



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Atividade do extrato rico em licopeno da goiaba vermelha
(*Psidium guajava* L.) em células de adenocarcinoma
mamário *in vitro***

RAIMUNDA CARDOSO DOS SANTOS

Teresina-PI
2017

RAIMUNDA CARDOSO DOS SANTOS

**Atividade do extrato rico em licopeno da goiaba vermelha
(*Psidium guajava* L.) em células de adenocarcinoma
mamário *in vitro***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia (Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais).

Orientador: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.

Teresina – PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

S237a Santos, Raimunda Cardoso dos.
Atividade do extrato rico em licopeno da goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.) em células de adenocarcinoma mamário *in vitro*[manuscrito] / Raimunda Cardoso dos Santos. – 2017.
115 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).
Tese (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO) -
Universidade Federal do Piauí, 2017.

Orientação: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.
Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

1. Goiaba Vermelha. 2. *Psidium guajava*. 3. Licopeno. 4. Câncer. 5. MCF-
7. I. Leite, José Roberto de Souza de Almeida. II. Título.






CDD: 610.7

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: RAIMUNDA CARDOSO DOS SANTOS

TÍTULO DO PROJETO: “Atividade do extrato rico em licopeno da goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.) em células de adenocarcinoma mamário *in vitro*.”

PROFESSOR ORIENTADOR: José Roberto de Souza de Almeida Leite

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite - UFPI (Presidente)	<u>Aprovado</u>	
Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos - UFPI (Examinador)	<u>Aprovado</u>	
Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva - IFPI (Examinadora)	<u>Aprovado</u>	
Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo – UFPI (Examinador)	<u>Aprovado</u>	
Prof. Dr. Joilson Ramos de Jesus - UFBA (Examinador)	<u>Aprovado</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 19 de Dezembro de 2017.

HORÁRIO: 09:00h

LOCAL: Na sala de reuniões do Campus Ministro Reis Veloso - Parnaíba.

Agradecimentos

À Deus, por ter me dado força, coragem e determinação para não fraquejar e desistir no meio do caminho diante das dificuldades.

Aos meus pais, Maria do Carmo Cardoso dos Santos e Santino Raimundo dos Santos, pelos exemplos de força, coragem, incentivo, orações e o amor incondicional.

Ao meu esposo Anderson Santos de Araújo, pelo amor e companheirismo em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Francisca S. de Oliveira, Raimundo C. dos Santos, Jovita C. dos Santos, Maria da Paz C. dos Santos, Lázaro C. dos Santos, Antônio C. dos Santos, Reginaldo C. dos Santos, Nilson C. dos Santos, Nelson C. dos Santos e Thiago S. C. dos Santos, pelo apoio, carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite, pela confiança, entusiasmo e amizade. Por todos os ensinamentos ao longo desses 11 anos juntos (Iniciação Científica, orientador de estágio na empresa Vegeflora, orientador de TCC, orientador quando desempenhei a função de técnica em Desenvolvimento Tecnológico Industrial, orientador na especialização, mestrado e agora do doutorado). Sem o seu incentivo e apoio nada disso seria possível.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC, *Campus* Parnaíba, Universidade Federal do Piauí, pelo apoio técnico essencial para os resultados deste trabalho.

A todos os colaboradores deste trabalho que acreditaram e não mediram esforços para a realização do mesmo.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, pelo apoio técnico essencial para os resultados deste trabalho.

À professora Graziella Anselmo Joanitti, por ter acreditado e aceitado em participar do desafio da realização desse trabalho.

Ao professor Fernando Aécio Carvalho por ter aceitado a contribuir com parte dos resultados deste trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, pelos os experimentos que foram realizados e contribuído para este trabalho.

À Phytobios Pesquisa Desenvolvimento e Inovação LTDA, empresas do Grupo Centroflora, por ter acreditado neste trabalho e ter cedido suas instalações para desenvolvimento de parte dos experimentos.

À Cristina Ropke, pela amizade e por ter acredita neste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e competência na avaliação deste trabalho.

À Nádia Tavares, Nayra Tavares e a Natália Tavares, pelo apoio, amizade e por ter me acolhido em Brasília quando tiver que realizar os experimentos com células tumorais.

Aos amigos de turma do doutorado RENORBIO: Yuri Campelo, Marcelo Mesquita, Rogério Almiro, Tamnata Ferreira, Jefferson Rocha e Mariana Moraes, pelo apoio, amizade e companheirismo.

Aos professores que compõem o Programa RENORBIO, Ponto Focal Universidade Federal do Piauí, pela formação e conhecimentos compartilhados.

À professora Durcilene Alves da Silva, que com sua paciência e doçura sempre tinha uma palavra de conforto e entusiasmo para compartilhar com os alunos nos momentos de desânimo e desespero.

À professora Janiciara Botelho, que gentilmente emprestou algumas vidrarias do laboratório do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, necessárias para obtenção do extrato utilizado nesse trabalho.

Aos amigos do BIOTEC: Joilson Ramos, Leiz Verás, Taiane Oliveira, Aline Rodrigues, Silvania Siqueira, Monialine Sousa, Adelaide Guimarães, Nábila Martins, Jéssica Pires, Eryka Oliveira, Emanuel Oliveira, Antônia Carla Oliveira, Elanno Nascimento, Francisco Edmar Lima, Natália Dionísio, Jéssica Fortes, Fábio Oliveira, Parick Quelemes, Daniel Arcanjo, Roberta Rodrigues e Márcia Perfeito, pelo apoio, amizade e companheirismo.

