



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,**  
**INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA**

**O EFEITO ANTITUMORAL DO EXTRATO**  
**HIDROALCOÓLICO DO FRUTO DA *Myrciaria dubia***  
**(KUNTH) *MCVAUGH* (CAMU-CAMU)**

**JEFTÉ TEIXEIRA DA SILVA**

RIO BRANCO, AC  
ABRIL/2018

**JEFTE TEIXEIRA DA SILVA**

**O EFEITO ANTITUMORAL DO EXTRATO  
HIDROALCOÓLICO DO FRUTO DA *Myrciaria dubia*  
(KUNTH) MCVAUGH (CAMU-CAMU)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

**Orientador: Prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva**

RIO BRANCO, AC

ABRIL/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E  
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA

**O EFEITO ANTITUMORAL DO EXTRATO  
HIDROALCOÓLICO DO FRUTO DA *Myrciaria dubia*  
(KUNTH) MCVAUGH (CAMU-CAMU)**

JEFTE TEIXEIRA DA SILVA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: \_\_\_\_\_

---

Prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva  
Presidente da Banca - Universidade Federal do Acre

---

Prof. Dr. Carromberth Carioca Fernandes  
Membro Interno - Universidade Federal do Acre

---

Prof. Dr. Miguel Sordi Bortolini  
Membro Externo - Universidade Federal do Acre

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

---

S586e Silva, Jefte Teixeira da, 1995-  
O efeito antitumoral no extrato hidroalcoólico do fruto da *Myrciaria  
Dubai* (Kunth) MCVAUGH (Camu-camu) / Jefte Teixeira da Silva. – 2018.  
35 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências e Inovação Tecnológica para a Amazônia.  
Rio Branco, 2018.

Inclui referências bibliográficas e anexo.

Orientador: Prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva.

1. Camu-camu. 2. Antioxidantes. 3. Antineoplásico. I. Título.

CDD: 509

---

Bibliotecária: Alanna Santos Figueiredo CRB-11º/1003

**Dedico este trabalho ao meu Deus, que tudo criou, à minha querida esposa Talita, que sempre esteve ao meu lado, e aos meus pais Valério e Vera, por todo o incentivo demonstrado.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia, Universidade Federal do Acre, pela oportunidade de incorporar-me e desenvolver-me nesse curso de pós-graduação.

Ao prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva, pela orientação, paciência e persistência nesses dois anos de trabalho.

Ao prof. Dr. Carromberth Carioca Fernandes, pela cessão do espaço do Laboratório de Produtos Naturais, Microbiologia e Biotecnologia e pelas valiosas orientações para a confecção do extrato.

Ao Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, na pessoa do prof. Dr. Demétrius Antonio Machado de Araújo, por viabilizar a realização dos testes in vitro.

Ao Laboratório de Neuro e Imunofarmacologia, Fiocruz-Rondônia, na pessoa do prof. Dr. Quintino Moura Dias Júnior, pela cessão das células de adenocarcinoma mamário utilizadas na pesquisa.

Aos membros que compuseram a banca examinadora, pelas preciosas sugestões para melhoria do trabalho: Prof. Dr. Carromberth Carioca Fernandes, Profa. Dr. Miguel Sordi Bortolini.

“A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode. Isso fica sendo a minha última e mais elevada descoberta”. Isaac Newton

## RESUMO

O fruto da *Myrciaria dubia* é conhecido por apresentar o maior teor de vitamina C entre os frutos da região amazônica. Diversos estudos têm demonstrado os benefícios do seu uso, como a melhora do perfil lipídico e redução do estresse oxidativo de ratos diabéticos, a redução dos níveis plasmáticos de glicose, insulina e lipídios, além das atividades anti-inflamatória, hepatoprotetora, antimicrobiana e antígeno-tóxica. Assim, pode-se observar que a *M. dubia* apresenta elevado potencial de utilização na prevenção e tratamento de diversas doenças, inclusive dos diferentes tipos de câncer. O presente trabalho investigou a ação citotóxica do extrato bruto hidroalcoólico da casca do fruto da *Myrciaria dubia* em células neoplásicas das linhagens de leucemia monocítica aguda (THP-1) e leucemia mieloide crônica (K562). A viabilidade celular foi avaliada pelo MTT (-3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazol). Para o teste in vivo, 16 camundongos fêmeas Swiss sofreram a indução de tumor ascítico de Erlich e foram distribuídos em 2 grupos de 08 animais. Um dos grupos recebeu tratamento com o extrato hidroalcoólico, por gavagem, na concentração de 1g de extrato por kg de peso do animal. Ao final do experimento, foi feita a remoção do líquido ascítico dos animais, para a realização de contagem celular total e análises morfométricas, e do sangue para verificação de marcadores inflamatórios e dos perfis hepático e renal, além das dosagens do lipidograma e glicemia. Os resultados demonstraram redução significativa de peso e circunferência abdominal nos animais do grupo tratado com o extrato, com o peso sendo 11% menor nesse grupo,  $p < 0,01$ . Nas análises bioquímicas verificou-se a significativa diminuição da transaminase glutâmico oxalacética (TGO) ( $p < 0,01$ ) e dos demais parâmetros ( $p < 0,05$ ), com exceção do triglicerídeo. O teste in vitro demonstrou elevado potencial citotóxico do extrato para as células neoplásicas, principalmente as da linhagem de leucemia mieloide crônica (K562), com redução significativa da viabilidade celular até mesmo na menor concentração do extrato e  $IC_{50} = 0,28 \pm 3,13$  mg de extrato. Confirma-se, então, os efeitos anti-inflamatório e protetor de lesão tecidual do fruto da *M. dubia* e fica demonstrado o potencial citotóxico do extrato hidroalcoólico da casca do fruto em células leucêmicas, o que possibilita o fracionamento do extrato para a potencialização dos efeitos demonstrados e identificação dos compostos fitoquímicos bioativos.

**Palavras-chave:** *Myrciaria dubia*, antioxidante, antineoplásico, tumor de erlich, compostos fenólicos



## ABSTRACT

The fruit of *Myrciaria dubia* is known to present the highest vitamin C content among the fruits of the Amazon region. Several studies have demonstrated the benefits of its use, such as the improvement of lipid profile and reduction of oxidative stress in diabetic rats, reduction of plasma glucose, insulin and lipid levels, as well as anti-inflammatory, hepatoprotective, antimicrobial and antigenotoxic activities. Thus, it can be observed that *M. dubia* has a high potential of use in the prevention and treatment of several diseases, including the different types of cancer. The present work investigated the cytotoxic action of the crude hydroalcoholic extract of the *Myrciaria dubia* fruit bark on neoplastic cells of the acute monocytic leukemia (THP-1) and chronic myeloid leukemia (K562) lines. Cell viability was assessed by MTT (-3- (4,5-dimethyl-2-thiazole) 2,5-diphenyl-2-H-tetrazonium bromide). For the in vivo test, 16 Swiss female mice underwent the Erlich ascites tumor induction and were distributed in 2 groups of 08 animals. One of the groups received treatment with the hydroalcoholic extract by gavage, in the concentration of 1g extract per kg of animal weight. At the end of the experiment, the ascitic fluid was removed from the animals to perform a total cell count and morphometric analysis, and the blood was checked for inflammatory markers and hepatic and renal profiles, as well as lipid and blood glucose measurements. The results showed a significant reduction in weight and waist circumference in the animals treated with the extract, with the weight being 11% lower in this group,  $p < 0.01$ . The biochemical analysis showed a significant decrease in glutamic oxalacetic transaminase (OGT) ( $p < 0.01$ ) and other parameters ( $p < 0.05$ ), with the exception of triglyceride. The in vitro test demonstrated a high cytotoxic potential of the extract for the neoplastic cells, especially those of the chronic myeloid leukemia (K562) strain, with a significant reduction in cell viability even in the lowest extract concentration and  $IC_{50} = 0.28 \pm 3.13$  mg extract. The anti-inflammatory and protective effects of tissue damage of the *M. dubia* fruit are confirmed and the cytotoxic potential of the hydroalcoholic extract of the fruit peel in leukemic cells is demonstrated, which allows the fractionation of the extract to potentiate the demonstrated effects and identification of bioactive phytochemical compounds.

**Keywords:** *Myrciaria dubia*, antioxidant, antineoplastic, erlich tumor, phenolic compounds

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 01 Fluxograma de elaboração do extrato hidroalcoólico da casca do fruto da <i>M. dubia</i>	39
Figura 02 Análise de média e desvio padrão do peso em grama dos camundongos por dia de experimento	43
Figura 03 Valores da circunferência abdominal em centímetros aferidas nos dias 0 e 16 do experimento	44
Figura 04 Análises bioquímicas do soro dos camundongos pertencentes aos grupos A e B	47
Figura 05 A - fotografia de um camundongo do grupo A (A2) que não desenvolveu ascite; B – fotografia de um camundongo do grupo B (B8), no qual todos desenvolveram tumor ascítico.	49
Figura 06 Laparotomia exploratório de camundongo do grupo A que não desenvolveu ascite (A) e de camundongo do grupo B com ascite (B).	49
Figura 07 Fluxograma de elaboração do extrato bruto hidroalcoólico da casca do fruto da <i>M. dubia</i> (EBHC).	56
Figura 08 Efeito citotóxico em células THP-1 em resposta ao aumento de da concentração do EBHC, tratamento de 24 e 72 h	58
Figura 09 Efeito citotóxico em células K562 em resposta ao aumento de da concentração do EBHC, tratamento de 24 e 72 h	60

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

	<b>Pág.</b>
Tabela 1. Concentração de Ácido Ascórbico na polpa ou suco de camu-camu expressa em mg por 100g de fruto ou 100 mL de suco, de acordo com as respectivas publicações.	27
Tabela 2. Concentração de antocianinas, flavanois e carotenoides no fruto camu-camu	29
Tabela 3. Concentração de minerais na polpa e no suco de camu-camu	30
Tabela 4. Valores dos pesos dos camundongos em gramas por dia do experimento	42
Tabela 5. Valores das circunferências abdominais em centímetros aferidas nos dias 0 e 16 do experimento	43
Tabela 6. Análises bioquímicas do soro dos camundongos pertencentes aos grupos A e B.	49
Tabela 7. Contagem total de células e análises citométricas em 75 $\mu$ L de amostra de líquido ascítico diluída 1.600 x em PBS 1% por meio do MOXI Z Mini Automated Cell Counter Kit	

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
2n	Diploide
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
CK	Creatinoquinase
CKMB	Creatinoquinase fração MB
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBHC	Extrato bruto hidroalcoólico da casca do camu-camu
g	Grama
g	Força g
GalN	D-galactosamina
GC	Grupo controle
GI	Grupo de intervenção
GSH	Glutationa
h	Horas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IC50	Concentração inibitória média capaz de exercer 50% do efeito máximo
IDR	Ingestão diária recomendada
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
K562	Leucemia mieloide crônica
KBrO <sub>2</sub>	Bromato de potássio
kg	Quilograma
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
<i>M. dubia</i>	<i>Myrciaria dubia</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MPI	<i>Moxi Population Index</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólico
NO	Óxido nítrico

PBS	Tampão fosfato salino
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TAE	Tumor Ascítico de Ehrlich
TGO	Transaminase glutâmica oxalacética
TGP	Transaminase glutâmica pirúvica
THP1	Leucemia monocítica aguda
TSE	Tumor Sólido de Ehrlich
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VT	Volume tumoral

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	18
1.2 Câncer de mama .....	20
1.3 Tumor de Ehrlich.....	21
Capítulo I.....	23
<i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) <i>McVaugh</i> : aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico.....	24
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 Métodos .....	25
3 Aspectos botânicos .....	26
4 Composição Química .....	26
3.1 Vitamina C.....	27
3.2 Compostos fenólicos.....	27
3.3 Minerais .....	30
4 Potencial Farmacológico .....	30
4.1 Efeito anti-inflamatório .....	30
4.2 Efeito antígenotóxico e antineoplásico.....	31
4.3 Efeito antioxidante.....	32
4.4 Efeito antimicrobiano e antiprotozoário .....	32
4.5 Efeito hipolipidêmico e hipoglicêmico.....	33
4.6 Efeito Hepatoprotetor .....	34
5 Conclusão .....	34
Capítulo II.....	35
Efeito antitumoral do extrato hidroalcoólico do fruto da <i>Myrciaria dubia</i> (camu-camu) em tumor ascítico de Ehrlich .....	36
Resumo .....	36
1 INTRODUÇÃO.....	36

2	Materiais e métodos.....	38
2.1	Animais para o experimento.....	38
2.2	Produção do extrato hidroalcoólico.....	38
2.3	Inoculação das células do tumor de Ehrlich .....	39
2.4	Delineamento experimental para avaliação da sobrevida e eficácia antitumoral .....	40
2.5	Coleta de sangue e líquido ascítico.....	40
2.6	Análises bioquímicas.....	41
2.7	Contagem e vitalidade das células do líquido ascítico .....	41
2.8	Aspecto Ético.....	41
2.9	Estatística.....	41
3	Resultados.....	42
3.1	Avaliação da sobrevida e eficácia tumoral .....	42
3.2	Análises Bioquímicas .....	44
3.3	Contagem global de células do líquido ascítico .....	48
3	Discussão .....	50
5	Conclusão.....	51
	Capítulo III.....	52
	Efeito citotóxico do extrato hidroalcoólico do fruto da <i>Myrciaria dubia</i> sobre as linhagens leucêmicas THP-1 e K562.....	53
1	INTRODUÇÃO.....	53
2	Materiais e métodos.....	55
2.1	Produção do extrato hidroalcoólico.....	55
2.2	Teste MTT .....	56
2.3	Análise estatística .....	57
3	Resultados.....	57

4	Discussão .....	61
5	Conclusão.....	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
	ANEXO I.....	72
	Crítérios das Revistas.....	72
	ANEXO II.....	73
	Certificado de aprovação do CEUA .....	73



## INTRODUÇÃO GERAL

Desde os primórdios da humanidade, o homem sempre manteve um estreito relacionamento com as plantas, utilizando-as para alimentação, confecção de instrumentos, construção de abrigos, como fonte de combustão e para atender finalidades terapêuticas (1). No entanto, até o século XVII, os produtos botânicos eram utilizados in natura ou após serem submetidos a procedimentos simples, como cocção, infusão e maceração (2). O médico suíço Paracelso, considerado o pai da Físico-Química, foi o primeiro a propor a extração de produtos naturais bioativos a partir de fontes vegetais, originando a noção de princípio bioativo (3). Porém, foi apenas no século XVIII que teve início o processo de identificação destas substâncias e, com isso, a transição entre plantas medicinais e os produtos farmacêuticos modernos (3). Atualmente, muitas destas substâncias são sintetizadas e comercializadas em larga escala (4).

Muitos dos compostos bioativos identificados e isolados de vegetais foram descobertos a partir da investigação do uso dessas plantas para finalidades medicinais, principalmente pelas comunidades tradicionais, como as indígenas (2). Outros foram descobertos acidentalmente, toma-se como exemplo um fato curioso acontecido há vários anos na Austrália, onde um rebanho de carneiros que se alimentavam de um trevo (*Trifolium subterraneum*) começou a apresentar distúrbios de gravidez, desenvolvimento mamário e secreção láctea, independentemente de serem fêmeas ou machos. Posteriormente, esta atividade estrogênica foi atribuída à genisteína, composto pertencente ao grupo dos flavanoides, subgrupo isoflavona, que fazia parte dos constituintes químicos do trevo (5). Atualmente, sabe-se que essa isoflavona pode ser encontrada em grãos de soja, em um percentual relativamente elevado, (6) e apresenta significativo efeito antimutagênico (7) e antioxidante (8).

