

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

MARIANA GONÇALVES CORRÊA

**EFEITO DOS EXTRATOS DE CULTIVARES DE GOIABA EM LINHAGENS  
CELULARES HUMANAS DE CÂNCER DE MAMA**

Rio de Janeiro

2016

Mariana Gonçalves Corrêa

**EFEITO DE EXTRATOS DE CULTIVARES DE GOIABA EM LINHAGENS  
CELULARES HUMANAS DE CÂNCER DE MAMA**

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

Rio de Janeiro

2016

Corrêa, Mariana Gonçalves.

Efeito de cultivares de goiaba em linhagens celulares humanas de câncer de mama / Mariana Gonçalves Corrêa, 2016.

130 f. ;30 cm

Orientador: Anderson Junger Teodoro.

Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

1.Goiaba. 2. Câncer de mama. 3. Antioxidante. 4. Compostos bioativos. I. Teodoro, Anderson Junger. II.Universidade Federal do Estado do Rio Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e de Saúde. III.Curso de Mestrado em Alimentos e Nutrição. IV. Título.

CDD -

Mariana Gonçalves Corrêa

**EFEITO DE EXTRATOS DE CULTIVARES DE GOIABA EM LINHAGENS  
CELULARES HUMANAS DE CÂNCER DE MAMA**

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

Orientador: Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca examinadora

Dr. Anderson Junger Teodoro

Escola de Nutrição / Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

---

Dra. Claudia Cardoso Netto

Instituto Biomédico / Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro -  
UNIRIO

---

Dr. Leandro Miranda Alves

Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade Federal do Rio de Janeiro –  
UFRJ

## DECICATÓRIA

*Aos meus pais, Cristina e Jubert,  
e ao meu irmão Jubert, pela motivação e  
presença constante em minha vida...*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro, meu orientador neste trabalho, meus sinceros agradecimentos por ter me aceito como orientando. Obrigada pela oportunidade.

Aos meus pais que tanto amo, Cristina e Jubert, que sempre me apoiaram em tudo.

Aos meus amigos e familiares que sempre me incentivaram e, acreditaram em mim.

Ao meu marido, Maurillo, que sempre me incentivou nesta longa caminhada.

A amiga, Jessica Soldani, pelo apoio, paciência e auxílio em diversos experimentos.

A amiga/ chefe, Adriana Cavalcanti pelo incentivo e paciência durante todo o curso.

Aos meus professores pelos ensinamentos, incentivos, que muito contribuíram para a minha trajetória acadêmica.

*“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais retorna ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

## RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres, sendo a causa mais frequente de morte associada ao câncer em mulheres no mundo. Esta é uma doença complexa causada por um acúmulo progressivo de mutações genéticas múltiplas, combinada a outros fatores, sendo de extrema importância a melhoria nos protocolos de tratamento e prevenção. A utilização de alimentos funcionais e compostos quimiopreventivos, parece contribuir muito neste processo, atuando como mecanismo de ação antioxidante, anti-inflamatória, anti-hormonal e antiangiogênica. A goiaba apresenta elevado potencial funcional relacionado a pigmentos que estão envolvidos em processos de prevenção ao câncer por possuírem atividade antioxidante. O objetivo do trabalho foi a avaliação do efeito dos extratos de cultivares de goiaba (Pedro Sato, Hitígio e Tsumori) sobre a proliferação, ciclo celular e apoptose de diferentes linhagens cancerígenas humanas de mama em diferentes tempos de incubação. Na avaliação da ação antioxidante *in vitro*, o cultivar Pedro Sato (PS) apresentou a maior atividade com a solução extratora acetona 70%. Após 48 horas de tratamento, todos os extratos dos cultivares de goiaba promoveram redução da viabilidade celular da linhagem MDA-MB-235. Na linhagem MCF-7 após 24 de tratamento, os cultivares PS e HI foram os extratos mais eficazes. Os cultivares PS, Hitígio (HI) e TS promoveram o aumento de células na fase sub-G0, seguido de redução de células na fase G0/G1. Na linhagem MDA-MB-235, os cultivares PS e Tsumori (TS) foram capazes de aumentar o percentual celular na fase sub-G0, seguido por diminuição da fase G0/G1 e fase G2/M. Na análise do processo de apoptose, foi identificado um aumento relativo de 6 a 8 vezes após o tratamento com os extratos de goiaba na linhagem MDA-MB-235. Já na linhagem MCF-7, houve aumento relativo no processo de apoptose somente nos cultivares PS E HI. Os dados deste trabalho indicam um efeito-antiproliferativo dos extratos dos cultivares de goiaba sobre células de adenocarcinoma de mama.

**Palavras-chave:** Goiaba. Câncer de mama. Antioxidante. Compostos bioativos.



## ABSTRACT

The breast cancer is the most common neoplastic among women and the most lethal for females, being the most frequent cause of cancer related death in women worldwide. This is a complex disease caused by a progressive accumulation of multiple genetic mutations, associate with other factors, it is extremely important to improve treatment protocols and prevention. The use of functional foods and chemopreventive compounds, seems to contribute a lot in this process, acting for antioxidant, anti-inflammatory, anti-angiogenic and hormonal mechanism. The guava has a high potential functional related to pigments are involved in processes of cancer prevention by having antioxidant activity. In this sense, the objective is to obtain and evaluate the effect of guava extracts (Pedro Sato, Hitígio e Tsumori) on proliferation, cell cycle and apoptosis in different human breast cancer lines at different incubation times. The study of in vitro antioxidante action demonstrate higher activitie of Pedro Sato (PS) cultivar with the extraction solution of acetone 70%. After 48 hours of treatment, all extracts from guava cultivars promoted reduction of MDA-MB-235 cell viability. In MCF-7 line, after 24 hours of treatment, Pedro Sato and Hitígio were the most effective extracts. PS, HI and TS cultivars promoted the increase of cells in sub G0 phase, followed by a reduction of cells in G0 / G1 phase of the MCF-7 line. In MDA-MB-235 line, PS and TS cultivars were able to increase the cell percentage in sub-G0 phase, followed by decrease in G0 / G1 and G2 / M phases. In the process of apoptosis assay, an increase was identified on a 6 to 8 fold after treatment with guava extract on MDA-MB-235 line. There was a relative increase in the apoptosis process only in PS AND HI cultivars in the MCF-7 line. Data from this study indicate a antiproliferative effect of extracts of guava cultivars on breast adenocarcinoma cells.

**Keywords:** Guava. Breast cancer. Antioxidant. Bioactive compounds.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Goiaba dos cultivares Pedro Sato, Tsumori e Hitigio	<b>18</b>
<b>Figura 2</b>	Classes de compostos bioativos em alimentos	<b>23</b>
<b>Figura 3</b>	Visão esquemática do processo da carcinogênese e ação de quimioprevenção.	<b>26</b>
<b>Figura 4</b>	Atividade Antioxidante pelo método de DPPH (A), ABTS(B) e FRAP(C) de cultivares de goiaba extraídos por metanol(I), metanol 50%(II), extração sequencial com metanol 50% e acetona 70%(III) e acetona 70%(IV), etanol(VI) e água(VII).	<b>46</b>
<b>Figura 5</b>	Compostos fenólicos totais dos cultivares de goiaba extraídos por metanol(I), metanol 50%(II), extração sequencial com metanol 50% e acetona 70%(III) e acetona 70%(IV), etanol(VI) e água(VII).	<b>47</b>
<b>Figura 6</b>	Efeito dos extratos de cultivares de goiaba Tsumori(ETS), Pedro Sato (EPS) e Hitigio (EHI) (15-5000 mcg/mL) sobre a viabilidade celular de células MDA-MB-435 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento.	<b>49</b>
<b>Figura 7</b>	Efeitos dos extratos de goiaba sobre a viabilidade celular de células MDA-MB-235 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento. Células MDA-MB-235 visualizadas em microscópico não tratadas (CT) e após tratamento com duas concentrações dos extratos dos cultivares de goiaba.(PS,HI,TS).	<b>50</b>
<b>Figura 8</b>	Efeito dos extratos de cultivares de goiaba Tsumori(TS), Pedro Sato (PS) e Hitigio (HIT) (15-5000 mcg/mL) sobre a viabilidade celular de células MCF-7 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento.	<b>51</b>
<b>Figura 9</b>	Efeito do extrato de goiaba sobre a viabilidade celular de células MCF-7 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento. Células MCF-7 visualizadas em microscópico não tratadas (CT) e após tratamento com duas concentrações dos extratos dos cultivares de goiaba.(PS,HI,TS).	<b>52</b>
<b>Figura 10</b>	Efeito dos extratos de cultivares de goiaba sobre a progressão do ciclo celular em células MDA-MB 235 48 horas após a incubação.	<b>54</b>
<b>Figura 11</b>	Efeito Efeito dos extratos de cultivares de goiaba sobre a progressão do ciclo celular em células MCF-7 24 horas após a incubação.	<b>55</b>
<b>Figura 12</b>	Taxa de aumento relativo de apoptose nas linhagens MDA-MB-235 tratadas com extrato de goiaba após 24 horas.	<b>58</b>
<b>Figura 13</b>	Taxa de aumento relativo de apoptose nas linhagens MCF-7 tratadas com extrato de goiaba após 24 horas.	<b>60</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Componentes nutricionais encontrados em 100g de polpa de goiaba ( <i>P. Guajava</i> ).	<b>18</b>
<b>Tabela 2</b>	Valores de peso, dimensão °Brix, acidez e vitamina C em goiaba cultivar Pedro sato(PS), Hitigio(HI) e Tsumori(TS).	<b>23</b>
<b>Tabela 3</b>	Coordenadas de cor (L*a* b*) de amostras goiaba cultivar Pedro Sato(PS), Hitigio(HI) e Tsumori(TS).	<b>26</b>
<b>Tabela 4</b>	Efeito dos cultivares dos extratos de goiaba (1000 e 50000mcg/mL) sobre o processo de morte celular por apoptose nas células de adenocarcinoma de mama humano (MDA MB 235) 48h após a incubação.	<b>46</b>
<b>Tabela 5</b>	Efeito dos cultivares dos extratos de goiaba (1000 e 5000mcg/mL) sobre o processo de morte celular por apoptose nas células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) 24 h após a incubação.	<b>47</b>

## LISTA DE SIGLAS

$\mu\text{mol}$	Micromolar
ANOVA	análise de variância
AP-1	proteína ativadora
ATCC	american type Culture Collection
AUC	área abaixo da curva
B16F10	linhagem celular de melanoma
Bcap-37	câncer de mama humano
Bcl-2	célula-b de linfoma 2 (do inglês, b-cell lymphoma 2)
CBA	Compostos bioativos
cDNA	dna complementar (do inglês, complementary dna)
COX-2	ciclooxigenase-2
CPIR	taxa de inibição da proliferação celular
Ct	limiar de ciclo (do inglês, threshold cycle)
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DMEM	meio base de eagle modificado por dulbecco (do inglês, dulbecco's modified eagle's medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês, deoxyribonucleic acid)
DNase	enzima que catalisa a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiéster na estrutura do DNA
DPPH	radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR ou ERBB	fator de crescimento epidérmico
ERES	elementos do dna responsivos ao estrogênio
FITC	isotiocianato de fluoresceína (do inglês, fluorescein isothiocyanate)
FRAP	capacidade ferri-redutora
g	grama
G0	estado de quiescência das células durante o ciclo celular
G1	primeira fase do ciclo celular
G2	primeira fase do ciclo celular

GADPH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH-px	glutaciona peroxidase
GSTM <sub>1</sub>	glutaciona s-transferase m1
GSTP <sub>1</sub>	glutaciona s-transferase p1
HeLa	linhagem de adenocarcinoma humano de câncer cervical
HER-2	receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (do inglês, human epidermal growth factor receptor 2)
HER-3	receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 3 (do inglês, human epidermal growth factor receptor 3)
HER-4	receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 4 (do inglês, human epidermal growth factor receptor 4)
IL-1	interleucina-1
IL-12	interleucina-12
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
INCA	Instituto Nacional de Câncer
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
JNK	c-jun n-terminal quinase
K562	linhagem celular derivada de leucemia mielóide crônica humana
L	Litro
M	Mitose
MAPK	via de sinalização intracelular da quinase protéica ativada por mitógeno
MCF-7	linhagem celular epitelial derivada de um adenocarcinoma mamário humano
mcg/ml	micrograma/mililitro
MDA-MB-231	linhagem celular epitelial derivada de um adenocarcinoma mamário humano
MDA-MB-235	linhagem celular epitelial derivada de um carcinoma ductal mamário humano
MEK	mapk quinase
MGC-803	câncer gástrico humano
MMP-9	metaloproteinase de matriz-9
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro

MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NF-kappa B	fator nuclear kappa b
Nrf2	fator relacionado ao e2
ORAC	capacidade de absorção de radical de oxigênio
p53	proteína citoplasmática supressora de tumor
PBS	solução salina tamponada (do inglês, phosphate buffered saline)
PC3	câncer de próstata humano
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês, polymerase chain reaction)
PGR	gene do receptor de progesterona
PKC	proteína quinase c
PPAR- $\gamma$	receptor ativado por proliferadores de peroxissomos- $\gamma$
PRAB	isoformas A e B do receptor de progesterona
RE	receptor de estrogênio
RNA	ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RP	receptor de progesterona
RT-PCR	reverse transcription pcr
S	fase de replicação do dna durante o ciclo celular
SFB	soro fetal bovino
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral
TPTZ	reagente 2,3,5-cloreto trifeniltetrazolium
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
VCAM-1	moléculas de adesão celular vascular-1

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1	GOIABA: ASPECTOS NUTRICIONAIS E FITOQUÍMICOS.....	17
2.2	COMPOSTOS BIOATIVOS.....	21
2.4	COMPOSTOS BIOATIVOS X CÂNCER.....	25
2.5	CÂNCER DE MAMA.....	30
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
4.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	38
4.2	PREPARO DOS EXTRATOS.....	38
4.3	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	39
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRANTE DO RADICAL DPPH.....	39
4.5	ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIXODANTE TOTAL PELA CAPTURA DO RADICAL ABTS.....	40
4.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO – FRAP..	40
4.7	CULTURA DE CÉLULAS E PROTOCOLO DE TRATAMENTO.....	41
4.8	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE MTT.....	41
4.9	ANÁLISE DE CICLO CELULAR.....	42
4.10	AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE.....	42
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	44
5.1	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS DE CULTIVARES DE GOIABA.....	44
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE CULTIVARES DE GOIABA	45
5.3	AVALIAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.....	47
5.4	ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR.....	48
5.5	EFEITO DO EXTRATOS DE GOIABA NO CICLO CELULAR .....	53
5.6	EFEITO DO EXTRATOS DE GOIABA NA APOPTOSE.....	56
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	68
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	69

## 1. INTRODUÇÃO

A Goiaba é originária da América Tropical, e difundiu-se para todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. É uma planta da família Mirtáceas, do gênero *Psidium*, sendo a *Psidium Guajava L.* a espécie mais conhecida no Brasil (MANICA *et al.*, 2000). Sua produção em escala mundial no país teve início na década de 70, quando grandes áreas tecnificadas foram implantadas, com produção direcionada para o mercado nacional e internacional, na forma *in natura*, industrializada (doces e sucos) e desidratada (CHOUDHURY *et al.*, 2001).

GONZAGA NETO & SOARES *et al.*, (1994) relatam que apesar de existir vários tipos de goiabeiras com potencial para exploração econômica, a espécie *Psidium Guajava* tem grande interesse comercial. Existem plantios comerciais de goiabeiras em praticamente todas as regiões brasileiras, com destaque para os estados de São Paulo, Pernambuco e Bahia.

No Rio de Janeiro, a cidade de Cachoeira de Macacu é o maior produtor de doce do Goiaba de Mesa e o segundo maior do Brasil. A mesma região possui 3 tipos de cultivares de Goiaba (Pedro Sato, Hitígio e Tsumori), cerca de seis mil toneladas de goiaba são plantadas anualmente em uma área de 200 hectares (IBQH, *et al.*, 2011).

No Brasil, embora os trabalhos relacionados à seleção de plantas de goiabeira tenham sido realizados (Instituto Agrônômico e Embrapa), as principais variedades produtoras de frutos destinados ao consumo com fruta fresca, surgiram de trabalhos desenvolvidos por produtores de origem japonesa, que, pela seleção realizada em seus pomares, obtiveram plantas, cujo frutos apresentavam qualidades adequadas à comercialização. Essa seleção realizada pelos produtores propiciou o surgimento de cultivares importantes como a Kumagai, Ogawa, Pedro Sato e Hitígio.

Dentre as frutas tropicais brasileiras, a goiaba ocupa lugar de destaque, não só pelo seu aroma e sabor, como também pelo seu valor nutricional, o que coloca o Brasil na posição de maior produtor de goiabas vermelhas. O



consumo de goiaba in natura é considerado pequeno no Brasil, entretanto, o fruto constitui-se em matéria-prima para doces, geleias e sucos, com larga aceitação no mercado interno. A goiaba obtida como co-produto da industrialização pode ser considerada uma boa fonte de compostos naturais que tem atividade antioxidante significativa (MARTÍNEZ *et al.*, 2012).

Do ponto de vista nutricional, a goiaba é excelente fonte de vitaminas, minerais, fibras, carotenoides e flavonoides. Sendo que a composição média para cada 100g de poupa é: proteína (1g), cálcio (15 mg); ferro(1mg); vitamina A (0,06mg); tiamina(0,05mg); e fósforo(26mg), podendo variar de acordo com o cultivar, localização geográfica e condições de cultivo. Segundo a tabela da USDA (2006), a goiaba contém quatro vezes mais vitamina C (200-300mg) do que a laranja, que possui 50 mg de vitamina C.100 g<sup>-1</sup>, além de ser fonte de licopeno, com teor duas vezes maior do que o presente no tomate.

Aliados aos avanços da ciência e ancorados na divulgação das propriedades nutricionais dos alimentos e suas potenciais ações benéficas à saúde humana, prevenindo e tratando doenças, as frutas tropicais têm sido consideradas promotoras da saúde e peças-chave na promoção da qualidade de vida (MENCARELLI *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2010).

Muitos estudos têm relatado as propriedades antioxidantes dos sucos de frutas e polpas de frutas comestíveis (MOKBEL & HASHINAGA *et al.*, 2006). No entanto, existem poucas informações disponíveis sobre o valor medicinal e nutricional dos frutos subtropicais.

Desde 1930, estudos epidemiológicos têm demonstrado a relação entre dieta e risco de câncer, dentre eles o de mama (HILL *et al.*, 1997). Diferentes autores afirmam que o controle do peso corporal, a redução do consumo de gordura animal e alta ingestão de frutas, hortaliças e grãos integrais protegem contra o câncer (HILL, *et al.*, 1997; BÉLIVEAU *et al.*, 2007). Estudos confirmam a associação entre o consumo de nutrientes e compostos bioativos presentes em frutas e hortaliças e a redução do risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer (MIGNONE *et al.*, 2009; LEWIS *et al.*, 2009).

A partir do exposto acima, justifica-se a realização de pesquisas direcionadas ao estudo da goiaba e o seu efeito sobre células de câncer de mama humano, no intuito de avaliar a implicação dessa fruta sobre o desenvolvimento do câncer de mama.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Goiaba: Aspectos Nutricionais e Fitoquímicos

A fruticultura nacional tem grande potencial de expansão, pois há inúmeras frutas nativas e exóticas muito pouco exploradas economicamente, cujos estudos para expandi-las, na sua maioria, estão em andamento, como por exemplo, atemóia, maná, canistel, mirtilo, lichia, physalis, carambola, entre outras (KISS *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2002).

*Psidium guajava* (*P. guajava*) é uma planta nativa da América tropical e pertence à família *Myrtaceae*. *P. Guajava* é chamado de "guayaba" em países de língua espanhola e "goiaba" no Brasil. É uma fruta tropical importante amplamente cultivada em Taiwan, Hawaii, Tailândia, Filipinas e Malásia. Todas as peças, incluindo as frutas, folhas e cascas têm sido tradicionalmente utilizadas como medicamentos fitoterápicos e exibem muitos usos terapêuticos. (LEVY & CARLEY *et al.*, 2012).

