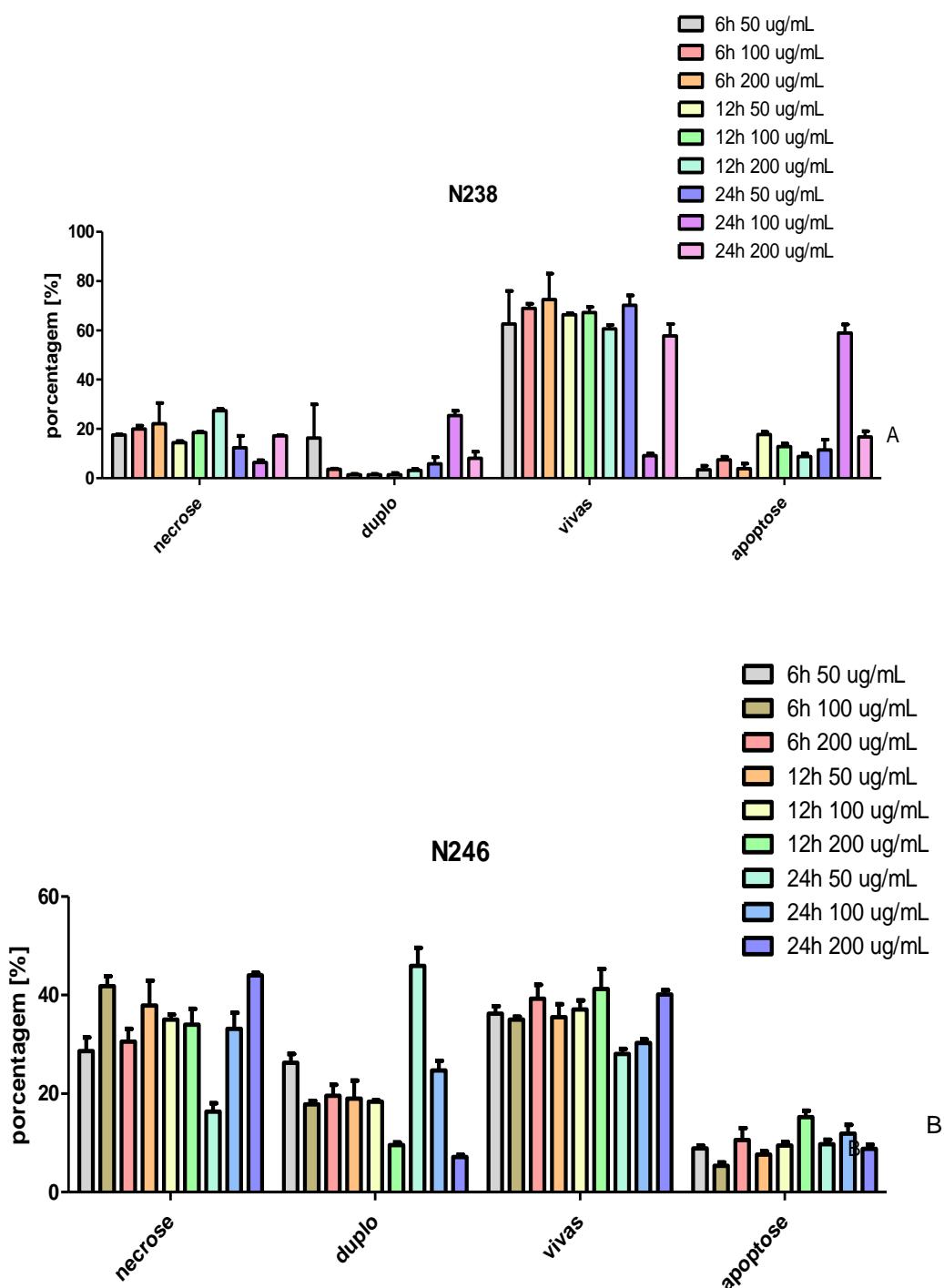
**Figura 4 –** Porcentagem de apoptose, de células vivas (Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>-</sup>), de células com dupla marcação (apoptose tardia e necrose Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>) e necrose (Anexina<sup>-</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>) nos tempos de 6 horas, 12 horas e 24 horas, nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL para o extrato selecionado N80 (A) e N144 (B).



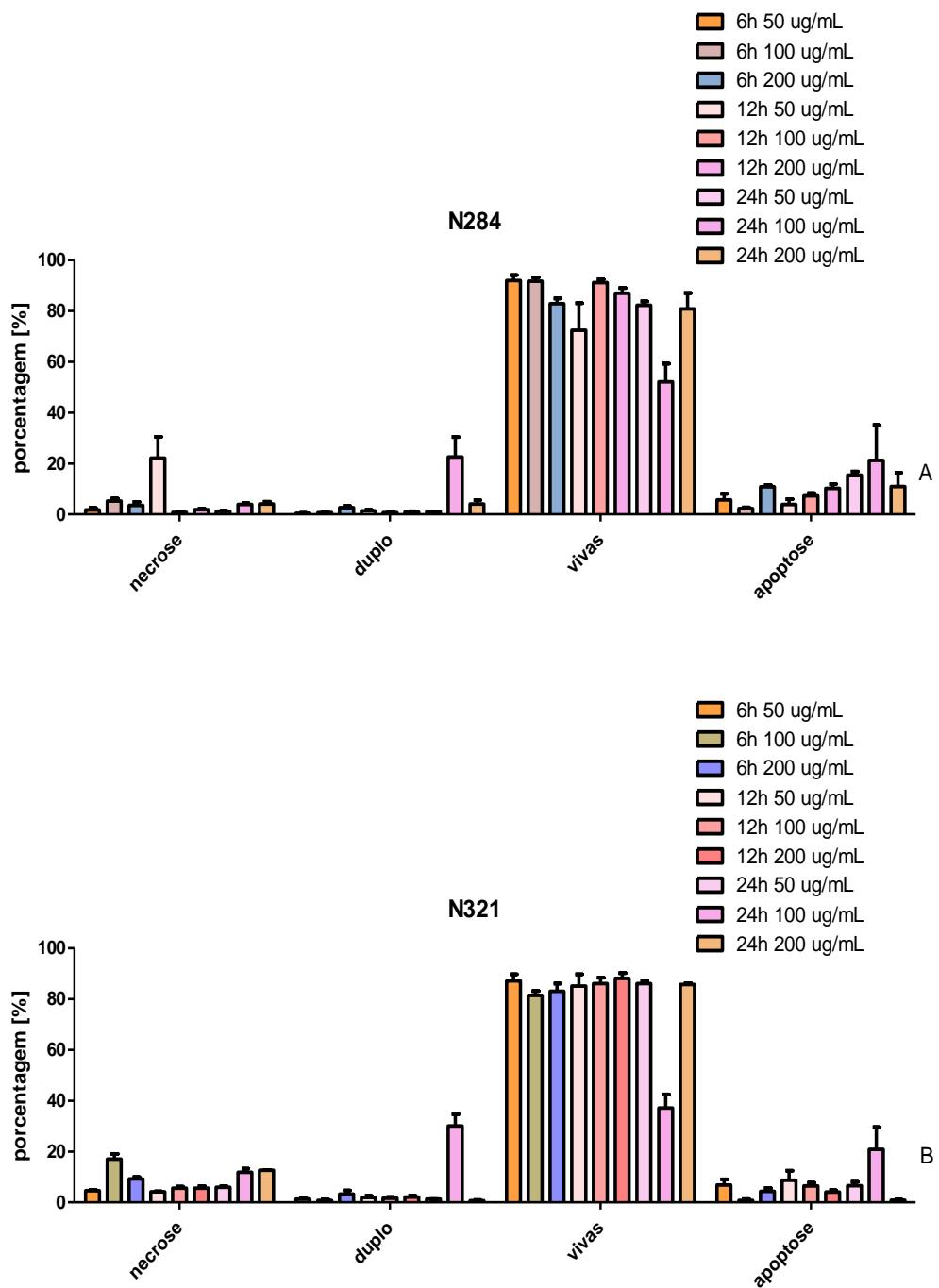
**Figura 5** - Porcentagem de apoptose (Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>-</sup>), de células vivas, de células com dupla marcação (apoptose tardia e necrose Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>), e necrose (Anexina<sup>-</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>), nos tempos de 6 horas, 12 horas e 24 nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL para o extrato selecionado N172 (A) e N178 (B).



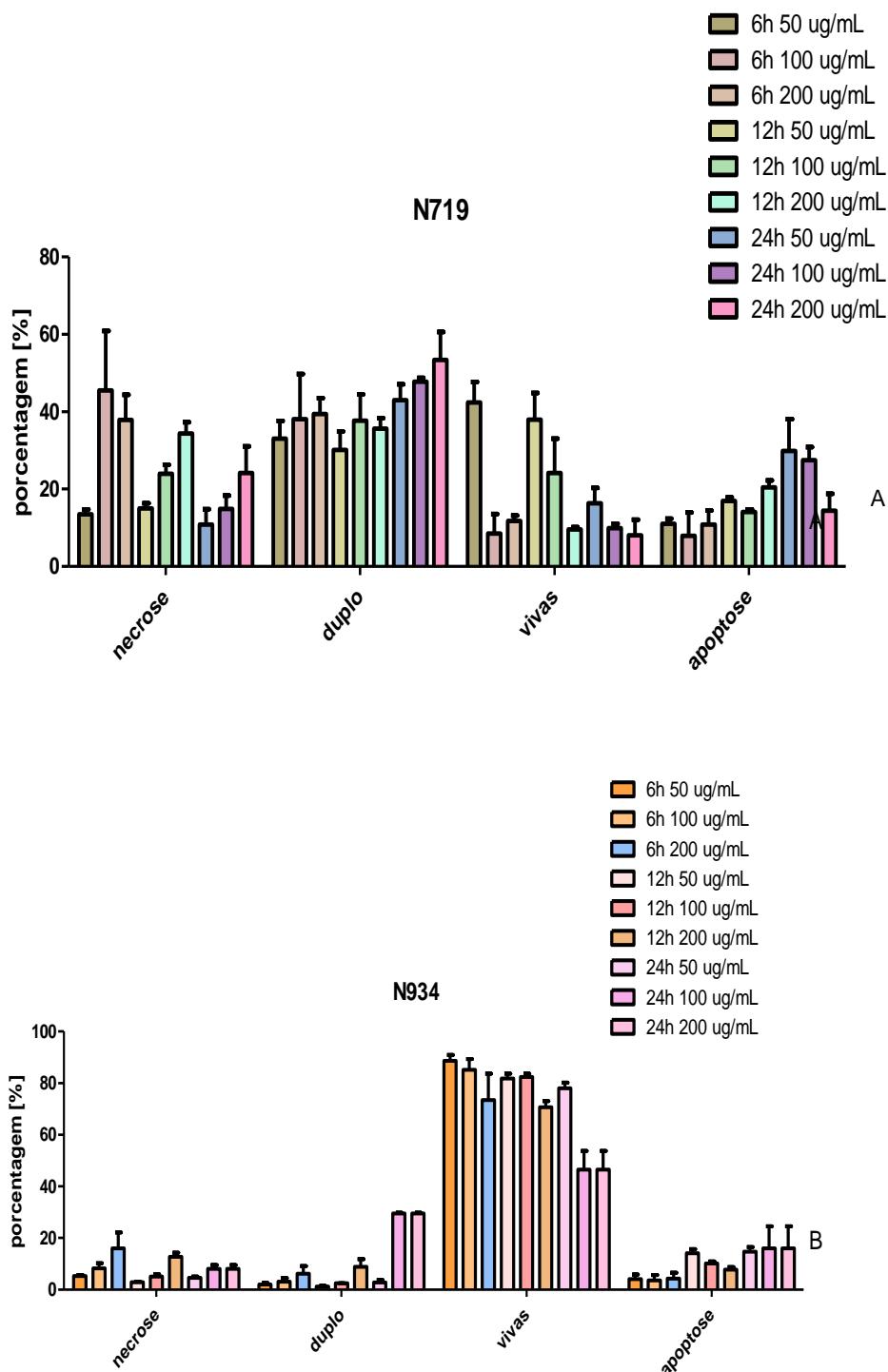
**Figura 6 –** Porcentagem de apoptose (Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>-</sup>), de células vivas, de células com dupla marcação (apoptose tardia e necrose Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>) e necrose (Anexina<sup>-</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>), nos tempos de 6 horas, 12 horas e 24 horas, nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL para o extrato selecionado N238 (A) e N246 (B).