A busca por novos compostos bioativos permanece, e a região amazônica brasileira se apresenta nesse cenário como um reservatório de uma gigantesca biodiversidade florística que deve ser explorada para tratamento e prevenção de diversas doenças, inclusive o câncer (9).

O câncer é a segunda doença com maior índice de mortalidade no mundo, estando atrás apenas das doenças cardiovasculares (10). Por sua elevada prevalência, difícil tratamento e frequentes reincididas (11), as neoplasias malignas tem sido alvo de diversas pesquisas que visam o desenvolvimento de novos quimioterápicos.

Neste trabalho, nos propomos a realizar intensa pesquisa bibliográfica, enfatizando o potencial farmacológico do fruto da *M. dubia*, e a desenvolver testes experimentais para verificação do efeito antitumoral do seu extrato hidroalcoólico em tumor ascítico induzido em camundogos, além de verificar o efeito citotóxico em linhagens de células neoplásicas pelo teste in vitro de citotoxicidade com o MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólico]}.

## 1.1 Câncer

Câncer é uma terminologia que designa um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que apresentam capacidade de invadir tecidos e órgãos adjacentes, podendo por via linfática ou hematogênica, espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (12). Dividindo-se rapidamente, essas células possuem elevada agressividade, desencadeando um processo de proliferação incontrolável, que culmina com a formação dos tumores malignos (13). O termo neoplasia significa literalmente novo crescimento e define condições de proliferação celular anormal, encontrada tanto em tumores benignos quanto em malignos (14). Entretanto, os tumores benignos são massas celulares circunscritas, de crescimento lento e que mantem características teciduais, sendo geralmente separadas do tecido adjacente por intermédio de uma cápsula (13).

Normalmente a presença de tumores benignos não coloca em risco a vida do indivíduo (14). Já os tumores malignos, crescem de forma invasiva com a característica de serem potencialmente letais, podendo reincidir, tanto localmente como à distância do sítio primário, mesmo após o tratamento (15).

Atualmente, de acordo com dados publicados pela Organização Mundial da Saúde, o câncer é considerado a segunda causa de morte no mundo e foi responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015. Em todo o globo, cerca 1 em cada 6 mortes é devido ao câncer. E as estimativas mostram que o número de novos casos deverá aumentar cerca de 70% nas próximas duas décadas (16).

Existem três abordagens principais para o tratamento de câncer: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Atualmente, a quimioterapia é considerada o método mais efetivo para o tratamento da doença, pois diversos tumores caracterizam-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, havendo a necessidade de uma abordagem terapêutica sistêmica (17).

O sucesso no tratamento das neoplasias por meio da quimioterapia depende da maior sensibilidade das células neoplásicas aos fármacos aplicados, visto que células em proliferação são em geral, mais susceptíveis a estes agentes do que as células quiescentes, de tecidos que apresentam baixa taxa de renovação (18). Entretanto, as diferenças de sensibilidade entre as células neoplásicas e normais são às vezes pequenas, e a toxicidade é um problema comum (19).

Embora existam fármacos consagrados no tratamento do câncer, nenhuma das abordagens terapêuticas atuais é capaz de regredir completamente as suas diferentes manifestações (18). Além disso, o uso de agentes antitumorais acarreta numa alta incidência de efeitos adversos associados à sua elevada toxicidade e inespecificidade (20). Portanto, a descoberta de novos compostos bioativos com capacidade antitumoral e antineoplásica é crucial para o desenvolvimento de um tratamento efetivo com a minimização dos efeitos colaterais.

## 1.2 Câncer de mama

De acordo com a organização Pan-Americana da Saúde, o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres, ocupando a segunda posição entre as principais causas de morte nesse público. Estima-se que, em 2012, 408 mil mulheres foram diagnosticadas com a doença e mais de 92 mil morreram devido ao câncer, no continente americano (21). No Brasil, a estimativa de novos casos para o ano de 2018 é de 59.700, sendo o tipo de câncer mais comum entre as mulheres brasileiras, depois do de pele não melanoma. O câncer de mama também acomete homens, porém é raro, representando apenas 1% do total de casos da doença (22).

O câncer de mama, que acomete as mulheres principalmente após os 35 anos de idade, pode desencadear perda funcional e alterações na autoimagem que afetam a saúde nos níveis psíquico, emocional e social das pessoas acometidas (23). A doença muitas vezes altera a qualidade de vida dos pacientes, promovendo mudanças que afetam o trabalho, a família e a sexualidade (24).

A mastectomia é o tratamento primário do câncer de mama, consistindo na intervenção cirúrgica de remoção do tumor, podendo atingir tecidos circundantes ou até culminar com a retirada da mama, dos linfonodos axilares e dos músculos peitorais (25). Tratamentos complementares geralmente são necessários, como a radioterapia,

quimioterapia e hormonioterapia, melhorando a eficiência do tratamento e aumentando a possibilidade de cura (25).

Contudo, devido principalmente à quimioterapia e radioterapia, podem ocorrer efeitos secundários importantes nas células normais dos tecidos lábeis, que apresentam renovação contínua, como as do gastrointestinal, capilares e as do sistema imunológico, causando diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e maior suscetibilidade às infecções (26).

Devido à similaridade entre células malignas e normais do corpo, o grande desafio para o tratamento do câncer de mama, e dos diversos tipos de câncer, é a distinção entre essas células, o que demonstra a necessidade de intensa pesquisa para a descoberta de novos medicamentos destinados ao combate seletivo das células tumorais (27).

### 1.3 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich foi desenvolvido por Paul Ehrlich em 1905, sendo, no ano seguinte, classificado como um adenocarcinoma mamário espontâneo de camundongos fêmeas (28). Inicialmente, o tumor era experimentalmente induzido e mantido sob a forma sólida, sendo transferido entre animais da mesma espécie (28). Somente em 1932, Loewenthal e Jahn desenvolveram a forma ascítica do tumor, ao implantar células obtidas do tumor de Erlich na cavidade peritoneal de camundongos, observando o crescimento das células neoplásicas suspensas no fluido ascítico (29).

Após 7 dias de inoculação, a forma sólida do tumor de Erlich apresenta-se como massa palpável de consistência firme. A análise histopatológica da massa tumoral permite verificar estroma delicado e parênquima indiferenciado, com células arredondadas, com citoplasma escasso, núcleo central, nucléolos proeminentes e intenso pleomorfismo; além de serem observadas figuras de mitose e mitoses aberrantes (30).

Por outro lado, nesse mesmo período de evolução, o tumor ascítico apresenta grande quantidade de fluido levemente viscoso e de aspecto leitoso, com predominância de células tumorais (30). A análise citológica indica células pleomórficas, com diâmetro de 2 a 3 vezes superior ao das hemácias (31).

O tumor de Erlich tem sido utilizado como modelo experimental para vários estudos, tais como : avaliação de efeito antitumoral de toxinas (32), extratos vegetais (33), drogas anti-inflamatórias (34), agentes proteicos (35), neurotransmissores (31);

além de testes para o desenvolvimento de marcadores de proliferação celular (36), verificação da resposta imunológica ao tumor (37) e influência do estresse sobre câncer (38).

# Capítulo I

O capítulo I será enviado à revista *Acta Amazonica* em forma de artigo de revisão. Essa revista científica multidisciplinar de livre acesso foi fundada em 1971 pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, sendo publicadora de artigos em uma ampla gama de disciplinas, incluindo botânica, agronomia, ciência florestal, zoologia, ecologia, química, climatologia, saúde e ciência social. O seu conceito Qualis CAPES é B2 na área interdisciplinar.

## ***Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico**

### Resumo

*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh é uma planta frutífera pertencente à família Mirtaceae, amplamente distribuída na bacia amazônica. Esta revisão teve como objetivo sumarizar o conhecimento botânico, de composição química e potencial farmacológico do fruto da *M. dubia*. A pesquisa foi realizada nas bases PubMed, Lilacs e SciELO com utilização dos descritores "*Myrciaria dubia*" or "*camu-camu*". No total foram encontrados 130 artigos, publicados entre 1990 e 2018, dos 44 foram escolhidos por abordarem o tema proposto, a partir dos quais verificou-se que o fruto apresenta grande variedade de compostos bioativos: vitamina E,  $\beta$ -caroteno, pectina, fibras, minerais (nitrogênio, fósforo e potássio), vários compostos fenólicos com atividade antioxidante, como flavonóides, taninos e ácidos fenólicos, além de ácidos orgânicos (ácido cítrico e ácido málico) e ácidos graxos (ácido esteárico [ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ ], linoléico ou ômega 6 [ $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$ ] e oleico ou omega 9 [ $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH} = \text{CH} (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$ ]). Os artigos selecionados também demonstraram diversos benefícios atribuídos ao uso do fruto da *M. dubia*, como melhora do perfil lipídico e redução do estresse oxidativo em ratos diabéticos, redução dos níveis plasmáticos de glicose, insulina e lipídios, bem como as atividades anti-inflamatórias, hepatoprotetora, antimicrobianas e antígenotóxicas. Pode-se, portanto, inferir que a *M. dubia* apresenta alto potencial para sua utilização como alimento nutritivo capaz de atuar na prevenção e tratamento de diversas doenças.

**Palavras-chave:** *Myrciaria dubia*, camu-camu, compostos fenólicos, compostos bioativos

## 1 INTRODUÇÃO

O camu-camu (*Myrciaria dubia*) é uma árvore frutífera, pertencente à família Mirtaceae, amplamente distribuída na bacia amazônica (39). Essa planta possui elevado teor de vitamina C, encontrado principalmente em seu fruto, podendo chegar a 6.000 mg de ácido ascórbico por 100 g de fruto (peso fresco), de acordo com Yuyama (2002)(40).

No território brasileiro, a *M. dubia* recebe diversas designações populares: araçá, araçá-d'água, araçá-do-lago, araçarana, araçazinho, caçari, camucamuzeiro, crista-de-galo, sarão e socorón (41). Quanto à disposição geográfica, é um arbusto típico da Amazônia, crescendo nas margens de rios e lagos, podendo ser encontrado tanto na região amazônica brasileira, como em outros países da América do Sul, como Colômbia, Peru e Venezuela (42).

O fruto da *M. dubia* apresenta polpa macia e succulenta utilizada, principalmente no Peru, para o preparo de refresco, sorvete, picolé, geleia, doce e licor (43). Devido à acidez elevada, os frutos raramente são consumidos frescos. Dentre os diversos elementos que podem ser encontrado no fruto, estão: vitamina A, glicose, frutose, amido, pectina, antocianinas, fibras, minerais (nitrogênio, fósforo e potássio) e vários compostos fenólicos com atividade antioxidante (2,6,7).

Diversos estudos têm demonstrado os benefícios do uso do camu-camu e seus derivados, como a melhora do perfil lipídico e redução do estresse oxidativo de ratos diabéticos (46) , a redução dos níveis plasmáticos de glicose, insulina e lipídios, relatada por Nascimento et al. (2013) (47), além das atividades antiinflamatória (48), hepatoprotetiva (49) e antimicrobiana (50) demonstradas em diversas pesquisas.

Dessa forma, o camu-camu apresenta propriedades que demonstram elevado potencial para sua utilização como alimento funcional atuante na prevenção e tratamento de diversas doenças.

## 2 Métodos

O levantamento foi realizado por meio de pesquisa livre na Pubmed, Scielo e Lilacs, onde foram incluídas nos resultados de busca obras completas de língua espanhola, inglesa ou portuguesa e suas respectivas traduções. Os descritores utilizados foram: “*Myrciaria dubia*” or “*camu-camu*”. Ressaltando que a coleta de material no Scielo foi realizada através da busca por assunto, pois neste banco de informações não se utiliza busca por descritores.

No total foram encontrados 130 artigos, publicados entre 1990 e 2018, dos quais foram selecionados para esta pesquisa somente artigos que, na leitura dos resumos, se enquadrassem no tema: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico da *M. dubia*. Dos 130 artigos, 44 atenderam aos critérios estabelecidos,



sendo que os demais enfatizavam aspectos agronômicos, filogenéticos, de melhoramento genético e engenharia de produção não aplicáveis ao tema desenvolvido.

### 3 Aspectos botânicos

A *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh, é uma espécie da flora amazônica que apresenta característica diploide com  $2n = 22$  cromossomos, está distribuída em grande parte da Amazônia brasileira, nos estados do Pará, Amapá, Amazonas, Rondônia, Roraima e Mato Grosso. É encontrada, ainda, na Amazônia peruana e na Amazônia venezuelana (53). Tornou-se conhecida pela elevada concentração de vitamina C, além de produzir diversos compostos fitoquímicos bioativos (51).

Segundo Yuyama (52), a morfologia da *M. dubia* é de um arbusto lenhoso que pode medir de 1,5 a 4 metros de altura. Seu caule pode se apresentar de duas formas: um curto caule que se ramifica, assim que emerge do chão, ou um conjunto de caules que simultaneamente emergem do solo. Seu fruto tem aspecto bacáceo, globoso, com mesocarpo carnoso (gelatinoso) e esbranquiçado, de sabor cítrico; verde pálido quando imaturo e vináceo quando maduro, de 1,4 a 2,7 cm de altura e 1,6 a 3,10 cm de diâmetro. O fruto pode conter de 1 a 4 sementes, de aspecto reniforme, com fibrilas na superfície (52).

### 4 Composição Química

O fruto da *M. dubia* é rico em antioxidantes naturais, ácido ascórbico, vitamina E,  $\beta$ -caroteno e diversos compostos fenólicos, tais como flavonóides, taninos e ácidos fenólicos (54,55). Os compostos fenólicos possuem excelente atividade antioxidante por causa de suas propriedades redutoras e estrutura química que desempenham um papel importante na neutralização e sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, sendo capazes de atuar nos estágios de iniciação e propagação do processo oxidativo (56).

O fruto também contém uma gama de aminoácidos, ácidos orgânicos (como ácido cítrico, ácido isocítrico e ácido málico) e ácidos graxos (predominantemente ácido esteárico  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}]$ , linoleico ou ômega 6  $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7\text{COOH}]$  e oleico ou ômega 9  $[\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH} = \text{CH} (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}]$ , além dos carboidratos glicose e frutose (57).

### 3.1 Vitamina C

A concentração de vitamina C encontrada no camu-camu, equivale, de modo geral, a 40 vezes a de uma laranja e 55 vezes a de um limão (58).

Observando-se a tabela 01, percebe-se que há grande variação quanto à concentração de ácido ascórbico encontrada no fruto da *M. dubia*, de 861,73 a 6000 mg de ácido ascórbico por 100 g de fruto. Os fatores capazes de influenciar o teor de vitamina C do fruto incluem o estado de maturação, frutos mais verdes apresentam maior concentração da vitamina em questão, solo, clima, sazonalidade e método de quantificação. Apesar da variação apresentada pelos estudos, o camu-camu mantém sua posição de fruto com o maior teor de vitamina C (40,59).

Tabela 01: Concentração de Ácido Ascórbico na polpa ou suco de camu-camu expressa em mg por 100 g de fruto ou 100 mL de suco, de acordo com as respectivas publicações.

Referências	Concentração de Ácido Ascórbico
Yuyama, 2002 (40)	3571 – 6000 mg/100 g de fruto
Rufino, 2010 (60)	1882 ± 43.2 mg/100 g de fruto
Villanueva- Tiburcio, 2010 (59)	2191 mg/100 g de fruto
Andrade, 1995 (44)	2400 – 3100 mg/100 g de fruto
Justi, 2001 (61)	1380- 2050 mg/100 g de fruto
Nascimento, 2013(47)	861.73 ± 64.13 mg/100 g de fruto
Patroc, 2012 (62)	1686 mg/100 mL de suco
Neves, 2015(63)	1532.3 mg/100 mL de suco

### 3.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos apresentam uma característica comum, são derivados da mesma estrutura química, o benzeno, associada a um grupo hidrofílico. De acordo com sua estrutura e o modo de ligação de seus anéis polifenólicos, esses compostos são classificados em: flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (54). Entre as principais classes de flavonoides estão os flavonóis, as flavonas, as flavanonas, as antocianinas e as isoflavonas. Pertencendo ao subgrupo dos flavanois, a quercetina é o

flavanoide mais abundante nos alimentos, inclusive em frutos cítricos, como o fruto da *M. dubia* (54,56).