Esta planta está disponível na América do Sul, Europa, África e Ásia. Os nomes comuns de *Psidium guajava* goiaba são (em Inglês), jambu batu (Malay), mansala (Índia) e guayaba (África) (SUL'AIN, ZAZALI & AHMAD *et al.*, 2012). O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de goiaba e maior parte da produção do país está destinada para a indústria alimentar para produzir diferentes produtos, como doces, sucos, geleias e polpa congelada. Na medicina tradicional extratos de raízes, cascas e folhas de goiaba têm sido utilizados para tratar uma ampla gama de doenças (LEVY & CARLEY *et al.*, 2012).

O fruto é constituído de uma baga, é carnosos, possui casca verde, amarelada ou roxa, com superfície irregular, de cerca de oito centímetros de diâmetro (GIACOMINO *et al.*, 2012). Em seu interior, há uma polpa rosada, branca ou dourada, contendo dezenas de pequenas sementes duras, mas que podem ser ingeridas sem causar problemas à saúde do homem. Os frutos são destinados para os mais diversos fins desde o consumo "*in natura*", bem como na indústria farmacêutica. Seus usos medicinais iniciaram com os índios que usavam tradicionalmente a decocção de folhas, flores e cascas de goiaba para

curar a disenteria, dor de garganta, vômitos, problemas de estômago, vertigem e para regularizar períodos menstruais. Seus usos tópicos são utilizados como antisséptico natural para ulcerações e feridas da pele (GIACOMINO *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Cultivares de Goiaba Pedro Sato, Tsumori e Hitigio

A literatura mostra bons efeitos sobre dor de dente, úlceras orais, gengivas inflamadas, dores no peito, dor de estômago, e tratamento de leucorréia, diarreia, disenteria, vômitos, convulsões e epilepsia, doenças psíquicas e alguns hiperglicemia. Foi considerado anti-malárico, anti-bacteriana, anti-séptico, cólica-alívio, anti-espasmódico, adstringente, anti-ulceroso, hipotensor, anti-inflamatória, antioxidante e anticancerígeno.

Nutricionalmente, a goiaba rende em média 68 calorias por 100 gramas, é uma boa fonte de fibra, e contém quatro vezes o teor de vitamina C de laranjas. A maior parte da vitamina C é encontrado na pele do fruto, que geralmente não é descascada antes do consumo. A quantidade de vitamina C é tão alta, que um purê de frutas foi utilizado por tropas aliadas na Segunda Guerra Mundial para fortalecer suas rações (SATO *et al.*, 2010). A tabela 1 mostra os componentes nutricionais encontrados na polpa da fruta.

O efeito protetor exercido pela goiaba tem sido atribuído à presença de compostos antioxidantes, principalmente os carotenoides, destacando o licopeno devido ao seu maior poder antioxidante, e o beta-caroteno, como fonte de vitamina A (RODRIGUEZ –AWAYA *ET AL.*, 2001; BARREIROS *ET AL.*, 2006, NASCIMENTO *et al.*, 2006).

**Tabela 1.** Componentes nutricionais encontrados em 100g de polpa de goiaba (*P. Guajava*)

	<b>Nutrientes (por 100g)</b>	<b>Sato et al., 2010</b>	<b>Joseph &amp; Priya, 2011</b>	
<b>Energia e macronutrientes</b>	Calorias (Kcal)	68	77 - 86	
	Proteína (g)	2,55	0,1 - 0,5	
	Lipídeo (g)	0,95	0,43 - 0,7	
	Carboidrato (g)	14,32	9,1 - 17	
	Fibras totais (g)	5,4	0,9 - 1 (Crude fiber)	
<b>Minerais</b>	Cálcio - Ca (mg)	18	17,8 - 30	
	Ferro - Fe (mg)	0,26	200 - 400 (I.U.)	
	Potássio - K(mg)	417	-	
	Sódio - Na (mg)	2	-	
	Zinco - Zn (mg)	0,23	-	
	Selênio - Se (mcg)	0,6	-	
<b>Vitaminas</b>	Vitamina C (mg)	228,3	-	
	Tiamina (mg)	0,067	0,03 - 0,04	
	Riboflavina (mg)	0,04	0,6 - 1,068	
	Niacina (mg)	1,084	40 (I.U.)	
	Vitamina B3 (I.U)	-	35	
	Vitamina B6 (mg)	0,11	-	
	Folato (mcg)	49	-	
	Vitamina A (I.U.)	624	0,046 (mg)	
	Beta caroteno (mcg)	374	-	
	Vitamin E alpha-tocoferol (mg)	0,73	-	
	Vitamin K filoquinona (mcg)	2,6	-	

Fonte: adaptado de Sato et al., 2010 e Joseph & Priya, 2011

O licopeno, que aparece atualmente como um dos mais potentes antioxidantes, vem sendo sugerido como importante composto para prevenção da carcinogênese e aterogênese, por proteger moléculas como lipídios, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), proteínas e DNA (AGARWAL. S; RAO. A.V *et al.*, 2000). O atual e crescente interesse em estudar o licopeno provém de sucessivas observações sobre o possível papel protetor deste componente dietético em doenças degenerativas. (AGARWAL. S; RAO. A.V *et al.*, 2000). Outro aspecto da atividade dos carotenóides diz respeito à polaridade. Os apolares, como licopeno e beta caroteno são mais regeneradores do que

preventivos, combatendo os radicais formados mais no interior da membrana (RODRIGUEZ –AWAYA *ET AL.*, 2001; BARREIROS *ET AL.*, 2006, NASCIMENTO *et al.*, 2006), tornando-se importante avaliar a presença dessas substâncias em produtos processados derivados de fruta (CAMPELO *et al.*, 2008).

Assim, a quantificação destes compostos em produtos fonte de goiaba pode conduzir a uma valorização do produto junto do consumidor em virtude do seu uso podendo constituir uma alternativa mais saudável (POKORNY; YANISHILIEVA *et al.*, 2001). Evidências epidemiológicas crescentes no papel de antioxidantes na prevenção de certas doenças têm conduzido ao desenvolvimento de grande número de métodos para determinação de capacidade antioxidante de determinadas substâncias (VASCONCELO *ET AL.*, 2007; PEREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO *et al.*, 2006).

Além dos carotenoides, as frutas, principalmente as que apresentam a coloração vermelha/azul, são as mais importantes fontes de compostos fenólicos em dietas alimentares. Muitos destes compostos apresentam vários efeitos biológicos, incluindo ações antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora. Estes compostos fenólicos apresentam diversas funções de defesa para as plantas, não somente contra agentes do ambiente (luz, temperatura e umidade), mas também para fatores internos, incluindo diferenças genéticas, nutrientes, hormônios, contribuindo para a sua síntese (AHERNE & O'BRIEN *et al.*, 2002).

Além disso, a goiaba é rica em ácidos taninos, fenóis, triterpenos, flavonóides, os óleos essenciais, as saponinas, as lectinas, vitaminas, fibras e ácidos gordos, particularmente licopeno, como citado anteriormente, substância importante na prevenção de alguns tipos de câncer. A fruta contém açúcares, ferro, cálcio, fósforo e vitaminas A e B (para além de C) em concentrações mais elevadas do que a maioria dos outros frutos.

Esses compostos bioativos, tais como vitaminas, compostos fenólicos e pigmentos, são em sua maioria metabólitos secundários, que geralmente, estão relacionados com os sistemas de defesa das plantas contra a radiação ultravioleta ou as agressões de insetos ou patógenos, mas que nos seres humanos, em baixas concentrações, desempenham um importante papel de proteção como agentes antioxidantes, capazes de retardar ou inibir a oxidação

de diversos substratos (HALLIWELL; GUTTERIDGE *et al.*, 2000; MANACH *et al.*, 2004). Os compostos fenólicos estão entre as mais difundidas classes de metabólitos secundários, sendo conhecidos pela sua grande importância no sistema de defesa das plantas, onde a maioria dos estudos relaciona esses compostos com estresse metabólico, parede celular e exsudatos de raízes e sementes (MANACH *et al.*, 2004).

## **2.2. Compostos Bioativos**

Além dos macro e micronutrientes essenciais, a dieta habitual fornece alguns compostos químicos, presentes em sua maioria, em frutas e hortaliças, que exercem potente atividade biológica, já comprovada por vários pesquisadores. Esses compostos são chamados de compostos bioativos (CBAs) ou, algumas vezes, de fitoquímicos e podem desempenhar diversos papéis em benefício da saúde humana (CARRATU; SANZINI *et al.*, 2005).

Existem convincentes evidências científicas em favor da associação entre dieta e doenças crônicas. Baseado em tais evidências, diretrizes dietéticas foram formuladas ao redor do mundo para a prevenção de doenças crônicas tais como câncer, doença cardiovascular, diabetes e osteoporose (RAO & RAO *et al.*, 2007).

A constatação de que dietas ricas em vegetais, como a da população mediterrânea contemporânea e da população asiática, reduzem o risco das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) impulsionou pesquisas que identificaram substâncias nutrientes e não nutrientes atuantes em alvos fisiológicos específicos e que, dessa forma, interferem nos processos patogênicos dessas doenças.

Essas evidências resultaram, entre outras coisas, em mudanças nas recomendações dos guias alimentares, os quais passaram a indicar a ingestão de maior número de porções de frutas e de hortaliças na dieta (SABATE *et al.*, 2003; LARSEN *et al.*, 2003; MINICH & BLAND *et al.*, 2008). Alimentos de origem vegetal são fontes de energia, proteína, vitaminas e minerais e a única ou principal fonte de vitamina C, folato, fibras e compostos bioativos (CBAs), dos quais o metabolismo humano também é dependente.

Em um novo paradigma, a ingestão insuficiente de CBAs provenientes de vegetais constitui importante componente de risco das DCNT, contribuindo na mesma magnitude do consumo excessivo de energia e de gorduras totais e saturadas na dieta. Isso indica que os CBAs, da mesma forma que os demais nutrientes, são essenciais para que se atinja a carga completa (geneticamente determinada) de longevidade. Segundo esse novo paradigma, as DCNT seriam doenças relacionadas também à deficiência de substâncias “essenciais para a longevidade” (WILLIAMSON & HOLST *et al.*, 2008; JACOBS & TAPSELL, *et al.*, 2007). O aumento da ingestão de ácidos graxos saturados (AGS) pela dieta favorece a ativação da resposta inflamatória e, conseqüentemente, o aumento do risco para DCNT (KENNEDY *et al.*, 2009), já que os AGS estimulam a via de sinalização do fator de transcrição denominado fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), que resulta no aumento da expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas na resposta inflamatória.

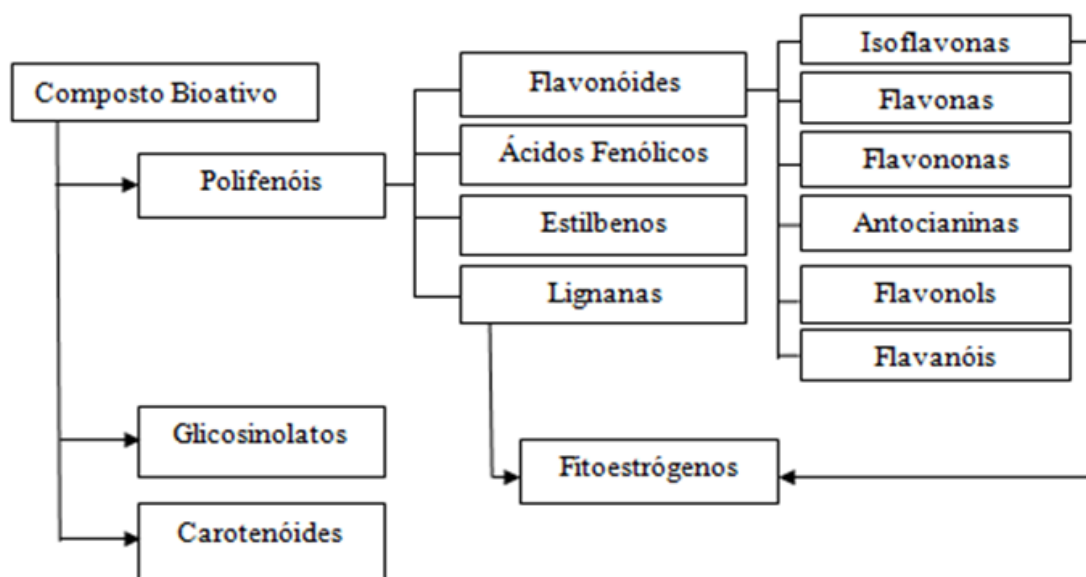
Os CBAs presentes nos alimentos podem agir de diferentes formas, tanto no que se refere aos alvos fisiológicos como aos seus mecanismos de ação. A ação antioxidante, comum nesses compostos, por exemplo, deve-se ao potencial de óxido-redução de determinadas moléculas, à capacidade dessas moléculas em competir por sítios ativos e receptores nas diversas estruturas celulares ou, ainda, à modulação da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em mecanismos intracelulares de defesa contra processos oxidativos degenerativos de estruturas celulares (DNA, membranas).

Embora seja reconhecido que CBAs presentes na dieta atuem na manutenção da saúde, faz-se necessário reconhecer que o efeito protetor às DCNT parece não se reproduzir pela sua ingestão isolada, na forma de suplementos. Estudos clínicos, em que a dieta foi suplementada com  $\beta$ -caroteno, vitamina C ou vitamina E, mostraram que essas substâncias, isoladas da matriz alimento, não foram eficazes na diminuição de risco à DCNT (LIU *et al.*, 2004), indicando que fatores como a biodisponibilidade e a ação sinérgica, entre outros, atuam nesse processo.

Na dieta habitual, alguns gramas de CBAs por dia são ingeridos. No entanto, as concentrações desses compostos no organismo humano são muito baixas (na faixa de micromoles), o que está relacionado à sua limitada absorção e biodisponibilidade.

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

Como existem em grande número, eles podem ser subdivididos em grupos com milhares de compostos distintos. Algumas substâncias são próprias de alguma espécie ou gênero de plantas, outras são unidas por um complicado critério de classificação. A Figura 2 mostra as diversas classes de compostos bioativos presentes nos alimentos.



**Figura 2.** Classes de compostos bioativos em alimentos

Os CBAs podem ativar, por exemplo, as vias de sinalização intracelulares adaptativas contra o estresse oxidativo e à exposição ao ambiente. Eles exercem ainda benefícios à saúde, ao menos em parte, atuando como “agentes de estresse de baixa dose” ou pró-oxidantes, e preparam as células para resistirem às condições mais severas de estresse:



doses baixas ativam vias de sinalização que resultam no aumento da expressão de genes, os quais codificam proteínas visando à proteção celular. Provavelmente, um CBA é capaz de modular uma ou duas reações *in vivo* que, como consequência, afetarão diferentes processos. A inibição de uma única enzima como a cicloxigenase (COX-2), por exemplo, afeta a inflamação e, conseqüentemente, o desenvolvimento de diversas DCNT. (BASTOS *et al.*, 2009). A tabela 1 resume a relação entre os diferentes CBAs, os alimentos em que estão presentes e a ação na resposta inflamatória.

Essas substâncias exercem ainda outras várias ações do ponto de vista biológico, como modulação de enzimas de detoxificação, estimulação do sistema imune, redução da agregação plaquetária, modulação do metabolismo hormonal, redução da pressão sangüínea, e atividade antibacteriana e antiviral (CARRATU & SANZINI *et al.*, 2005).

O organismo humano é dotado de um complexo sistema de defesa, e os xenobióticos, que entram no corpo, sofrem uma série de transformações mediadas por enzimas. Existem basicamente dois tipos de enzimas de biotransformação de xenobióticos. As enzimas de fase I, que incluem as enzimas da família do citocromo P-450 dependentes de monoxigenases, geralmente são responsáveis pela ativação dos compostos e, por esse motivo, são chamadas de ativadoras. E as enzimas de fase II, como as glutatona, quinona redutase, UDP-glucuronosil transferase, dentre outras, que possuem como principal característica o poder de adição ou conjugação de cofatores endógenos, como glutatona, ácido glucurônico, formando produtos não tóxicos e, por essa razão, também são chamadas de detoxificadoras (CHEN & ANDREASSON *et al.*, 2001).

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Já foi detectada a ocorrência de mais de 8000 compostos fenólicos (PEREIRA *et al.*, 2011), sendo que os principais podem ser classificados em dois grupos: os flavonóides (polifenóis) e os não flavonóides (fenóis simples ou ácidos) (MELO & GUERRA *et al.*, 2002; BURNS *et al.*, 2001).

Esses compostos agem neutralizando e sequestrando radicais livres e também quelam metais de transição. Os intermediários formados pela ação de

antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias. Os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila adjacentes (orto-difenóis), localizados em várias posições dos anéis A, B e C, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação com o oxigênio (-C=O) de algumas moléculas de flavonóides garantem a esses compostos sua alta atividade antioxidante (HRAZDINA *et al.*, 1970; RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Estudos realizados com os compostos fenólicos demonstram sua capacidade antioxidante, assim como seu possível efeito na prevenção de diversas enfermidades cardiovasculares, cancerígena e neurológica (HARBORNE & WILLIAMS *et al.*, 2000; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 2002). De maneira geral, a ação benéfica dos compostos fenólicos na saúde humana vem sendo relacionada com a sua atividade antiinflamatória e com a atividade que impede, não só a aglomeração das plaquetas sanguíneas, mas também a ação de radicais livres no organismo. Uma vez que protegem moléculas como o DNA, podem vir a abortar alguns processos carcinogênicos.

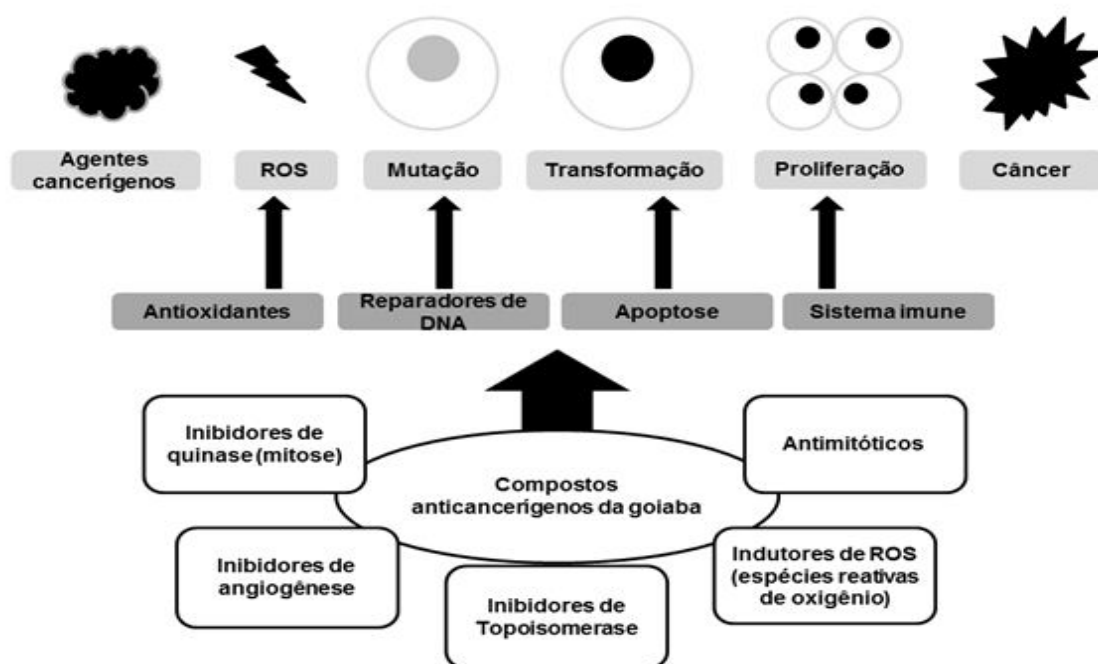
### **2.3. Compostos Bioativos X Câncer**

O termo “câncer” é utilizado para designar um conjunto de mais de 100 doenças comumente caracterizadas pelo crescimento descontrolado e pela proliferação de células anormais (INCA/MS, 2013). O desenvolvimento de novos agentes anti-câncer é vital, porque o câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, responsável por 7,6 milhões de mortes em 2005. O número deverá subir para 9 milhões em 2015, e mais de 11 milhões de mortes em 2030 (SUL'AIN, ZAZALI & AHMAD *et al.*, 2012).