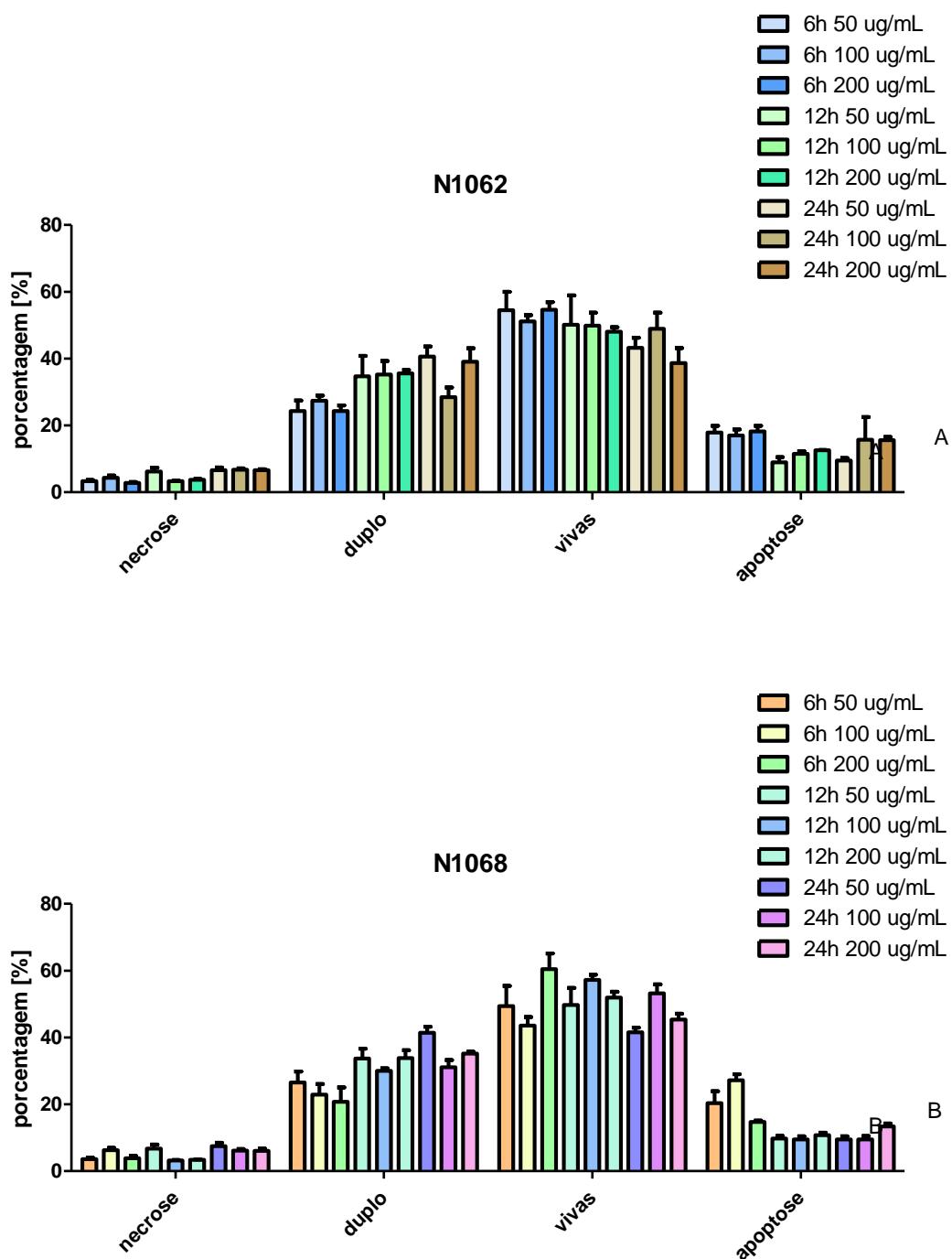
**Figura 7** - Porcentagem de apoptose (Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>-</sup>), de células vivas, de células com dupla marcação (apoptose tardia e necrose Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>), e necrose (Anexina<sup>-</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>), nos tempos de 6 horas, 12 horas e 24 horas nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL para o extrato selecionado N284 (A) e N321 (B).



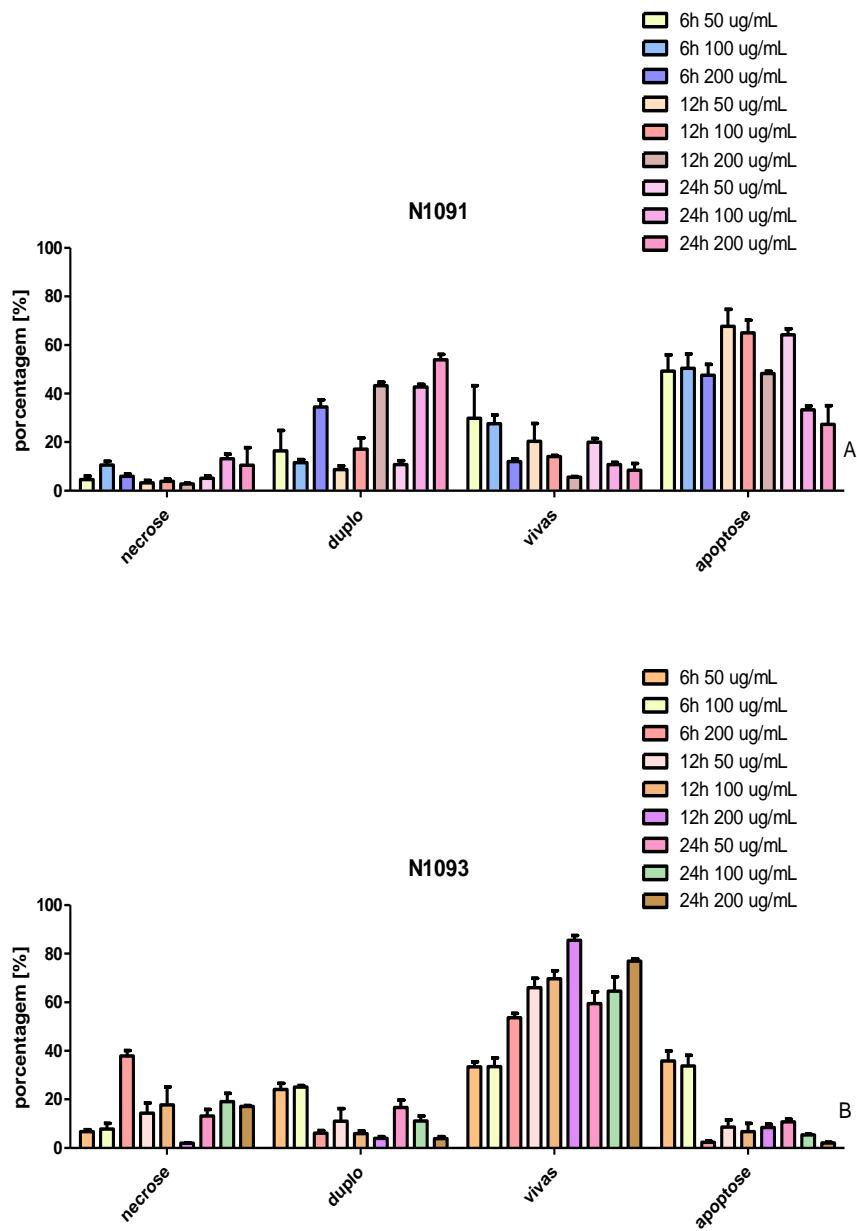
**Figura 8** - Porcentagem de apoptose (Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>-</sup>), de células vivas, de células com dupla marcação (apoptose tardia e necrose Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>) e necrose (Anexina<sup>-</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>), nos tempos de 6 horas, 12 horas e 24 horas nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL para o extrato selecionado N719 (A) e N934 (B).



**Figura 9** - Porcentagem de apoptose (Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>-</sup>), de células vivas, de células com dupla marcação (apoptose tardia e necrose Anexin<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>) e necrose (Anexina<sup>-</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>), nos tempos de 6 horas, 12 horas e 24 horas, nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL para o extrato selecionado N1062 (A) e N1068 (B).



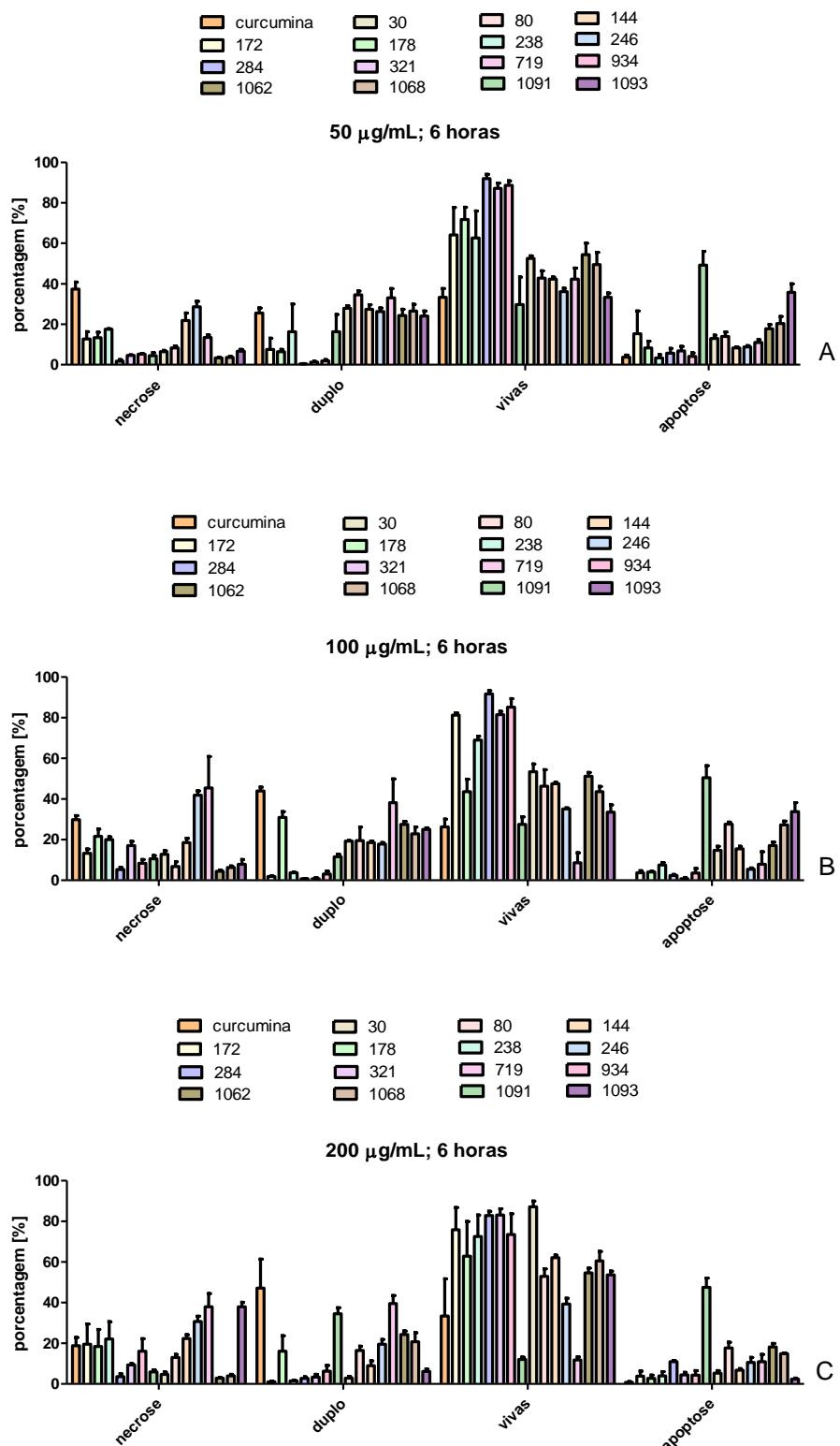
**Figura 10** - Porcentagem de apoptose (Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>-</sup>), de células vivas, de células com dupla marcação (apoptose tardia e necrose (Anexina<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>+</sup> ) e necrose (Anexina<sup>-</sup> / 7-AAD<sup>+</sup> ), nos tempos de 6 horas, 12 horas e 24 horas, nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL para o extrato selecionado N1091 (A) e N1093 (B).