Outro flavanoide de elevada concentração no fruto da *M. dubia* são as antocianinas, presentes durante o processo de amadurecimento alteram a cor do fruto de verde a vermelho ou roxo (64). A cianidina-3-glicosídeo é antocianina mais frequente nesse fruto amazônico (65).

Conforme demonstrado na tabela 2, o camu-camu é um fruto rico em compostos fenólicos, principalmente flavanoides, com concentração variando de 12,9 mg a quase 1 g de flavanoides por 100 g de fruto. Apesar dos comprovados benefícios promovidos pelos flavanoides, não existe uma recomendação para a sua ingestão diária, apenas uma estimativa de consumo médio, que segundo Rodrigues (2003) (66) está entre 26 mg e 1 g/dia, para que e possam trazer benefícios à saúde.

<b>Referências</b>	<b>Antocianinas</b>	<b>Flavanoídes</b>	<b>Carotenóides</b>
<b>Rufino, 2010</b> (60)	42.2 ± 17.0 mg/100 g		0.4 ± 4.4 mg/100 g
<b>Zanatta, 2007</b> (64)	54 ± 25.9 mg/100 g		0,35 ± 0,26 – 1,1 ± 0,24 mg/100 g
<b>Maeda, 2006</b> (67)	9,98 ± 0,19 mg/100 g	183,27 ± 9 mg/100 g	
<b>Nascimento, 2013</b> (47)	9.98 ± 0.19 mg/100 g	400 mg/100 g	
<b>Semilla, 2009</b> (68)	74,04 mg/100 g	994,97 ± 194,0 mg/100 g	
<b>Patroc, 2012</b> (62)		400 mg/100 mL de suco	

Tabela 02: Concentração de antocianinas, flavanoídes e carotenóides no fruto camu-camu

Os compostos fenólicos podem agir protegendo os sistemas biológicos por meio da estimulação de enzimas antioxidantes, que facilitam a eliminação de compostos tóxicos endógenos e exógenos, além de reduzir a absorção de compostos tóxicos devido à inibição do citocromo P450 (69). Alguns compostos fenólicos são capazes de estimular as vias de reparo do DNA, através da transcrição, regulação ou estabilização de mRNA (15).

### 3.3 Minerais

O cálcio e o potássio são os minerais mais abundantes na *M. dubia* (Tabela 3). No entanto, segundo os dados apresentados por Ferreira (2016)(70), que demonstrou as maiores concentrações, o valor de cálcio para 100 g de fruto não alcançou a 10% do valor de ingestão diária recomendada (IDR), que é de 1000 mg (71). Já o valor de potássio por 100 g de amostra, se aproximou muito do IDR desse macromineral, que é de 2000 mg.

Tabela 03: Concentração de minerais na polpa e no suco de camu-camu

<b>Minerais</b>	<b>Patroc, 2012 (62)</b>	<b>Gonçalves, 2014 (72)</b>	<b>Ferreira, 2016 (70)</b>
<b>Cálcio (mg)</b>	7,18 /100 mL de suco	5,5 100 g de fruto	91,8-92,2 100 g de fruto seco
<b>Potássio (mg)</b>	14,27 /100 mL de suco	123,2 100 g de fruto	1170-1930 100 g de fruto seco
<b>Magnésio (mg)</b>	0,4 /100 mL de suco	8,8 100 g de fruto	58,3-95 100 g de fruto seco
<b>Sódio (mg)</b>	1,96 /100 mL de suco	146,3 100 g de fruto	
<b>Zinco (µg)</b>	0,52/100 mL de suco	0,23 100 g de fruto	3,2-3,5 100 g de fruto seco
<b>Cobre (µg)</b>	0,19 /100 mL de suco	0,09 100 g de fruto	0,3-0,5 100 g de fruto seco
<b>Ferro (µg)</b>	0,27/100 mL de suco	0,47 100 g de fruto	14-17,7100 g de fruto seco
<b>Manganês (µg)</b>	0,59/100 mL de suco	0,39/ 100 g de fruto	1,4-11 g de fruto seco

## 4 Potencial Farmacológico

### 4.1 Efeito anti-inflamatório

No estudo realizado por Inoue (2008) (48) 20 mulheres fumantes foram divididas em 2 grupos de 10 voluntárias, tratadas diariamente com 70 mL de suco de camu-camu (100%) e tabletes contendo 1050 mg de vitamina C, a mesma quantidade de vitamina encontrada nos 70 mL de suco do fruto. O tratamento foi realizado durante 7 dias. A principal descoberta desse estudo é que os marcadores de estresse oxidativo, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG)

urinário, os níveis séricos totais de espécies reativas de oxigênio (EROS) e os marcadores inflamatórios, proteína C reativa de alta sensibilidade (hsCRP), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8) diminuíram significativamente depois do tratamento diário com 70 mL do suco. No entanto, essas mudanças não foram observados após a ingestão diária de comprimidos com 1050 mg de vitamina C, em condições semelhantes. Esses resultados sugerem que o suco do fruto da *M. dubia* contém antioxidantes mais poderosos e melhor atividade anti-inflamatória, comparadas aos comprimidos de vitamina C isolada.

O trabalho desenvolvido por Azawa (2011) (73) demonstra que o pré-tratamento oral com extrato bruto de sementes de camu-camu (CCS) pode suprimir a formação de edema de pata induzido por carragenina em camundongos, por meio da inibição da inflamação localizada. Os efeitos do CCS sobre a síntese de óxido nítrico (NO) foram examinados nas células Raw264.7, que ao serem estimuladas por LPS (lipopolissacarídeos) mostraram níveis de NO significativamente aumentados em comparação às células tratadas com extrato, essa estimulação foi inibida na presença de CCS de maneira a demonstrar relação de dose-dependência.

#### 4.2 Efeito antígeno-tóxico e antineoplásico

A ação genotóxica e antígeno-tóxica do suco de *M. dubia* em células sanguíneas de camundongos foram analisadas usando o teste de cometa. Os animais foram distribuídos em 4 grupos de 10 integrantes e tratados com suco de camu-camu nas concentrações de 25%, 50% e 100% e água, para o grupo controle. O suco e a água foram administrados por gavagem na proporção de 0,1 mL para cada 10 g de peso do animal. Os animais do primeiro grupo receberam somente uma administração do suco e foram monitorados pelas 48 horas seguintes. O segundo grupo recebeu tratamento com suco durante 28 dias e o terceiro grupo foi tratado com suco durando 56 dias. Os animais do grupo controle foram mantidos nas mesmas condições que os demais, no entanto receberam a administração de água ao invés do suco. Apenas as concentrações de 50% e 100% desempenharam um papel modulador na genotoxicidade induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio), embora o suco de 25% exibisse um leve efeito antígeno-tóxico. A análise fitoquímica revelou a presença de saponinas, flavonóides e taninos no suco de *M. dubia*. Esses compostos presentes no fruto, juntamente com a vitamina C, provavelmente teve um papel fundamental papel na redução do dano do DNA induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (74).

#### 4.3 Efeito antioxidante

Na pesquisa desenvolvida por Solis (2009) (68), a avaliação da atividade antioxidante foi verificada por meio do sequestro de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e determinação do IC50 da *M. dubia*. O IC50 é definido como a concentração do aditivo que produz uma inibição de 50% de dano oxidativo. Os melhores resultados de IC50 foram verificados na casca e polpa do fruto da *M. dubia* com concentração de 146,94 µg/mL e 167,67 µg/mL, respectivamente.

Rafael (2010) (75) também apresentou resultados que sugerem um efeito protetor do extrato aquoso do fruto da *M. dubia* contra danos oxidativos provocados pelo KBrO<sub>3</sub> (bromato de potássio). Levine et al. (2001) (76) verificaram que a suplementação com vitamina C em humano diminui os danos no DNA induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estudos in vivo em células humanas (Sai et al., 1992) (20) mostram que elevadas concentrações intracelulares de ácido ascórbico reduzem mutações causadas por KBrO<sub>3</sub>. É provável que o elevado teor de vitamina C e compostos fenólicos presentes na *M. dubia* são responsáveis pelo efeito protetor evidenciado nos resultados.

#### 4.4 Efeito antimicrobiano e antiprotozoário

O fruto de *M. dubia* apresenta altos níveis de ácido elágico, taninos, cianidina, quercetina, catequina (5,7,16), rutina e kaempferol (46,55) componentes que estão relacionados à atividade antimicrobiana (50). Borges et al. (77) e Myoda (50) relataram propriedades antibacterianas e antifúngicas da folha, casca e extratos dos frutos de plantas do gênero *Myrciaria*, inclusive da *M. dubia*.

*M. dubia* pode ser considerado uma importante fonte para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de malária e leishmaniose, uma vez que seu extrato foi ativo contra o protozoário *Plasmodium falciparum* e apresentou atividade moderada contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, e não apresentou toxicidade para células humanas hepáticas HepG2, em testes in vitro (78).

#### 4.5 Efeito hipolipidêmico e hipoglicêmico

A ingestão do suco do fruto de *M. dubia* apresentou efeito modulador do perfil lipídico em ratos. Dentre as doses de suco utilizadas, a de 10 mL/kg foi a que apresentou melhor resposta sobre o perfil lipídico, reduzindo o colesterol total e o LDL-c (lipoproteína de baixa densidade) (62).

No estudo desenvolvido por Vargas (2015)(79), foram avaliados 18 voluntários de ambos os sexos com idades entre 21 e 31 anos. Os participantes foram distribuídos em dois grupos: grupo intervenção (GI) recebeu diariamente 8 cápsulas contendo 260 mg de pó de camu-camu e 320 mg de Vitamina C; e o grupo controle (GC) que recebeu diariamente cápsulas contendo 320mg de vitamina C sintética. No GI, após 15 dias de intervenção foi evidenciado aumento significativo nos valores séricos de ácido ascórbico (+ 25,8 %,  $p < 0,05$ ), reduções significativas na glicemia de jejum (-12,7 %;  $p < 0,05$ ), e no colesterol total (-19,3 %;  $p < 0,05$ ) e tendência de diminuição no LDL-c (-19 %;  $p > 0,05$ ) e nos triglicerídeos (-14,2 %;  $p > 0,05$ ).

Sabe-se que a enzima aldose redutase (AR) tem papel preponderante na manifestação do diabetes melitos. Os inibidores da aldose redutase são capazes de evitar a redução da glicose para sorbitol e, assim, reduzem as complicações diabéticas (80). Três compostos isolados da *M. dubia* demonstraram capacidade de inibição dessa enzima: 1) ácido elágico, 2) ácido 4-O-metilágico, 3) ácido 4-( $\alpha$ -ramnopiranosil) elágico. O composto 3 mostrou a mais forte inibição da AR recombinante humano (HRAR), e sua atividade inibitória contra o HRAR foi 60 vezes maior que a da quercetina (81).

No trabalho de Nascimento (2012) (47), a obesidade foi induzida nos ratos por meio de injeção subcutânea de glutamato monossódico. Os animais foram, então, divididos em 2 grupos: um grupo experimental tratado com 25 mL/dia de polpa do fruto da *M. dubia* (CCG) e um grupo não tratado (CG). A suplementação com a polpa induziu a perda de peso corporal no grupo CCG, com diminuição de 31,7% quando comparado com CG. Houve também redução no peso de tecido visceral (36,4%) e tecido epididimal (24%) no grupo CCG, enquanto no grupo CG esses tecidos sofreram aumento de 14,3% e 20,2%, respectivamente. O tratamento de ratos obesos com o fruto também reduziu o colesterol (39,6%), triglicerídeos (40,6%), LDL (2,14%) e VLDL (36,4%), em comparação com o aumento observado no grupo CG, colesterol (60%), triglicerídeos (44%), LDL (118%) e VLDL (14,3%). Uma redução de 44,5% nas atividades de insulina foi observada, bem como uma redução nos níveis de TNF- $\alpha$  (12,7%) em ratos obesos tratados com o fruto.



#### 4.6 Efeito Hepatoprotetor

Para avaliar o efeito protetor do suco de frutos contra a lesão hepática induzida por D-galactosamina (GalN), ratos foram alimentados com sucos de frutos liofilizados (12 tipos totais) durante 7 dias, e então a lesão hepática foi induzida por injeção de GalN. O aumento dos marcadores de lesão hepática ALT, AST, LDH e bilirrubina, induzido por D-galactosamina, foram significativamente suprimidos nos ratos alimentados com suco do fruto da *M. dubia*. Alguns outros sucos (acerola, fruta de dragão, shekwasha e carambola) também tendiam a ter efeitos supressivos, embora não houvesse significância estatística. O efeito hepatoprotetor da *M. dubia* foi principalmente atribuído ao composto 1-metilamato isolado do seu fruto (49).

#### 5 Conclusão

O fruto da *M. dubia*, por seus comprovados efeitos antioxidante, anti-inflamatório, microbicida, antígenotóxico, antidislipidêmico e hipoglicêmico, pode ser utilizado como alimento funcional, bem como apresenta elevado potencial para servir de fonte de princípios ativos para o desenvolvimento de novos fármacos que poderão ser empregados no tratamento e prevenção de diversas doenças.

# Capítulo II

O segundo capítulo será submetido à revista *Journal of Ethnopharmacology* em forma de artigo original. Essa é a revista oficial da Sociedade Internacional de Etnofarmacologia, tendo como objeto de publicação os resultados de pesquisas sobre o uso de plantas, fungos, animais, microrganismos e minerais e seus efeitos biológicos e farmacológicos. O fator de impacto da revista é de 3,115.

## **Efeito antitumoral do extrato hidroalcoólico do fruto da *Myrciaria dubia* (camu-camu) em tumor ascítico de Ehrlich**

### Resumo

Os tratamentos complementares que incluem a utilização de alimentos funcionais, fitoterápicos, atividades físicas, métodos psicológicos-comportamentais e, principalmente, plantas medicinais, estão sendo cada vez mais empregados como terapia alternativa no tratamento do câncer. A *Myrciaria dubia*, por apresentar compostos com atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimutagênica, possui elevado potencial de utilização na prevenção e tratamento das diversas neoplasias malignas. O presente trabalho visa demonstrar o efeito antitumoral do extrato bruto hidroalcoólico da casca do camu-camu (EBHC) em tumor ascítico de Ehrlich induzido em camundongos. Para o experimento, 16 camundongos fêmeas Swiss sofreram a indução do tumor ascítico de Erlich e foram distribuídos em 2 grupos de 08 animais. Um dos grupos recebeu tratamento com o EBHC, por gavagem, na concentração de 1 g de extrato por kg de peso do animal. Ao final do experimento, foi feita a coleta do líquido ascítico dos animais, para a realização de contagem celular total e análises morfométricas, e do sangue para verificação de marcadores inflamatórios e dos perfis hepático e renal, além das dosagens do lipidograma e glicemia. Os resultados demonstraram redução de peso e circunferência abdominal nos animais do grupo tratado com o extrato, com o peso sendo 11% menor nesse grupo,  $p < 0,01$ . Nas análises bioquímicas verificou-se a diminuição do TGO ( $p > 0,01$ ) e dos demais parâmetros ( $p > 0,05$ ), com exceção do triglicerídeo. Dos animais tratados com extrato, 4 não desenvolveram o tumor. Verificou-se, assim, que o EBHC apresenta significativo efeito de supressão da resposta inflamatória tumoral.