Acredita-se que o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas seja responsável por determinar a progressão de células normais, através de estágios hiperplásicos e displásicos, em um câncer invasivo e, finalmente, em uma doença metastática (GARNIS *et al.*, 2004).

O consumo de compostos bioativos, presentes em frutas e vegetais, auxilia na prevenção de processos degenerativos diminuindo a incidência e a taxa de mortalidade por câncer ou doenças cardiovasculares, por exemplo. A

prevenção que as frutas e os vegetais promovem contra estas patologias tem sido atribuída à ação de antioxidantes presentes nestes alimentos (YEN *et al.*, 2001). A figura 3 ilustra os diferentes mecanismos de quimioprevenção dos compostos bioativos durante o processo de carcinogênese.



Fonte: Adaptado Patel & Goyal (2012)

**Figura 3.** Visão esquemática do processo da carcinogênese e ação de quimioprevenção.

Atualmente, grande atenção tem sido dada a estratégias preventivas e, neste contexto, a utilização de alimentos funcionais com compostos quimiopreventivos parece contribuir muito neste processo, atuando com mecanismos de ação anti-carcinogênicos, antioxidantes, antiinflamatórios, antiangiogênicos (PALOZZA *et al.*, 2002; NAZARIAN *et al.*, 2010).

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

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

Diversas investigações epidemiológicas (populacionais) e experimentais (in vivo ou em animais e in vitro ou em culturas de células) têm demonstrado que os antioxidantes podem diminuir o risco de diversos tipos de patologias, entre eles o ácido ascórbico, fitoestrógenos da soja e carotenóides ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina) (KLEINER *et al.*, 1998; FERRARI *et al.*, 2001; WEISBURGER *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2009).

Recentemente, os cientistas descobriram evidências que as combinações específicas de fitoquímicos são mais eficazes na proteção contra doenças do que os compostos isolados, que aponta para a necessidade de estudar a sinergia entre os compostos ativos em plantas, por exemplo, através da experimentação de extratos de plantas (CHIARI *et al.*, 2012).

Diferenças de atividade antiproliferativa podem ainda variar dependendo da forma de utilização do alimento e das partes utilizadas no preparo dos extratos potencialmente bioativos. Extratos de diferentes frutas mostraram elevada atividade antiproliferativa nas linhagens de câncer AGS (carcinoma humano gástrico) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), sendo estes efeitos superiores à polpa. Neste estudo, observou-se uma correlação direta entre o conteúdo fenólico e o efeito antioxidante dos extratos, mas não foi observada correlação entre a atividade antioxidante e atividade antiproliferativa. (KIM *et al.*, 2011).

Michaud *et al.*, (2000) relataram que a ingestão de carotenoides reduziu em 32% o risco de câncer de pulmão em não fumantes. Em fumantes, no entanto, a redução do risco era insignificante para os demais antioxidantes, exceto licopeno. Verificou-se, então, que o fumo alterava a concentração de muitos carotenoides, mas não do licopeno. Uma significativa redução no risco de câncer era notada com o aumento no consumo de licopeno, corroborando a literatura médica.

Assim, o licopeno apresentou maior eficiência na proteção das membranas celulares contra as lesões causadas pelo radical dióxido de

nitrogênio (encontrado no fumo); e, desta forma, despontou como tendo um papel especial na prevenção do câncer de pulmão (BOHM *et al.*, 1995).

Na goiaba existem compostos fenólicos, especialmente os flavonóides, ambos os antioxidantes poderosos, de grande importância na prevenção da ação dos radicais livres no organismo e, por conseguinte, são capazes de prevenir o câncer e ajudar a evitar o envelhecimento prematuro da pele. As propriedades relacionadas com a saúde em relação aos compostos fenólicos são baseadas principalmente em sua atividade antioxidante, particularmente como removedor de radicais livres e como quelantes de metais capazes de catalisar a peroxidação de lipídios. Tem sido demonstrado que os polifenóis (flavonóides e vitamina C) têm a capacidade de neutralizar a toxicidade, mutagenicidade e de carcinogenicidade.

De acordo com Peng *et al.*, (2011), o extrato aquoso de goiaba possui um teor extremamente alto de polifenóis e isoflavonóides. Neste estudo, o IC<sub>50</sub> para suprimir a viabilidade celular de linhagem de próstata foi de 0,57 mg/ml. Além disso, a goiaba pode eficazmente inibir a expressão do VEGF, IL-6 e IL-8 citocinas, e MMP-2 e MMP-9, fatores importantes que afetam a migração celular e um crescimento do tumor. Sato *et al.* (2010) sugere que certos componentes nas folhas têm atividade anti-cancerígena. Em seus estudos, ele descobriu também que as atividades citotóxicas de goiaba podem desencadear uma inibição na via de NF-kB (Fator nuclear-kappaB), o mesmo constatado por KAILEH *et al.*, (2007) em seus resultados.

LEVY & CARLEY *et al.*, (2012) também demonstraram que o extrato de *P. guajava* tem uma atividade citotóxica significativa em células cancerosas de leucemia (Kasum -1). A concentração de IC<sub>50</sub> de 200 ug/mL obtidos no estudo deles foi comparável ao valor de IC<sub>50</sub> de 250 ug/ml obtido por Chen *et al.*, (2007) na linhagem de carcinoma de células de próstata humana (DU-145) tratadas com extrato aquoso de *P. guajava*.

No estudo de ALVEOLIE *et al.*, (2013), o extrato de várias concentrações de folhas de *Psidium guajava* L. apresentam uma considerável atividade anticancerígena na linhagem celular SH-2 (câncer oral humano). Quando visto ao microscópio, muitas células sem nucléolo (lise de núcleo) foram observadas no grupo tratado com o extrato. Lee & Park *et al.*, (2010) avaliaram os efeitos citotóxicos de extratos de acetona da goiaba em células

HT-29 (linhagem de adenocarcinoma de cólon humano) e, posteriormente, propuseram um mecanismo responsável pela sua atividade a morte celular. O principal grupo de inibidores de carcinogênese é representado por antioxidantes, segundo eles. Além disso, há também indutores de morte programada de células (apoptose) e inibidores da enzima citocromo P450 (responsáveis pela ativação de fármacos metabólicos que conduzem à formação de radicais livres carcinogênicos).

A goiaba, particularmente as suas folhas, contém metabólitos secundários de plantas com alguns polifenóis com potencial antioxidante intrínseco, anti-inflamatório, e propriedades antivirais. Vários componentes da goiabeira foram postulados como tendo efeitos anticâncer *in vitro*, como o ácido ascórbico (vitamina C), os flavonóides (apigenina), e o licopeno (SATO *et al.*, 2012).

Na Coreia, RYU *et al.*, (2012) descobriram que o extrato de hexano da folha de goiabeira (GHF) foi capaz de induzir efeitos citotóxicos e apoptóticos em células PC-3 (linhagem de câncer de próstata). Os mecanismos do potencial apoptótico molecular de GHF foram correlacionados com a supressão da via de sinalização AKT/mTOR/S6K1 e MAPK. Este efeito do GHF correlaciona-se com a sub-regulação de muitas proteínas que mediam a proliferação celular, sobrevivência celular, metástase e angiogênese. Na análise do GHF, foram identificados 60 compostos, incluindo  $\beta$ -eudesmol,  $\alpha$ -copaeno, fitol,  $\alpha$ -patchoulene, óxido de cariofileno  $\beta$ -(CPO), caryophylla-3 (15), 7 (14) -dien-6-ol, (E) -metil isoeugenol,  $\alpha$ -terpineol, e octadecano. Estes resultados sugerem que as folhas de goiaba podem interferir em várias cascatas de sinalização ligadas com tumorigênese e fornecer uma fonte de potenciais compostos terapêuticos para a prevenção e tratamento do câncer.

Em outro estudo, o extrato aquoso de *Psidium guajava* L. inibiu linhagem DU-145 de uma maneira dose e tempo-dependente (CHEN *et al.*, 2007). A concentração de 1,0 mg/mL reduziu a viabilidade de PE de CaP DU-145 (células de androgênio CaP independentes) a 36,1 e 3,59%, respectivamente, após 48 h e 72 h de incubação. Eles examinam que capacidade de formação de colônias foi aparentemente reduzida. BOMTEMPO *et al.*, (2011) em seu estudo também confirmou a atividade seletiva contra certos tipos de tumor.

## 2.4. Câncer de Mama

O câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres e a forma mais letal para o sexo feminino, sendo a causa mais frequente de morte associada ao câncer em mulheres no mundo (BRISKEN; O'MALLEY *et al.*, 2010; OMS, 2013). Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), válidos para o ano de 2014, estimam incidência de aproximadamente 580 mil novos casos de câncer. Destes, são esperados 57.120 casos de câncer da mama.

A carcinogênese mamária é caracterizada por vários estágios, incluindo imortalidade celular, hiperplasia, tumorigenicidade e invasividade (MEDINA, *et al.*, 1996). Os eventos que conduzem à malignidade levam a mudanças nos processos celulares, como proliferação celular, apoptose e angiogênese, resultando na aquisição de fenótipo maligno (GALVÃO *et al.*, 2011).

As primeiras lesões estruturalmente evidentes constituem as hiperplasias intraductais, nas quais o epitélio apresenta alterações em sua estrutura, mas não atipia citológica, contendo poucas alterações genéticas. Tais hiperplasias avançam a um estado de atipia celular e oclusão dos ductos, resultando em um carcinoma intraductal *in situ* (CIS). Neste, a atipia é mais evidente e há um aumento significativo da atividade mitótica epitelial e das alterações genéticas. O processo progride a carcinoma localmente invasivo (CI), no qual a membrana basal é rompida e as células epiteliais invadem o estroma circundante, com possibilidade de metástase para vários órgãos, como pulmões, ossos e fígado (TLSTY *et al.*, 2004).

O câncer de mama não é o tumor primário que causa a morte das pacientes, mas sim a distribuição de células tumorais à distância, as chamadas metástases (WEIGELT *et al.*, 2005). Os principais alvos de metástase nesse tipo de câncer são os ossos, pulmões, fígado e cérebro. Portanto, estes órgãos, quando acometidos, são responsáveis pela alta taxa de mortalidade (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012). Ainda não é possível avaliar o risco de metástases, e por causa disso, mais de 80% das pacientes com câncer de mama recebem terapia adjuvante. No entanto, 40% destas apresentam recidiva e morte em decorrência das metástases (WEIGELT *et al.*, 2005).

As taxas de incidência de câncer de mama também são influenciadas, dentre outros fatores, pelo gênero, idade, história reprodutiva da mulher, predisposição genética (mutações nos genes BRCA1 e BRCA2), doença benigna prévia, estilo de vida e exposição da mama à radiação (TRICHOPOULOS *et al.*, 2008). Mulheres que apresentam mutação nos genes BRCA1 e BRCA2 têm 85% de chance de desenvolver câncer de mama antes dos 70 anos de idade (INCA, 2010). De fato, as taxas de incidência de câncer de mama aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, o mesmo se dá de forma mais lenta. Essa mudança no comportamento desta taxa é conhecida na literatura como "*Clemmesen's hook*" e tem sido atribuída ao início da menopausa. Alguns estudos apontam para dois tipos de câncer de mama relacionados com a idade: o primeiro tipo, que acomete 90% dos tumores, ocorre na idade da pré-menopausa e é caracterizado por ser mais agressivo e negativo para o receptor de estrogênio (RE), isto é, que não depende do RE para o crescimento das células. O segundo ocorre na idade da pós-menopausa e apresenta-se RE-positivo, podendo ser efetivamente tratado por inibição da função do RE, uma vez que RE é importante para o crescimento dessas células. As variações morfológicas dos tumores também estão relacionadas ao RE, como por exemplo, os carcinomas medulares são RE - negativos, enquanto que os carcinomas tubulares e lobulares apresentam um fenótipo ER-positivo. Com relação aos carcinomas medulares, pode-se dizer ainda que eles estão associados às mutações no gene *BRCA1* e são mais frequentes em populações de baixo risco, como as japonesas. Por outro lado, os carcinomas tubulares e lobulares têm associação com as mutações do gene *BRCA2* e são mais comuns em populações de alto risco, como a dos Estados Unidos (INCA, 2010; CHAN *et al.*, 2008).

O câncer é uma doença originada a partir de três fatores preponderantes: os fatores ambientais, fatores hereditários e a pré-disposição genética (quando há um risco mais elevado para o familiar de um doente desenvolver a doença, do que para a população em geral) (NIGRO *et al.*, 1989). Contudo, alguns estágios devem ser percorridos até que o câncer se instale, destacando-se a indução, promoção e progressão. O estágio da "indução" é caracterizado pela instabilidade genômica que leva a lesão no DNA, podendo induzir a mutações. Essa alteração genômica ocorre por vários



fatores, dentre eles: rearranjos cromossômicos, radiação ultravioleta, agentes químicos e vírus oncogênicos. Todos estes fatores poderão gerar uma mudança irreversível do genótipo da célula normal progenitora, produzindo uma célula “iniciada”. O segundo estágio consiste na ativação de oncogenes ou inibição de genes supressores do tumor e é denominado “promoção”. Um exemplo é o do gene *p53* que na sua forma não mutada é um gene supressor de tumor e as células neste estágio são denominadas “transformadas” (NIGRO *et al.*, 1989). Embora o surgimento do câncer ocorra quando a célula perde o controle no seu processo de multiplicação passando a fazê-la de forma desordenada e acelerada, o motivo pelo qual a célula perde o equilíbrio no seu desenvolvimento ainda não está totalmente esclarecido (WEINBERG *et al.*, 2008). O último estágio da carcinogênese é chamado de “progressão”, onde há mudanças do microambiente celular com o objetivo de manter o processo maligno e a capacidade de gerar metástases. Durante esta fase, são geradas condições para o crescimento das células imortalizadas, tais como produção de fatores de crescimento e citocinas (PETÉN *et al.*, 1990).

Duas teorias tentam explicar a origem dos carcinomas mamários. Em uma delas, o câncer de mama têm sua origem em uma célula única do epitélio glandular mamário que adquire uma ou mais mutações em genes que controlam programas essenciais, como proliferação, morte e diferenciação celular. Por apresentar vantagem seletiva, a célula transformada é selecionada e passa por uma expansão clonal, sendo que cada uma de suas células-filha tem o potencial de adquirir novas alterações moleculares. A progressão da neoplasia continua até a formação de uma massa tumoral com assinatura de expressão gênica específica. Os sucessivos eventos de alteração molecular, seleção e expansão clonal levam a um acúmulo de modificações genéticas e epigenéticas, induzindo a progressão tumoral (AXELROD *et al.*, 2006).

No modelo da célula-tronco de câncer (cancer stem cell - CSC), os tumores são organizados em uma hierarquia celular em que as células-tronco são as únicas células com potencial de proliferação ilimitada e com a capacidade de impulsionar o crescimento e progressão tumoral. Segundo esse modelo, os cânceres se originam a partir da transformação maligna de uma célula-tronco adulta. Isto leva a expansão clonal das células progenitoras que sofrem outras alterações genéticas e/ou epigenéticas para se tornarem

totalmente transformadas. Dessa forma, os tumores contêm um componente celular que retêm as propriedades fundamentais de células-tronco que iniciam e conduzem a carcinogênese (CHARAFE-JAUFFRET *et al.*, 2009).

As hiperplasias epiteliais de mama são caracterizadas pela proliferação de células epiteliais para o interior de ductos ou lóbulos mamários e são classificadas com base no padrão citológico e de crescimento arquitetural das células. Os mais incidentes são o do tipo ductal, o qual corresponde a cerca de 80% dos tumores diagnosticados, e os lobulares, com aproximadamente 15% (BOMBONATI; SGROI *et al.*, 2011).

O carcinoma de mama in situ constitui um conjunto de lesões da mama caracterizado pela proliferação epitelial maligna restrita aos ductos ou lóbulos mamários e, portanto, totalmente limitadas pela lâmina basal (SCHMITT; GOBBI *et al.*, 2006). O grupo dos carcinomas invasivos é caracterizado por uma profunda heterogeneidade histomorfológica e clínica (BOMBONATI; SGROI *et al.*, 2011) e inclui todos os carcinomas mamários que infiltram o estroma, independentemente da coexistência de componente in situ. O carcinoma ductal invasivo é o tipo mais frequente de câncer de mama e apresenta comportamento agressivo (SCHMITT; GOBBI *et al.*, 2006).

O tratamento do câncer de mama sofreu várias mudanças nas últimas décadas devido à descoberta de biomarcadores específicos de diagnóstico e prognóstico que permitem a aplicação de terapias individualizadas para os diferentes subgrupos moleculares. Estes subgrupos mostram diferenças específicas em relação ao comportamento clínico-biológico (WEIGEL; DOWSETT *et al.*, 2010). Alguns exemplos de genes envolvidos no processo da tumorigênese da mama e que são usados como marcadores moleculares de diagnóstico são os receptores de hormônios esteróides (receptor de estrogênio - RE e receptor de progesterona - RP), o oncogene ERBB2 e o gene supressor de tumor *p53* (o qual algumas vezes é denominado *Trp53* em camundongos ou *TP53* em humanos) (HARRIS *et al.*, 1996).

O estrogênio é um hormônio esteroidal que atua como estímulo proliferativo em células normais dos órgãos proliferativos, sendo considerado um estimulante para a iniciação e promoção de tumores nestes órgãos (FABIAN & KIMLER *et al.*, 2007). O grau de expressão do RE é, sem dúvida, o mais importante marcador molecular no câncer da mama, uma vez que fornece

o índice de sensibilidade ao tratamento endócrino e está relacionado a uma variedade de características histológicas nesse tipo de câncer. Tumores de pacientes que apresentam RE positivo, os quais correspondem a cerca de 80% dos casos de câncer de mama, utilizam o hormônio estrógeno como o principal estímulo de crescimento. Por este motivo, o RE é alvo direto das terapias hormonais, sendo a ausência ou presença da sua expressão um ponto decisivo no tratamento (WEIGEL & DOWSETT *et al.*, 2010). Sabe-se que boa parte das pacientes que apresentam resistência aos tratamentos adjuvantes se dá, em parte, pela inativação do gene que codifica para RE (ESR1) por metilação da sua região promotora. Este dado tem sido descrito para diferentes populações (MIRZA *et al.*, 2009), inclusive em pacientes brasileiras (RAMOS *et al.*, 2010).

O gene do RP (PGR) também tem papel fundamental da tumorigênese do câncer de mama promovendo a proliferação celular. Este receptor pode ser expresso tanto em tecidos normais quanto em neoplásicos (LIU *et al.*, 2004). A perda de expressão de RP e RE constitui um potencial mecanismo de resistência à terapia hormonal e, em ambos os casos, a inativação da expressão desses genes por mecanismos epigenéticos tem um importante papel neste contexto (LIU *et al.*, 2004; DUNNWARD *et al.*, 2007).