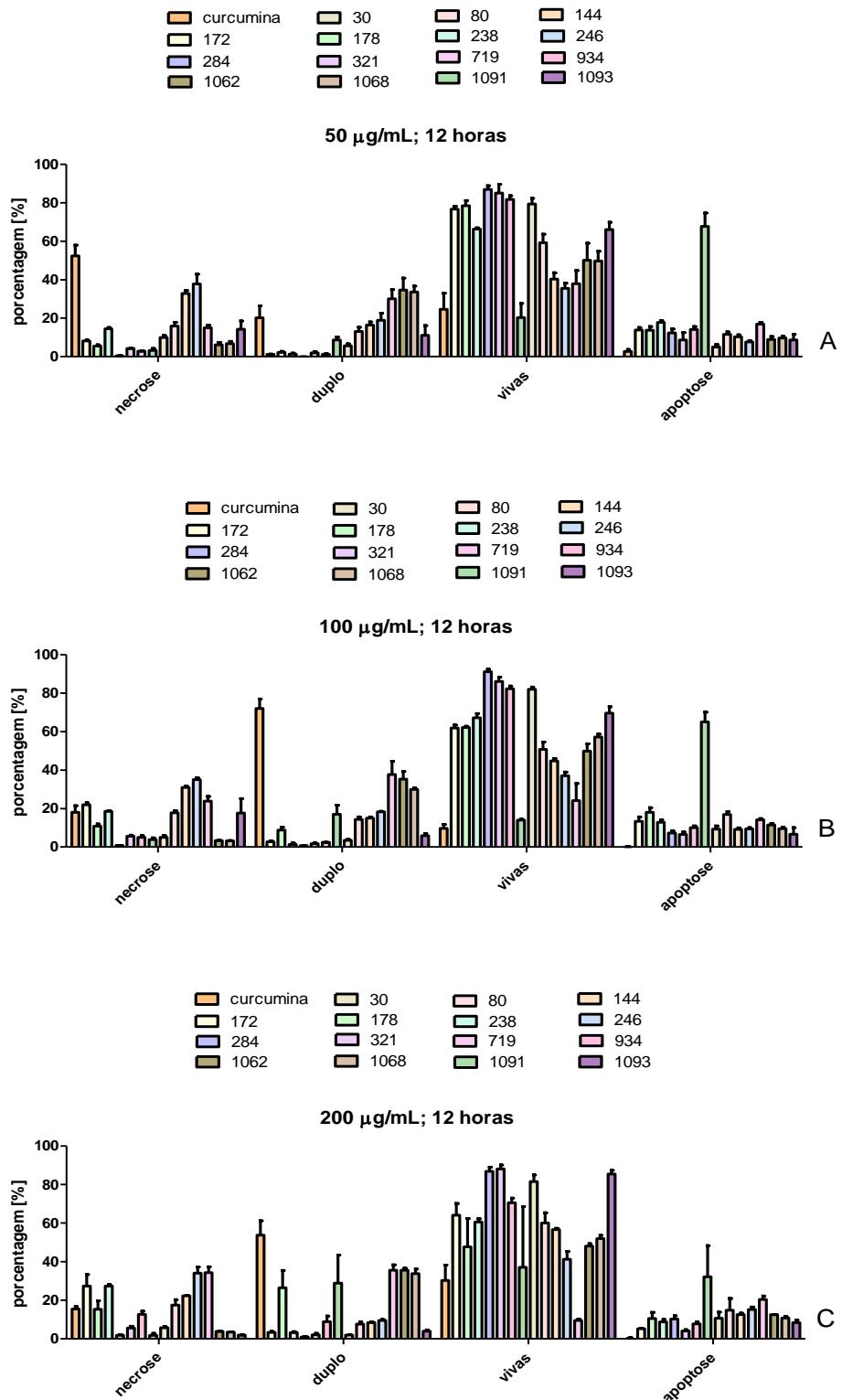
Os extratos N30, N172, N178, N284, N321, N934, N1062, N1068 e N1093 apresentaram um percentual de apoptose baixo em relação ao tempo e concentração utilizados nesse trabalho. Porém, apresentaram um percentual de células vivas alto, sugerindo que, após tratamento com um maior tempo de contato com as células, os

extratos poderiam apresentar uma resposta melhor quanto a apoptose das células MCF-7.

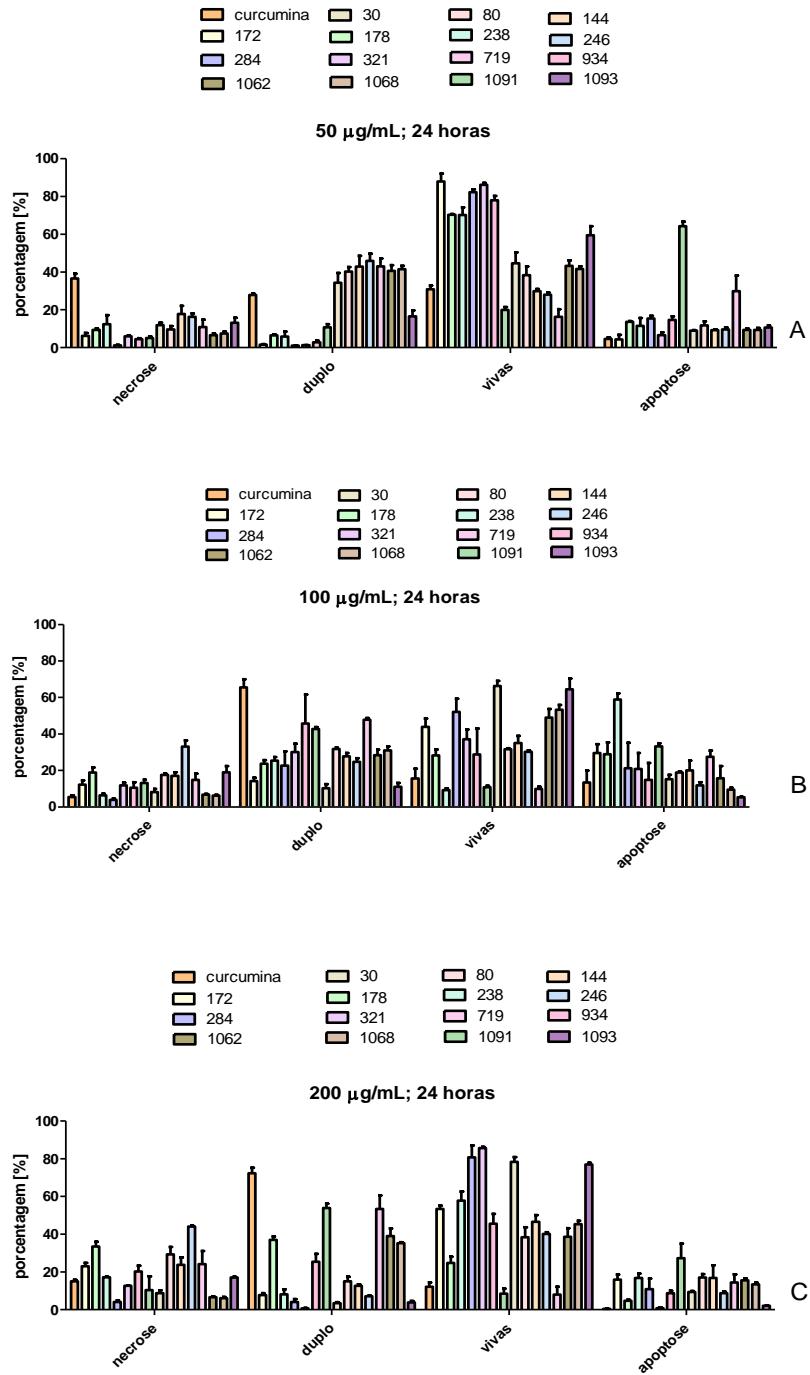
**Figura 11** – Relação concentração/tempo dos extratos selecionados com tratamento de 6 horas na concentração de 50 µg/mL (A), de 100 µg/mL (B) e de 200 µg/mL (C).



**Figura 12** - Relação concentração/tempo dos extratos selecionados na triagem com tratamento de 12 horas na concentração de 50 µg/mL (A), de 100 µg/mL (B) e de 200 µg/mL (C).



**Figura 13** – Relação concentração/tempo dos extratos selecionados na triagem com tratamento de 24 horas na concentração de 50 µg/mL (A), de 100 µg/mL (B) e de 200 µg/mL (C).

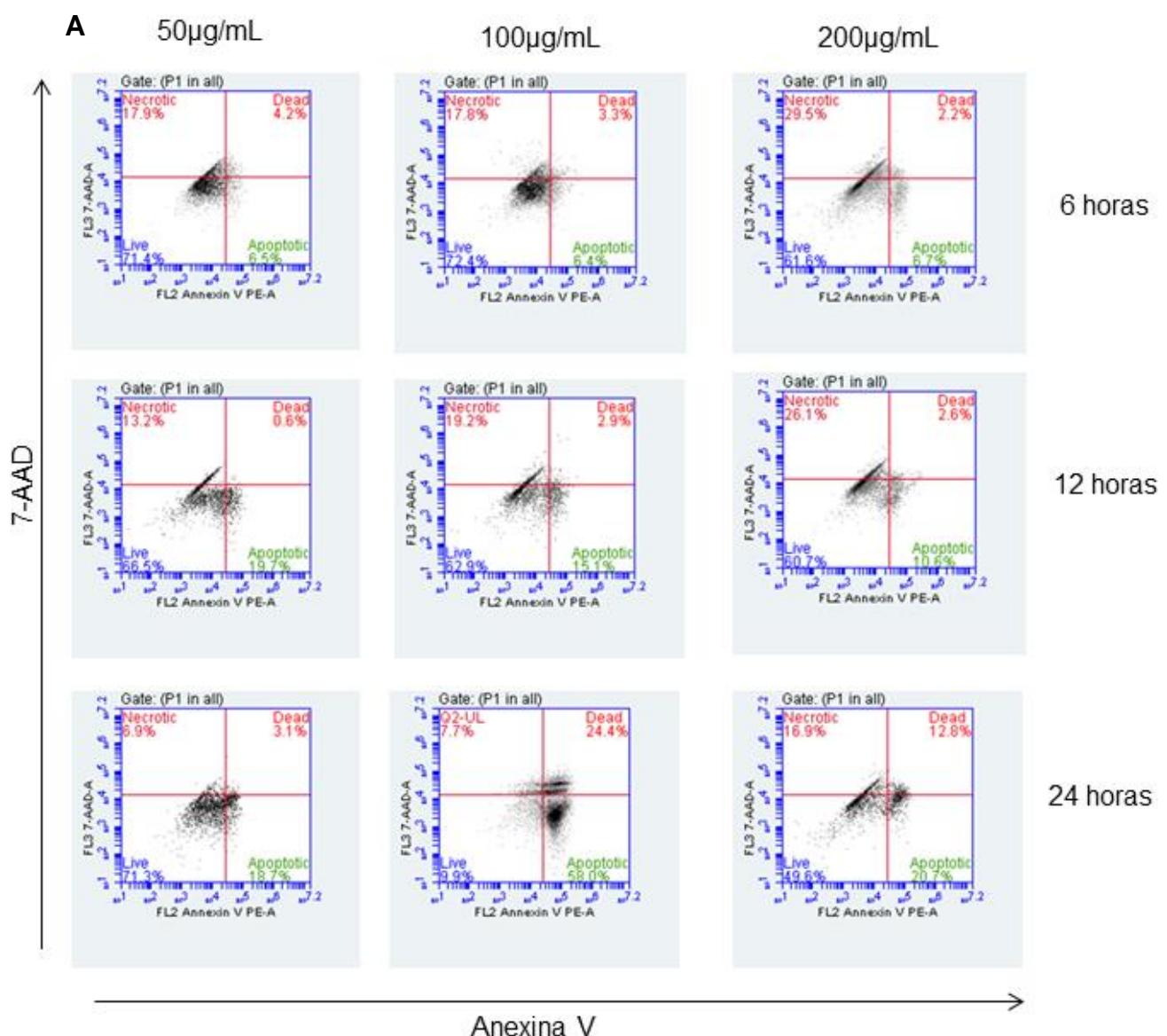


O extrato N238 se destaca no tempo de 24 horas e concentração de 100 µg/mL, apresentando elevado percentual de apoptose em relação aos outros tempos e concentrações (Figura 14 A). Já o extrato N 1091 se destaca em todos os tempos e

concentrações em relação a porcentagem de apoptose dos outros extratos e da curcumina (Figura 14 B).