Palavras-chave: *Myrciaria dubia*, antitumoral, anti-inflamatório

### 1 INTRODUÇÃO

Devido ao alto custo e aos intensos efeitos colaterais associados aos tratamentos convencionais contra o câncer, muitos pacientes estão se voltando para as terapias alternativas ou não tóxicas (82). Frequentemente chamadas de complementares, não-ortodoxas ou não convencionais, essas terapias incluem a utilização de alimentos, fitoterápicos, plantas

medicinais, atividades físicas, bem como de métodos psicológico-comportamentais, visando uma melhor atuação do sistema imunológico no combate às células neoplásicas (83).

Câncer é uma terminologia que designa um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que apresentam capacidade de invadir tecidos e órgãos adjacentes, podendo por via linfática ou hematogênica, espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (12). Dividindo-se rapidamente, essas células possuem elevada agressividade, desencadeando um processo de proliferação incontrolável, que culmina com a formação de neoplasias malignas (13). O termo neoplasia significa literalmente novo crescimento e define condições de proliferação celular anormal, encontrada tanto em tumores benignos quanto em malignos (14).

Normalmente a presença de tumores benignos não coloca em risco a vida do indivíduo (14). Já os tumores malignos, têm a característica de serem potencialmente letais, podendo reincidir, tanto localmente como à distância do sítio primário, mesmo após o tratamento (15).

Existem três abordagens principais para o tratamento do câncer: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia (17). Embora existam fármacos consagrados no tratamento quimioterápico, nenhuma das abordagens terapêuticas atuais é capaz de regredir completamente as diferentes manifestações dessa doença (18). Além disso, o uso desses agentes anticancerígenos acarreta uma alta incidência de efeitos adversos que estão associados à sua elevada toxicidade e inespecificidade (20). Portanto, a descoberta de novos compostos bioativos com capacidade antitumoral e antineoplásica é crucial para que se tenha um tratamento eficiente contra os diversos tipos de neoplasias malignas, reduzindo os efeitos colaterais (82).

Para a determinação do efeito antitumoral e antineoplásico de novos compostos bioativos, faz-se necessário a utilização de modelos experimentais que simulem as neoplasias humanas sem comprometer os princípios éticos da pesquisa científica (84). Nessa perspectiva está o tumor de Ehrlich, desenvolvido em 1905, inicialmente era induzido e mantido sob a forma sólida com a inoculação de células de adenocarcinoma mamário, sendo transferido entre animais da mesma espécie (28). Em 1932, Loewenthal e Jahn (29) desenvolveram a forma ascítica do tumor, ao implantar células obtidas do tumor de Erlich na cavidade peritoneal de camundongos, observando o crescimento das células neoplásicas suspensas no fluido ascítico. Obteve-se, então, um modelo experimental eficiente para o desenvolvimento de estudos relacionados à biologia molecular do câncer, resposta inflamatória tumoral e farmacologia oncológica (28).

Muitos produtos naturais amazônicos têm sido utilizados em modelos experimentais de tumores para a identificação de princípios ativos com efeito antineoplásico e antitumoral. Diversas drogas utilizadas no tratamento de neoplasias malignas foram isoladas a partir de extratos botânicos, como o paclitaxel, os alcalóides da vinca, a camptotecina e a podofilina (85). Estudos sobre as atividades antineoplásicas de produtos naturais amazônicos apresentam resultados promissores, tais como a pesquisa desenvolvida por Ozi *et al* (2011) (86) na qual de 72 extratos de plantas da Amazônia e da Mata Atlântica foram utilizados para verificação de efeito citotóxico no carcinoma de células escamosas da cavidade oral, dos quais quatro extratos apresentaram efeito significativo.

A *Myrciaria dubia* (Kunth) *McVaugh* é uma planta frutífera pertencente à família Mirtaceae, amplamente distribuída na bacia amazônica. Seus componentes fitoquímicos atuam promovendo a melhora do perfil lipídico e redução do estresse oxidativo (46), redução dos níveis plasmáticos de glicose, insulina e lipídios (47), além de apresentarem atividades anti-inflamatória (48), hepatoprotetiva (49), antimicrobiana (50) e antigenotóxica (74).

No presente estudo, verificou-se o efeito antitumoral do extrato bruto hidroalcoólico da casca do fruto da *Myrciaria dubia* frente ao tumor ascítico de Ehrlich desenvolvido em camundongos fêmeas da linhagem *Swiss*.

## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Animais para o experimento

Foram utilizados 16 (dezesesseis) camundongos fêmeas da linhagem *Swiss*, com idade média de 3 (três) meses, distribuídos na proporção de 4 (quatro) animais por gaiola. Os animais receberam água potável e ração padrão, *ad libitum*, permanecendo em condições ambientais de temperatura de 22°C, umidade relativa média de 55% e exaustão contínua, obedecendo ao ciclo de claro e escuro, na proporção de 12 horas claro e 12 horas escuro.

### 2.2 Produção do extrato hidroalcoólico

Os frutos foram lavados, imersos, durante 15 minutos, em solução de hipoclorito de sódio diluído a 1%, despolpados, sendo a casca e a polpa separadas, congeladas a -80°C e liofilizadas em liofilizador do tipo L101 da marca Liotop (2008, São Carlos, Brasil). Em

seguida, para a confecção do extrato procedeu-se de acordo com o fluxograma representado na figura 01.

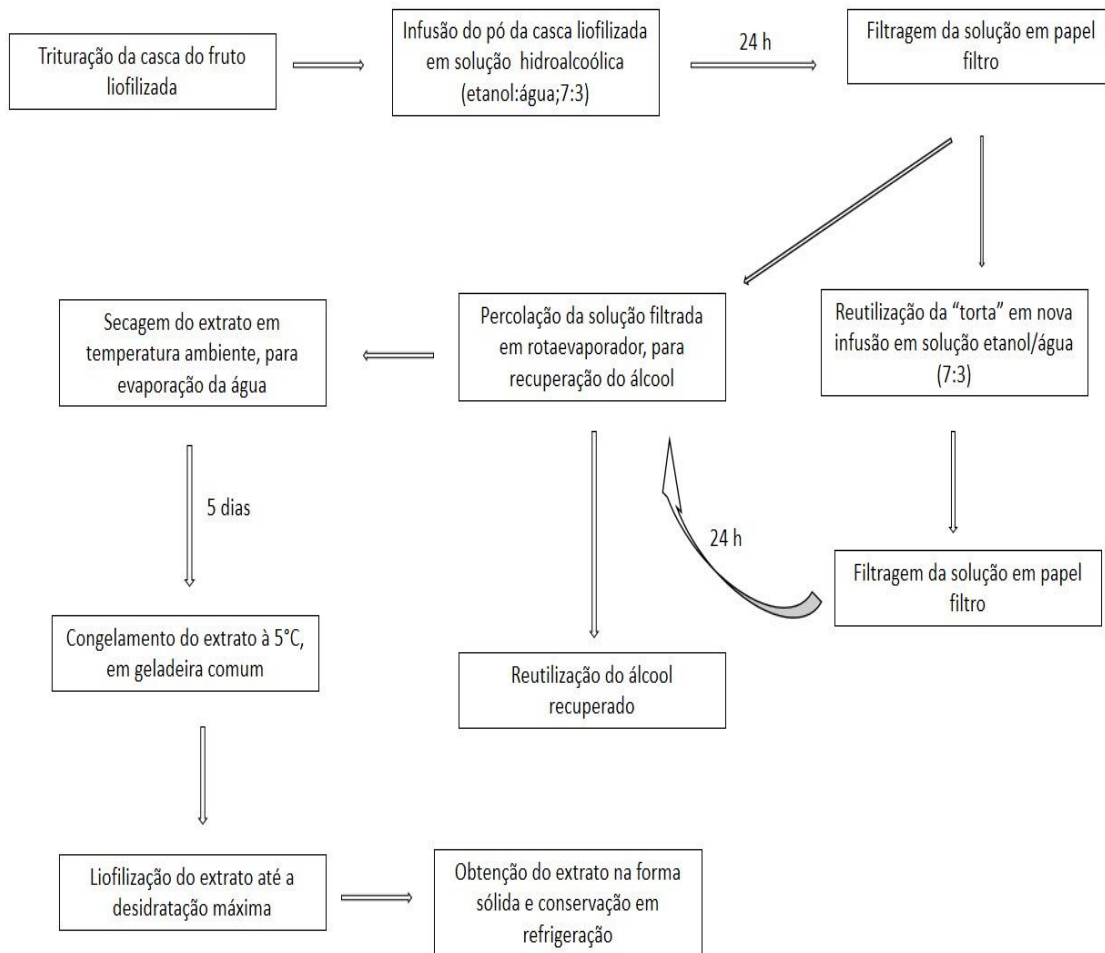


Figura 01 – Fluxograma de elaboração do extrato hidroalcoólico da casca do fruto da *M. dubia*

### 2.3 Inoculação das células do tumor de Ehrlich

As células de tumor de Erlich foram cedidas pelo Laboratório de Imunologia Celular aplicada à Saúde do Instituto Fiocruz – Rondônia, sendo mantidas em repique contínuo, feito a cada 10 dias mediante inoculação intraperitoneal em camundongos, que atuavam como reservatórios das células neoplásicas.

Para a indução do tumor, as células neoplásicas foram coletadas por punção peritoneal nos camundongos reservatórios. Após a retirada das células, foram realizadas três lavagens do líquido ascítico, diluindo-o em solução PBS (Tampão Fosfato Salino) 1%. A cada lavagem, o material foi centrifugado em centrífuga refrigerada (4 °C) a 373,3 g. Então, realizou-se a contagem e avaliação da viabilidade celular mediante o emprego do teste de exclusão com

azul de Tripan. A inoculação das células de tumor de Ehrlich foi feita por via intraperitoneal, injetando-se  $5 \times 10^6$  células/animal num volume igual a 0,2 mL. Todos os animais receberam células tumorais no tempo 0 do estudo.

#### 2.4 Delineamento experimental para avaliação da sobrevida e eficácia antitumoral

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 (dois) grupos compostos por 8 (oito) camundongos fêmeas:

- Grupo Controle (GC): sofreu a indução do tumor ascítico de Erlich sem o recebimento do tratamento.
- Grupo Tratamento (GT): sofreu a indução do tumor ascítico de Erlich e foi submetido ao tratamento com o extrato hidroalcoólico da casca do fruto na concentração de 1 g de extrato por 1 kg de peso do animal, diluídos em solução salina (0,1 mL/ 10 g).

O peso corporal dos animais foi registrado em dias alternados até o dia da eutanásia, 16<sup>º</sup> dia após o início do experimento. O desenvolvimento da ascite foi acompanhado mediante a mensuração da circunferência do abdômen de cada animal, utilizando-se fita métrica e o peso foi aferido por meio de balança de precisão. Os animais foram identificados por meio de marcação de listras no rabo, com pincel permanente.

#### 2.5 Coleta de sangue e líquido ascítico

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com associação de cloridrato de xilazina e cloridrato de quetamina, com doses de 7,5 mg/kg e 60 mg/kg, respectivamente. Em seguida foram eutanasiados por exsanguinação, com a coleta de aproximadamente 800 µL de sangue por punção cardíaca. O material coletado foi acondicionado em tubos de ensaio sem anticoagulante com gel separador, centrifugado a 1048 g e armazenado a 5 °C até às análises bioquímicas .

A coleta do líquido ascítico foi feita por meio de paracentese, punção em cavidade peritoneal, sendo armazenado em tubos Falcon e criopreservado a 5 °C para análises posteriores.

## 2.6 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram feitas por sistema de identificação espectrofotométrica em analisador bioquímico semi-automático Bioplus-2000 (2012, São Pulo), utilizando-se kits comerciais para dosagens dos analitos: transaminase glutâmica oxalacética (TGO), ureia, lactato desidrogenase (LDH), além das dosagens de glicose, triglicerídeos e colesterol total.

## 2.7 Contagem e vitalidade das células do líquido ascítico

A contagem e verificação de vitalidade das células do líquido ascítico coletado dos animais do experimento foi feita por meio do MOXI Z Mini Automated Cell Counter Kit (ORFLO, Ketchum, EUA). Para que o líquido ascítico coletado alcançasse a concentração dentro da faixa de sensibilidade do contador, entre  $5 \times 10^3$  (cinco mil) e  $5 \times 10^5$  (quinhentos mil) células, a amostra foi diluída 1.600 x em PBS 1%. A contagem foi feita em 75  $\mu$ L da amostra de diluída.

## 2.8 Aspecto Ético

A pesquisa foi aprovada pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Acre (UFAC), sob o número de processo 23107.02596/2016-54 e número de protocolo 49/2016.

## 2.9 Estatística

Todos os dados foram expressos em média e desvio padrão. Para verificar as diferenças estatísticas foi usado o teste de ANOVA e *t student* por meio do software GraphPadPrism® 7.04 (2017). As diferenças encontradas possuem um nível de significância de 0,01 ou 0,05.



### 3 Resultados

#### 3.1 Avaliação da sobrevida e eficácia tumoral

Na tabela 4 constam os dados do peso em g dos camundongos, mensurado em dias alternados do experimento.

Tabela 4: valores dos pesos dos camundongos em gramas por dia do experimento

Animais	Dias do experimento										Média	DP
	0	2°	4°	6°	8°	10°	12°	14°	16°			
<b>GT</b>												
<b>A1</b>	37	32,6	32,2	32,2	32,6	34,1	32,6	34	34,2	33,50	1,55	
<b>A2</b>	40,7	40,04	40,4	40,6	41,2	40	39,7	41,2	40,8	40,52	0,53	
<b>A3</b>	41,6	38,3	37,7	37,8	36,2	39,4	35,5	41,6	43,7	39,09	2,73	
<b>A4</b>	41,8	41,6	40,2	40	40,3	41,1	38,2	38,6	39,3	40,12	1,26	
<b>A5</b>	46,6	43,5	41,7	42,7	38,8	40,7	45,6	45,6	44,3	43,28	2,56	
<b>A6</b>	40,5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<b>A7</b>	34,4	33,8	37,2	36,5	31,8	34,6	37,3	34,94	-----	35,07	1,87	
<b>A8</b>	44,5	49,9	48,2	47,5	48,2	48,4	48	48,3	47,6	47,84	1,43	
<b>GC</b>												
<b>B1</b>	44,3	43,8	44,6	42	46,6	49,8	47,5	45,5	44,3	45,38	2,30	
<b>B2</b>	48,6	48,2	48,3	48	52,1	56,3	55,2	52,2	50,6	51,06	3,13	
<b>B3</b>	42,8	41,3	41,2	41,4	44,6	49,1	50,4	48,8	47,8	45,27	3,77	
<b>B4</b>	41,6	38,7	39,3	39,2	41,4	43,5	48,1	47,6	46,6	42,89	3,73	
<b>B5</b>	40,4	41,8	44,6	38,1	45,3	51,1	49,7	49	52	45,78	4,98	
<b>B6</b>	38,4	39,3	39,5	36,1	43,8	46,8	47,7	51,8	57,5	44,54	7,05	
<b>B7</b>	41,6	41,6	42,3	39,4	44,6	48,7	47,8	46,9	48,5	44,60	3,50	
<b>B8</b>	37	36,2	36	33,5	39,4	43,5	43,2	45,6	50,2	40,51	5,45	

----- Óbito

Os camundongos A6 e A7 do Grupo Tratamento morreram durante procedimentos do experimento.

Houve diferença quanto à comparação do peso apresentado pelos camundongos nos dados coletados a partir do 10° dia do experimento, conforme pode ser observado no gráfico (fig. 02). Os resultado de *p* encontrados para os dias 10, 12, 14 e 16 foram respectivamente de 0,0021, 0,0016, 0,0024 e 0,0045. Os animais do grupo GT, grupo tratado com extrato, apresentaram peso menor que os do grupo GC, que desenvolveram o tumor porém não receberam tratamento.