O gene ERBB2 é altamente expresso em aproximadamente 20% a 25% dos carcinomas ductais de mama (COUTURIER *et al.*, 2008) e codifica para a proteína denominada HER2. Em geral, mulheres com carcinoma invasivo HER2 positivo possuem uma doença mais agressiva, com pior prognóstico e maior probabilidade de recidiva, com sobrevida global menor quando comparadas com as mulheres HER2 negativas (HENRY; HAYES *et al.*, 2006; WEIGEL; DOWSETT *et al.*, 2010). Entretanto, a superexpressão de HER2 em tumores primários de mama beneficia as pacientes com a terapia anti-HER2 (WEIGEL; DOWSETT *et al.*, 2010), que consiste no anticorpo monoclonal Herceptin® (trastuzumab) que se liga ao HER2, impedindo a sinalização de crescimento (CARTER *et al.*, 1992).

O gene p53 apresenta-se mutado em 80% dos cânceres humanos, além de ser o gene mais frequentemente mutado. A p53 tem como função fisiológica à regulação do ciclo celular podendo promover a interrupção do mesmo ou a apoptose em resposta ao dano no DNA (YOUNG; ANDERSON *et al.*, 2008). Nas células de cânceres, a p53 induz a apoptose pela via intrínseca associada

à mitocôndria (CHEN *et al.*, 2009). Além disso, a p53 tem um papel chave na regulação do consumo de glicose por induzir a ativação sistemática de muitas vias devido, por exemplo, ao aumento de transportadores de glicose, estimulando a glicólise, ou por afetar a biogênese mitocondrial (JOSEPH *et al.*, 2004). Os efeitos da p53 na glicólise podem ser afetados pela proteína TIGAR (regulador da apoptose e da glicólise estimulado pela p53), a qual inibe o metabolismo de glicose por diminuir os níveis de frutose 2,6- bifosfato na célula (BENSAAD *et al.*, 2006). Entretanto, este efeito modulador negativo da glicólise somente acontece quando a p53 não está mutada, ou seja, em aproximadamente 20% dos casos neoplásicos, como já descrito anteriormente.

Além dos oncogenes, outra característica de extrema relevância nos cânceres de mama, que são mais comuns em mulheres, é que estes podem ser triplamente negativos para o que não possui receptor de estrogênio, deixando de expressar esses receptores ou o receptor ficando negativo. Esses receptores se ligam ao estrogênio, um hormônio ovariano, que promove a proliferação e o crescimento celular (MONROE *et al.*, 2005). O estrogênio afeta o desenvolvimento e diferenciação da glândula mamária mediada por seus receptores (LINDBERG *et al.*, 2010). Já foi demonstrado que cerca de 66% dos cânceres mamários expressam o receptor de estrogênio (RE). Os REs medeiam as ações do estrogênio, aumentando a transcrição de genes ou diretamente através da ligação aos elementos do DNA responsivos ao estrogênio (EREs) nas regiões de controle do estrogênio (ou SERM) dos genes alvos ou através de precursores alternativos envolvendo interações reguladoras com a transcrição de outros fatores (MONROE *et al.*, 2005; LINDBERG *et al.*, 2010). Há dois tipos de RE: o RE $\alpha$  e o RE $\beta$ . A proliferação e a progressão do câncer de mama são conduzidas por RE $\alpha$  e a maioria das células, pelo menos inicialmente, expressam este receptor. Ao contrário, o RE $\beta$  não está relacionado com a tumorigênese e sua ausência pode afetar o desenvolvimento da glândula mamária. A expressão de RE $\beta$  está associada com tumores menos invasivos e proliferativos (LINDBERG *et al.*, 2010). As linhagens de câncer de mama podem ser agrupadas em RE $\alpha$ -positivas e RE $\alpha$ -negativas. O grupo RE $\alpha$ -positivo (que engloba a linhagem celular MCF-7) pode ser efetivamente tratado pela inibição da função do RE $\alpha$ , como pelo tamoxifeno. Já o grupo RE $\alpha$ -negativo (que engloba a linhagem MDA-MB-435) é

altamente invasivo, sendo resistente ao tratamento baseado em antagonistas de RE $\alpha$  (CHAN *et al.*, 2008, LINDBERG *et al.*, 2010).

Somando-se os fatores já citados e devido ao seu estágio avançado de desenvolvimento e suas propriedades metastáticas, o carcinoma mamário é considerado um tumor humano de crescimento acelerado (PEDERSEN *et al.*, 1978; ZU; GUPPY *et al.*, 2004). A grande maioria das linhagens tumorais que apresentam um crescimento rápido possui um metabolismo energético notavelmente modificado se comparadas com os tecidos de origem, como observado em tumores das glândulas mamárias (MCF-7, MDA-MB-435, MDA-MB-231) (MAZUREK *et al.*, 1997).

As linhagens utilizadas no trabalho são derivadas de carcinoma de mama. A linhagem MDA-MB-235 não expressa receptores hormonais, apresenta alto potencial metastático e alta tumorigenicidade. Esta linhagem tem morfologia estrelada e é considerada célula epitelial mesenquimal. A linhagem celular epitelial MCF-7 apresenta receptores de estrogênio e progesterona e baixo potencial metastático. No tratamento de um tumor maligno sensível a hormônios, se o receptor é bloqueado, o crescimento celular pode ser inibido (ALKHALAF *et al.*, 2003). Esta linhagem tem morfologia fusiforme e são consideradas luminais (LACROIX *et al.*, 2004)

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral:**

O presente trabalho tem como objetivo investigar a influência dos extratos de cultivares goiaba (Pedro Sato, Hitígio e Tsumori) em linhagens celulares humanas de câncer de mama (MDA- MB-235 e MCF-7 ).

#### **3.2. Específicos:**

1 – Produzir extratos de diferentes cultivares de goiaba(Pedro Sato, Hitígio e Tsumori) e avaliar a atividade antioxidante dos extratos produzidos.

2 - Avaliar o efeito dos extratos de cultivares de goiaba sobre a proliferação de diferentes linhagens cancerígenas humanas de mama em diferentes tempos de incubação.

3 - Verificar modificações no ciclo celular de linhagens cancerígenas humanas de mama pela ação dos extratos de goiaba.

4 - Avaliar os efeitos dos extratos de goiaba sobre o processo de morte celular em linhagens cancerígenas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Obtenção das amostras**

Amostras de cultivares de goiaba, Pedro Sato(PS), Hitigio (HI) e Tsumori(TS) foram obtidas junto ao Projeto Frutificar da Secretaria de Estado de Agricultura e Pecuária – SEAPEC que possui culturas de goiaba. A caracterização nutricional foi composta das seguintes análises: Acidez total titulável, açúcares redutores, açúcares totais, °Brix, densidade, Vitamina C e teor de fibras segundo metodologia oficial (Adolf Lutz, 2005). Nas amostras foram avaliados ainda parâmetros físicos de peso, dimensão e coloração, em colorímetro Konica (Minolta CM-5) utilizando escala CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ).

### **4.2. Preparo dos Extratos**

Os extratos de semente e polpa da goiaba foram preparados conforme metodologia descrita por Rocha (2007) a partir de frutos obtidos de produtores locais da região de Cachoeira de Macacu.

Em seguida, as amostras sofreram extração com sete soluções extratoras: metanol, metanol 50%, extração sequencial (metanol 50% e acetona 70%), acetona 70%, metanol acidificado, etanol e água para as análises de compostos bioativos e atividade antioxidante.

O extrato para os ensaios celulares foi obtido a partir de 50g de amostra (polpa de goiaba), com a adição de 50 ml de acetona 70%, e avolumada em balão volumétrico de 100 ml com água destilada. Após esta etapa, houve a homogeneização em vórtex por aproximadamente 2 minutos e posteriormente sofreu agitação por meio de banho com agitação durante 60 minutos. A solução foi filtrada à vácuo com papel de filtro quantitativo Whatman n°. 1 e colocada em um balão para a etapa de retirada completa do solvente em rotaevaporador (Marconi®) a 60° C por 2 horas. Após o procedimento, o material foi congelado a 0°C por 24 horas. Posteriormente, seguiu para o

liofilizador, no qual permaneceu por 72 horas. Em seguida, foi acondicionado em frasco âmbar e congelado à -20°C, para posteriores análises.

#### **4.3. Determinação de compostos fenólicos totais**

A análise de compostos fenólicos totais dos extratos foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton & Rossi *et al.*, (1965), utilizando o ácido gálico como padrão. A determinação foi realizada usando alíquotas de 0,1 mL a 1 mL dos extratos obtidos anteriormente, que foram transferidas para tubos de ensaio e adicionado 2,5 mL do reagente Folin Ciocalteu, diluído em água 1:10. A mistura permaneceu em repouso de 3 a 8 minutos. Em seguida foi adicionado 2 mL de carbonato de sódio 4% e os tubos deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A absorvância foi medida em espectrofotômetro (Turner TM®) a 760nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente de ácido gálico, com base em uma curva de calibração de ácido gálico com concentrações variando de 5 a 20µg/ml.

#### **4.4 Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH**

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams *et al.*, (1995). O DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical de hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável e, desta forma, é reduzido na presença de um antioxidante. Para avaliação da atividade antioxidante, os extratos de goiaba foram adicionados para reação com o radical estável DPPH em uma solução de metanol. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 515 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio arrancado de um composto antioxidante. A redução do radical do DPPH foi medida através da leitura da absorvância a 515 nm em 100 min de reação.



A atividade antioxidante foi expressa de acordo com a Equação 1 de Mensor *et al.*, (2001), descrita abaixo: %AA = 100 - {[(Absamostra - Absbranco) X 100] / Abscontrole}

#### **4.5. Análise de atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS•+**

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

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

#### **4.6. Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro – FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)**

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi utilizada a metodologia descrita por Benzie & Strainet *et al.*, (1996), com algumas modificações. Esta se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH=3,6), o complexo Fe<sup>3+</sup>/tripiridiltriazina (TPTZ), para formar Fe<sup>2+</sup>, de intensa cor azul e absorção máxima a 593nm. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 20 ml de tampão acetato (300 nM, pH 3,6), 2,0 ml de TPTZ (10mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,0 ml de FeCl<sub>3</sub> (20mM) em solução aquosa. Para realização do ensaio, foram adicionados 20 µL de amostra, 20µL do padrão (sulfato ferroso), e 20µL do branco (água Mili-Q) + 180 µL do reagente FRAP que foi injetado automaticamente pelo leitor de

microplacas *VICTOR multilabel contador* (Perkin-Elmer, EUA) perfazendo um volume total de 200  $\mu\text{L}$  em cada poço da microplaca. As medidas foram realizadas em triplicata. A curva de calibração foi feita com sulfato ferroso (50-750 $\mu\text{mol/L}$ ) e os resultados foram expressos em  $\mu\text{molFe}^{2+}/\text{L}$ .

#### **4.7. Cultura de células e protocolo de tratamento**

As linhagens de carcinoma de mama (MDA-MB-235 e MCF-7 ) foram obtidas a partir do Banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio Dulbecco's e meio RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e 2 g/L tampão HEPES, pH 7,4, sob atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Para cada experimento, todas as células foram plaqueadas, em 104 células/ $\text{cm}^2$  em placas de 6 e 96 poços, para análises de ciclo celular e proliferação celular, respectivamente. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado e as células sofreram incubações com diferentes concentrações de extratos de goiaba previamente liofilizados dissolvidos em água a 50°C ou em água e acetona 70 (1:1). Células não tratadas foram incluídas em cada placa. As células foram então incubadas por 24 e 48 horas, com troca de meio a cada 24 horas.

#### **4.8. Ensaio de viabilidade celular pelo ensaio de MTT**

A viabilidade celular foi determinada pelos ensaios de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio), conforme descrito por Mosmann *et al.*, (1983). Foram plaqueadas  $1.0 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços que, 24 horas depois, foram incubadas com diferentes concentrações de extrato de cultiaves de goiaba, que variavam de 15 a 5000 mcg/mL. Após 24 h e 48 h de incubação, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de MTT (5g/L) em cada poço. O meio foi, então, recolhido depois de 4 h de incubação e 100  $\mu\text{L}$ /poço de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados, a fim de dissolver o produto gerado. Por fim, a placa foi lida em leitor de microplacas (Bio-Rad 2550, USA) a 570nm. A taxa de inibição da proliferação celular (CPIR) foi calculada com base na fórmula:  $\text{CPIR} = (1 - \text{valor médio do grupo experimental} / \text{valor médio do grupo controle}) \times 100\%$ .

#### **4.9. Ensaio de ciclo celular**

A análise de ciclo celular foi realizada utilizando ensaio com iodeto de propídio. As células foram ressuspensas em 500 µL de solução fria de Vindelov (VINDELOV, 1977), contendo 0,1% de Triton X-100, 0,1% de RNase e 50 µg/mL iodeto de propídio (Sigma). Após incubação por 15 minutos, a suspensão celular foi analisada para conteúdo de DNA em citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences). Após a aquisição de 20000 eventos, os dados foram analisados em software Cell Quest. As células com conteúdo menor de DNA que G1 na distribuição do ciclo celular foram contadas como células hipodiplóides (sub-fase G1). A percentagem de população de células em uma fase específica foi estimada com WinMDI 2.9.

As proporções relativas de células com conteúdo de DNA indicativo de apoptose (<2n), fase G0-G1 (2n), fase S (fase > 2n mas <4n), e fase G2/M (4n) foram adquiridos e analisados utilizando CellQuest. A percentagem de população de células em uma fase específica foi estimada com o auxílio do software WinMDI 2.9.

#### **4.10. Ensaio de apoptose**

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

#### **4.11. Análise Estatística**

Os dados apresentados serão médias e ( $\pm$ ) desvio padrão de dois experimentos independentes feitos em triplicata. Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.0 e Statistical 6.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análises Físico-Químicas dos extratos de cultivares de goiaba

Na tabela 2, encontram-se as análises de peso, dimensão, ° Brix, acidez e vitamina C, das amostras dos três cultivares de goiaba (Pedro Sato, Hitigio e Tsumori). As análises revelaram valores médios de peso de  $220,16 \pm 40,08$ g do cultivar Pedro Sato,  $158,16 \pm 15,43$ g do cultivar Hitigio e  $297,52 \pm 79,06$ g do cultivar Tsumori. As dimensões obtidas foram de  $8,34 \pm 0,51$ cm do cultivar Pedro Sato,  $7,27 \pm 0,40$ cm do cultivar Hitigio e  $8,78 \pm 1,01$ cm do cultivar Tsumori.

Os cultivares Pedro Sato, Hitigio e Tsumori apresentaram os valores de grau brix sem diferença estatística entre eles ( $p > 0,05$ ) com valores respectivos médios de 10,11, 9,47 e 11,08 g% ácido cítrico. A acidez revelou valores de  $0,36 \pm 0,01$ g/mol,  $0,39 \pm 0,01$ g/mol e  $0,47 \pm 0,03$ g/mol para os cultivares Pedro Sato, Hitigio, e Tsumori respectivamente. Os valores observados de ácido ascórbico entre os diferentes cultivares não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ), com valores médios máximo e mínimo de 81,81 e 79,35 mg ácido ascórbico/100g, para o cultivares Pedro Sato e Tsumori, respectivamente.

**Tabela 2:** Valores de peso, dimensão °Brix, acidez e vitamina C em goiaba cultivar Pedro sato(PS), Hitigio(HI) e Tsumori(TS). Letras diferentes apresentam diferença significativa teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

	PS	HI	TS
<b>Peso (g)</b>	$220,16 \pm 40,08^a$	$158,16 \pm 15,43^b$	$297,52 \pm 79,06^c$
<b>Dimensão(cm)</b>	$8,34 \pm 0,51^a$	$7,27 \pm 0,40^b$	$8,78 \pm 1,01^c$
<b>Sólidos Solúveis (°Brix)</b>	$10,11 \pm 0,02^a$	$9,47 \pm 0,01^a$	$11,08 \pm 0,01^a$
<b>Acidez(g% ácido cítrico)</b>	$0,36 \pm 0,01^a$	$0,39 \pm 0,01^a$	$0,47 \pm 0,03^b$
<b>Ácido Ascórbico (mg%)</b>	$81,81 \pm 2,04^a$	$79,35 \pm 3,30^a$	$80,36 \pm 1,87^a$

PS – Pedro Sato HI – Hitigio TS - Tsumori

Na tabela 3 encontram-se os resultados referente a análise colorimétrica dos parâmetros L\*, a\* e b\*. Com relação o perfil de cor da casca foi observado que os maiores valores dos parâmetros L\* (65,56) e b\* (42,30) foram encontrado no cultivar PS.

As amostras apresentaram os seguintes resultados: o cultivar Pedro Sato, na análise da casca, apresentou valor médio de 65,56±1,72 (L\*); para os valores de a\* o cultivar Hitigio apresentou o menor valor médio com -5,18±2,32 (a\*)(P<0,05), indicando a cor verde mais intensa e para a escala b\* o cultivar Pedro Sato apresentou o valor médio de 42,3±3,16 (b\*) indicando a cor da casca mais clara e amarelada quando comparada com os outros cultivares. Dentre as polpas analisadas o cultivar Pedro Sato apresentou valor médio de 55,21±1,68 (L\*), na escala a\* o valor 32,25±1,17(a\*) indicando uma cor vermelha mais intensa em relação aos outros cultivares analisados. Os cultivares não apresentaram diferença significativa nos valores da escala b\*(p>0,05).

**Tabela 3.** Coordenadas de cor (L\*a\* b\*) de amostras goiaba cultivar Pedro Sato(PS), Hitigio(HI) e Tsumori(TS). Letras diferentes apresentam diferença significativa teste Tukey (p<0,05).