**Figura 14** - Plots de citometria de fluxo representando os percentuais de apoptose do extrato N238(A) e N1091 (B).

**Família Clusiaceae - *Vismia schultesii* (N238)**

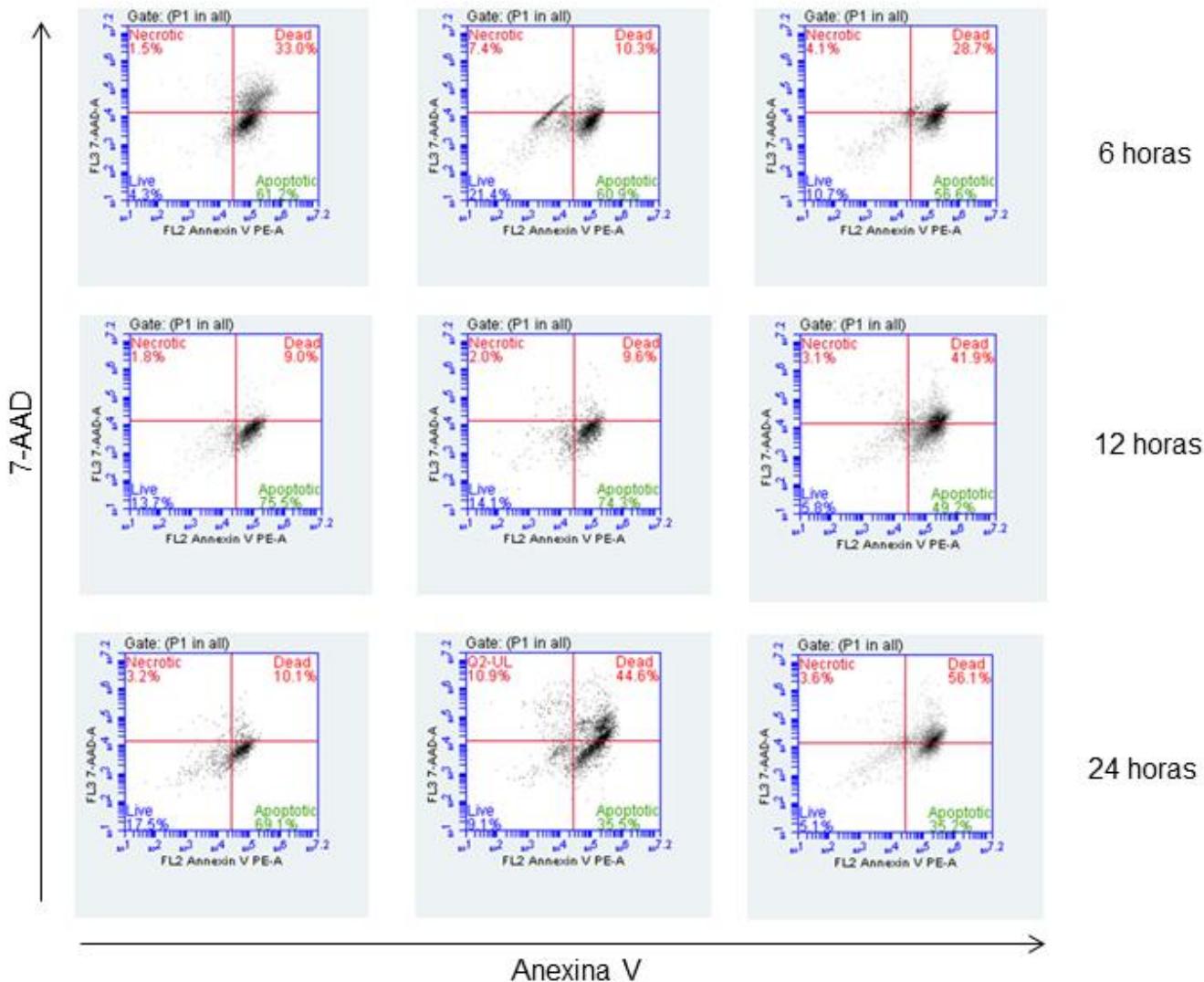


## Família Annonaceae – *Guartteria riparia* (N1091)

**B** 50 $\mu$ g/mL

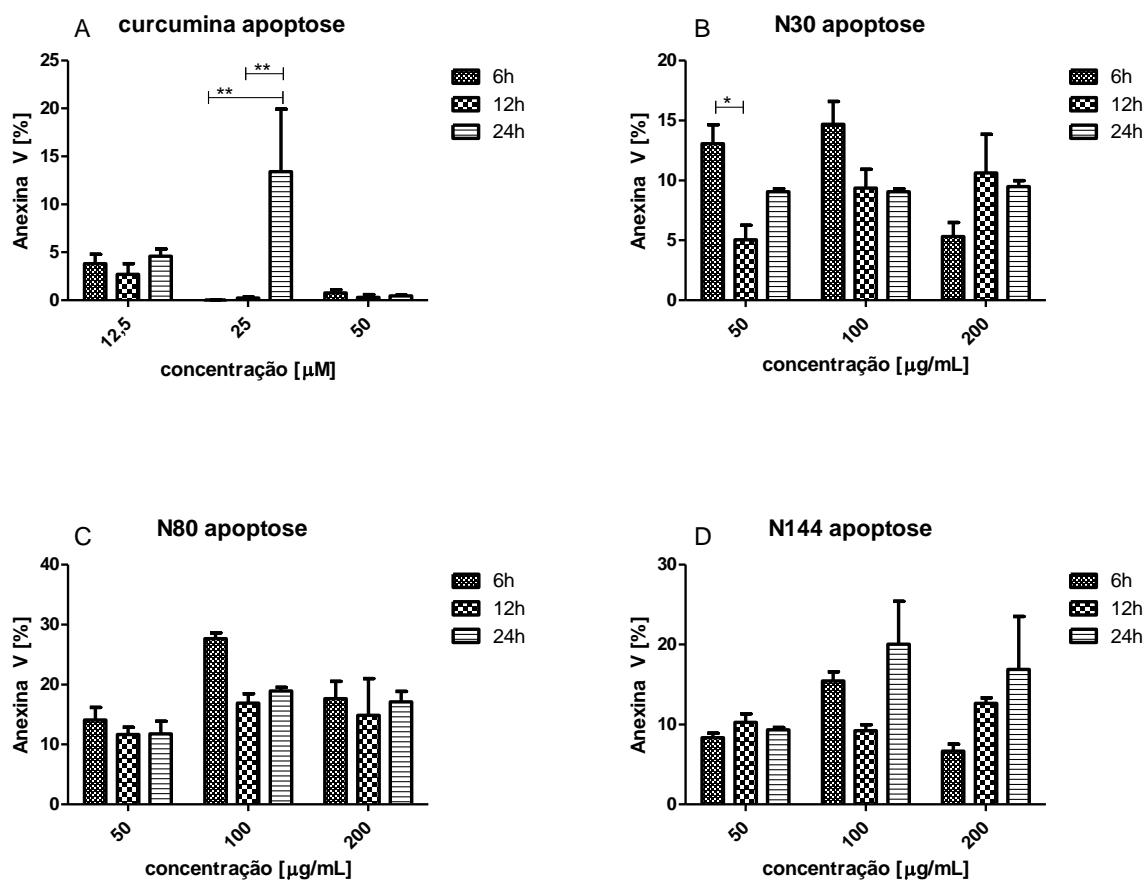
100 $\mu$ g/mL

200 $\mu$ g/mL

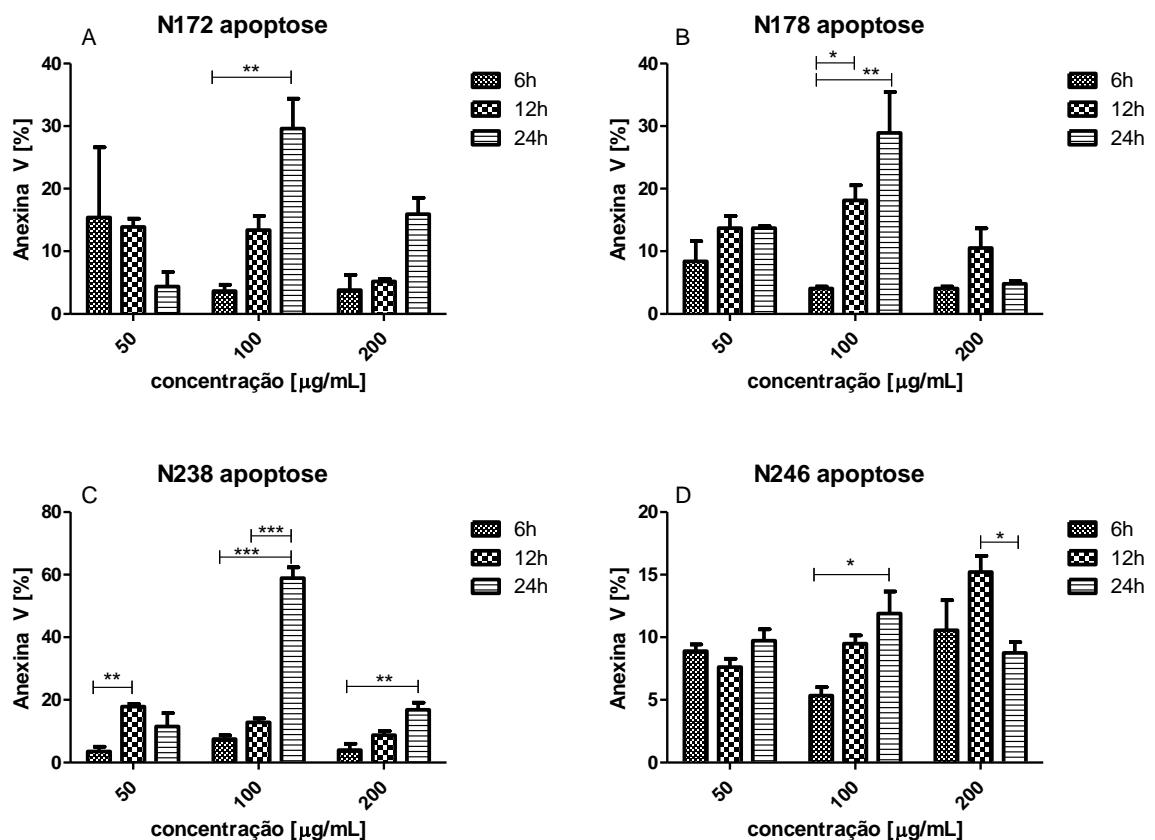


Resultados estatísticos obtidos pelo ensaio da ANOVA de duas vias com média e desvio padrão para três experimentos independentes, considerando tempo e concentração como as duas variáveis indicando significância para os valores \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$  e \*\*\*  $p<0,001$  (Figuras 15 a 18).