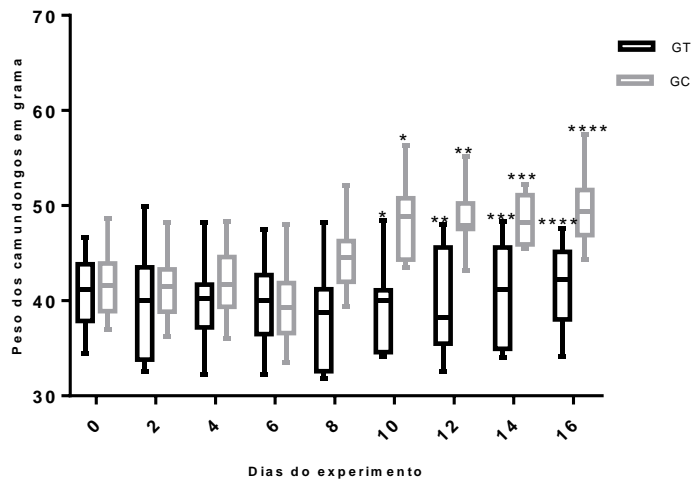


Figura 02- Análise de média e desvio padrão do peso em grama dos camundongos por dia de experimento. Os símbolos iguais representam diferenças significantes entre os grupos GT e GC ( $p < 0,01$ ),  $q = 1\%$ , nos dias 10 (\*\*), 12(\*\*), 14(\*\*\*) e 16 (\*\*\*\*).

Os dados referentes à aferição da circunferência dos animais estão apresentados na tabela 5. Sendo o dia 0 referente ao dia da inoculação das células tumorais e o último dia do experimento representado como dia 16.

Tabela 5: valores das circunferências abdominais em centímetros aferidas nos dias 0 e 16 do experimento

	Dias do experimento		
	0	16°	Variação
<b>GT</b>			
<b>A1</b>	9	8,5	-0,5
<b>A2</b>	9,2	9	-0,2
<b>A3</b>	9,5	10,5	1
<b>A4</b>	9,5	8,5	-1
<b>A5</b>	9,8	10	0,2
<b>A6</b>	8,7	-----	-8,7
<b>A7</b>	8,6	-----	-8,6
<b>A8</b>	10,5	9,5	-1
<b>GC</b>			0
<b>B1</b>	10	11	1
<b>B2</b>	9,7	11	1,3
<b>B3</b>	9,2	11	1,8
<b>B4</b>	9,7	10,5	0,8
<b>B5</b>	9,4	12	2,6
<b>B6</b>	8,5	12	3,5
<b>B7</b>	9,5	10,5	1
<b>B8</b>	9,2	12	2,8

A análise dos dados referentes às circunferências abdominais, permite inferir que só houve diferença significativa entre os dois grupos quanto à mensuração realizada no último dia (fig. 03). Não havia, portanto, diferença entre a circunferência dos animais dos grupos GT e GC no dia da inoculação das células tumorais, mas ao término do experimento os animais do grupo tratado com extrato, GT, apresentaram valores de circunferência abdominal significativamente menores em relação aos do grupo não tratado.

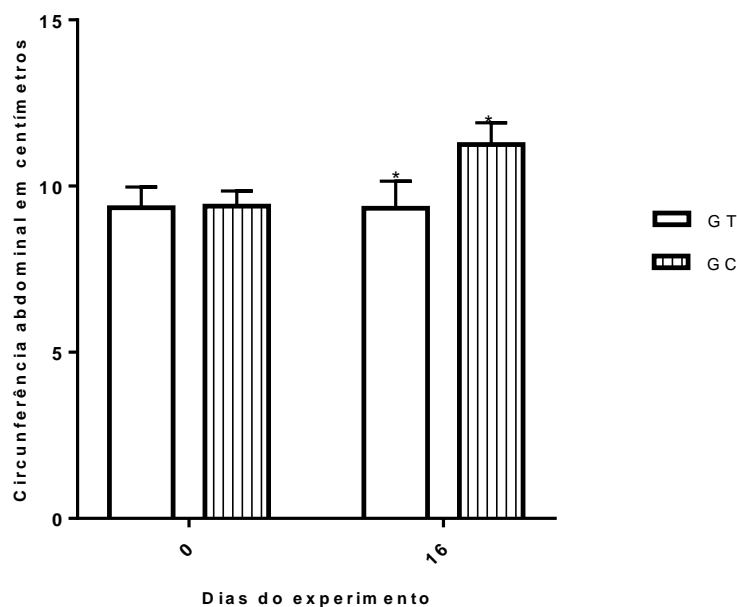


Figura 03 – Valores da circunferência abdominal em centímetros aferidas nos dias 0 e 16 do experimento. Os símbolos iguais representam diferenças significantes entre os grupos GT e GC ( $p < 0,01$ ),  $q = 1\%$ , no 16º dia do experimento.

### 3.2 Análises Bioquímicas

Os resultados das análises bioquímicas estão dispostos na tabela 06, de acordo com os parâmetros analisados.

Tabela 06: análises bioquímicas do soro dos camundongos pertencentes aos grupos A e B.

	<b>Triglicerídeo</b>	<b>Colesterol</b>	<b>Glicose</b>	<b>LDH</b>	<b>TGO</b>	<b>Ureia</b>
<b>VR</b>	87 ± 5,03	66 ± 2,8	112 ± 10,37	1407 ± 745	77,5 ± 6,8	45 ± 5,54
<b>GT</b>						
<b>A1</b>	40	36	211	947	*	63
<b>A2</b>	25	45	293	1676	157	31
<b>A3</b>	169	99	159	2793	360	85
<b>A4</b>	78	47	254	1763	172	88
<b>A5</b>	65	78	158	1894	*	47
<b>A6</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>A7</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>A8</b>	67	43	228	1919	165	50
<b>MEDIA</b>	74	58	217,17	1832	214	60,667
<b>GC</b>						
<b>B1</b>	191	76	16	3085	*	149
<b>B2</b>	92	76	193	*	*	127
<b>B3</b>	108	92	161	3643	682	38
<b>B4</b>	63	83	149	3740	502	157
<b>B5</b>	145	109	175	1336	645	84
<b>B6</b>	82	72	189	3473	525	224
<b>B7</b>	282	109	133	2696	487	52
<b>B8</b>	99	71	147	2477	467	82
<b>MEDIA</b>	132,75	86	145,38	2921	551	114,13
(-----) Óbito		(*) Amostra insuficiente		VF Valor de referência		

Aplicando-se os parâmetros bioquímicos analisados ao teste *t student*, verificou-se que somente no parâmetro transaminase glutâmica oxalacética (TGO) houve diferença entre os grupos de  $p < 0,001$ , enquanto que para os demais analitos a discrepância foi de  $p > 0,05$ , com exceção do triglicerídeo e com maior evidência para a dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH) (fig. 04).

Quando se faz a comparação dos resultados das análises bioquímicas com o valores de referência, verifica-se que o desenvolvimento do tumor ascítico desencadeou, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, além de alterações hepática e renal. Enquanto que o extrato apresentou efeito hipolipidêmico, com as médias dos valores referentes ao triglicerídeo e ao colesterol do GT inferiores aos valores de referência, além de ter atuado como hepatoprotetor e nefroprotetor, com a diminuição dos valores referentes ao TGO e à ureia. A glicemia foi único parâmetro bioquímico em que o grupo tratado com o extrato apresentou índices mais elevados que o grupo não tratado.



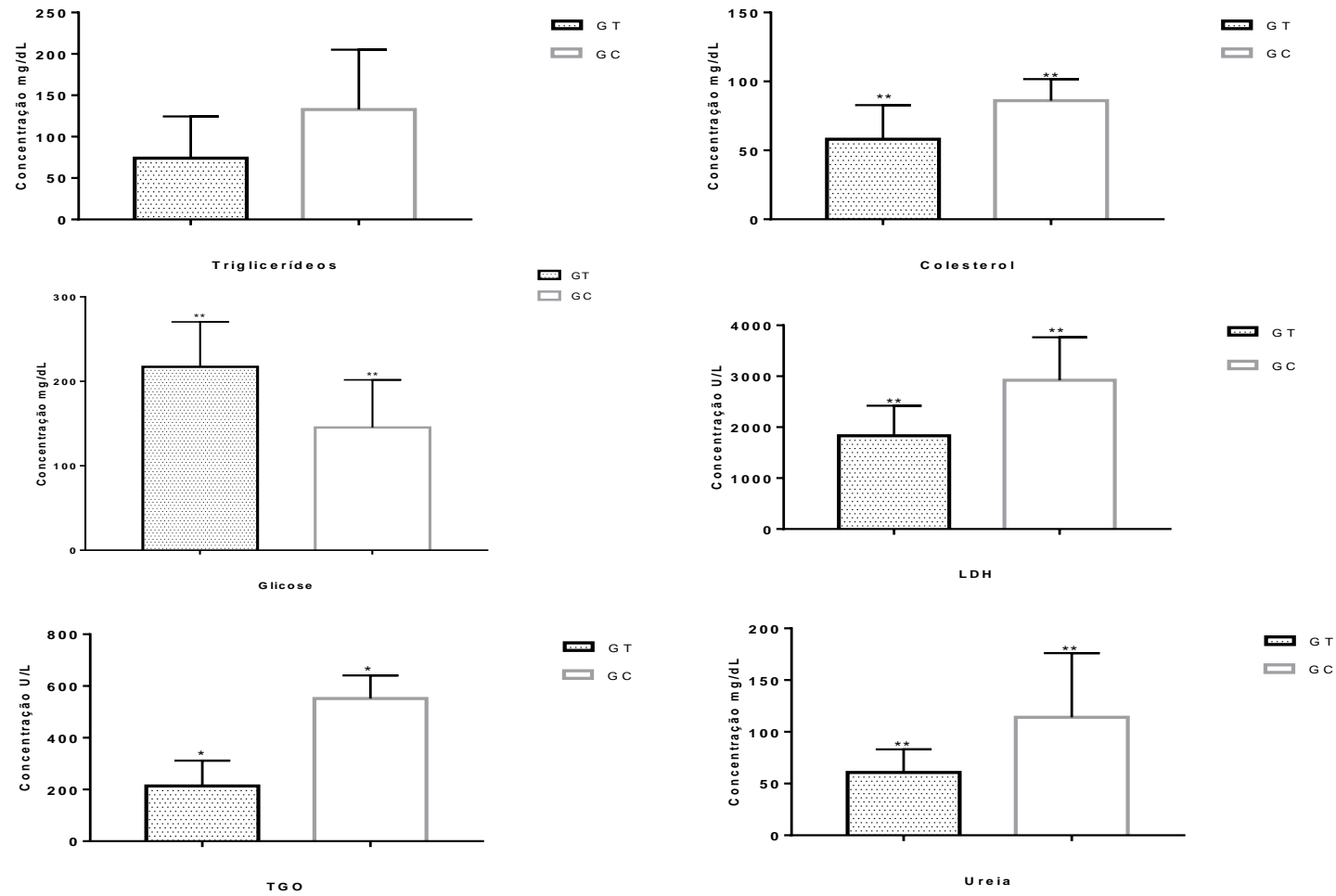


Figura 04 - Análises bioquímicas do soro dos camundongos pertencentes aos grupos GT e GC. Os símbolos iguais representam diferenças significantes entre os grupos GT e GC, sendo (\*) correspondente a  $p > 0,01$ ,  $q = 1\%$  e (\*\*) para  $p > 0,05$ ,  $q = 5\%$

### 3.3 Contagem global de células do líquido ascítico

Os dados obtidos a partir da contagem das células, com a mensuração de seus diâmetro e volume, podem ser observados na tabela 07.

Tabela 07: Contagem total de células e análises citométricas em 75µL de amostra de líquido ascítico diluída 1.600 x em PBS 1% por meio do MOXI Z Mini Automated Cell Counter Kit

	<b>Concentração (x10 células /mL)</b>	<b>Contagem</b>	<b>Diâmetro médio (µm)</b>	<b>Volume médio (pL)</b>	<b>MVI (%)</b>
<b>A3</b>	0,103	5132	13,629	0,994	70
<b>A5</b>	0,169	8443	12,268	0,725	75
<b>B1</b>	0,259	12939	12,665	0,798	69
<b>B2</b>	0,165	8233	13,496	0,965	73
<b>B3</b>	0,097	4841	12,982	0,859	75
<b>B4</b>	0,3	15008	12,31	0,732	78
<b>B5</b>	0,185	9239	12,265	0,725	71
<b>B6</b>	0,165	8246	11,963	0,672	68
<b>B7</b>	0,274	13680	11,615	0,615	74
<b>B8</b>					

Dos animais do GT que sobreviveram ao tratamento apenas 2 desenvolveram uma ascite perceptível, 4 não desenvolveram o tumor ascítico. Todos os animais do grupo não tratado com extrato hidroalcoólico do fruto da *M. dubia* (grupo B) desenvolveram o tumor ascítico (fig. 05 e 06). O tratamento estatístico dos dados da contagem total de células e das análises citométricas indicou não haver diferença significativa entre os grupos.

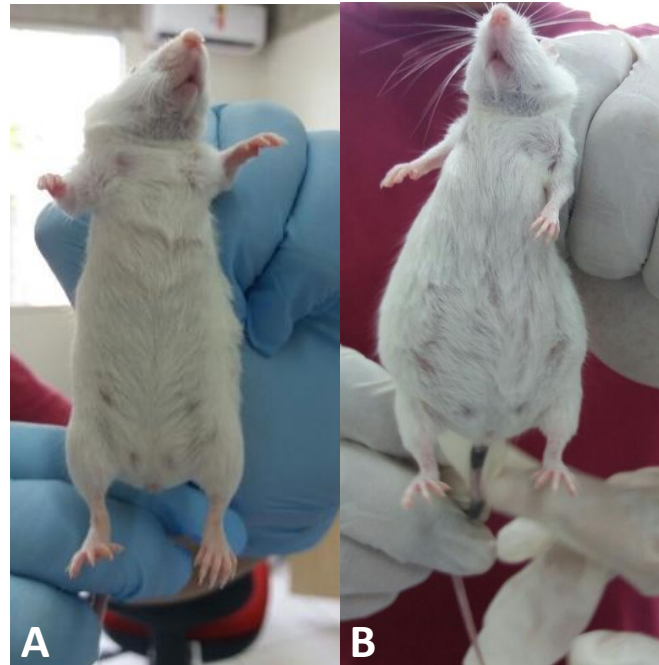


Figura 05 - A - fotografia de um camundongo do grupo A (A2) que não desenvolveu ascite; B – fotografia de um camundongo do grupo B (B8), no qual todos desenvolveram tumor ascítico.



Figura 06 - Laparotomia exploratório de camundongo do grupo A que não desenvolveu ascite (A) e de camundongo do grupo B com ascite (B).



### 3 Discussão

De acordo o estudo desenvolvido por Moshcov (2013) (31), o desenvolvimento mais significativo da ascite provocada pelo tumor de erlich ocorre após o 7º dia de inoculação, o que foi confirmado no experimento, sendo que a diferença mais relevante quanto ao peso e circunferência abdominal entre os animais dos grupos CC e CT ocorreu a partir do 10º, sendo que os animais do grupo tratado apresentaram peso 11,3% menor que os do GC.

Os menores valores de peso e circunferência abdominal observados nos animais do GT indicam que o extrato possui capacidade de regular a lesão e reposta inflamatória induzidas pelas células tumorais, que levam às alterações vasculares de vasodilatação e aumento da permeabilidade, culminando com o edema e, portanto, com o aumento de peso e volume abdominal dos animais acometidos pelo tumor. Hilbig *et al* (87) verificaram efeito semelhante utilizando extrato aquoso da planta *Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch.