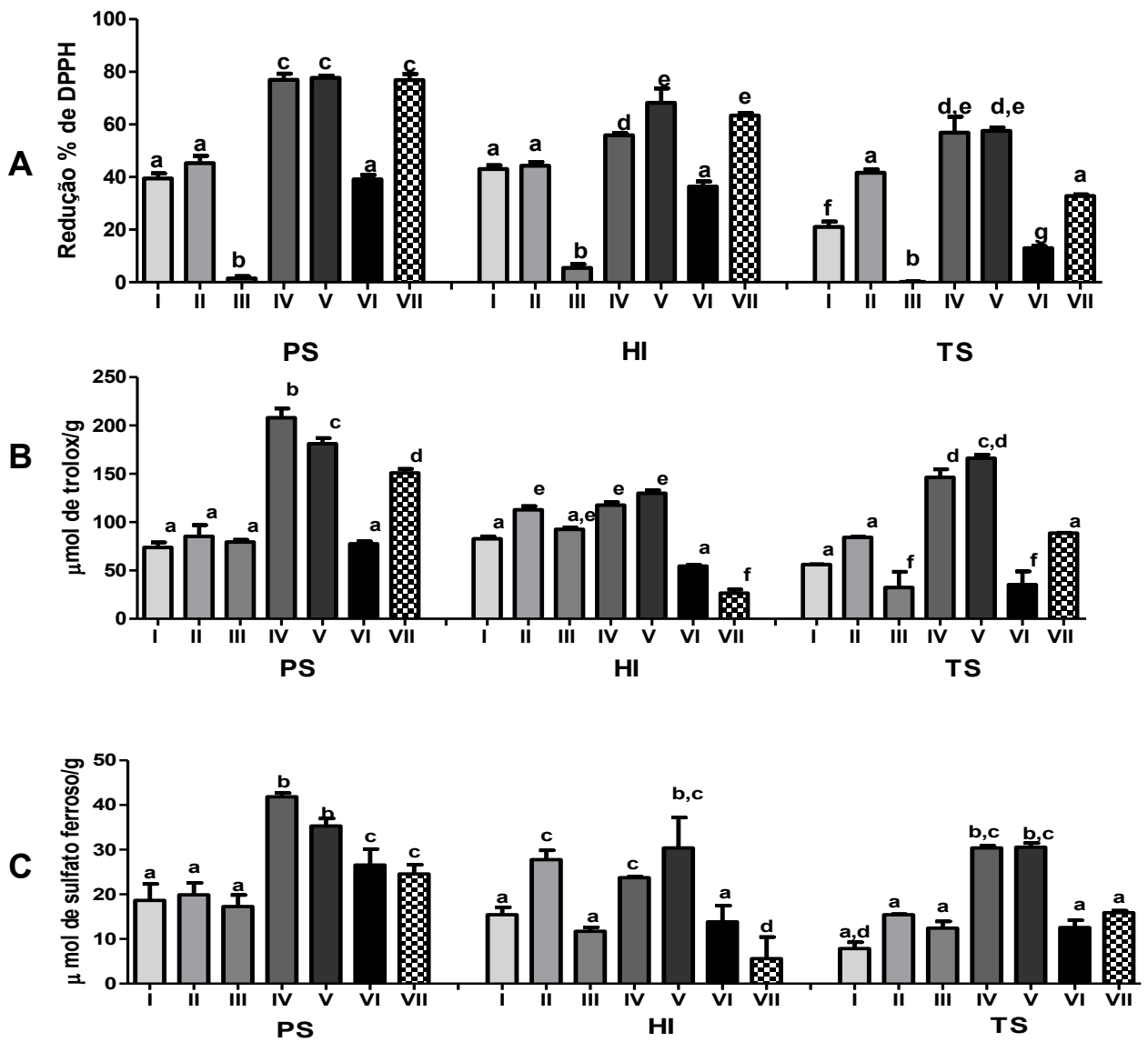
Coordenadas de cor	Casca			Polpa		
	HI	PS	TS	HI	PS	TS
L*	59,90±3,71 <sup>a,b</sup>	65,56±1,72 <sup>a</sup>	55,49±10,06 <sup>b</sup>	58,53±1,72 <sup>a</sup>	55,21±1,68 <sup>a</sup>	61,83±4,59 <sup>a</sup>
a*	-5,18±2,32 <sup>a</sup>	-0,40±2,22 <sup>b</sup>	0,90±4,59 <sup>b</sup>	30,99±1,24 <sup>a</sup>	32,25±1,17 <sup>a</sup>	22,45±1,97 <sup>b</sup>
b*	39,59±3,08 <sup>a</sup>	42,30±3,16 <sup>a</sup>	28,59±9,12 <sup>b</sup>	21,81±0,51 <sup>a</sup>	21,69±2,02 <sup>a</sup>	21,01±1,16 <sup>a</sup>

PS – Pedro Sato HI – Hitigio TS - Tsumori

## 5.2. Avaliação das atividades antioxidantes nos extratos de cultivares de goiaba

Na figura 4, encontram-se os resultados obtidos com as análises de atividade antioxidante. Inicialmente foi possível observar uma maior redução do radical DPPH na amostra do cultivar Pedro Sato com as soluções extratoras IV, V, VII, demonstrando valores de redução percentual médios de 76,96±2,35%,

77,73±0,84%, 76,87±2,31 % além de IC<sub>50</sub> com valores de 3,06mg, 2,99mg e 5,79mg, respectivamente(Figura 4A).



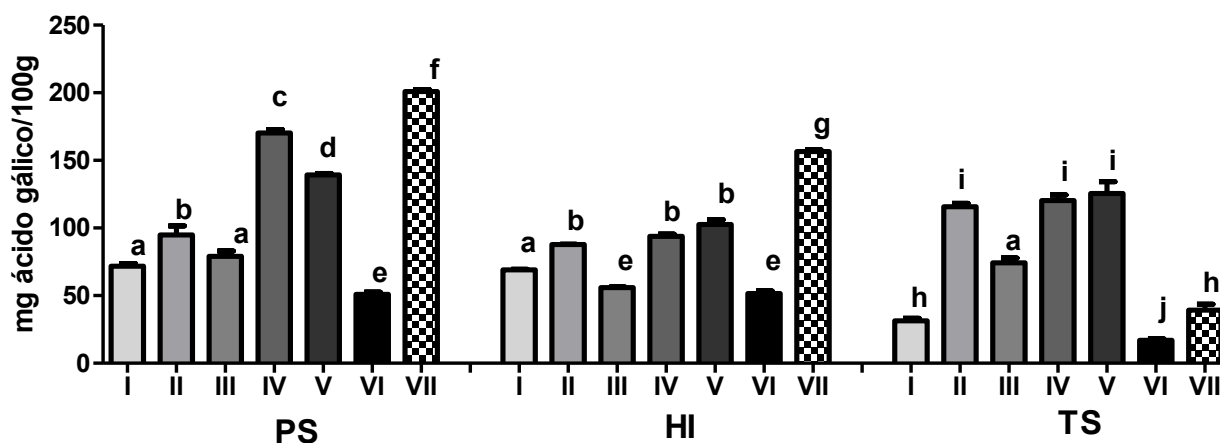
**Figura 4.** Atividade Antioxidante pelo método de DPPH (A), ABTS(B) e FRAP(C) de cultivares de goiaba extraídos por metanol (I), metanol 50% (II), metanol acidificado (III), acetona 70% (IV), extração sequencial com metanol 50% e acetona70% (V) e etanol (VI) e água (VII). Letras diferentes apresentam diferença significativa teste Tukey (p<0,05).

Os resultados observados pelo método ABTS (Figura 4B) apresentaram uma atividade antioxidante maior no cultivar Pedro Sato, com as soluções extratoras IV e V tendo como valores médios  $208,05 \pm 9,69$  e  $181,07 \pm 5,93$   $\mu\text{mol}$  de trolox/g, respectivamente.

Na análise de redução do ferro pelo método FRAP (Figura 4C), novamente o cultivar Pedro Sato apresentou os resultados superiores ( $p < 0,05$ ) dentre os cultivares analisados. As soluções extratoras com melhor desempenho foram a solução IV e V com valores médios de  $41,84 \pm 0,84$  e  $35,33 \pm 1,69$   $\mu\text{mol}$  de sulfato ferroso/g para esse cultivar.

### 5.3. Avaliação do teor de fenólicos totais nos extratos de cultivares de goiaba

Na análise dos teores totais de compostos fenólicos (Figura 5), observa-se valores maiores para cultivar Pedro Sato ( $p > 0,05$ ) em comparação as amostras Hitigio e Tsumori, com as melhores extrações realizadas pelas soluções extratoras IV, V e VII, apresentando os valores  $170,33 \pm 2,42$ ,  $139,36 \pm 1,05$ ,  $200,87 \pm 1,43$  mg ácido gálico/100g, respectivamente.



**Figura 5.** Compostos fenólicos totais dos cultivares de goiaba extraídos por metanol (I), metanol 50% (II), metanol acidificado (III), acetona 70% (IV), extração sequencial com metanol 50% e acetona 70% (V) e etanol (VI) e água (VII). Letras diferentes apresentam diferença significativa teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

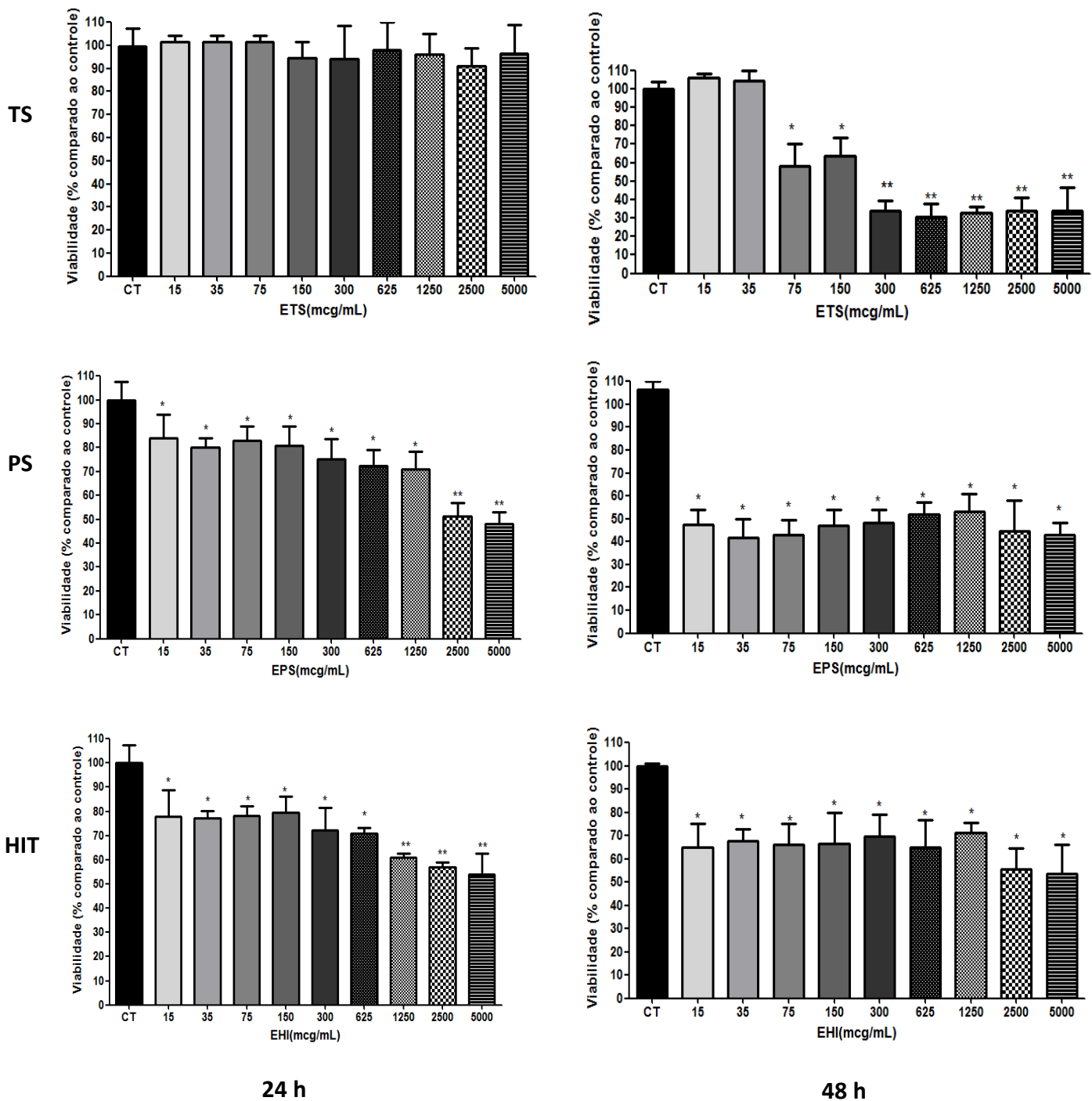


#### **5.4. Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT**

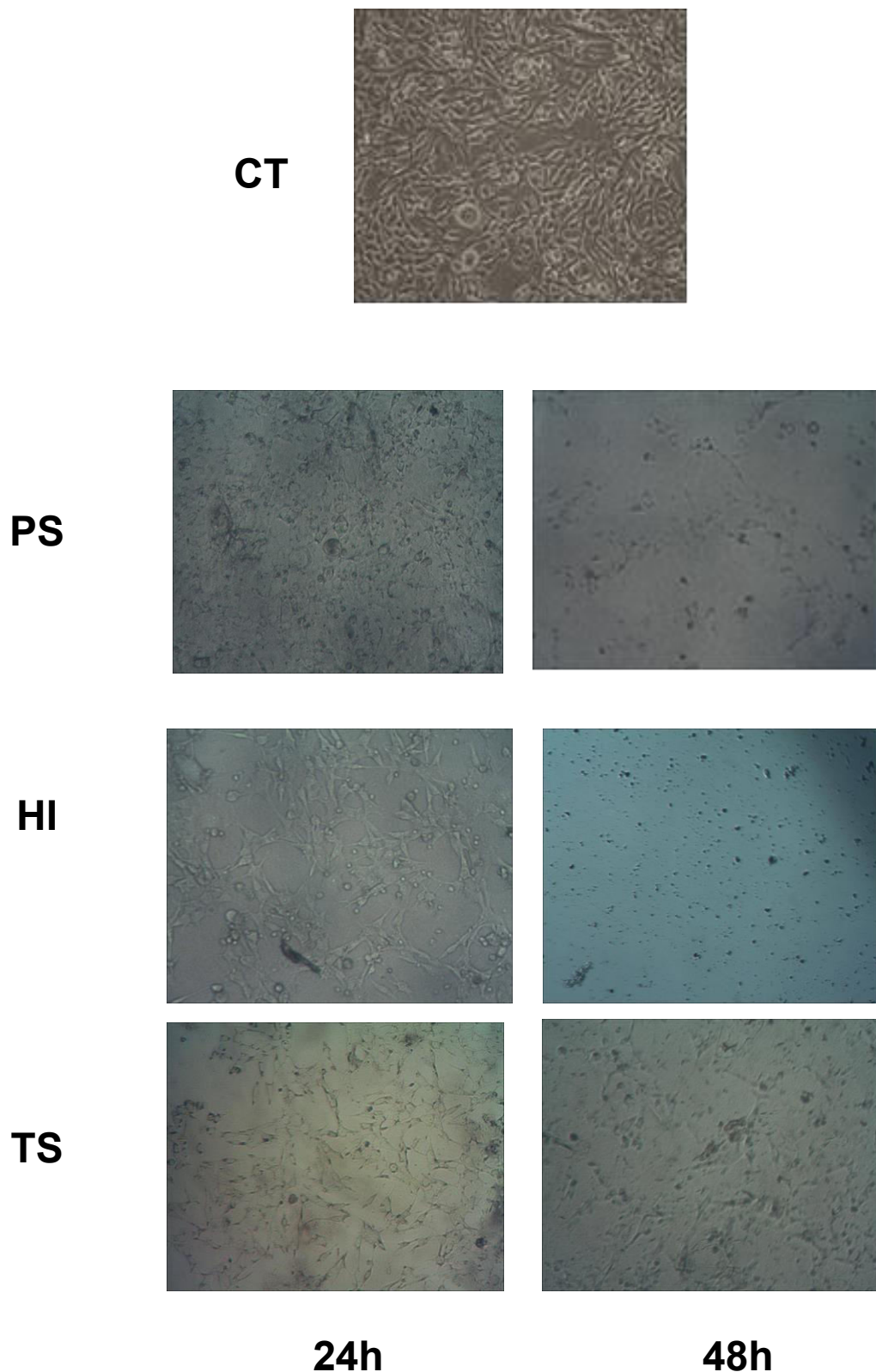
Para análise da viabilidade celular, as células de carcinoma de mama (MDA-MB-235 e MCF-7), foram incubadas com concentrações de 15-5000mg/ml de extratos de diferentes cultivares de goiaba, e analisadas, durante intervalos de 24 e 48 horas após o início do tratamento.

O ensaio de MTT foi utilizado para monitorar a viabilidade celular. Na linhagem celular MDA-MB-235, foi possível observar que os extratos de goiaba modificaram o perfil de crescimento celular após 24 e 48 horas de tratamento. Após 24 horas, o cultivar PS foi o que apresentou o maior percentual de redução (45%) na viabilidade celular, seguido do cultivar HI. As células tratadas com o cultivar TS não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ) no perfil de crescimento celular quando comparadas as células não tratadas (CT). Por outro lado, após 48 horas de tratamento, foi constatado que todos os extratos dos cultivares de goiaba promoveram redução na viabilidade da linhagem MDA-MB235. O extrato do cultivar TS, a partir da concentração de 300mg/mL, obteve a maior capacidade de redução com inibição média de 70%. Os cultivares PS e HI não apresentaram diferença estatística nas concentrações utilizadas (15-5000mg/ml) com reduções máximas de 57% e 44%, respectivamente (Figuras 6 e 7).

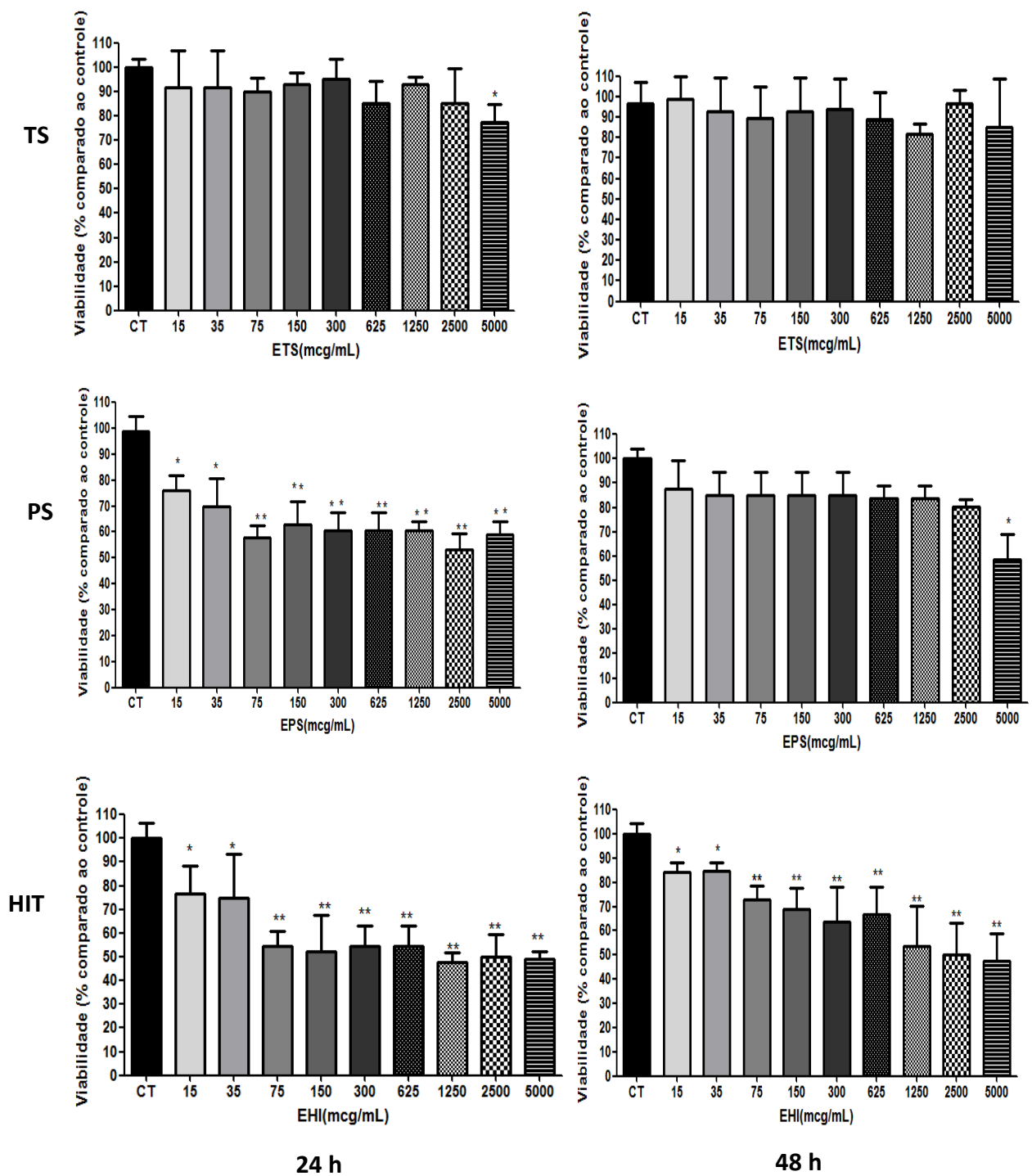
Os extratos de goiaba mostraram reduções na viabilidade celular, em comparação ao grupo controle, na linhagem MCF-7 após 24 e 48 horas de tratamento. Inicialmente, após 24 horas de tratamento, o efeito foi mais agudo, onde os cultivares PS e HI mostraram reduções de 50% nas duas amostras a partir da concentração de 75 mcg/mL até 5000 mcg/mL, enquanto que o extrato do cultivar TS reduziu apenas 10% na maior concentração. Após 48 horas (Figura 8), em contato com os extratos de goiaba, constatou-se que o cultivar TS não apresentou redução na viabilidade celular, e o cultivar PS reduziu 40% na concentração de 5000 mcg/mL. Somado à isso, o extrato HI apresentou comportamento semelhante aos resultados após de 24 horas de tratamento quando comparado às células não tratadas (Figuras 8 e 9).