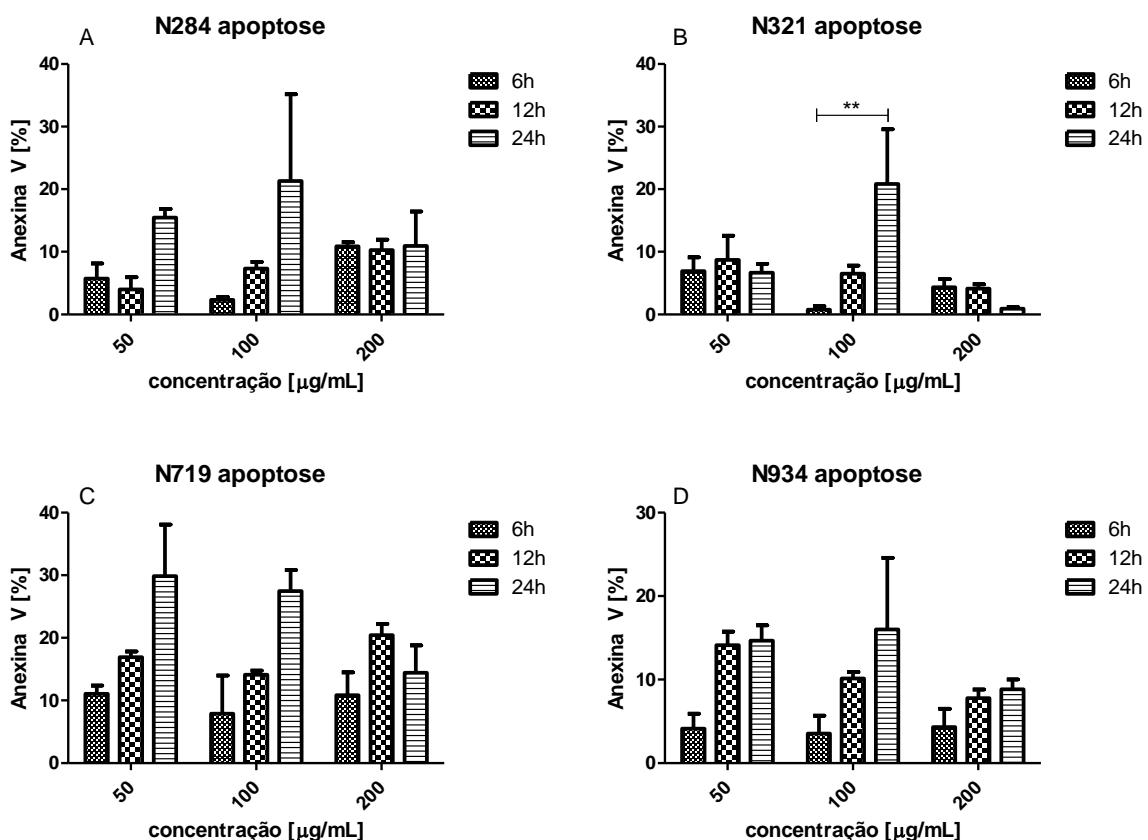
**Figura 15** – Considerando tempo e concentração como as duas variáveis, o gráfico que representa a curcumina (A) indica significância estatística comparando-se o tempo de 24h de tratamento ao tempo de 6h e 12 horas de tratamento na concentração de 25  $\mu\text{M}$  (\*\*  $<0,01$ ). O gráfico que representa o extrato N30 (B) apresenta significância estatística comparando-se o tempo de 24h de tratamento ao tempo de 12h de tratamento na concentração de 50  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (\*  $p<0,05$ ), O gráfico que representa o extrato N80 (C) e o extrato N144 (D), não apresentaram significância estatística.



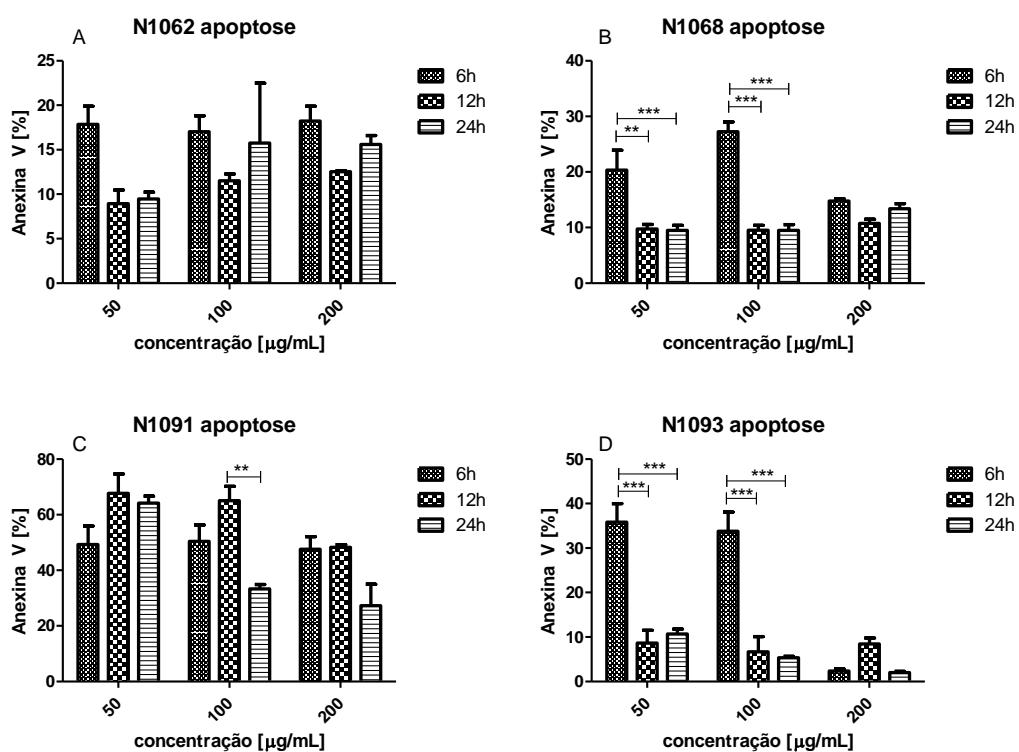
**Figura 16** – Considerando tempo e concentração como as duas variáveis, o gráfico que representa o extrato N172 (A) indica significância estatística comparando-se o tempo de 24h de tratamento ao tempo de 6h de tratamento na concentração de 100 µg / mL (\*\*  $p<0,01$ ). O gráfico que representa o extrato N178 (B) apresenta significância estatística comparando-se o tempo de 24 h de tratamento ao tempo de 6 h de tratamento na concentração de 100 µg / mL (\*\*  $p<0,01$ ) e comparando-se o tempo de 12 horas de tratamento ao tempo de 6 horas de tratamento (\*  $p<0,05$ ). O gráfico que representa o extrato N238 (C) apresenta significância estatística comparando-se o tempo de 12h de tratamento ao tempo de 6h de tratamento na concentração de 50 µg / mL (\*\*  $p<0,01$ ), comparando-se o tempo de 24 h de tratamento ao tempo de 12 h e 6 h de tratamento na concentração de 100 µg / mL (\*\*  $p<0,001$ ) e comparando-se o tempo de 24 h de tratamento ao tempo de 6 h de tratamento na concentração de 200 µg / mL (\*\*  $p<0,01$ ). O gráfico que representa o extrato N246 (D), apresenta significância estatística comparando-se o tempo de 24 h de tratamento ao tempo de 6 h de tratamento na concentração de 100 µg / mL (\*  $p<0,05$ ) e comparando-se o tempo de 12 h de tratamento ao tempo de 24 h de tratamento na concentração de 200 µg / mL (\*  $p<0,05$ ).



**Figura 17** – Considerando tempo e concentração como as duas variáveis, o gráfico que representa o extrato N284 (A) não apresenta significância estatística. O gráfico que representa o extrato N321 (B) indica significância estatística comparando-se o tempo de 24h de tratamento ao tempo de 6 h de tratamento na concentração de 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (\*\*  $p < 0,01$ ). O gráfico que representa o extrato N719 (C) e o extrato N934 (D), não apresentaram significância estatística.

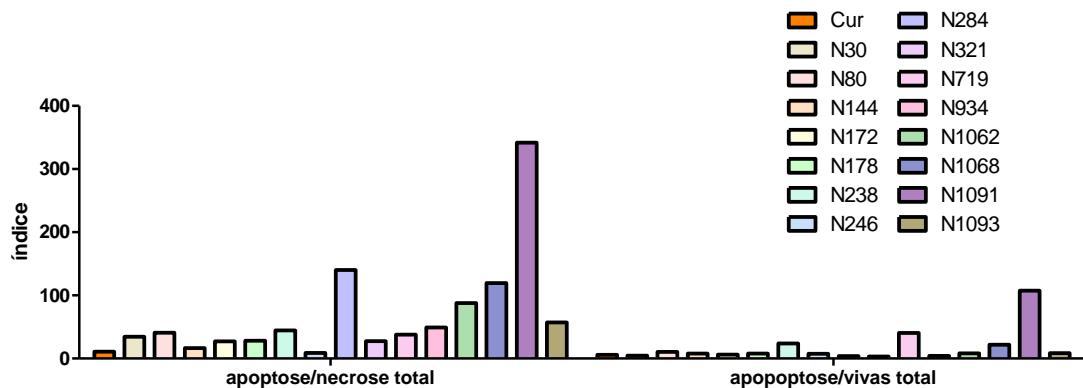


**Figura 18** – Considerando tempo e concentração como as duas variáveis, o gráfico que representa o extrato N1062 (A) não apresenta significância estatística. O gráfico que representa o extrato N1068 (B) apresenta significância estatística comparando-se o tempo de 6 h de tratamento ao tempo de 12 h de tratamento na concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (\*\*  $p<0,01$ ), comparando-se o tempo de 6 horas de tratamento ao tempo de 24 h de tratamento na concentração 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (\*\*\*  $p<0,001$ ), comparando-se o tempo de 6 h de tratamento ao tempo de 12 h de tratamento na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (\*\*\*  $p<0,001$ ), comparando-se o tempo de 6 horas de tratamento ao tempo de 24 h de tratamento na concentração 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (\*\*\*  $p<0,001$ ). O gráfico que representa o extrato N1091 (C) apresenta significância estatística comparando-se o tempo de 12 h de tratamento ao tempo de 24 h de tratamento na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (\*\*  $p<0,01$ ). O gráfico que representa o extrato N1093 (D), apresenta significância estatística comparando-se o tempo de 6 h de tratamento ao tempo de 12 h de tratamento na concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (\*\*\*  $p<0,001$ ), comparando-se o tempo de 6 h de tratamento ao tempo de 24 h de tratamento na concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (\*\*\*  $p<0,001$ ), comparando-se o tempo de 6 h de tratamento ao tempo de 12 horas de tratamento na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (\*\*\*  $p<0,001$ ) e comparando-se o tempo de 6 h de tratamento ao tempo de 24 horas de tratamento na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (\*\*\*  $p<0,001$ ).



A figura 19 representa a razão entre células em apoptose e células em necrose e a razão entre células em apoptose e células vivas. O índice de apoptose, principalmente, nos extratos N284 e N1091 é maior em relação ao índice de necrose. O índice de células em apoptose, principalmente, nos extratos N719 e N1091 é maior em relação ao índice de células vivas.

**Figura 19 – Razão entre apoptose e necrose e entre apoptose e células vivas.**



## 6 DISCUSSÃO

A indução de apoptose é um dos mecanismos mais buscados por pesquisadores na tentativa de compreender o mecanismo de escape que a célula tumoral utiliza contra o sistema imunológico e também encontrar um composto ativo sobre as células tumorais e que causem efeitos colaterais reduzidos durante os tratamentos de quimioterapia (IGNEY *et al.*, 2002). Apoptose é o tipo de morte celular programada fisiológica do organismo para eliminar células defeituosas, com DNA comprometido, para eliminar células velhas e assim controlar a homeostasia, de forma organizada e sem o comprometimento da membrana celular e sem provocar inflamação no tecido, pois os corpos apoptóticos são fagocitados por células locais (KERR *et al.*, 1994) pela exposição da fosfatidilserina em sua membrana, que é um sinal natural da célula de que ela precisa ser eliminada (ZIMMERMANN *et al.*, 211), diferentemente da necrose que é um processo de morte celular danoso, pois sua membrana é rompida e todos os compostos intracelulares são expostos e reconhecidos pelas células do sistema imunológico causando inflamação (HANAHAN & WEINBERG, 2000; HANAHAN & WEINBERG 2011). Tratamentos contra câncer que induzam a morte celular via apoptose são de grande importância, pois as células tumorais são potencialmente resistentes, o que possibilita o crescimento exacerbado das células tumorais e também minimiza efeitos colaterais (MOCHIZUKI *et al.*, 2003; JARZAB *et al.*, 2016).

No presente estudo foi empregada a técnica de verificação de apoptose por citometria de fluxo com anexina V e 7-AAD. As células apoptóticas foram marcadas com Anexina V pela exposição de fosfatidilserina (PS) que fica na superfície interna da bicamada lipídica voltada para o citosol. Nas células no início da apoptose a membrana celular ainda permanece intacta, mas sofre uma desorganização e a PS é translocada para a superfície exterior da bicamada. A anexina V é uma proteína que se liga a fosfolipídeos e possui alta afinidade por PS. Essa mudança na membrana possibilita a ligação da anexina V com a PS exposta possibilitando a detecção da apoptose inicial antes da perda da integridade da membrana celular. Já o 7-AAD é um marcador nuclear que se intercala em qualquer DNA desde que a membrana celular esteja permeável, sendo possível a distinção entre células apoptóticas e necróticas. Tanto a curcumina como os extratos vegetais citotóxicos foram submetidos a esta técnica.