A demonstração de inexistência de relação entre a contagem de células do líquido ascítico e o tratamento com o extrato pode ser explicada pelo fato de que o aumento da ascite, a partir do 7º dia de inoculação do tumor, ocorre sem crescimento significativo da população de células tumorais, como demonstrado por Moshkov em sua pesquisa com dopamina (31). O principal mecanismo responsável pelo aumento do volume do líquido ascítico não é a proliferação neoplásica, mas a intensidade da lesão e da resposta inflamatória induzida pelas células tumorais no peritônio, perceptível pelo intenso infiltrado leucocitário e aspecto hemorrágico do líquido ascítico.

A diminuição significativa dos parâmetros bioquímicos TGO e LDH, no grupo tratado com extrato, evidenciam seu efeito protetor no processo de lesão tecidual. A transaminase glutâmica oxalacética (TGO) é uma enzima presente nas células hepáticas e seu extravasamento para corrente sanguínea indica lesão de hepatócito. A diminuição desse parâmetro no grupo tratado com o extrato hidroalcoólico da casca do fruto da *M. dubia* indica efeito hepatoprotetor, que também foi demonstrado por Kachi *et al* (49) que, ao induzir lesão hepática com D-galactosamina, verificou o efeito protetor exercido pela substância 1-metilamato, importante componente do fruto da *M. dubia*. Da mesma forma a lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima distribuída pelos diversos tecidos do organismo, sendo um marcador generalista de lesão tecidual. A lesão induzida pelo tumor de erlich se dá principalmente devido à resposta inflamatória, portanto, a diminuição das enzimas indicadoras de lesão tecidual, TGO e LDH, comprovam o efeito anti-inflamatório do extrato

hidroalcoólico da casca do fruto da *M. dubia*, no desenvolvimento do tumor de erlich, resultado semelhante ao encontrado por Azawa et. al (2011) (73), ao tratar o tumor ascítico com o extrato metanólico da semente da *M.dubia*.

A dosagem dos níveis de ureia do GT, que se assemelhou às encontradas em condições fisiológicas normais, indica efeito protetor do extrato sobre tecido renal, potencial que ainda não havia sido atribuído à *M. dubia* na literatura. O efeito hipolipidêmico do fruto demonstrado nos estudos de Schwertz *et al* (2012) (62) e Vargas *et al* (79), foi confirmado no tratamento com o extrato hidroalcoólico da casca do fruto, no qual o grupo tratado apresentou valores médios de triglicérides e colesterol inferiores aos valores de referência.

O único parâmetro bioquímico em que os animais do GT, apresentaram valores superiores aos animais do grupo controle foi a glicose, o que pode ser explicado pela elevada concentração do extrato e pela presença de carboidratos como amido, glicose e frutose no fruto da *M. dubia* (88).

O não desenvolvimento do tumor de erlich em 4 dos camundongos do grupo que recebeu o tratamento, pode ser indicador de um efeito pró apoptótico do extrato nas células neoplásicas, bem como, pode demonstrar a capacidade do extrato de modular um tipo de resposta imune que seja capaz de debelar o tumor ascítico. O que indica a possibilidade de identificação e isolamento de substâncias presentes no fruto da *M. dubia* para utilização no tratamento do câncer.

## 5 Conclusão

O extrato bruto hidroalcoólico da casca do fruto da *M. dubia* foi capaz de evitar ou reduzir a resposta inflamatória tumoral e os efeitos lesivos causados pelo desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos Swiss. Como o extrato bruto contém grande diversidade de compostos com potencial bioativo, recomenda-se o seu fracionamento e a aplicação de suas frações em novos testes de verificação do efeito antitumoral, para a potencialização desse efeito e possível identificação dos princípios ativos.

# Capítulo III

O capítulo III será submetido em forma de artigo original à *BMC Research Notes*, que publica resultados de pesquisas cientificamente válidos que não podem ser considerados artigos completos de pesquisa ou metodologia. Seu fator de impacto é 1,54.

## **Efeito citotóxico do extrato hidroalcoólico do fruto da *Myrciaria dubia* sobre as linhagens leucêmicas THP-1 e K562**

### Resumo

A leucemia é uma neoplasia maligna que acomete as células sanguíneas, geralmente, de origem desconhecida. Os diversos tipos de leucemias são tratados com quimioterapia, sendo que diversas drogas utilizadas no tratamento dessa neoplasia foram isoladas a partir de extratos botânicos, como o paclitaxel, os alcalóides da vinca, a camptotecina e a podofilina. O presente estudo visa demonstrar o efeito citotóxico do extrato bruto hidroalcoólico da casca do fruto da *M. dubia* (EBHC) sobre as células das linhagens de leucemia monocítica aguda (THP-1) e leucemia mieloide crônica (K562). Para verificação do efeito as células das linhagens THP-1 e K562 foram plaqueadas e tratadas com o extrato pelo período de 24 e 72 horas. O MTT foi adicionado e após 4 h o seu excedente foi removido, sendo adicionado 100 µl de DMSO (PA) para solubilizar os cristais de formazan produzidos durante a incubação. Em seguida, as placas foram avaliadas espectrofotometricamente (540 nm) para se determinar a viabilidade celular. O teste in vitro demonstrou elevado potencial citotóxico do extrato para as células neoplásicas, principalmente as da linhagem K562, com redução significativa da viabilidade celular até mesmo na menor concentração testada (0,1875 mg) e  $IC_{50} = 0,28 \pm 3,13$  mg de extrato.

Palavras-chave: *Myrciaria dubia*, camu-camu, citotóxico, antileucêmico

## 1 INTRODUÇÃO

Os diferentes tipos de câncer apresentam a característica comum de se iniciarem com alterações celulares, marcadas por desvios nos mecanismos responsáveis pela proliferação e diferenciação das células e no processo de apoptose (13). Assim, o câncer surge quando uma célula, por diversas razões, perde o controle sobre seu ciclo, passando a dividir-se descontroladamente (89). As mutações ocorridas no DNA são as principais responsáveis pela mudança no repertório da expressão genética que ocasionam perda do controle do ciclo celular, determinando a manifestação de uma neoplasia (15).

A ocorrência de mutações genéticas podem resultar na ativação de proto-oncogenes em oncogenes e a inativação dos genes supressores tumorais (12). A ativação de proto-oncogenes

em oncogenes, pode levar à superexpressão de diversas proteínas e receptores responsáveis pelo crescimento, diferenciação e proliferação celular (93). Já a inativação de 27 genes supressores tumorais, particularmente o gene p53, leva à perda do controle da parada do ciclo celular em decorrência de um dano extenso ao DNA, ocorrendo conseqüentemente, a perda do estímulo para a apoptose (90). Muitos cânceres como o de mama, pulmão, cólon retal, ovário e próstata, têm sido associados com a inibição da apoptose, especialmente relacionada com a mutação do gene p53 (17).

A leucemia é uma neoplasia maligna que acomete as células sanguíneas, geralmente, de origem desconhecida (94). Tem como principal característica a proliferação de células imaturas anormais na medula óssea, que substituem o tecido hemopoietico convencional (95). A medula é o local de formação das células sanguíneas e ocupa a região esponjosa dos ossos (96). Nela são encontradas as células que dão origem aos leucócitos, que são as células de defesa, aos eritrócitos, que transportam o oxigênio e às plaquetas, responsáveis por reverter os processos hemorrágicos (94).

As leucemias são geralmente caracterizadas pela produção descontrolada de leucócitos anormais na medula óssea o que compromete a formação e a maturação das células normais (97). A leucemia mielóide tem a sua origem nas células da linhagem mielóide e a leucemia linfóide se origina de células da linhagem linfóide (94). Nos dois casos se observa um grande número de células neoplásicas no sangue periférico (94).

Todos os tipos de leucemias são tratados com quimioterapia para a destruição das células leucêmicas (98). No entanto, muitos tratamentos complementares, que incluem a utilização de alimentos funcionais, fitoterápicos, atividades físicas, métodos psicológicos-comportamentais e, principalmente, plantas medicinais, estão sendo cada vez mais empregados como terapia alternativa no tratamento do câncer (83).

Os produtos naturais apresentam grande diversidade de substâncias e propriedades farmacológicas. Diversas drogas utilizadas no tratamento de neoplasias malignas foram isoladas a partir de extratos botânicos, como o paclitaxel, os alcalóides da vinca, a camptotecina e a podofilina (85). Estudos sobre as atividades antineoplásicas de produtos naturais apresentam resultados promissores, tais como a pesquisa desenvolvida por Ozi *et al* (2011) (86) na qual, de 72 extratos de plantas da Amazônia e da Mata Atlântica que foram utilizados para verificação de efeito citotóxico no carcinoma de células escamosas da cavidade oral, quatro extratos apresentaram efeito significativo.

A *Myrciaria dubia* (Kunth) *McVaugh* é uma planta frutífera pertencente à família Mirtaceae, amplamente distribuída na bacia amazônica. Seus componentes fitoquímicos atuam promovendo a melhora do perfil lipídico e redução do estresse oxidativo (46), a redução dos níveis plasmáticos de glicose, insulina e lipídios (47), além de apresentarem atividades antiinflamatória (48), hepatoprotetiva (49), antimicrobiana (50) e antígenotóxica (74).

O presente estudo visa demonstrar o efeito citotóxico do extrato bruto hidroalcoólico da casca do fruto da *M. dubia* (EBHC) sobre as células das linhagens de leucemia monocítica aguda (THP-1) e leucemia mieloide crônica (K562), utilizando-se o teste MTT.

## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Produção do extrato hidroalcoólico

Os frutos foram lavados, imersos, durante 15 minutos, em solução de hipoclorito de sódio a 1% diluído na proporção de 10 gotas para 1L de água, despolpados, a pele e polpa separadas, congeladas a -80 °C e liofilizadas em liofilizador do tipo L101 da marca Liotop (2008, São Carlos, Brasil). Em seguida, para a confecção do extrato procedeu-se de acordo com o fluxograma representado na figura 07 para a confecção do extrato.

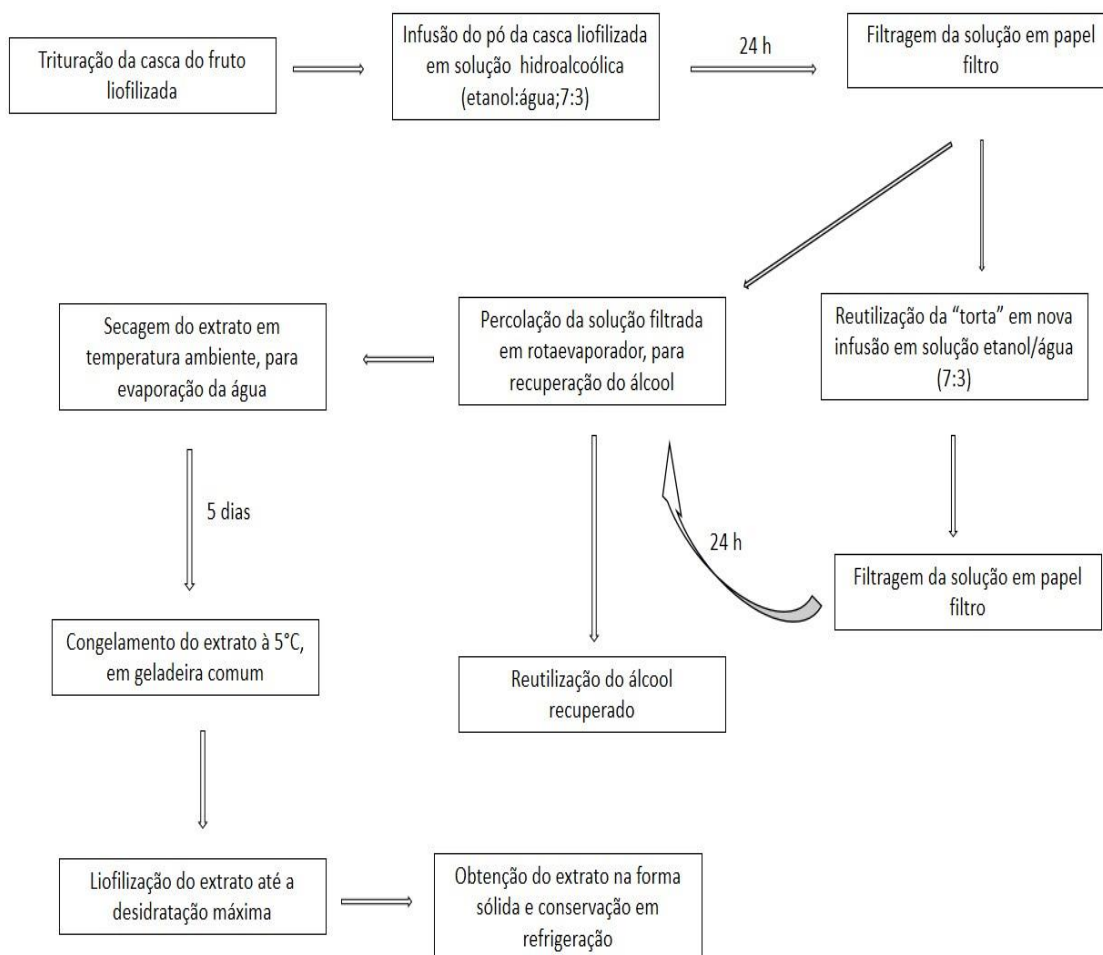


Figura 07 – Fluxograma de elaboração do extrato bruto hidroalcoólico da casca do fruto da *M. dubia* (EBHC).

## 2.2 Teste MTT

O MTT (brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil) é um sal de coloração amarelo-ouro, que é reduzido a formazan (um composto de coloração púrpura) pelo metabolismo mitocondrial. Desta forma, o MTT atua como um indicador da função mitocondrial e, por conseguinte, da viabilidade celular (99).

Para a avaliação do efeito citotóxico dos extrato de *Myrciaria dubia*, procedeu-se da seguinte maneira: células das linhagens THP-1 e K562 foram plaqueadas em placas de 96 poços, em uma densidade celular de  $5 \times 10^6$  células/mL e incubadas em uma estufa em ambiente controlado (temperatura de 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>). 24 horas após a incubação das células, o meio foi removido e substituído por outro meio contendo o extrato (100).

Após o seu tratamento pelo período de 24 e 72 horas o meio de cultura contendo os extratos foi retirado, e o MTT (1 mg/mL) foi adicionado, seguido de incubação por 4 horas, em ambiente controlado. Decorrido esse período, o MTT excedente foi removido, sendo adicionado 100 µl de DMSO (PA) para solubilizar os cristais de formazan produzidos durante a incubação. Em seguida, as placas foram avaliadas espectrofotometricamente com o auxílio de um leitor de placas (540nm) para se determinar a viabilidade celular (101).

### 2.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos por média  $\pm$  desvio padrão, analisados de forma independente. Os ensaios foram analisados por ANOVA seguido do teste de Bonferrone utilizando o programa Graph Pad versão 7.04 (2017).

## 3 Resultados

Os testes de citotoxicidade realizados nas células da linhagem de leucemia monocítica aguda (THP-1) indicam diferença de  $p < 0,001$  para concentração de 0,75 mg de extrato e de  $p < 0,0001$  para a concentração de 1,5 mg de extrato em relação ao grupo controle, no teste de 24 h. A concentração de 0,375 mg só apresentou diferença relevante no tratamento de 72 h (fig. 08). A concentração inibitória média capaz de promover 50% do efeito máximo (IC50) foi de  $1,15 \pm 4,21$  mg de extrato da casca do fruto da *M. dubia*.