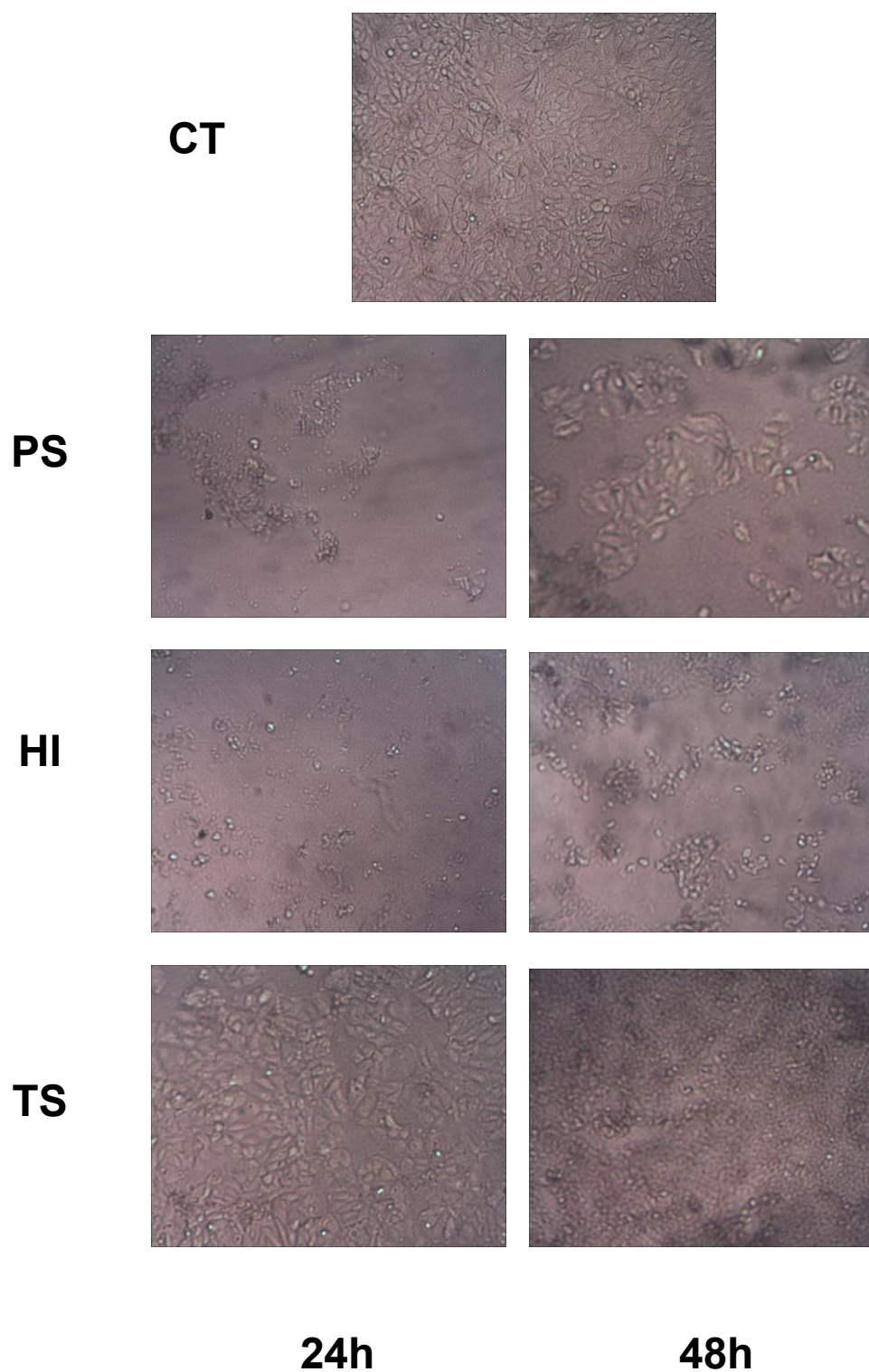
**Figura 6.** Efeito dos extratos de cultivares de goiaba Tsumori(ETS), Pedro Sato (EPS) e Hitígio (EHI) (15-5000 mcg/mL) sobre a viabilidade celular da linhagem MDA-MB-435 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento. Foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).



**Figura 7.** Efeitos dos extratos de goiaba sobre a viabilidade celular da linhagem MDA-MB-235 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento. Células MDA-MB-235 visualizadas em microscópio não tratadas (CT) e após tratamento com duas concentrações dos extratos dos cultivares de goiaba.(PS,HI,TS).



**Figura 8.** Efeito dos extratos de cultivares de goiaba Tsumori(TS), Pedro Sato (PS) e Hitigio (HIT) (15-5000 mcg/mL) sobre a viabilidade celular da linhagem MCF-7 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento. Foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).



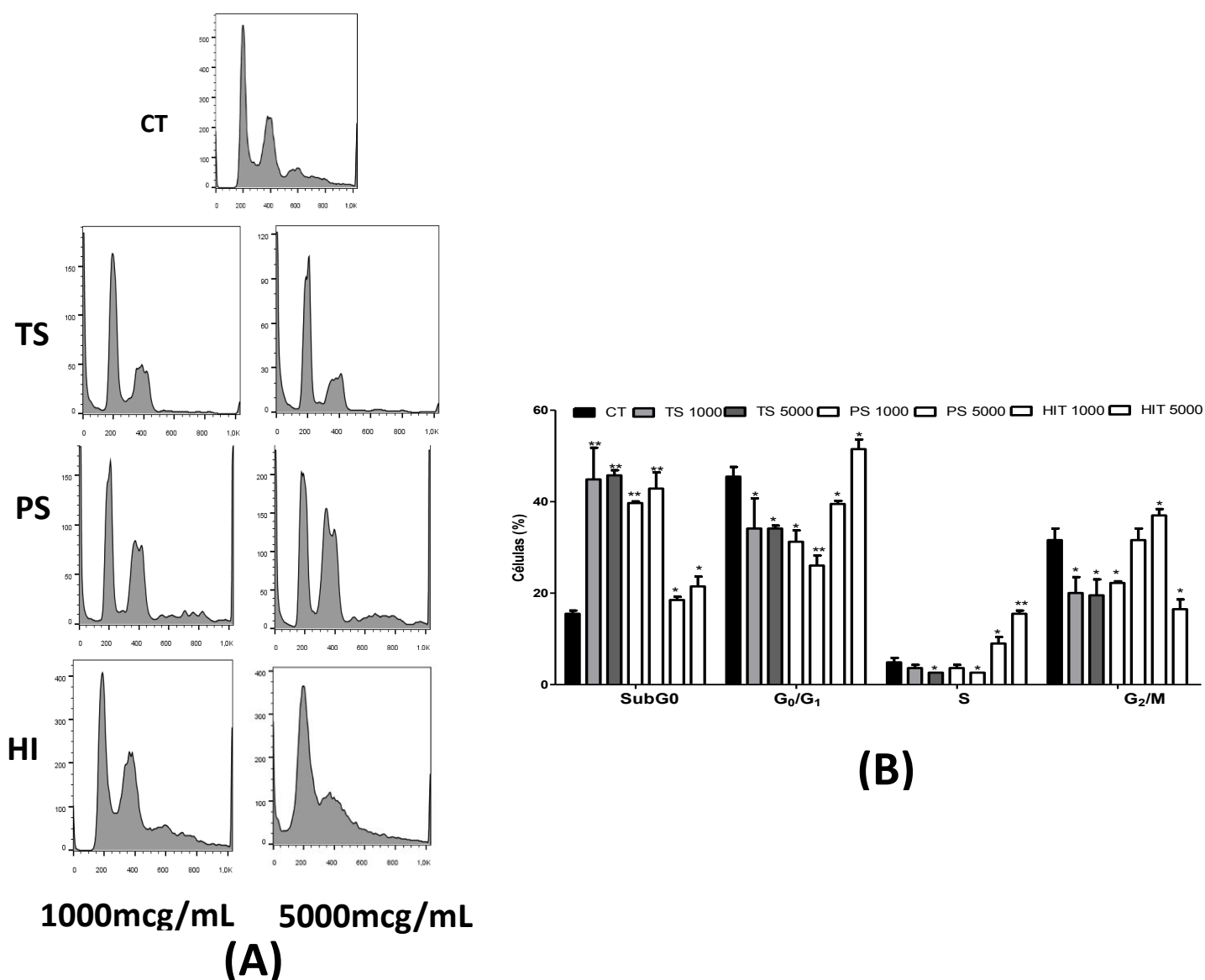
**Figura 9.** Efeito do extrato de goiaba sobre a viabilidade celular da linhagem MCF-7 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento. Células MCF-7 visualizadas em microscópio não tratadas (CT) e após tratamento com duas concentrações dos extratos dos cultivares de goiaba.(PS,HI,TS).

### **5.5. Efeito dos extratos de cultivares de goiaba no ciclo celular**

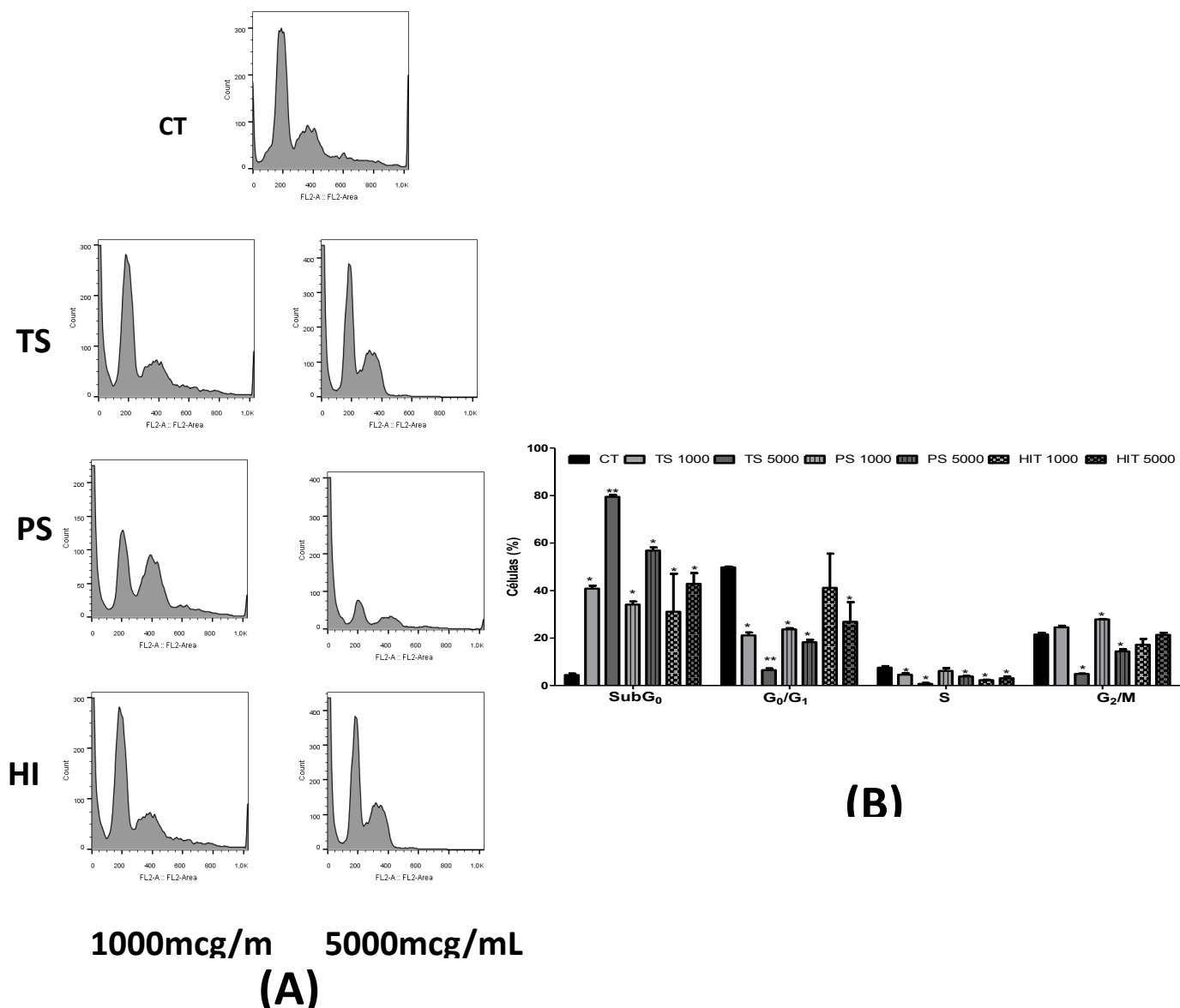
Com a finalidade de monitorar a influência dos extrato dos cultivares de goiaba no ciclo celular das linhagens de carcinoma de mama humano, estas foram incubadas durante 48 horas na linhagem MDA-MB-235 (figura 10) e 24 horas na linhagem MCF-7 (figura 11) com os três diferentes extratos de goiaba, e posteriormente, foi quantificado o percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular.

Quando as células MDA-MB-235 foram tratadas com os três extratos de goiaba, nas concentrações de 1000mcg/ml e 5000mcg/ml, após 48 horas foi possível observar que nos cultivares PS e TS, houve aumento no percentual na fase sub G<sub>0</sub>, seguido por diminuição das fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>/M. Além disso foi observado na maior concentração (5000mcg/ml) do cultivares TS e PS uma redução de células na fase S (Figura 10).

Foi observado, após 24 horas de tratamento, que os extratos de cultivares goiaba (PS, HI, TS) foram capazes de produzir uma redução da proliferação de células da linhagem MCF-7. Neste sentido, todos os cultivares aumentaram, em relação as células não tratadas, o percentual de células na fase sub G<sub>0</sub> ( $p < 0,05$ ), e promoveram uma redução de células na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, com exceção da menor concentração (1000mcg/ml) do cultivar HI (Figura 11). Foi possível ainda constatar uma redução de células na fase S após o tratamento com os cultivares de goiaba, com exceção da menor concentração dos extratos TS e PS. Além disso, houve uma diminuição de células na fase G<sub>2</sub>/M, nas duas concentrações (1000mcg/ml e 5000mcg/ml) de HI ( $P > 0,05$ ) e na maior concentração (5000mcg/ml) de PS, observa-se ainda aumento da fase G<sub>2</sub>/M na menor concentração (1000mcg/ml) de PS.



**Figura 10.** Efeito dos extratos de cultivares de goiaba sobre a progressão do ciclo celular em células MDA-MB 235 48 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em (A). Os resultados quantitativos do efeito do composto sobre esta linhagem celular estão ilustrados no gráfico (B). Os resultados são expressos com média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas com 1000 e 5000 mcg/mL de extratos de cultivares de goiaba Tsumori(TS), Pedro Sato (PS) e Hitígio (HIT). Foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).



**Figura 11.** Efeito dos extratos de cultivares de goiaba sobre a progressão do ciclo celular em células MCF-7 24 horas após a incubação. As fases do ciclo celular estão ilustradas em (A). Os resultados quantitativos do efeito do composto sobre esta linhagem celular estão ilustrados no gráfico (B). Os resultados são expressos com média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos. Diferenças significativas entre as células não tratadas (CT) e as tratadas com 1000 e 5000 mcg/mL de extratos de cultivares de goiaba Tsumori(TS), Pedro Sato (PS) e Hitígio (HI). Foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).



## **5.6. Efeito dos extratos de cultivares de goiaba sobre a taxa de apoptose**

A quantificação do número de células em processo apoptótico pode ser uma medida útil para avaliar a cinética de células cancerosas. A alteração do equilíbrio entre proliferação celular e morte por apoptose tem sido associado à tumorigênese. Neste ensaio, as células em estudo foram incubadas com extratos de cultivares de goiaba (1000mcg/ml e 5000mcg/ml) 48 horas na linhagem MDA-MB-235 e durante 24 horas na linhagem MCF-7.

Os dados sobre a influência dos extratos de goiabas no processo de apoptose nas linhagens celulares de carcinoma de mama humano encontram-se descritos nas Tabelas 4 e 5 e na Figuras 12 e 13.

Na linhagem MDA-MB-235, o extrato do cultivar TS promoveu uma diminuição nas células viáveis e um aumento do percentual de células em apoptose tardia. Foi possível observar ainda, na concentração de 1000mcg/ml, um aumento das células em apoptose inicial e diminuição das células não apoptóticas em ambas as concentrações utilizadas.

Já o cultivar PS promoveu uma redução de células viáveis, seguido de um aumento do percentual de células em apoptose inicial e tardia, com diminuição de células não apoptóticas.

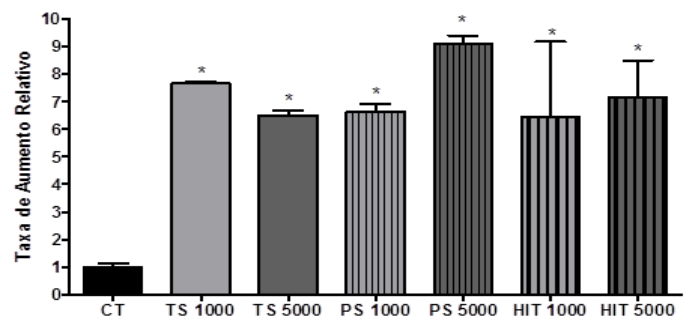
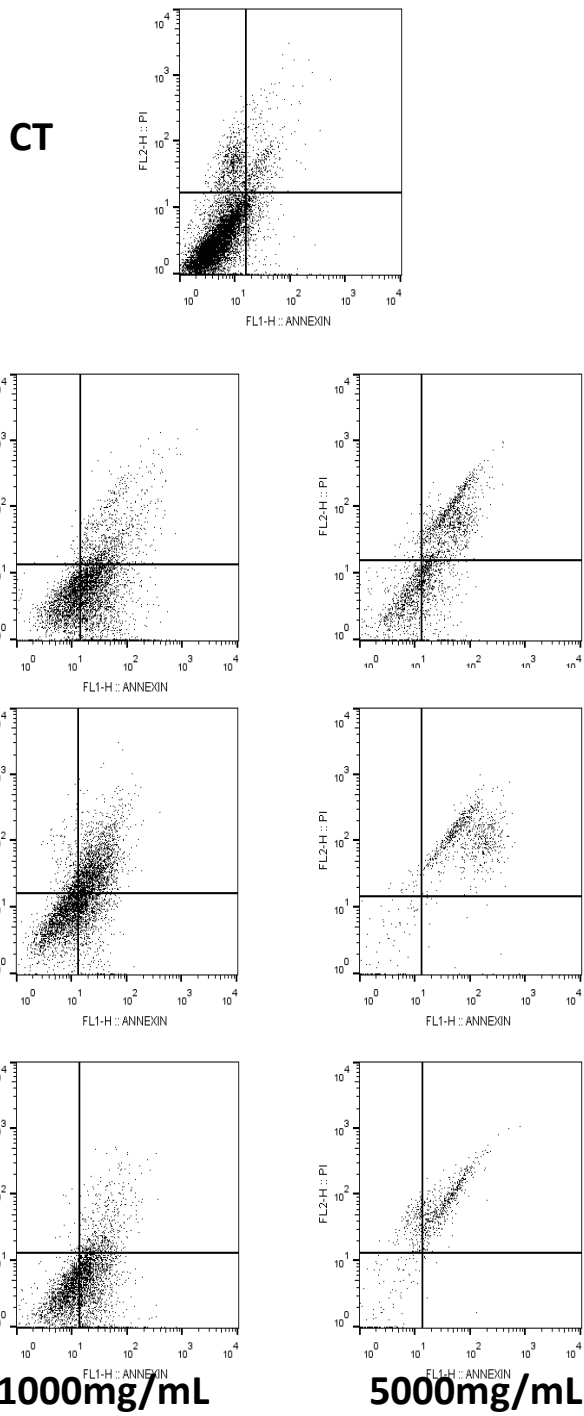
No cultivar HI também foi observado diminuição de células viáveis, seguido do aumento de células em apoptose inicial, na concentração de 1000mcg/ml, e aumento de células em apoptose tardia para concentração de 5000mcg/ml. Não foi observado diminuição das células não apoptóticas na concentração de 5000mcg/ml, havendo redução de células não apoptóticas na concentração de 1000mcg/ml.