A curcumina é um composto natural isolado do rizoma de *Curcuma longa* (Zingiberaceae) (KOOHPAR *et al.*, 2015) que apresenta efeito antitumoral (WANG *et al.*,

2017). Estudos anteriores mostram que a curcumina é capaz de induzir apoptose nas células tumorais de mama MCF-7 (SOTO *et al.*, 2016; STEUBER *et al.*, 2016) e tem sido alvo de diversos estudos contra o câncer de mama pela sua capacidade de levar as células tumorais a apoptose (KOOHPAR *et al.*, 2015). No presente trabalho, a curcumina foi utilizada como substância referência indutora de apoptose inicial, sendo o percentual de apoptose apresentado em 24 horas na concentração de 25  $\mu$ M, seletivo para a atividade indutora de apoptose dos extratos. A curcumina tem sido amplamente estudada por apresentar efeitos anti-inflamatórios, antiangiogênicos, antioxidantes e efeitos antitumorais (LV *et al.*, 2014). Estudo evidenciou efeito antitumoral da curcumina contra linhagem celular de câncer de mama MCF-7 pela inibição da viabilidade celular e indução de citotoxicidade de forma tempo/concentração dependente e indução de apoptose nas células tumorais de mama (KOOHPAR *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017). Estudos recentes mostram que a curcumina sozinha ou em combinação com outro agente antitumoral é capaz de induzir de forma eficaz a apoptose em células tumorais de mama (KOOHPAR *et al.*, 2015). Um exemplo desta combinação é a associação da curcumina com o paclitaxel. A curcumina isolada ou em combinação com o fármaco, que já é utilizado em protocolos de terapias contra o câncer, apresenta a capacidade de induzir apoptose em células tumorais de mama, elevando o nível de proteínas pró-apoptóticas como p53, Bid, caspase3, caspase 8 e Bax (SOTO *et al.*, 2016). A curcumina também é um composto quimiopreventivo, pois tem a capacidade de supressão, retardo ou inversão da carcinogênese, sendo muito promissor pela redução de morbidade e mortalidade do câncer ao atrasar o processo de carcinogênese (NOBILI *et al.*, 2009). Por conta de suas conhecidas propriedades a curcumina foi selecionada como substância indutora de apoptose de referência e os valores determinados no presente estudo foram considerados determinantes para a seleção de extratos vegetais citotóxicos indutores de apoptose.

Os 114 extratos utilizados nesse estudo foram previamente testados quanto à citotoxicidade para células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e o CI50 de cada extrato foi determinado e variam de 3,64  $\mu$ g/mL a 78,67  $\mu$ g/mL (FRANA *et al.*, 2015). Outros estudos também testaram a citotoxicidade de extratos de plantas em relação às células MCF-7 e o CI50 foi determinado. Estudo realizado com o extrato da planta iraniana *Ziziphus spina christi* (Rhamnaceae), apresentou CI50 de 20  $\mu$ g/mL (FARMANI *et al.*, 2016). Já estudo com extratos de plantas africanas, *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), *Pyrenacantha staudtii* (Icacinaceae), *Picralima nitida* (Apocynaceae) e *Jatropha*

*gossypifolia* (Euphorbiaceae) apresentou uma variação do CI50 de 23 µg/mL a 38 µg/mL (ENGEL *et al.*, 2014). Deste modo, os resultados encontrados por Frana *et al.* (2015) estão de acordo com os achados da literatura. Os taxanos, principalmente o paclitaxel, molécula isolada da *Taxus brevifolia*, apresenta CI50 para células MCF-7 de 33,4 nM (CHAVOSHI *et al.*, 2017), enquanto a curcumina apresentou CI50 para células MCF-7 de 40 µM ( ZHOU *et al.*, 2011).

Os extratos com atividade citotóxica para células MCF-7, cujos resultados foram obtidos em trabalhos prévios (FRANA *et al.*, 2015), foram triados em relação à capacidade de indução de morte celular por apoptose. Os extratos selecionados apresentaram percentual de apoptose com variação de 13,7% a 58,93%, em 24 horas de tratamento. Estudo realizado com *Ziziphus spina Christi* (Rhamnaceae), em ensaio de 48 horas, mostrou que extrato dessa espécie apresentou um percentual apoptótico de 3,2% em células MCF-7 através de ensaio em citometria de fluxo com anexina V e PI (iodeto de propídio) e também apresentou inibição do ciclo mitótico na fase G1 (FARMANI *et al.*, 2016). O estudo com extratos de plantas africanas, *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), *Pyrenacantha staudtii* (Icacinaceae), *Picralima nitida* (Apocynaceae) e *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) mostrou que o extrato de *Pyrenacantha staudtii* apresentou o maior percentual apoptótico de 1,52% e os resultados mostram interrupção do ciclo mitótico evitando a proliferação das células MCF-7 em 48 horas (ENGEL *et al.*, 2014). Os taxanos, principalmente paclitaxel (*Taxus brevifolia*) e docetaxel (semissintético da *Taxus baccata*), que são compostos naturais isolados e utilizados em tratamentos quimioterápicos contra o câncer de mama, agem no ciclo mitótico e, por consequência, podem levar as células à morte por apoptose (MARSH *et al.*, 2009 e ROCHA *et al.*, 2001). Após 24 horas de tratamento e ensaio com anexina V e PI o paclitaxel apresenta um percentual de células em apoptose inicial de 25,7 % (CHAVOSHI *et al.*, 2017). Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam o alto percentual de indução de apoptose nas células MCF-7 obtidos pelos extratos vegetais de plantas Amazônicas.

Os 15 extratos selecionados foram submetidos a tratamentos de 6 horas, 12 horas e 24 horas, nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL. Após o ensaio com tempos e concentrações diferentes, os extratos apresentaram percentuais de apoptose diminuídos, mas os percentuais de células vivas mantiveram-se altos, o que sugere que sejam feitos ensaios com maior tempo de exposição das células ao tratamento com os extratos, para que o tempo de morte por apoptose possa ser identificado. Os extratos N30, N144, N238 e N1068 são membros da família Clusiaceae, sendo N30 e N144 da

espécie *Calophyllum brasiliense*, o N238 da espécie *Vismia schultesii* e o N1068 da espécie *Clusia spathulaefolia*. A porcentagem de apoptose desses extratos é maior do que a da substância referência indutora de apoptose (curcumina) sendo o N238 o que se destaca entre os selecionados por apresentar um percentual médio de 58,93% de ocorrência de apoptose. Os extratos N30 e N144 são aquosos e da espécie *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), obtidos do caule e das folhas, respectivamente. Essa espécie apresenta propriedades quimiopreventivas e atividade antifúngica pela presença de moléculas já isoladas, as xantonas. O extrato orgânico das folhas de *C. brasiliense* apresentou atividade antitumoral *in vitro* contra células tumorais de próstata, melanoma e carcinoma renal (MARCIAL *et al.*, 2007). O N238 é um extrato aquoso obtido a partir do caule da espécie *Vismia schultesii*, membro da família Clusiaceae. O gênero *Vismia* possui espécies com alto potencial antitumoral humano (HUSSAIN *et al.*, 2012). As espécies *V. baccifera*, *V. jefensis* e *V. macrophylla* apresentam atividade antitumoral contra linhagens de células de câncer de mama e de pulmão e *V. guianensis* contra células de carcinoma epidermóide oral humano (HUSSAIN *et al.*, 2012) e também atividade anti-inflamatória e antifúngica (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Estudo *in vitro* com extrato aquoso de *V. baccifera* mostrou a indução da morte de células de hepatocarcinoma mediadas pelo aumento de EROs, característico para atividade antitumoral (LIZCANO *et al.*, 2015).

O N1068 é um extrato aquoso obtido do caule da espécie *Clusia spathulaefolia*. Este gênero apresenta uma diversidade de metabólitos como as benzofenonas, as xantonas e os biflavonóides. Muitas espécies são utilizadas pelo mundo para tratar reumatismo, problemas de estômago e como laxante. Estudos com plantas desse gênero mostraram que seus componentes apresentaram atividades antimicrobiana (benzofenona), contra *Escherichia coli*, antioxidante (biflavonóides), pela capacidade de eliminar radicais livres *in vitro*, e antitumoral (derivados de floroglucinol), pelas propriedades quimiopreventivas e inibição da produção de NO (FERREIRA *et al.*, 2015).

O N80 é um extrato aquoso obtido a partir dos órgãos aéreos do gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae) e apresentou um percentual médio de 13,64%, próximo ao valor médio da curcumina. Essa família apresenta compostos das classes dos flavonóides e polifenóis, moléculas com grande potencial antitumoral e antioxidante (HUSSAIN *et al.*, 2014). Compostos químicos presentes no gênero *Byrsonima* também apresentam propriedades gastroprotetoras, como a rutina, a isoquercitina e a quercitina (SILVA *et al.*, 2016).

Os extratos N172, N178, N284 e N321 pertencem a famílias diferentes e todos apresentaram percentual de apoptose maior que o da curcumina, sendo o extrato N172 da espécie *Macrolobium multijugum* (Leg-Caesalpinoideae) o que mais se destaca entre os quatro extratos, com percentual médio de 29,63% de apoptose. O N172 é um extrato aquoso obtido das folhas de *Macrolobium multijugum*, membro da Subfamília Caesalpinoideae, família Leguminosae. Essa família é composta por espécies que apresentam flavonóides com atividade inibidora de proteases e possuem propriedades antifúngicas, anticarcinogênicas, supressoras da replicação de retrovírus e inibição do desenvolvimento intraeritrocitário do parasita *Plasmodium falciparum*. Um aminoácido inibidor de protease, serina, foi isolado e purificado a partir das sementes da espécie *Caesalpinia bonduc*, que também apresenta efeito antiparasitário contra *Plasmodium falciparum* por interromper o processo de ruptura de células com o parasita, impedindo a invasão eritrocitária (BHATTACHARYYA & BABU, 2017). O N178 é um extrato aquoso obtido a partir dos órgãos aéreos da espécie *Trichilia cf. pleeana* (Meliaceae). Plantas desta família apresentam atividades antimalária, anti-hipertensiva e antitumoral (LEONG *et al.*, 2016). Estudo com extratos etanólico de folhas e de raízes da espécie *Trichilia hirta* evidenciou a composição química de saponinas, taninos, flavonóides e comarinos. A administração destes extratos em camundongos BALB/C indicou propriedades estimulantes leucocitárias sugerindo uma possível nova alternativa para o desenvolvimento de agentes imunoprotetores (SOSA *et al.*, 2010).

O N284 é um extrato aquoso obtido a partir dos órgãos aéreos da espécie *Amphirrhox longifolia*, membro da família Violaceae. Esta família possui compostos chamados ciclotídeos, que possuem atividade antibacteriana, antitumoral e anti-HIV. Vigno 5 é um ciclotídeo isolado da espécie *Viola ignobilis*, da família Violaceae. Estudo com vigno 5 evidencia a indução de apoptose, após 24 horas de tratamento, pela via intrínseca mitocondrial associada a liberação de citocromo c e aumento da atividade das caspases 3 e 9 em células tumorais cervicais humanas (ESMAELI *et al.*, 2016).

O N321 é um extrato orgânico obtido a partir de folhas e flores da espécie *Psidium densicomum*, membro da família Myrtaceae. O terpeno-4-ol (TP4O) é principal composto do óleo essencial extraído da espécie *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) e apresenta efeito antitumoral em diversas linhagens de células tumorais pela indução de apoptose. Em estudo recente, o TPO4 induziu apoptose em células de tumor colorretal pelo aumento de EROs geradas pela mitocôndria (NAKAYAMA *et al.*, 2017). O extrato etanólico da espécie *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) apresenta efeito

antitumoral contra células tumorais de próstata. O composto isolado chalamona cardamonina inibiu a proliferação de células tumorais de próstata e induziu a fragmentação do DNA, sugerindo um efeito apoptótico nas células (PASCOAL *et al.*, 2014).

Os extratos N246 e N1062 pertencem à família Rubiaceae, sendo que o N246 apresentou percentual médio de apoptose de 14,03%, muito próximo ao valor médio da curcumina, e o N1062 um percentual médio de apoptose de 20,98%. O N246 é um extrato aquoso obtido a partir dos órgãos aéreos de uma espécie membro da família Rubiaceae e o N1062 é um extrato aquoso obtido do caule de espécie do gênero *Duroia*, também da família Rubiaceae. Estudo com extrato metanólico da espécie *Anthocephalus cadamba* evidenciou atividade antitumoral em células de carcinoma de Ehrlich ascítico de camundongo. A apoptose foi induzida pelo aumento da expressão de diversos fatores, principalmente das proteínas pró-apoptóticas, p53 e p21, e diminuição da proteína antiapoptótica, Bcl-2 (DOLAI *et al.*, 2016). Um composto derivado de um flavonóide, 3HFD (7, 3', 5' – trihidroxifavonona), foi isolado da espécie *Hydnophytum formicarium*. O composto 3HFD induziu apoptose em células MCF-7 após 72 horas de tratamento, aumentando a expressão da proteína pró-apoptótica Bax e diminuindo a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Dessa forma, sugere-se que a molécula 3HFD seja um promissor agente quimioterápico (ABDULLAH *et al.*, 2010). Estudo com a espécie *Coffea arábica* (Rubiaceae) evidenciou efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes *in vitro* com células AML-12 (derivadas de hepatócitos de ratos). A expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  e IL-6 foi reduzida em células tratadas com extratos de grãos de café e a diminuição desta expressão está relacionada ao aumento dos níveis de torrefação do café. A atividade antioxidante nas células foi observada pelo tratamento com grãos de café (café verde) com menor torrefação e maior concentração de ácido clorogênico (JUNG *et al.*, 2017).