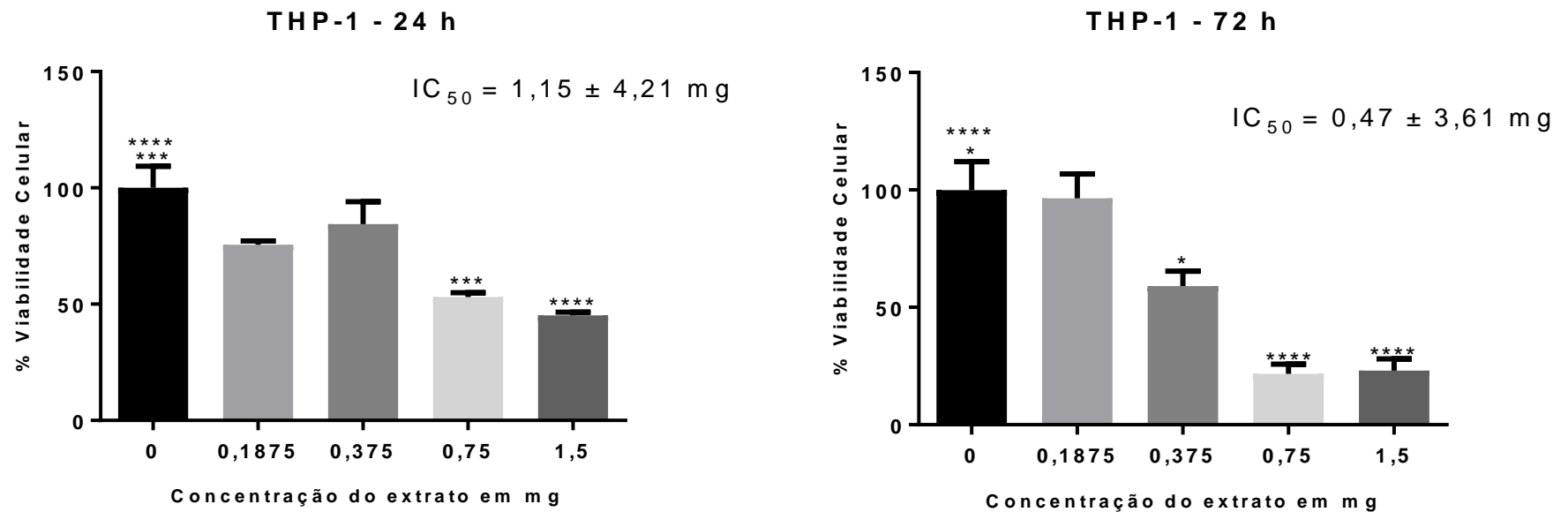


Figura 08 - Efeito citotóxico em células THP-1 em resposta ao aumento de da concentração do EBHC, tratamento de 24 e 72 h. Os símbolos iguais representam diferenças significantes entre os grupo controle, representado pela concentração 0, e os grupos tratados com diferentes concentrações de extrato, sendo (\*) correspondente a  $p < 0,05$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

A resposta das células de leucemia mieloide crônica (K562) ao extrato hidroalcolico apresentou diferença de  $p < 0,001$  para a concentração 0,1875, e de  $p < 0,0001$  para as concentrações 0,375, 0,75, e 1,5 mg de extrato, no tratamento de 72 h (fig. 09).

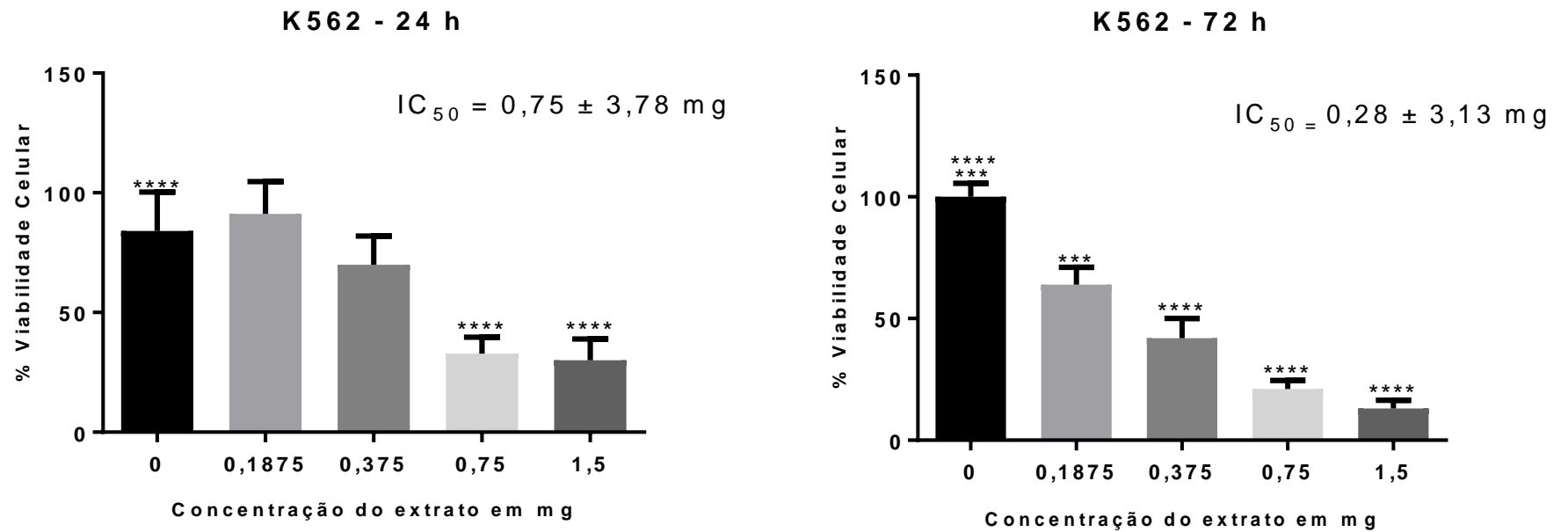


Figura 09 - Efeito citotóxico em células K562 em resposta ao aumento de da concentração do EBHC, tratamento de 24 e 72 h. Os símbolos iguais representam diferenças significantes entre os grupo controle, representado pela concentração 0, e os grupos tratados com diferentes concentrações de extrato, sendo (\*\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

#### 4 Discussão

O efeito citotóxico exercido pelo extrato sobre as células da linhagem de leucemia monocítica aguda (THP-1), só foi significativo a partir da concentração 0,75 mg de extrato, no tratamento de 24 h, e mesmo com elevação da concentração para 1,5 mg não houve diminuição proporcional da viabilidade celular. Tal efeito não demonstra relação de dose-dependência, o que dificulta a determinação de dose adequada do extrato para indução de pleno efeito antineoplásico e demonstra inespecificidade das reações promotoras de morte celular desencadeadas pelos componentes do extrato, resultado semelhante ao encontrado por Jasamai et al (2016) (102), ao testar o extrato etanólico de *Allium savitum* em células da linhagem K562.

Entretanto a resposta demonstrada pelas células de leucemia mieloide crônica, principalmente no tratamento de 72 h, indica relação de dose dependência, com a concentração do extrato sendo inversamente proporcional à viabilidade celular. Até a menor concentração do extrato demonstrou efeito citotóxico significativo, semelhantes aos resultados positivos de 04 dos 72 extratos aplicados por Ozi et al (2011) (86) em células do carcinoma escamoso de cavidade oral.

Essa relação de dose dependência demonstrada pelo efeito do extrato sobre a viabilidade celular, também encontrada por Ayesha (2014) (103) em seu estudo com os extratos de *Origanum syriacum* e *Thymus vulgaris*, indica sinalização de componentes do extrato via receptor de membrana citoplasmática, gerando a transdução de sinal intracelular que culmina com a efetivação da morte celular. Vários compostos fenólicos já identificados na *Myrciaria dubia* apresentam efeito pró apoptótico, tais como a quercetina (33) e a cianidina-3-glicose (104). No entanto, muitos outros estão por ser descobertos.

#### 5 Conclusão

O extrato bruto hidroalcoólico da casca da *M. dubia* apresenta uma grande quantidade de compostos bioativos ainda não identificados. O fracionamento desse extrato e a aplicação dessas frações em testes para verificação de efeito antineoplásico e antitumoral podem potencializar o efeito já demonstrada e permitir a identificação e isolamento dos compostos fitoquímicos responsáveis pelo efeito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Petrovska B. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev* [Internet]. 2012;6(11):1. Available from: <http://www.phcogrev.com/text.asp?2012/6/11/1/95849>
2. Halberstein RA. Medicinal plants: Historical and cross-cultural usage patterns. *Ann Epidemiol*. 2005;15(9):686–99.
3. Farnsworth NR, Morris RW. Higher plants - the sleeping giant of drug development. *American J Pharm* [Internet]. 1976;March-April:46–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6423811>
4. Walton NJ, Mayer MJ, Narbad A. Vanillin. *Phytochemistry*. 2003;63(5):505–15.
5. Bradbury RB, White DE. The Chemistry of Xubterranean Clover. Part I. Isolation of Formononetin and Genistein. *Commonw Sci Ind Res Organ Org*. 1951;
6. Dixon RA, Ferreira D. Genistein. *Phytochemistry*. 2002;60(3):205–11.
7. Miyazawa M, Sakano K, Nakamura SI, Kosaka H. Antimutagenic activity of isoflavones from soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *J Agric Food Chem*. 1999;47(4):1346–9.
8. Conklin KA, Conklin KA. Dietary Antioxidants During Cancer Chemotherapy : Impact on Chemotherapeutic Effectiveness and Development of Side Effects Dietary Antioxidants During Cancer Chemotherapy : Impact on Chemotherapeutic Effectiveness and Development of Side Effects. 2009;(February 2015):37–41.
9. Kumar DG, Parvathi V, Meenakshi P, Rathi MA, Gopalakrishnan VK. Anticancer activity of the ethanolic extract of *Crateva nur-vala* bark against testosterone and MNU - induced prostate cancer in rats. *Chin J Nat Med* [Internet]. 2012;10(5):334–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(12\)60067-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(12)60067-3)
10. Malta DC, Moura L de, Prado RR do, Escalante JC, Schmidt MI, Duncan BB. Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões , 2000 a 2011. *Epidemiol Serv Saúde*. 2014;23(4):599–608.
11. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. O câncer e seus fatores de risco. 2ª. Rio de Janeiro: INCA; 2013. 56 p.
12. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* [Internet]. 2009;458(7239):719–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07943>
13. Harrington KJ. The biology of cancer. *Med (United Kingdom)* [Internet]. 2016;44(1):1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2015.10.005>

14. Libenson L, Jena M. On The Definition, Cause and Nomenclature of Cancer. *Med Hypotheses*. 1978;4(2):277–81.
15. Soto AM, Sonnenschein C. The somatic mutation theory of cancer: Growing problems with the paradigm? *BioEssays*. 2004;26(10):1097–107.
16. OMS. Câncer. Ficha Inf [Internet]. 2018; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
17. Engers R, Gabbert HE. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2000;126(12):682–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11153140>
18. Dickens E, Ahmed S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surg (United Kingdom)* [Internet]. 2018;36(3):134–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.12.002>
19. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Basis of Colorectal Cancer. 2013;2449–60.
20. Sai K, Umemura T, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y. The Protective Role of Glutathione, Cysteine and Vitamin C against Oxidative Damage Induced in Rat Kidney by Potassium Bromate. Vol. 83, *Japanese Journal of Cancer Research*. 1992. p. 45–51.
21. OPAS/OMS. Câncer de mama é a 2ª principal causa de morte entre mulheres nas Américas; diagnóstico precoce e tratamento podem salvar vidas. 2016; Available from: [http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5273:cancer-de-mama-e-a-2a-principal-causa-de-morte-entre-mulheres-nas-americas;-diagnostico-precoce-e-tratamento-podem-salvar-vidas&Itemid=839](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5273:cancer-de-mama-e-a-2a-principal-causa-de-morte-entre-mulheres-nas-americas;-diagnostico-precoce-e-tratamento-podem-salvar-vidas&Itemid=839)
22. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2017. 130 p.
23. Silvia A, Makluf D. Avaliação da qualidade de vida em mulheres com câncer da mama. *Rev Bras Cancerol*. 2006;52(1):49–58.
24. Fenomenológica UC. Vivências de Familiares de Mulheres com Câncer de Mama : Experiences of Family Members of Women with Breast Cancer : A Phenomenological Approach. 2011;27:475–84.
25. Inumaru LE, Silveira EA Da, Naves MMV. Risk and protective factors for breast cancer: a systematic review. *Cad saúde pública, Rio Janeiro*. 2011;27(7):1259–70.
26. Frazier JL, Han JE, Lim M, Olivi A. Immunotherapy Combined with Chemotherapy in the Treatment of Tumors. *Neurosurg Clin N Am* [Internet]. 2010;21(1):187–94.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nec.2009.09.003>

27. Quilles MB, Carli CBA, Ananias SR, Ferreira LS. Antitumour and Anti-Infl ammatory Effects of Palladium ( II ) Complexes on Ehrlich Tumour. *Zeitschrift für Naturforsch.* 2013;68:293–301.
28. Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich ' s magic bullet concept : 100 years of progress. *Nat Rev cancer.* 2008;8(june):473–80.
29. Loewenthal H, Jahn G. Übertragungversuche mit carcinomatoser Mause Ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und Chemische Einwirkungen. *Zeitschrift Fur Krebsforsch Und Klin Onkol.* 1932;37:439–47.
30. Dagli MLZ, Guerra JL, Saldiva PHN. An Experimental Study on the Lymphatic Dissemination of the Soud Ehruch Tumor in Mice. *Braz J vet Res anim Sci.* 1992;29(1):97–103.
31. Moshkov DA, Romanchenko SP, Parnyshkova EY, Bezgina EN, Zaichkina SI, Pavlik LL. Effect of dopamine on ehrlich ascites carcinoma cells. *Bull Exp Biol Med.* 2013;154(5):686–91.
32. Mady EA. ANTITUMOR AND BIOCHEMICAL EFFECTS OF *Echis coloratus* CRUDE VENOM ON EHRlich ASCITES CARCINOMA CELLS IN VIVO. *J Venom Anim Toxins.* 2002;8:283–96.
33. Radhika M, Ghoshal N, Chatterjee A. Comparison of effectiveness in antitumor activity between flavonoids and polyphenols of the methanolic extract of roots of *Potentilla fulgens* in breast cancer cells. *J Complement Integr Med [Internet].* 2012;9(1). Available from: <https://www.degruyter.com/view/j/jcim.2012.9.issue-1/1553-3840.1644/1553-3840.1644.xml>
34. Pal S, Choudhuri T, Chattopadhyay S, Bhattacharya A, Datta GK, Das T, et al. Mechanisms of curcumin-induced apoptosis of Ehrlich's ascites carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288(3):658–65.
35. Kar B, Kumar RBS, Bala A, Dolai N, Mazumder UK, Haldar PK. Evaluation of antitumor activity of *mimusops elengi* leaves on Ehrlich's ascites carcinoma-treated mice. *J Diet Suppl.* 2012;9(3):166–77.
36. Silva AE, Santos FGA, Cassali GD. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. *Arq Bras Med Vet e Zootec.* 2006;58(4):658–61.
37. Segura JA, Barbero LG, Márquez J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell

- populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immunol Lett.* 2000;74(2):111–5.
38. Palermo-Neto J, De Oliveira Massoco C, Robespierre De Souza W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behav Immun.* 2003;17(1):43–54.
  39. Felipe D, Gentil DEO, Alberto S, Nascimento DO. PREPARAÇÃO DAS SUBAMOSTRAS , TEMPERATURA E PERÍODO DE SECAGEM NA DETERMINAÇÃO DO GRAU DE UMIDADE DE SEMENTES DE CAMU-CAMU ( *Myrciaria dubia* ( H . B . K . ) McVaugh ). *Rev Bras Sementes.* 2002;24:62–9.
  40. Yuyama K, Aguiar JPL, Yuyama LKO. CAMU-CAMU : UM FRUTO FANTÁSTICO COMO FONTE DE VITAMINA C. *Acta Amaz.* 2002;32(1):169–74.
  41. Ferreira M das GR, Ribeiro GD. Coleção de fruteiras tropicais da Embrapa Rondônia. *Comun Técnico* 306. 2006;1–14.
  42. Alberto S, Ferreira N, Gentil DFDO. PROPAGAÇÃO ASSEXUADA DO CAMU-CAMU ( *Myrciaria dúbia* ) ATRAVÉS DE ENXERTIAS DO TIPO GARFAGEM. *Acta Amaz.* 1997;27(3):163–8.
  43. Freitas CAB, Silva AS, Alves CN, Nascimento WMO. Characterization of the Fruit Pulp of Camu-Camu. *J Braz Chem Soc.* 2016;27(10):1838–46.
  44. Andrade JS, Aragão CG, Galeazzi MAM, Ferreira SAN. CHANGES IN THE CONCENTRATION OF TOTAL VITAMIN C DURING MATURATION AND RIPENING OF CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh) FRUITS CULTIVATED IN THE UPLAND OF BRASILIAN CENTRAL AMAZON. *Acta Horticulturae.* 1995;177–80.
  45. Sorifa M, Oh S, Eun J, Ahmed M. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu ( *myrciaria dubia* ) fruit : A review. *Food Reaserch Int.* 2011;44(7):1728–32.
  46. De Souza Schmidt Gonçalves AE, Lajolo FM, Genovese MI. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of brazilian native fruits and commercial frozen pulps. *J Agric Food Chem.* 2010;58(8):4666–74.
  47. Nascimento O V, Boleti ANAPA, Yuyama LKO, Lima ES. Effects of diet supplementation with Camu-camu ( *Myrciaria dubia* HBK McVaugh ) fruit in a rat model of diet-induced obesity. *An Acad Bras Cienc.* 2013;85(1):355–63.
  48. Inoue T, Komoda H. Tropical fruit camu-camu ( *Myrciaria dubia* ) has anti-oxidative



- and anti-inflammatory properties. *J Cardiol*. 2008;52:127–32.
49. Kachi TA, Hiina YS, Awaguchi TK, Awagishi HK, Orita TM, Ugiyama KS. 1-Methylmalate from Camu-Camu ( *Myrciaria dubia* ) Suppressed D -Galactosamine-Induced Liver Injury in Rats. *Biocience, Biotechnol Biochem*. 2010;74(3):573–8.
  50. Myoda T, Fujimura S, Park B, Nagashima T, Nakagawa J, Nishizawa M. Antioxidative and antimicrobial potential of residues of camu-camu juice production. *J Food, Agric Environ*. 2010;8(2):304–7.
  51. Camargo L, Xavier V, Alves E, Giselly C, Lima B, Ruffo S. Determining the harvest time of camu-camu [ *Myrciaria dubia* ( H . B . K . ) McVaugh ] using measured pre-harvest attributes. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2015;186:15–23.
  52. Yuyama K. A CULTURA DE CAMU-CAMU NO BRASIL. *Rev Bras Frutic*. 2011;33:335–690.
  53. Martin MP, Peters CM, Ashton MS. Revisiting Camu-camu (*Myrciaria dubia*): Twenty-seven Years of Fruit Collection and Flooding at an Oxbow Lake in Peruvian Amazonia. *Econ Bot*. 2014;68(2):169–76.
  54. Bataglion GA, Felipe MA, Eberlin MN, Koolen HHF. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC – MS / MS. *Food Chem*. 2015;180:280–7.
  55. Fracassetti D, Costa C, Moulay L, Tomás-barberán FA. Ellagic acid derivatives , ellagitannins , proanthocyanidins and other phenolics , vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit ( *Myrciaria dubia* ). *Food Chem*. 2013;139(1–4):578–88.
  56. Sousa CMDM, Silva HRE, Vieira GM, Ayres MCC, Da Costa CLS, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim Nova*. 2007;30(2):351–5.
  57. Langley PC, Jr JVP. Antioxidant and Associated Capacities of Camu Camu ( *Myrciaria dubia* ): A Systematic Review 1. *J Altern Complement Med*. 2015;21(1):8–14.
  58. Rodrigues RB, De Menezes HC, Cabral LMC, Dornier M, Reynes M. An Amazonian fruit with a high potential as a natural source of vitamin C: the camu-camu ( *Myrciaria dubia* ). *Fruits*. 2001;56(5):345–54.
  59. Villanueva-tiburcio JE, Condezo-hoyos LA, Asquieri ER. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). *Ciência e Tecnol Aliment*. 2010;30(1):151–60.

60. Rufino SM, Alves RE, Brito ES De, Pérez-jiménez J, Saura-calixto F, Mancini-filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem* [Internet]. 2010;121(4):996–1002. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>
61. Justi KC, Visentainer JV, Souza N. Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu-camu ( *Myrciaria dubia* ) pulp . *Arch Latinoam Nutr*. 2001;50(4):405–8.
62. Schvertz MC, Maia JRP, Souza RFS de, Aguiar JPL, Yuyama LKO, Lima ES. Efeito hipolipidêmico do suco de camu-camu em ratos. *Rev Nutr*. 2012;25(1):35–44.
63. Neves LC, Benedette RM, Chagas EA. CHARACTERIZATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF NATIVES FRUITS FROM THE BRAZILIAN AMAZON REGION. *Rev Bras Frutic*. 2012;34(4):1165–73.
64. Zanatta CF, Mercadante AZ. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chem*. 2007;101(4):1526–32.
65. Gómez JCC, Rodríguez FG, Amaral CA, Luis A. VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE VITAMINA C Y ANTOCIANINAS EN *Myrciaria dubia* “ CAMU CAMU .” *Rev la Soc Química del Peru*. 2013;79(4):319–30.
66. Rodrigues HG, Diniz YS, Faine LA, Almeida JA, Fernandes AAH, Novelli ELB. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. *Rev Nutr*. 2003;16(3):315–20.
67. Maeda RN, Pantoja L, Yuyama LKO, Char JM. DETERMINAÇÃO DA FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO NÉCTAR DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia* McVaugh). *Ciência e Tecnol Aliment*. 2006;26(1):70–4.
68. Solis VS, Doza LS, Sotero DG De, Correa SI. ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM PULP , CÁSCARA Y SEMILLA DEL FRUTO DEL CAMU CAMU (*Myrciaria dubia* H.B.K.). *Rev la Soc Química del Peru*. 2009;75(3):293–9.
69. Hodek P, Trefil P, Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem Biol Interact*. 2002;139(1):1–21.
70. Ferreira P, Ribeiro DA, Stringheta PC. Teor de vitamina C ,  $\beta$ -caroteno e minerais em camu-camu cultivado em diferentes ambientes. *Ciência Rural St Maria*. 2016;46(3):567–72.
71. Gonçalves AE de SS. Compostos bioativos do camu-camu ( *Myrciaria dubia* McVaugh ): caracterização e atividade biológica. Universidade de São Paulo; 2012.
72. Elisa A, Schmidt DS, Lellis-santos C, Curi R, Maria F, Inés M. Frozen pulp extracts of

- camu-camu ( *Myrciaria dubia* McVaugh ) attenuate the hyperlipidemia and lipid peroxidation of Type 1 diabetic rats. *Food Research Int* [Internet]. 2014;64:1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.074>
73. Azawa KY, Uga KS, Onma AH, Hirosaki MS, Oyama TK. Anti-Inflammatory Effects of Seeds of the Tropical Fruit Camu-Camu ( *Myrciaria dubia* ). *J Nutr Science Vitaminol*. 2011;57:104–7.
  74. Carlos F, Arruda A, Ledel A, Dauth C, Faria N, Nazário R, et al. Antigenotoxic effect of acute , subacute and chronic treatments with Amazonian camu – camu ( *Myrciaria dubia* ) juice on mice blood cells. *FOOD Chem Toxicol* [Internet]. 2012;50(7):2275–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.021>
  75. Rafael A, José P, José G, C FJ, Shiga B. Efecto citoprotector del camu-camu *Myrciaria dubia* en tres líneas celulares de ratón expuestos in vivo a bromato de potasio. *Rev Peru Biol*. 2010;17(3):389–92.
  76. Levine M, Wang Y, Padayatty SJ, Morrow J. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001;98(17):9842–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55540&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  77. Borges LL, Conceição EC, Silveira D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. *Food Chem* [Internet]. 2014;153:224–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.064>
  78. Carolina V, Correia DS, Lima NO, Augusto F, Oliveira DS, Paula A, et al. Major Article Evaluation of the antiplasmodial and leishmanicidal potential of *Myrciaria dubia* (Myrtaceae) extract. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(5):586–92.
  79. Vargas BL, Gonçalves IFA, Lúcia ID. Efeito das cápsulas de camu-camu sobre a glicemia e o perfil lipídico de adultos saudáveis. *Rev Cuba Plantas Med*. 2015;20(1):48–61.
  80. Terashima H, Hama K, Yamamoto R, Tsuboshima M, Kikkawa R, Hatanaka I, et al. Effects of a new aldose reductase inhibitor on various tissues in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 1984;229(1):226–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6423811>
  81. Mcvaugh K. Aldose reductase inhibitors from the leaves of *Myrciaria dubia*. *Phytomedicine*. 2004;11:652–6.

82. Spadacio C, Barros NF. Use of complementary and alternative medicine by cancer patients: systematic review. *Rev Saude Publica*. 2008;42(1):158–64.
83. CASSILETH BR. Alternative and Complementary Cancer Treatments. *Oncologist*. 1996;1:120–5.
84. Baillif R. The Solid Phase of the Ehrlich Ascites Tumor in Mice. *Cancer Res* [Internet]. 1954;14:554–8. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
85. Wall ME, Wani MC. Camptothecin and Taxol: Discovery to Clinic - Thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res* [Internet]. 1995;55:753–60. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-83242011000600008&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242011000600008&lng=en&tlng=en)
86. Ozi JM, Suffredini IB, Paciencia M, Frana SA, Dib LL. In vitro cytotoxic effects of Brazilian plant extracts on squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Braz Oral Res* [Internet]. 2011;25(6):519–25. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-83242011000600008&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242011000600008&lng=en&tlng=en)
87. Hilbig J, Policarpi P de B, Grinevicius VMA de S, Mota NSRS, Pedrosa RC, Block JM. Aqueous extract from Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell show activity against breast cancer cell line MCF-7 and Ehrlich ascites tumor in Balb-C mice. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.012>
88. Fujita A, Sarkar D, Wu S, Kennelly E, Shetty K, Inés M. Evaluation of phenolic-linked bioactives of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc . Vaugh ) for antihyperglycemia , antihypertension , antimicrobial properties and cellular rejuvenation. *FRIN* [Internet]. 2015;77:194–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.009>
89. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell*. 1991;64(2):327–36.
90. Katzenwadel A, Wolf P. Androgen deprivation of prostate cancer : Leading to a therapeutic dead end. *Cancer Lett* [Internet]. 2015;367(1):12–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.06.021>
91. Gunadharini DN, Elumalai P, Arunkumar R, Senthilkumar K, Arunakaran J. Induction of apoptosis and inhibition of PI3K/Akt pathway in PC-3 and LNCaP prostate cancer cells by ethanolic neem leaf extract. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2011;134(3):644–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.015>

92. Jiang Q, Yeh S, Wang X, Xu D, Zhang Q, Wen X, et al. Targeting androgen receptor leads to suppression of prostate cancer via induction of autophagy. *J Urol*. 2012;188(4):1361–8.
93. Yves I, Macêdo L De, Garcia LF, Raimundo J, Neto O, Carneiro K, et al. Electroanalytical tools for antioxidant evaluation of red fruits dry extracts. 2017;217:326–31.
94. Rose-inman H. Acute Leukemia. *Hematol Clin NA* [Internet]. 2017;31(6):1011–28. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.08.006>
95. Hanlon K. Chronic myeloid leukaemia Key points. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2017;1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.02.004>
96. Devereux S. Chronic lymphocytic leukaemia Key points. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2017;1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.02.001>
97. Principe MI Del, Buccisano F, Soddu S, Maurillo L, Cefalo M, Piciocchi A, et al. INVOLVEMENT OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN ADULT PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA: INCIDENCE AND IMPACT ON OUTCOME. *Semin Hematol* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.02.006>
98. Eby GA. Treatment of acute lymphocytic leukemia using zinc adjuvant with chemotherapy and radiation - A case history and hypothesis. *Med Hypotheses*. 2005;64(6):1124–6.
99. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-castro A. Acta Histochemica Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology : Viability assessment , fluorescence imaging , and labeling perspectives. *Acta Histochem* [Internet]. 2018;(December 2017):0–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>
100. Kwiecinski MR, Felipe KB, Schoenfelder T, de Lemos Wiese LP, Rossi MH, Gonçalves E, et al. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *J Ethnopharmacol*. 2008;117(1):69–75.
101. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63.
102. Jasamai M, Hui CS, Azmi N, Kumolosasi E. Effect of *Allium sativum* (Garlic) methanol extract on viability and apoptosis of human leukemic cell lines. *Trop J Pharm Res*. 2016;15(7):1479–85.

103. Ayesh BM, Abed AA, Faris DM. In vitro inhibition of human leukemia THP-1 cells by *Origanum syriacum* L . and *Thymus vulgaris* L . extracts. *BMC Res Notes*. 2014;1–6.
104. Hosseini MM, Karimi A, Behroozaghdam M, Javidi MA, Ghiasvand S, Bereimipour A, et al. Cytotoxic and Apoptogenic Effects of Cyanidin-3-Glucoside on the Glioblastoma Cell Line. *World Neurosurg* [Internet]. 2017;108:94–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2017.08.133>

## ANEXO I

### Critérios das Revistas

#### Artigo 1

O primeiro artigo será submetido à revista **Acta Amazônica**, tendo sido elaborado de acordo com as regras da revista disponíveis no sítio eletrônico:<  
[https://acta.inpa.gov.br/guia\\_ingles.php](https://acta.inpa.gov.br/guia_ingles.php)>.

#### Artigo 2

O primeiro artigo será submetido à revista **Journal of Ethnopharmacology**, tendo sido elaborado de acordo com as regras da revista disponíveis no sítio eletrônico:<  
<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-ethnopharmacology/0378-8741/guide-for-authors>>.

#### Artigo 3

O primeiro artigo será submetido à revista **BCM Research Notes**, tendo sido elaborado de acordo com as regras da revista disponíveis no sítio eletrônico:<  
<https://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/submission-guidelines/preparing-your-manuscript/research-note>>.

## ANEXO II

## Certificado de aprovação do CEUA

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE</b> <b>Comitê de Ética no Uso dos Animais</b>
<b>CERTIFICADO</b>	
<p>Certifico que a proposta intitulada “EFEITO PROTETOR DO FRUTO DA <i>Myrciaria dúbia</i> H. B. K. (McVough) (CAMU-CAMU) (MYRTACEAE) NA INDUÇÃO DO CÂNCER DE PRÓSTATA EM CAMUNDONGOS”, registrada com o número de processo 23107.025296/2016-54 e número de protocolo 49/2016, sob responsabilidade de <b>Romeu Paulo Martins Silva</b> – que envolve a produção manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – UFAC) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE, em reunião de <b>03/05/2017</b>.</p>	
Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/01/2017 até 20/05/2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo/ <i>Swiss/Mus musculus</i>
Nº de animais	Nº 60
Peso/Idade	3 meses/30g
Sexo	Macho
Origem	Biotério da Superintendência Federal de Agricultura do Acre.
 <hr/> <b>Prof. Dr. Henrique Jorge de Freitas</b> Coordenador CEUA/UFAC Portaria nº670 de 06 de março de 2015	
Campus Universitário Reitor Áulio Gélío Alves de Souza, BR 364, Km 04 – Distrito Industrial – Rio Branco–AC, CEP: 69.915-900 Fone (0xx68) PABX: 212-3500 <a href="http://www.ufac.br">http://www.ufac.br</a>	