Na figura 12, é possível então observar um aumento relativo de 6 a 8 vezes em todos os cultivares após o tratamento com extratos de goiaba.

**Tabela 4.** Efeito dos cultivares dos extratos de goiaba (1000 e 5000mcg/mL) sobre o processo de morte celular por apoptose nas células de adenocarcinoma de mama humano (MDA MB 235) 48h após a incubação.

<b>Extrato</b>	<b>Fases do processo de morte celular</b>	<b>CT</b>	<b>1000mcg/mL</b>	<b>5000mcg/mL</b>
<b>TS</b>	Células viáveis (Anexina V- PI-)	82,60±4,81	39,10±4,20**	44,25±1,77**
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	3,27±0,76	17,58±2,39***	2,20±1,70
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	5,05±1,80	16,75±2,33***	36,15±1,20***
	Células não-apoptóticas (Anexina V- PI+)	9,06±3,73	1,03±0,63***	2,25±1,06**
<b>PS</b>	Células viáveis (Anexina V- PI-)	86,03±3,21	39,10±4,10***	44,25±1,77**
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	3,77±1,88	46,25±0,21***	17,85±0,96***
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	3,81±0,99	16,75±0,35***	36,15±1,20***
	Células não-apoptóticas (Anexina V- PI+)	6,42±1,52	0,61±0,16***	2,25±1,06**
<b>HIT</b>	Células viáveis (Anexina V- PI-)	80,28±1,35	47,45±9,00**	31,15±1,83***
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	2,73±1,74	42,55±19,16**	1,30±1,00
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	6,32±3,20	9,78±2,01	50,55±0,78***
	Células não-apoptóticas (Anexina V- PI+)	11,72±2,98	0,30±0,16***	13,55±3,64

(\*)p<0,05 (\*\*) p<0,01 (\*\*\*)p<0,001

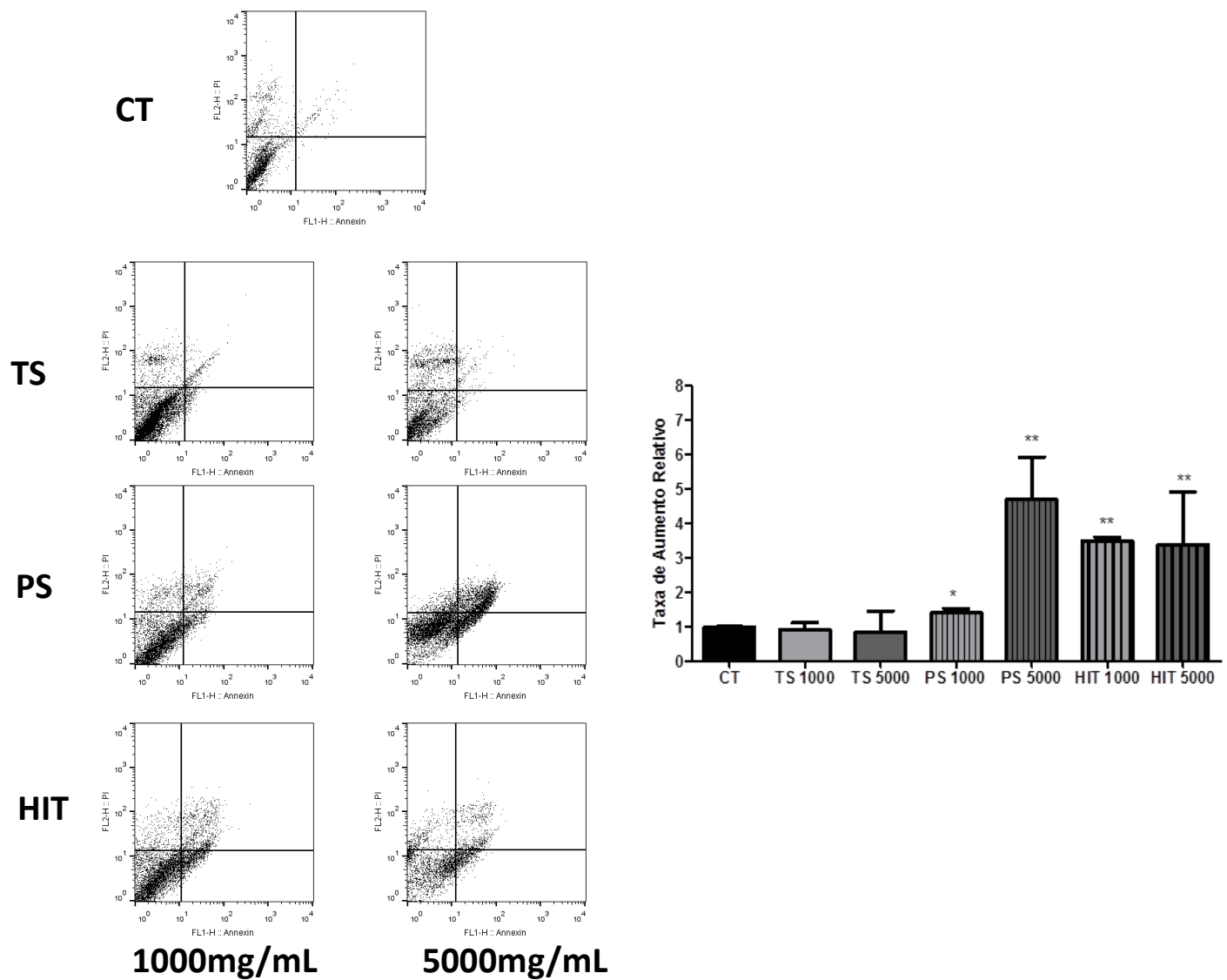


**Figura 12.** Taxa de aumento relativo de apoptose nas linhagens MDA-MB-235 tratadas com extrato de goiaba após 48 horas. Foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

**Tabela 5.** Efeito dos cultivares dos extratos de goiaba (1000 e 5000mcg/mL) sobre o processo de morte celular por apoptose nas células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) 24 h após a incubação.

<b>Extrato</b>	<b>Fases do processo de morte celular</b>	<b>CT</b>	<b>1000mcg/mL</b>	<b>5000mcg/mL</b>
<b>TS</b>	Células viáveis (Anexina V- PI-)	91,85±2,19	90,30±1,45	90,35±1,34
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	2,51±0,78	1,77±0,39	0,94±0,34*
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	3,57±0,85	2,38±0,30	2,87±1,90
	Células não-apoptóticas (Anexina V- PI+)	4,04±1,06	7,15±1,90*	8,87±2,60*
<b>PS</b>	Células viáveis (Anexina V- PI-)	93,60±1,34	89,75±1,64*	73,55±10,92**
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	0,84±0,78	4,29±0,39**	8,58±3,69***
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	0,25±0,57	2,93±0,11*	3,90±0,86*
	Células não-apoptóticas (Anexina V- PI+)	4,29±1,13	5,15±1,90	5,36±0,78
<b>HIT</b>	Células viáveis (Anexina V- PI-)	92,10±4,12	81,35±4,74*	83,70±2,38*
	Apoptose inicial (Anexina V+ PI-)	3,78±1,47	7,62±2,52**	8,24±0,72**
	Apoptose tardia (Anexina V+ PI+)	2,42±2,62	7,98±0,57**	6,36±1,25**
	Células não-apoptóticas (Anexina V- PI+)	3,71±1,21	2,08±1,64	2,94±0,98

(\*)p<0,05 (\*\*) p<0,01 (\*\*\*)p<0,001 / TS – Tsumori/PS-Pedro Sato / HIT – Hitigio.



**Figura 13.** Taxa de aumento relativo de apoptose nas linhagens MCF-7 tratadas com extrato de goiaba após 24 horas. Foram comparadas pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Já na linhagem MCF-7, que apresenta maior resistência com relação a utilização de quimioterápicos, o cultivar TS não promoveu grandes modificações no processo de morte celular, havendo apenas um leve aumento no percentual de células não apoptóticas. Os cultivares (PS E HI) promoveram uma diminuição no percentual de células viáveis, um aumento no percentual de apoptose inicial e tardia, e não foram observadas modificações no percentual de células não apoptóticas.

A figura 13 mostra uma taxa de aumento relativo no processo de apoptose somente para os cultivares PS E HI, com os aumento relativo de 3,6 para o cultivar PS (5000mcg/ml) e 2,4 para o HI, sendo o efeito mais pronunciado na concentração no cultivar PS (5000mcg/ml), não havendo diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas concentrações do cultivar HI.

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho forneceu diversos subsídios que apontam para o papel dos extratos de cultivares goiaba na prevenção do câncer de mama. Como já dito anteriormente, o câncer mais diagnosticado do mundo é o de mama e, no Brasil, apresenta-se como a neoplasia maligna mais incidente entre mulheres, assim como a principal causa de morte entre os diversos tipos de câncer. Evidências epidemiológicas indicam que a utilização de alimentos funcionais e compostos quimiopreventivos, parece contribuir muito na prevenção e tratamento do câncer, atuando com mecanismos de ação antioxidante, anti-inflamatória, anti-hormonal e antiangiogênica (HYOENJI KIM *et al.*, 2010).

As primeiras análises realizadas foram físico-químicas com a finalidade de avaliar principalmente o grau de maturação das goiabas de diferentes cultivares. Dentre os critérios mais importantes do processamento mínimo de frutas, o estágio de maturação no momento da colheita é um fator determinante para o sucesso do processamento. De acordo com CAVALINI *et al.*, (2006), os índices de maturação permitem expressar a fase do desenvolvimento do fruto, remetendo cada estágio a uma qualidade sensorial. Devido às operações envolvidas no processamento mínimo, os frutos sofrem modificações em suas estruturas. Por isso, para obtenção de um produto final de ótima qualidade, é essencial que os frutos sejam colhidos em estágio de maturação adequado.

No presente estudo, a acidez variou entre 0,36 e 0,47 g% ácido cítrico. Em um estudo de GOUVEIA *et al.*, (2004), os valores de pH variaram de 3,9 a 3,917, estando acima dos valores aqui observados. Em contrapartida, um estudo mais antigo (ITAL *et al.*, 1978) no qual o autor caracterizou goiabas vermelhas em três estágios diferentes de maturação achou valores de 0,39; 0,38 e 0,30, estes próximos aos encontrados em nossas análises. Os valores de °Brix dos diferentes cultivares foram próximos à 10% (10,11 para Pedro Sato, 9,57 para Hitígio e 11,08 para Tsumori). MAIA *et al.*, (1998), que avaliou quatro variedades de goiaba encontrou valores que ficavam entre 11,00 e 12,10%, diferentemente do encontrado por Gouveia *et al.* novamente, onde os valores do °Brix não foram superiores a 5,8%. O peso do fruto variou de 158,16g a 297,52g, estando dentro da faixa dos valores de peso de goiaba encontrado por GOUVEIA *et al.*, (2004) os quais foram de 148,2 a 172,3 g.

De acordo com nosso estudo, o melhor poder extrativo das substâncias antioxidantes da goiaba foi a acetona a 70%. Outro estudo, avaliou os efeitos citotóxicos de extrato de acetona de goiaba contra células de câncer de colón, na linhagem HT-29, e como resultado o número de células citotóxicas aumentaram com a concentração do extrato, tendo maior efeito inibidor a proliferação das células (BOHM *et al.*, 1995).

Segundo relatos de HE & VENANT *et al.* (2014), o teor de fenólicos totais do extrato etanólico de folhas de goiabeira foi maior do que extratos aquosos. Os mesmos resultados mostraram que o extrato etanólico de goiaba (GLE) continha atividade eliminadora de radical-GLE superior ao do aquoso devido à maior quantidade de compostos fenólicos, tal como representado pela CHIARI *et al.*, (2012) e THENMOZHI E RAJAN *et al.*, (2015).

MAIOLA *et al.*,(2013) determinou que o etanol é o melhor solvente em comparação com acetona para a extração de tanino a partir de folhas de goiabeira, sendo contrários aos achados desse estudo. O etanol com uma concentração de 30% resultou na quantidade de tanino 2,351 mg / g. Todos estes ensaios mostram que um dos fatores que afetam a qualidade de extratos de plantas medicinais é a concentração do solvente utilizado para a extração, bem como o tipo de solvente utilizado, indicando que no caso da goiaba, a extração com características apolares são mais eficientes, provavelmente por extrair maior quantidade de carotenóides.

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

Em nosso estudo, a atividade antioxidante dos extratos foi analisada por três diferentes métodos (DPPH, FRAP e ABTS). Para os três métodos utilizados, foram observados uma elevada atividade antioxidante nos três



cultivares (Pedro Sato, Hitígio e Tsumori), destacando-se o cultivar Pedro Sato, em todas análises com a maior atividade antioxidante, sendo o melhor extrato.

As diferenças observadas em relação a atividade antioxidante dos compostos e os diferentes métodos utilizados podem ser atribuídas à estrutura química de cada composto, além das características/especificidades de cada método (DÁVALOS *et al.*, 2004).

Em estudos envolvendo outras frutas, polpas de acerola e uva se destacaram na avaliação antioxidante, com mais de 90% de sequestro de DPPH após 30 minutos (VARGAS *et al.*, 2008). DUARTE-ALMEIDA *et al.*,(2006) encontraram elevada atividade antioxidante no extrato de acerola, seguido pelos extratos de amora, açaí e morango. Segundo ROCHA *et al.*,(2009) os valores médios encontrados para a atividade antioxidante de mirtilo foram de 32% e 43%, respectivamente para a polpa e extrato.

A aplicação de pigmentos naturais e a sua correlação com a atividade antioxidante em alimentos é de interesse tanto para a indústria como para os consumidores. Estudos recentes relacionam a ingestão de frutas e vegetais com propriedades antioxidantes e a diminuição do risco e desenvolvimento de algumas doenças crônico-degenerativas (SCHIAVON *et al.*, 2015).

Para a avaliação do efeito anti-tumoral dos extratos dos cultivares de goiaba foram utilizadas duas linhagens derivadas de carcinoma de mama. A linhagem celular epitelial MCF-7 apresenta receptores de estrógeno e progesterona e baixo potencial metastático. Esta linhagem tem morfologia fusiforme e são consideradas luminais. Além disso, são células com baixo grau de invasão em matrigel. A linhagem celular epitelial MDA-MB-235 não expressa receptores hormonais, além de apresentar alto potencial metastático e alta tumorigenicidade. Esta linhagem tem morfologia estrelada e é considerada célula epitelial mesenquimal (LACROIX *et al.*, 2004).

De acordo com resultados obtidos pelo ensaio de MTT, na linhagem MCF-7 tratada com os extratos de goiaba, foi observada uma inibição na viabilidade celular desde as menores doses, com 24 horas de tratamento, nos cultivares Hitígio e Pedro Sato. Nas células MDA-MB-235 houve uma redução sobre a viabilidade deste grupo celular com 48 horas de tratamento, mas apenas nas duas maiores concentrações (2500 e 5000 mcg/ml) no cultivar Pedro Sato, e a partir da concentração 1250 mcg/ml no cultivar Hitígio.

A desregulação no controle do ciclo celular é um aspecto fundamental no desenvolvimento do câncer. As células normais apenas proliferam em resposta ao desenvolvimento da célula ou a sinais presentes na mitose que indicam um requisito para o crescimento do tecido, enquanto que a proliferação das células cancerosas é desencadeada sem controle. Isto indica que as células cancerosas proliferam devido à presença de defeitos de sinalização internos e/ou externos, perdendo a capacidade de controlar sua taxa de proliferação. Um passo limitante no ciclo celular, que muitas vezes não é regulada no câncer, é a progressão de células na primeira fase (G1) do ciclo para a fase S (NAKAYAMA *et al.*, 2006; BOROJEVIC *et al.*, 2010).

Células neoplásicas apresentam-se em constante proliferação celular com grande proporção de células na fase S e G2/M (TYSON *et al.*, 2011). A eficiência de um composto bioativo de alimento no controle do câncer pode ser avaliada através da sua capacidade de bloquear o ciclo celular nas fases G0/G1 e G2/M, reduzindo a proporção de células em fase S (YAO *et al.*, 2011). Em nosso trabalho, nas células MCF-7, a análise ciclo celular revelou que o extrato de goiaba dos cultivares Pedro Sato e Hitígio aumentaram a proporção de células em fase sub G0 e reduziu o total de células presentes em G2/M, em 24 horas pós-tratamento. Estes dados sugerem uma parada de ciclo celular em fase G0/G1, onde as células ficam impossibilitadas de chegarem à etapa de mitose e, se multiplicarem. Com a parada do ciclo na fase G0/G1, pressupõe-se que um menor número de células prossiga no ciclo e, alcance as fase S e G2/M, ocasionando, conseqüentemente, a redução no percentual de células observado nesta fase. Neste sentido, somado aos achados aqui apresentados de que o extrato de goiaba inibiu a proliferação e viabilidade de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7, verificou-se que estes compostos bioativos presentes na goiaba também interferiram na distribuição de fases do ciclo celular.

Uma sequência programada de acontecimentos leva à eliminação de células sem causar danos adjacentes aos tecidos, sendo o processo de apoptose o responsável por manter as células saudáveis, eliminando o excesso ou células anormais. Quando células anormais não conseguem sofrer apoptose, aumenta-se a probabilidade de ocorrer mutações, podendo essas tornar-se células carcinogênicas. A apoptose acontece por ação de uma família

de cisteína proteases, as caspases, que são ativadas em resposta a estímulos pró-apoptóticos. As caspases promovem apoptose por: (a) indução de enzimas destrutivas, como DNases, (b) liberação de citocromo c via Bcl-2 proteínas da família, e (c) destruição das principais proteínas estruturais e regulatórias (SLEE *et al.*, 2001).

Apesar da enorme variedade dos tipos de câncer, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos. Sendo assim, a apoptose é alvo para um potencial uso terapêutico da morte celular programada ou para a compreensão dos mecanismos de resistência à radioterapia e à quimioterapia na prática clínica (GRIVICICH *et al.*, 2007). No presente estudo, os ensaios de apoptose demonstraram que os extratos de goiaba foram capazes de promover morte por apoptose em células de adenocarcinoma mamário MCF-7, quando comparados ao grupo controle após 24 horas de incubação. Em relação às células MDA-MB-235, também foram observados bons resultados, principalmente pelo cultivares Pedro Sato e Hitígio, após 48 hora de incubação.

Muitos autores mostraram que existe uma associação positiva entre a presença de receptores hormonais e um prognóstico mais favorável do câncer de mama. Cerca de dois terços desses carcinomas apresentam expressão de receptores de estrogênio (RE) e são denominados receptor de estrogênio positivo ou simplesmente RE-positivos. A presença de RE permite que o estrogênio exerça suas funções dentro das células, como a proliferação celular e a síntese de várias moléculas, entre as quais outros receptores, como o da progesterona. A expressão de receptor de progesterona (RP) ocorre, em geral, em tumores RE-positivos, embora nem todos os carcinomas RE-positivos expressem o RP. A presença de ambos os receptores indica um estado funcional mais próximo da célula mamária normal, não tumoral. Em outras palavras, estes tumores têm morfologia e funções mais parecidas com as das células de origem e, portanto, são menos agressivos para o organismo. A falta de expressão do RP indica uma menor diferenciação celular, sobretudo se esta negatividade estiver associada a altas taxas de proliferação celular. A ausência de ambos os receptores (RE e RP) já reflete um grau mais acentuado de perda de diferenciação e maior agressividade biológica. A expressão de RE por parte das células tumorais indica que pelo menos parte da proliferação celular

depende da estimulação pelo estrogênio. Sendo assim, é possível frear o crescimento celular através de bloqueios hormonais. O tratamento endócrino precoce do câncer de mama com receptor de estrogênio (ER) positivo reduz a recorrência e as taxas de mortalidade, com ou sem quimioterapia (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, na linhagem MCF-7 tratada com os extratos dos cultivares goiaba, foi observada inibição na viabilidade celular, indução da parada do ciclo e promoção da morte por apoptose, após 24 horas de tratamento. Estes efeitos também foram observados nas células MDA-MB-235, porém em 48 horas de tratamento. Diante dos dados encontrados neste trabalho, este fato se deve, provavelmente, ao bloqueio do receptor de estrogênio na linhagem MCF-7. Estes receptores hormonais são proteínas especializadas, presentes em células mamárias, que ao se ligarem aos hormônios correspondentes desencadeiam uma série de eventos implicados com várias funções celulares, incluindo multiplicação celular e, conseqüentemente, o crescimento do tumor.