Os extratos N719 e N934 pertencem à família Flacourtiaceae e ambos apresentaram percentual de apoptose de 16%, valor próximo ao de referência. O N719 é um extrato orgânico obtido a partir de folhas e caule da espécie *Laetia suaveolens*, membro da família Salicaceae. Em estudo anterior o extrato bruto de *Laetia suaveolens* apresentou atividade antitumoral contra células tumorais de próstata e carcinoma de células escamosas (ESTORK *et al.*, 2014). Estudo isolou, pela primeira vez, sete moléculas a partir do extrato de *Laetia suaveolens*: tocoferol apolar e sistosterol, ácido cafêfeilquínico polar, ácido cafeioilquínico, ácido feruloiquínico, hiperósido e frações de isoquercitina. As moléculas isoladas apresentam atividade antioxidante (ESTORK *et al.*,

2014). Estudo recente isolou metabólitos a partir do extrato de folhas da espécie *Casearia arbórea* (Salicaceae). Os metabólitos isolados: tricina, glucopiranósido de vanilol e o ácido vanílico apresentaram atividade antileishmania. Em particular, a tricina apresentou melhor resposta contra *Leishmania infantum*, pois elevou o nível de óxido nítrico nos macrófagos coletados do peritônio de camundongos BALB/c, sugerindo um efeito imunomodulatório nas células hospedeiras (SANTOS *et al.*, 2017). O N934 é um extrato aquoso obtido a partir do caule da espécie *Xylosma pseudosalzmanii*, membro da família Salicaceae. Estudo com extrato metanólico da espécie *Xylosma longifolium* apresentou compostos derivados de flavonoides, a rutina, a catequina e o kaempeferol, com atividade antifúngica. O estudo evidencia que o extrato de *Xylosma longifolium* reduz o crescimento de patógenos, *Epidermophyton* sp., *Microsporum* sp. e *Trichophyton* sp., e sugere a possível utilização do extrato como fungicida natural contra infecções fungicidas de pele (DEVIS *et al.*, 2013).

Os extratos N1091 e N1093 são da família Annonaceae e são da mesma espécie *Guatteria riparia*, porém, cada qual foi obtido de órgãos diferentes da planta, sendo o N1091 feito a partir das folhas, enquanto que o N1093 foi obtido do caule. O extrato N1093 apresentou percentual médio de apoptose igual ao da curcumina e o N1091 de 33.30%, maior que o valor médio da curcumina. Esta família possui componentes bioativos (alcalóides bisbenzilisoquinolínicos) com diversas atividades farmacológicas (MAHIOU *et al.*, 2000). Recentemente um estudo identificou a presença de cinco tipos de acetogeninas na espécie *Annona muricata* L. (muricina B, cis-annonacina-10-one, mosinona e cis-uvariamicina IV), que estão relacionadas a formação de órgãos e tecidos vegetais. e a distribuição destes compostos é específica em cada órgão da planta (SALDAÑA *et al.*, 2017). As acetogeninas são compostos com atividade antitumoral e apresentam citotoxicidade contra células MCF-7, HeLa, MKN-45 entre outras linhagens, pois apresentam a capacidade de inibir o complexo I da mitocôndria pela diminuição na produção de ATP e, desse forma, inibir a NADH oxidase na membrana plasmática das células tumorais (HONG *et al.*, 2017). A espécie *G. boliviiana*, encontrada na Bolívia, apresenta atividade antiparasitária principalmente contra *Leishmania brasiliensis* (MAHIOU *et al.*, 2000). Outros gêneros e espécies dessa família apresentam atividade antitumoral contra células tumorais de mama. O extrato da folha da espécie *Annona muricata* apresentou CI50 de 220 µg/mL e, após 72 horas de contato com as células MCF-7, apresentou média de 35,13% de apoptose determinado por ensaio de citometria de fluxo (NAJMUDDIN *et al.*, 2016). Os extratos das folhas das espécies de Annonaceae

*Uvaria longipes*, *Dasymaschalon* sp., *Marsyopetalum modestum* e *Artabotrys burmanicus* apresentaram atividade antitumoral contra diferentes linhagens de células tumorais após 24 horas de tratamento em concentração de 125 µg/mL. Os percentuais de apoptose foram determinados por citometria de fluxo e houve uma variação de 3,2% a 42,8% na menor concentração utilizada que foi de 125 µg/mL. Os valores apresentaram variação conforme o tipo celular, concentração utilizada e tempo de tratamento (PUMIPUTAVON *et al.*, 2017). O extrato N1091 (*Guatteria riparia*) apresentou percentuais apoptóticos elevados em todos os tratamentos da segunda etapa experimental, destacando-o em relação à curcumina e em relação aos demais extratos selecionados. Após o desenvolvimento do trabalho é importante ressaltar que os valores de CI50 variam muito entre os extratos e esse não é um fator determinante em relação à indução de apoptose das células. O valor do CI50 dos extratos não está relacionado ao fato de o extrato causar ou não apoptose nas células tumorais, e sim ao fato de um extrato ser citotóxico à célula em determinada concentração, ou seja, o CI50 não determina que a célula sofrerá apoptose pelo extrato, e sim se o extrato é ou não tóxico para a célula.

Os resultados obtidos mostram que os extratos selecionados apresentaram um percentual apoptótico superior em relação ao da curcumina, o que sugere um alto potencial antitumoral. Um ponto importante é que a curcumina é um composto já isolado e apresenta capacidade de induzir apoptose (PRASAD *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2011), enquanto os extratos brutos testados apresentam diversas moléculas em sua composição. Mesmo sob essas condições, consideradas desfavoráveis diante da avaliação frente a uma molécula isolada, os extratos apresentaram um alto percentual de apoptose nas células tumorais de mama MCF-7 em relação ao estabelecido para a curcumina, composto usado como referência para esse estudo.

Deste modo, os extratos selecionados no presente trabalho devem ser estudados com maior profundidade no que concerne à própria indução de apoptose e sua cinética, bem como um estudo pormenorizado de sua composição química, a fim de se determinar os compostos envolvidos na indução de apoptose e sua influência sobre as etapas do processo mitótico.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da triagem de 114 extratos brutos com citotoxicidade contra células de adenocarcinoma de mama humano foram selecionados 15 extratos que induziram apoptose nas células, cuja indução foi maior ou igual à da curcumina. Desta forma, os 15 extratos apresentaram alto potencial antitumoral para serem submetidos a estudos futuros.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, H.; PINIE, A. H. L.; HOHMANN, J.; MOLNÁR, J. A natural compound from *Hydnophytum formicarium* induces apoptosis of MCF-7 cells via up-regulation of Bax. **Cancer cell international**, v. 10, p. 1-6, 2010.
- AZADMEHR, A.; HAJIAGHAE, R.; BARADARAN, B.; YAZDI, H. H. Apoptosis cell death effect of *Scrophularia variegata* on breast cancer cells via mitochondrial intrinsic pathway. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, p. 443-446, 2015.
- BHADORIYA, A. S.; GANESHPURKAR, A.; BHADORIYA, R. P. S.; SAHU, S. K.; PATEL, J. R. Antidiabetic potential of polyphenolic-rich fraction of *Tamarindus indica* seed coat in alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Basic and Clinic Physiology and Pharmacology**, v.28, p. 1-9, 2017.
- BHATTACHARYYA, A.; Babu, C. R. Caesalpinia bonduc serine proteinase inhibitor CbTI-2: Exploring the conformational features and antimalarial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 294-306, 2017.
- CHAVOSHI, H.; VAHEDIAN V.; SAGHAEI, S.; BAGHER P.; RAEISI, M.; SAMADI, N. Adjuvant therapy with silibinin improves the efficacy of paclitaxel and cisplatin in MCF-7 breast cancer cell. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 8, p. 2243-2247, 2017.
- DEVIS, W. R.; SINGH, S. B.; SINGH, C. B. Antioxidant and anti-dermatophytic properties leaf and stem bark of *Xylosma longifolium* clos. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 1-9, 2013.
- DOLAI, N.; ISLAM, A.; HALDAR, P. K. Methanolic extract of *Anthocephalus cadamba* induces apoptosis in Ehrlich ascites carcinoma cells in experimental mice. **Indian journal of Pharmacology**, v. 48, p. 445-449, 2016.
- ENGEL, N.; FALODUN, A.; KÜHN, J.; KRAGI, U.; LANGER, P.; NEBE, B. Pro-apoptotic and anti-adhesive effects of four African plant extracts on the breast cancer cell line MCF-7. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v.14, p. 1-14, 2014.
- ESMAEILI, M. A.; MAHABADI, N. A.; HASHEMPOUR, H.; FARHADPOUR, M.; GRUBER, C. W.; GHASSEMPOUR, A. *Viola* plant cyclotide vigno 5 induces mitochondria-mediated apoptosis via cytochrome c release and caspases activation in cervical cancer cells. **Fitoterapia**, v. 109, p. 162-168, 2016.
- ESTORK, D. M.; GUSMÃO, D. F.; PACIENCIA, M. L. B. DÍAZ, I. E. C. VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N.; REIS, L. F. L.; MONTERO, E. F. S.; BERNARDI, M. M.; SUFFREDINI, I. B. First chemical evaluation and toxicity of *Casinga-cheirosa* to Balb-c male mice. **Molecules**, v. 19, p. 3973-3987, 2014.
- FARANI, F.; MOEIN, M.; AMANZADEH, A.; KANDELOUS, H. M.; EHSANPOUR, Z.; SALIMI, M. Antiproliferative Evaluation and Apoptosis Induction in MCF- 7 Cells by *Ziziphus spina Christi* Leaf Extracts. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, p. 315-321, 2016.

FERREIRA, R. O.; SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G. New polyprenylated phloroglucinol and other compounds isolated from the fruits of *Clusia nemorosa* (Clusiaceae). **Molecules**, v. 20, p. 14326-14333, 2015.

FRANA, S. A.; VARELLA, A. D.; PCAIENCIA, M. L. B.; SUFFREDINI, I.B. Atividade citotóxica de extratos vegetais de plantas amazônicas contra tumor de mama. **Infarma Ciências Farmacêuticas**, v. 27, supl. 1, p. S247, 2015.

GREEN, D. R. Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead (Minireview). **Cell**, v. 121, p. 671-674, 2005.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; ROBERT A. WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HONG, J.; SUN, Z.; LI, Y.; GUO, Y.; LIAO, Y.; LIU, M.; WANG, X. Folate – modified Annonaceous acetogenins nanosuspensions and their improved antitumor efficacy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 5053 – 5067, 2017.

HUSSAIN, H.; HUSSAIN, J.; HARRASI, A. A.; SALEEM, M.; GREEN, I. R.; REE, T. V.; GHULAM, A. Chemistry and biology of genus *Vismia*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, p. 1448-1462, 2012.

HUSSAIN, J.; ALI, L.; KHAN, A. L.; REHMAN, N. U.; JABEEN, F.; KIM, J. S.; AL-HARRASI, A. Isolation and bioactivities of the flavonoids morin and morin-3-o-β-D-glucopyranoside from *Acridocarpus orientalis* – A wild Arabian medicinal plant. **Molecules**, v. 19, p. 17763-17772, 2014.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. **Nature Reviews**, v.2, p. 277-288, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER “JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA”. **Inca**. 2017. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>. Acesso em: 03 de outubro de 2017.

JARZAB, A. O.; BELOWSKA, A. P.; BRZOZOWSKI, T. Therapeutic importance of apoptosis pathways in pancreatic cancer. **Folia Medica Cracoviensis**, v.1, p. 61-70, 2016.