Os dados apresentados neste trabalho mostraram que os extratos dos cultivares de goiaba podem desempenhar importante papel na redução da viabilidade celular, na modulação do ciclo celular e, no controle da progressão tumoral, via indução da apoptose.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo confirmou a elevada capacidade antioxidante dos extratos dos cultivares de goiaba, com inibição da proliferação celular e indução de apoptose em células cancerosas de câncer de mama humano.

O extrato do cultivar Pedro Sato obteve a maior capacidade antioxidante em todas as análises (DPPH, FRAP e ABTS) e os maiores teores de compostos fenólicos totais. Além disso, o extrato Pedro Sato promoveu, nas duas linhagens estudadas (MDA-MB-235 e MCF-7), altas reduções na viabilidade celular, diminuição de células nas fases G0/G1 e S, promovendo modificações específicas no ciclo celular e aumento da taxa de apoptose.

Os dados deste trabalho indicam que um efeito antiproliferativo dos extratos dos cultivares de goiaba, com destaque para o cultivar Pedro Sato, o qual é influenciado por diversos fatores que incluem: concentração do composto, tempo de incubação, captação e metabolismo celular dos mesmos.

O aprofundamento de estudos em modelos animais e clínicos, sobre a possível proteção dos extratos no processo de tumorigênese, ajudará a entender outros mecanismos ainda não elucidados por este trabalho.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL S, et al, **Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases**. Canad Med Assoc J 2000; 163(6):739-44.

AHERNE, S. et al, **Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism**. *Nutrition*, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.

ALKHALAF, M.; EL-MOWAFY, A.M. Overexpression of wild-type p53 gene renders MCF-7 breast cancer cells more sensitive to the antiproliferative effect of progesterone. *Journal of Endocrinology*, v.179, p. 55-62, 2003.

ARTACHO-CORDÓN, F.; RÍOS-ARRABAL, S. Matrix metalloproteinases: Potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. *Surgical oncology*, p. 1-9, 2012.

AXELROD, R.; AXELROD, D. E. Evolution of cooperation among tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 103, n. 36, p. 13474-13479, 2006.

BARGELLINI, A. et al. Trace elements, anxiety and immune parameters in patients affected by cancer. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, v.17, p. 3, 2003.

BARREIROS, A.L.B.S et al, **Estresse Oxidativo: relação entre geração e espécie reativas e defesa do organismo**. *Quimica Nova*, v.29, n.1, p113-123,2006.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, v. 53, p. 5, 2009.

BÉLIVEAU, R.; GINGRAS, D. Os alimentos contra o câncer: A prevenção e o tratamento do câncer pela alimentação. Petrópolis, **Vozes**, p.214, 2007.

BENSAAD, K. et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*, v. 126, p. 107-120, 2006.

BOHM F, TINKLER JH, TRUSCOTT TG. **Carotenoids protect against cell membrane damage by the nitrogen dioxide radical**. *Nat Med* 1995; 1:98-9.

BOMBONATI, A.; SGROI, D. C. The molecular pathology of breast cancer progression. **The Journal of pathology**, v. 223, n. 2, p. 307–17, 2011.

BONTEMPO, P. et al. Psidium guajava L. anti-neoplastic effects: induction of apoptosis and cell differentiation. **Cell proliferation**, v. 45, n. 1, p. 22-31, 2012.

BOROJEVC, Radovan; TEODORO, A.J.; SOARES, N.P.C.; MAIA, G.A.; OLIVEIRA, F.L.; MARTUCCI, Renata Brum. Influência dos carotenóides ma proliferação e ciclo celular de linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, 2010, 43:152-3

BRISKEN, C.; O'MALLEY, B. Hormone action in the mammary gland. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 12, p. 31-78, 2010.

BUCCHIERI, F. et al. Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidant-induced apoptosis. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 27, n. 2, p. 179-185, 2002.

BURNS, J. et al. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **J Agric Food Chem.**, v. 49, n. 12, p. 5797-808, 2001.

CAMPELO, J.G. et al. **Conteúdo de fenóis totais em goiaba de polpa vermelha e branca**. XVII Congresso de Iniciação Científica X Encontro de pós graduação,2008.

CARRATU, E.; SANZINI, E. “Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetable”. **Ann. Ist. Super Sanità**, v. 41, n. 1, p.7-16, 2005.

CARTER, P. et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.89, n.10, p. 4285-9, 1992.

CAVALINI, F.C. **Fisiologia do amadurecimento, senescência e comportamento respiratório de goiabas ‘Kumagai’ e ‘Pedro Sato’**. 2008.

90f. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

CAVALINI, F.C. et al. Índices de maturidade para goiabeiras ‘Kumagai’ e ‘Paluma’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p.176-179, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v28n2/a05v28n2.pdf>>. Acesso em 28 dez. 2007. doi: 10.1590/S0100-29452006000200005.

CHAN, W. S. et al. A Role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 68, p. 2592-2598, 2008.

CHARAFE-JAUFFRET, E.; GINESTIER, C. et al. Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. **BMC cancer**, v. 9, p. 202, 2009.

CHEN, S.; ANDREASSON, E. “Update on glucosinolate metabolism and transport”. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 39, p.743-58, 2001.

CHEN, T. et al. Caspase-and p53-dependent apoptosis in breast carcinoma cells induced by a synthetic selenadiazole derivative. **Chemico Biological Interaction**, v. 180, p. 54-60, 2009.

CHEN, X.; HE, B. Oxygen free radical scavenging activity and anti-lipid peroxidation of tea polyphenol. **Zhong Yao Cai.**, v. 21, p. 141–145, 2007.

CHOUDHURY, M.M. (Ed.) **Goiaba: pós colheita**. Petrolina: Embrapa semi árido, 2001. 45p.

COUTURIER, J. et al. Diagnosis of HER2 gene amplification in breast carcinoma. **Pathol Biol (Paris)**, v. 56, n. 6, p. 375-9, 2008.

DÁVALOS, A.; CORDOVEĂ, S.C.G; BARTOLOMEĂ, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p. 48-54, 2004.

DUNNWALD, L. K.; ROSSING, M. A. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. **Breast Cancer Res.**, v. 9, n. 1, p. 6, 2007.



EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. **The Lancet**, v. 378, n. 9793, p. 771-784, 2011.

FABIAN, C. J.; KIMLER, B. F. Use of biomarkers for breast cancer risk assessment and prevention. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 106, n. 1-5, p. 31-9, 2007.

FERRARI CKB. Et al, **Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection.** Int Med J 2001;8:175-84..

GALVÃO, E. R. C. G. N. Breast cancer proteomics: a review for clinicians. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, n. 6, p. 915-25, 2011.

GARNIS, C.; BUYS, T. P. et al. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. **Molecular Cancer**, v. 3, n. 9, 2004.

GIACOMINO, A. P. **Cultura da goiaba.** USP – ESALQ, Piracicaba, São Paulo. Disponível em: [www.almanaquedocampo.com.br](http://www.almanaquedocampo.com.br).

GONZAGA NETO L. et al, **Conservação pós colheita de goiabeira, variedade Paluma.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.34, n.1, p.1-6,1999.

GOUVEIA, J. P. G. et al. Determinação de características físico-químicas da goiaba: goiabeiras adubadas no semiárido da Paraíba. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 6, n. 1, p. 35-38, 2004.

GRIVICICH, I.; REGNER, A. et al. Morte Celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. Claredon Press, **Oxford**, New York, 3 ed., p. 968, 2000.

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

HARRIS, C. C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinican abridged historical perspective. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p.1187-98, 1996.

HE, Q. I. A. N.; VENANT, NIHORIMBERE. Antioxidant power of phytochemicals fromPsidium guajava leaf. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 5, n. 6, p. 676-683, 2004.

HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. **Oncologist**, v.11, n.6, p. 541-52, 2006.

HILL, M. J. Nutrition and Human Cancer. **Annals New York Academy of Sciences**, United States, v. 833, p. 68-78, 1997.

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

HRAZDINA, G.; BORZEL, A. J. et al. Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5-diglucosides. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 21, n. 4, p. 201-204, 1970.

HYOENJI K. et al. Comparative antioxidant and antiproliferative activities of red and white pitayas and their correlation with flavonoid and polyphenol content. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 38-45, 2010.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2010. Incidência de Câncer no Brasil**. Ministério da Saúde. Brasil. Rio de Janeiro, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos** , 4. ed. São Paulo: IMESP, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, disponível em <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>, 2010.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2013. Incidência de câncer no Brasil**. Ministério da Saúde. Brasil. Rio de Janeiro, 2013.

ITAL *et al.*, 1978, disponível em: <http://www.ital.sp.gov.br/>

JACOBS, D. R.; TAPSELL, L. C. Food, not nutrients, is the fundamental unit in nutrition. **Nutr Rev.**, v. 65, n. 10, p. 439-50, 2007.

JARDINI, F. A. et. al. Compostos fenólicos da polpa e sementes de romã (*punica granatum*, L.): atividade antioxidante e protetora em células mdck. **Alim. Nutr.**, v. 21, n. 4, p. 509-517, 2010.

JOSEPH, A.; MOKBEL, K. Male breast cancer. **International Journal of Fertility and Womens Medicine**, v. 49, p. 198-199, 2004.

KAILEH, Mary et al. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 510-516, 2007.

KENNEDY, A. et al. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. **J Nutr.**, v. 139, p. 1-4, 2009.

KIM, H. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p. 429-436, 2010.

KISS, J. **Estranhas no ninho**. Globo Rural, ed. 210, abr. 2003. Disponível em: <[http://www.revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg\\_article\\_print/...](http://www.revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg_article_print/...)>. Acesso em: 20 mai. 2013.

KLEINER SM. **Defense plants: foods that fight disease**. *Physic sportsmed*, 1997 [cited 1998 Sept 28]; 25(12).

KOK, M.; LINN, S. C. Gene expression profiles of the oestrogen receptor in breast cancer. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 68, n. 10, p. 291-302, 2010.

KOK, T. M.; VAN BREDA, S. G. et al. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds. **European Journal of Nutrition. Germany**, v. 47, p. 51-59, 2008.

LACROIX, M.; LECLERCQ, G. Relevance of breast cancer cells lines as models for breast tumours: an update. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 83, n. 3, p. 249-89, 2004.

LARSEN, C. S. Animal source foods and human health during evolution. **J Nutr.**, v. 133, n. 11, p. 3893-7, 2003.

LEWIS, J. E. et al. Intake of Plant Foods and Associated Nutrients in Prostate Cancer Risk. **Nutrition and Cancer**, England, v. 61, n. 2, p. 216-224, 2009.

LINDBERG, K. et al. Expression of Estrogen Receptor  $\beta$  Increases Integrin  $\alpha$ 1 and Integrin  $\beta$ 1 Levels and Enhances Adhesion of Breast Cancer Cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 222, p. 156-167, 2010.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **J Nutr.**, v. 134, n. 12, p. 3479-3485, 2004.

LIU, Z. J. Progesterone receptor gene inactivation and CpG island hypermethylation in human leukemia cancer cells. **FEBS Lett.**, v. 567, n. 2-3, p. 327-32, 2004.

MAILLOA, Meigy Nelce et al. Tannin extract of guava leaves (*Psidium guajava* L) variation with concentration organic solvents. **Intl J Sci Tech Res**, v. 2, n. 9, p. 106-10, 2013.

MANACH, C. et al. "Polyphenols: food sources and bioavailability". **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANICA, I.; ICUMA, IM., JUNQUEIRA, NTV. et al. Fruticultura tropical 6. Goiaba. Porto Alegre: cinco continentes, 2000. 374p.

MARTÍNEZ, R. et al, Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of manfo, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. **Food Chemistry** dez., 2012.

MAZUREK, S.; MICHEL, A. Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 4941–4952, 1997.

MEDINA, D. The mammary gland: A unique organ for the study of development and tumorigenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 1, n. 1, p. 5-19, 1996.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos . **Bol. SBCTA**. Campinas, v. 36, n. 1-11, 2002.

MICHAUD DS, FESKANICH D, RINN EB, COLDITZ GA, SPEIZER FE, WILLETT WC, et al. **Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts**. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(4):990-7.

MIGNONE, L. I. et al. Dietary carotenoids and the risk of invasive breast cancer. **Internacional Journal of Cancer**. United States, v. 124, n. 12, p. 2929-2937, 2009.

MINICH, D. M.; BLAND, J. S. Dietary management of the metabolic syndrome beyond macronutrients. **Nutr Rev.**, v. 66, n. 8, p. 429-44, 2008.

MIRZA, S. et al. Clinical significance of Stratifin, ERalpha and PR promoter methylation in tumor and serum DNA in Indian breast cancer patients. **Clin Biochem.**, v. 43, n. 4-5, p. 380-386, 2009.

MOKBEL, M. S.; HASHINAGA, F. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. **Food Chem.**, v. 94, p. 529–34, 2006.

MONROE, D. G. et al. Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  heterodimers exert unique effects on estrogen- and tamoxifen-dependent gene expression in human U2OS osteosarcoma cells. **Molecular Endocrinology**, v. 19, p. 1555-1568, 2005.

NAKAYAMA, K. I.; NAKAYAMA, K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 5, p. 369-81, 2006.

NASCIMENTO, P. **Avaliação da retenção de carotenóides de abóbora, mandioca e batata doce**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de alimentos) Universidade Estadual Paulista, 2006.

NAZARIAN, R. et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF (V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. **Nature**, v. 468, n. 7326, p. 973-977, 2010.

NIGRO, J. M. et al. Mutations in the p53 gene occurs in diverse human tumour types. **Nature**, v. 342, p. 705-708, 1989.

OMS: **Organização Mundial De Saúde**. Disponível em <<http://www.who.int/en/>> Acesso em: fevereiro de 2013.

PALOZZA, P. et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines by beta-carotene through down-regulation of cyclin A and Bcl-2 family proteins. **Carcinogenesis**. v. 23, n. 1, p. 11-18, 2002.

PEDERSEN, P. L. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells, **Prog. Exp. Tumor Res.**, v. 22, p. 190–274, 1978.

PENG, Chiung-Chi et al. The aqueous soluble polyphenolic fraction of Psidium guajava leaves exhibits potent anti-angiogenesis and anti-migration actions on DU145 cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

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

PEREZ-JIMÉNEZ, J; SAURA-CALIXTO, F. **Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays** . Food Research international, v.39,p.791-800,2006.

PETÉN, J. et al. Biology and natural history of breast câncer. **International Journal of Cancer Supplement**, v. 5, p. 5-21, 1990.

POKORNY, J; YANISHLIEVA, G. **Antioxidants in food: Pratical applications** Cambridge: CRC Press,2001.

PRIOR, R.L. et. al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.3273–3279, 2003.

RAMOS, E. A. et al. Simultaneous CXCL12 and ESR1 CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, p. 23, 2010.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacol. Res.**, v. 55, n. 3, p. 207-216, 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J. et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RODRIGUEZ –AWAYA, D.B.R. **A guide to carotenoid analysis in food.**Washington, D.C.:ILSI Press, 2001.

RYU, Nae Hyung et al. A hexane fraction of guava leaves (*Psidium guajava* L.) induces anticancer activity by suppressing AKT/mammalian target of

rapamycin/ribosomal p70 S6 kinase in human prostate cancer cells. **Journal of medicinal food**, v. 15, n. 3, p. 231-241, 2012.

SABATE, J. The contribution of vegetarian diets to health and disease: a paradigm shift? **Am J Clin Nutr.**, v. 78, p. 502-7, 2003.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SATO, Ryan et al. Anticancer Activity of Guava (*Psidium guajava*) Extracts. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 7, n. 1, 2010.

SCHIAVON, C. C. et al. Nutrition Education Intervention for Women With Breast Cancer: Effect on Nutritional Factors and Oxidative Stress. **Journal of nutrition education and behavior**, v. 47, n.1, p. 2-9, 2015.

SCHMITT, F.; GOBBI, H. Mama. In: BRASILEIRO-FILHO, G. et al. (Ed.). Bogliolo: patologia. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. p. 613-643, 2006.

SILVA, C. R. M.; NAVES, M. M. V. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 135-143, 2001.

SILVA, F. O.; MARTINS, M. I. E. et al. Custo de implantação de lichia em dois espaçamentos, Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, XXVII, 2002, Belém, PA. Anais... Belém: UFPEL, 2002.

Disponível

em: <[http://www.ufpel.tche.br/spfruti/anais\\_xvii\\_cbf/fitotecnia/300.htm](http://www.ufpel.tche.br/spfruti/anais_xvii_cbf/fitotecnia/300.htm)>. Acesso em: 20 mai. 2013.

SLEE, E. A. Executioner caspase-3,-6 and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phases of apoptosis. **J Biol Chem.**, v. 276, p. 7230–7236, 2001.



SUL'AIN, Mohd Dasuki; ZAZALI, Khaizil Emylia; AHMAD, Norliza. Screening on Anti-Proliferative Activity of Psidium Guajava Leaves Extract towards Selected Cancer Cell Lines.

SUN, J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **J Agric Food Chem.**, v.50, p.7449–7454, 2002.

SUN, J.; HAN, F. et al. Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. **Cancer Lett.**, v. 241, n. 1, p.124-34, 2006.

THENMOZHI, S.; RAJAN, S. GC-MS analysis of bioactive compounds in Psidium guajava leaves. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 5, p. 162-166, 2015.

THENMOZHI, S.; RAJAN, S. Reactive oxygen and nitrogen species scavenging activity of Psidium guajava (l) leaf. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 4, n. 1, p. 410-418, 2015.

TLSTY, T. D. et al. Genetic and Epigenetic Changes in Mammary Epithelial Cells May Mimic Early Events in Carcinogenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 9, n. 3, p. 263-274, 2004.

TRICHOPOULOS, D. et al. Early life events and conditions and breast cancer risk: from epidemiology to etiology. **International journal of cancer**, v. 122, n. 3, p. 481–485, 2008.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. Agricultural Research Service: Nutrient Data Laboratory. Washington, 2006. Disponível em: <[www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp)>.

VARGAS, P. N.; HOEZEL, S. C. et al. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n.1, p. 11-15, 2008.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. **Espécies Reativas de oxigênio e de Nitrogênio, antioxidantes e marcadores de danos oxidativos em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação.** Química Nova, v.30, n.5,p.1338,2007.

WEIGEL, M. T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocrine-related cancer**, v. 17, n. 4, p. 245–62, 2010.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.et al. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature reviews/Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591-602, 2005.

WEISBURGER JH. Eat to live, not live to eat. *Nutrition*, 2000;16: 767-73.

WILLIAMSON, G., HOLST, B. Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? **Br J Nutr.** v. 99, p. 55-8, 2008.

YAO, L. *et al.* Effect of soy skim from soybean aqueous processing on the performance of corn ethanol fermentation. **Bioresour Technol**102(19):9199-205, 2011.

YEN, G. C.; LAI, H. H. et al. Nutric oxide scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinite* root. **Food Chemistry**, v. 74, p. 471-478, 2001.

YONG, C. D.; ANDERSON, S. M. Sugar and fat- that's where it's at: metabolic changes in tumors. **Breast Cancers Research**, v. 202, p. 1-9, 2008.