JUNG, S.; KIM, M. H.; PARK, J. H.; JEONG, Y.; KO, K. S. Cellular Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Coffe Extracts with Different Roasting levels. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, p. 1-10, 2017.

KEER, J. F. R. ; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Apoptosis its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v. 73, p. 2013-2026, 1994.

KLUTHCOVSKY, A. C. G. C.; FARIA, T. N. P.; CARNEIRO, F. H.; STRONA, R. Female breast cancer mortality in Brazil and its regions. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 4, p. 387-393, 2014.

KOOHPAR, Z. K.; ENTEZARI, M.; MOVAFAGH, A.; HASHEMI, M. Anticancer Activity of Curcumin on Human Breast Adenocarcinoma: Role of Mcl-1 Gene. **Iran Journal Cancer Prevent**, v. 8, p. 1-4, 2015.

LEBLANC, H.; LAWRENCE, D.; VARFOLOMEEV, E.; TOTPAL, K.; MORLAN, J.; SCHOW, P.; FONG, S.; SCHWALL, R.; DOMINICK SINICROPI, D.; ASHKENAZI, A. Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. **Nature Medicine**, v.8, p. 274-281, 2002.

LEE, B.L.; LIEDKE, P. E. R.; BARRIOS, C. H.; SIMON, S.D.; FINKELSTEIN, D. M.; GOSS, P. L. Breast Cancer in Brazil: Present status and future goals (Review). **Lancet Oncology**, v.13, p. 95-102,2012.

LEONG, K. H.; LOOI, C. Y.; LOONG, X.; CHAH, F. K.; SUPRATMAN, U.; LITAUDON, M.; MUSTAFA, M. R.; AWANG, K. Cycloart-24-ene-26-ol-one, a new cycloartane isolated from leaves of *Aglaia exima* triggers tumor necrosis factor-receptor 1 mediated caspase-dependent apoptosis in colon cancer cell line. **Plos One**, v. 11, p. 1-17, 2016.

LIEDKE, P. E. R.; FINKELSTEIN, D. M.; SZYMONIFKA, J.; BARRIOS, C. H.; GUERRA, Y. C.; BINES, J.; VASCONCELOS, C.; SIMON, S. D.; GOSS, P. E. Outcomes of Breast Cancer in Brazil Related to Health Care Coverage: A Retrospective Cohort Study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 23, p. 126-133, 2014.

LISCANO, L. J. ; SILES, M.; TREPIANA, J. HERNÁNDEZ, M. L.; NAVARRO, R.; LARREA, M. B. R.; SANZ, J. I. R. *Piper* and *Vismia* species from Colombian Amazonia differentially affect cell proliferation of hepatocarcinoma cells. **Nutrients**, v. 7, p. 179-195, 2015.

LUO, S.; LI, Q.; CHEN, J.; WANG, W. Two Novel Curcumin Analogues Induced Reactive Oxygen Species Generation and Mitochondrial-Related Apoptosis in Human Breast Cancer MCF - 7 Cells. **Journal of Applied Pharmacy**, v.8, p. 1-6, 2016.

LV, Z. D.; XIANG-PING LIU, X. P.; ZHAO, W. J.; QIAN DONG, Q.; FU-NIAN LI, F. N.; WANG, H. B.; KONG, B. Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. **International Journal of Clinical & Experimental Pathology**, v.6, p. 2818-2824, 2014.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guateria boliviiana* (Annonaceae). **Phytochemistry**, v. 54, p. 709-716, 2000.

MARCIAL, C. R.; CHILPA, R. R.; ESTRADA, E.; ESPARZA, J. R.; FARIÑA, G. G.; FRAGOSO, L. R. Antiproliferative, cytotoxic and antitumor activity of coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 719-725, 2007.

MARSH, S.; LIU, G. Pharmacokinetics and pharmacogenomics in breast cancer chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 381-387, 2009.

MESQUITA, M. L.; PAULA, J. E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LOTUFO, L. V. C.; GROUGNET, R. MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 439-445, 2009.

MOCHIZUKI, T.; KUGE, Y.; ZHAO, S.; TSUKAMOTO, E.; HOSOKAWA, M.; STRAUSS, H. W.; BLANKENBERG, F. G.; TAIT, J. F.; TAMAKI, N. Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with <sup>99m</sup>tc-annexin v. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 44, p. 92-97, 2003.

NAJMUDDIN, S. U. F. S.; ROMLI, M. F.; HAMID, M.; ALITHEEN, N. B.; RAHMAN, N. M. A. N. A. Anti-cancer effect of *Annona muricata* linn leaves crude extract (AMCE) on breast cancer cell line. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, p. 1-20, 2016.

NAKAYAMA, K.; MURATA, S.; ITO, H.; IWASAKI, K.; VILLAREAL, M. O.; ZHENG, Y. W.; MATSUI, H.; ISODA, H.; OHKOHCHI, N. Terpinen-4-ol inhibits colorectal cancer growth via reactive oxygen species. **Oncology Letters**, v. 14, p. 2015-2024, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

NOBILI, S.; LIPPI D.; WITORT, E.; DONNINI, M.; BAUSI, L.; MINI, E.; CAPACCIOLI, S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 365-378, 2009.

OLIVEIRA, A. H.; OLIVEIRA, G. G.; NETO, F. C.; PORTUONDO, D. F.; DUHARTE, A. B. Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (aubl.) Pers. Extracts and activity against *Sporothrix schenckii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 195, p. 266-274, 2017.

PASCOAL, A. C. R. F.; EHRENFRIED, C. A.; LOPEZ, B. G. C.; GILIOLOI, R.; ANHÉ, G. F.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; STEFANELLO, M. E. A.; SALVADOR, M. J. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. **Molecules**, v. 19, p. 1843-1855, 2014.

PRASAD, C. P.; RATH, G.; MARTHUR, S.; BHATNAGAR, D.; RALHAN, R. Potent growth suppressive acrivity of curcumin in human breast cancer cells: Modulation of Wnt /  $\beta$  – catenin signaling. **Chemico – Biological Interactions**, v. 181, p. 263-271, 2009.

PUMIPUTAVON, K.; CHAOWASKU, T.; SAENJUM, C.; OSATHANUNKUL, M.; WUNGINTAWEEKUL, B.; CHAWANSUNTATI, K.; WIPASA, J.; LITHANATUDOM, P. Cell cycle arrest and apoptosis induction by methanolic leaves extracts of four Annonaceae plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, p. 1-11, 2017.

RARNSEWAK, R. S.; D. L. DEWITT, D. L.; NAIR, M. G. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of Curcumin I-III from *Curcuma longa*. **Phytomedicine**, v. 7, p. 303-308, 2000.

REUTER, S.; EIFES, S.; DICATO, M.; AGGARWAL, B. B; DIEDERICH, M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, p. 1340-1351, 2008.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 364-369, 2001.

SALDAÑA, C. A.R.; ORTEGA, M. R. C.; VÁRQUEZ M.M.; CHACÓN, I. D. C.; MORENO, M. C.; ESQUINCA, A.R. G. Acetogenins and alkaloids during the initial development of *Annona muricata* L. (Annonaceae). **Journal of Basic and Clinic Physiology and Phamacology**, v. 28, p. 1-10, 2017.

SANTOS, A. L.; YAMAMOTO, E. S.; PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; MARTINS, L. F.; UEMI, M.; SOARES, M. G.; LAGO, J. H. G.; TEMPONE, A. G.; SARTORELLI, P. Antileishmanial activity and Immunomodulatory effects of tricin isolated from leaves of *Casearia arborea* (Salicaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, p. 1-6, 2017.

SILVA, T. B. C.; COSTA, C. O. D.; GALVÃO, A. F.; BOMFIM, L. M.; RODRIGUES, A. C. B. C.; MOTA, M. C.S.; DANTAS, A. A.; SANTOS, T. R.; SOARES, M. B. P.; BEZERRA, D. P. Cytotoxic potencial of selected medicinal plants in northeast Brazil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, p. 1-9, 2016.

SON, Y. O.; KIM, J.; LIM, J.C.; CHUNG, Y.; CHUNG, G. H.; LEE, J. C. Ripe fruits of *Solanum nigrum* L. inhibits cell growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1421-1428, 2003.

SOSA, E. H.; CASTEJÓN, Y. M.; DUHARTE, A. B.; PORTUONDO, D.; TAMAYO, V.; QUEVEDO, H. J. M.; MANRIQUE, C. E. M. Leukocyte-stimulating effect and phytochemical screening of *Trichilia hirta* extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 1057-1059, 2011.

SOTO, E. T. Q.; CALAF, G. M. Effect of curcumin and paclitaxel on breast carcinogenesis. **Internacional Journal of Oncology**, v. 49, p. 2569-2577, 2016.

STEUBER, N.; VO, K.; WADHWA, R.; BIRCH, J.; IACOBAN, P.; CHAVEZ, P.; ELBAYOUMI, T. A. Tocotrienol nanoemulsion of curcumin elicit elevated apoptosis and augmentation efficacy against breast and ovarian carcinomas. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 1792, p. 1-17, 2016.

SUBARNAS, A.; DIANTINI, A.; ABDULAH, R.; ZUHROTUN, A.; HADISAPUTRI, Y.; PUSPITASARI, M. I.; YAMAZAKI, C.; KUWANO, H.; KOYAMA, H. Apoptosis induced in MCF-7 human breast cancer cells by 2',4'-dihydroxy-6-methoxy-3,5-dimethylchalcone isolated from *Eugenia aquea* Burm f. leaves. **Oncology Letters**, v.9, p. 2303-2306, 2015.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M. L. B.; VARELLA, D. A.; YOUNES, R. N. In vitro prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts. **Pharmazie**, v.61, p. 722-724, 2006.

SUFFREDINI, I.B.; VARELLA, D. A.; YOUNES, R.N. Cytotoxic Molecules from Natural Sources: Tapping the Brazilian Biodiversity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, p 1-9, 2006a.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M. L. B.; Frana, S.A.; Varella, D. A.; Younes, R. N. In vitro breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts. **Pharmazie**, v. 62, p. 798-800, 2007.

WANG, X.; HANG, Y.; LIU, J.; HOU, Y.; WANG, N.; WANG, M. Anticancer effect of curcumin inhibits cell growth through miR-21/PTEN/Akt pathway in breast cancer cell. **Oncology Letters**, v. 13, p. 4825-4831, 2017.

YADAV, N. K.; SAINI, K. S.; HOSSAIN, Z.; OMER, A.; SHARMA, C.; JIAUR R. GAYEN, J. R.; SINGH, P.; K. R. ARYA, K. R. A.; SINGH, R. K. *Saraca indica* bark extract shows *in vitro* antioxidant, antibreast cancer activity and does not exhibit toxicological effects. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, p. 1-15, 2015.

YANG, H. L.; CHEN, C. S.; CHANG, W. H.; LU, F. J.; LAI, Y. C.; CHEN, C. C.; HSEU, T. H.; KUO, C.T.; HSEU, Y. C. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by *Antrodia camphorata*. **Cancer Letters**, v. 231, p. 215-227, 2006.

YOUNES, R.N.; VARELLA, D.; SUFFREDINI, I.B. Extração e rastreamento de novas drogas em plantas brasileiras. **Acta Oncológica Brasileira**, v. 20, p. 15–19, 2000.

YOUNES, R. N.; VARELLA, D. A.; SUFFREDINI, I. B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**, v. 62, p. 763-768, 2008.

ZHOU, Q.; WANG, X.; LIU, X.; ZHANG, H.; LU, Y.; SU, S. Curcumin enhanced antiproliferative effect of mitomycin C in human breast cancer MCF-7 cells *in vitro* and *in vivo*. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, p. 1402-1410, 2011.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Dados de padronização e validação dos controles utilizados para todos os ensaios em citometria de fluxo.

Controles	7-AAD	Anexina + 7-AAD	Células Vivas	Células Apoptóticas
<b>Células não marcadas</b>	0,01%	0,01%	<b>99,94%</b>	0,04%
<b>Células + Anexina</b>	0,01%	0,05%	64,84%	<b>35,11%</b>
<b>Células + 7-AAD</b>	<b>40,07%</b>	0,03%	59,88%	0,02%
<b>Células + Anexina + 7-AAD</b>	4,30%	<b>24,74%</b>	66,94%	4,01%
<b>Célula + DMSO</b>	5,94%	27,34%	<b>62,75%</b>	3,97%

Células não marcadas = vivas; células + anexina, células + 7-AAD e células com dupla marcação = mortas por calor; células + DMSO = vivas.