À Adriany Amorim, Andreanne Vasconcelos, Jessica Teles e Alicia Ombredane pela amizade, companheirismo, solidariedade e pelos conhecimentos compartilhados.

À Rosylana Ponte, pela amizade e por ter me ajudando quando estava pagando as disciplinas em Teresina.

Aos amigos Leonardo Costa, Eline Cândia, Juliana Massulo, Juliana Melo, Francisco das Chagas Sales, Julianne Nunes, João Paulo da Silva, Elizabeht Moura, Rogério Azevedo, Kássia Pereira, Sâmya Chaves, Samara Viana, Samara Clotildes, Maria Aparecida Carvalho, Kelly Reis, Kelly Cosme, Andreane Coelho, Marília Mesquita, Bruno Oliveira, Cibelle Miranda, Gildeon Oliveira, Irineu Campelo, Alessandra Braga, Saul Lima, Juraci Santos, Layara Lopes, Wermeson Alencar, Jesselina Soares, Lilia Monteiro, Pedro Santos, Leônia Dantas, Liana Reis, Renata Oliveira, Talga Cardoso, Maria Carvalho, Lucídio Braga, Surame Pereira, Poliana Miranda, Maria Alice Ferreira pela amizade e pelos os momentos de descontração.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pelo suporte técnico através do Portal Periódicos.

À FAPEPI (Fundação de Amparo a Pesquisa do Piauí), pela concessão da bolsa.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa.

Ao RENORBIO/ Ponto focal Universidade Federal do Piauí, pelo subsídio à realização deste trabalho.

*Dedico este trabalho à minha família e a Deus,
pelo apoio e amor incondicional.*

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

(Galileu Galilei)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELA

RESUMO

ABSTRACT

INTROUÇÃO	18
OBJETIVOS	21
Objetivo geral	22
Objetivos específicos	22
CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO	23
1.1 - Goiabeira (<i>Psidium guajava</i> Lineu)	24
1.2 – Carotenoides	26
1.2.1 – Licopeno	31
1.3 - Câncer de mama	34
1.4 – Morte celular	39
CAPÍTULO 2 – ARTIGO PUBLICADO (tradução para a língua portuguesa)	44
2.1 – Introdução.....	48
2.2 – Materiais e Métodos.....	49
2.2.1 – Químicos e Reagentes.....	49
2.2.2 – Extração e Quantificação.....	50
2.2.3 – Estudos químicos.....	50
2.2.3.1 – Análises de espectrometria de massas.....	50
2.2.3.2 – Estudos experimentais de FTIR-ATR.....	51
2.2.4 – Estudos computacionais.....	51
2.2.5 – Estudos biológicos.....	52
2.2.5.1 – Animais.....	52
2.2.5.2 – Culturas de células MCF-7 e NIH-3T3.....	52
2.2.5.3 – Tratamento celular.....	52

2.2.5.4 – Ensaio de viabilidade das células MCF-7 e NIH-3T3.....	53
2.2.5.5 – Ensaio de viabilidade de macrófagos.....	54
2.2.5.6 – Integridade da membrana plasmática e contagem de células.....	54
2.2.5.7 – Ensaio de fragmentação de DNA e ciclo celular.....	55
2.2.5.8 – Potencial de membrana mitocondrial e aspectos morfológicos MCF-7.....	56
2.2.5.9 – Marcação por Anexina V FITC/ Iodeto de propídeo (PI).....	57
2.2.5.10 – Atividade hemolítica.....	57
2.2.6 – Análise estatística.....	58
2.3 – Resultados e Discussão.....	58
2.3.1 – Caracterização química.....	58
2.3.2 – O ELG exibiu citotoxicidade contra células cancerosas, mas não em linhagem celular normal.....	64
2.3.3 – O ELG não danificou a membrana celular das células MCF-7.....	67
2.3.4 – O ELG afetou a proliferação das células MCF-7.....	67
2.3.5 – O ELG aumentou a fragmentação do DNA e deteve o ciclo celular em MCF-7.....	68
2.3.6 – O ELG induziu alterações no potencial da membrana mitocondrial nas células MCF-7.....	70
2.3.7 – Alterações morfológicas induzidas pelo ELG em células MCF-7.....	72
2.3.8 – O ELG não induziu necrose ou apoptose tradicional em células MCF-7.....	73
2.3.9 – O ELG não mostrou atividade hemolítica.....	80
2.4 – Conclusões.....	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
APÊNDICE.....	104
APÊNDICE 1 – Vencendo o câncer.....	105
APÊNDICE 2 – Atividades desenvolvidas durante a Pós-graduação.....	107
ANEXOS.....	111
ANEXO 1 – Comprovante do artigo publicado.....	112
ANEXO 2 – Artigos publicado em periódico indexado relacionado a <i>Psidium guajava</i>	113
ANEXO 3 – Carta de aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa da UFPI.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAF-1	Fator de ativação da protease apoptose 1
ATP	Adenosina trifosfato
CM	Câncer de mama
DFT	Teoria do funcional da densidade
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELG	Extrato rico em licopeno da goiaba vermelha
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADD	Domínio de Morte Associado ao Faz
FSC	Tamanho celular (do inglês "Forward Scatter")
FTIR-ATR	Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada
HIV	Vírus da imunodeficiência Humana
IAPs	Proteínas inibidoras de apoptose
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% das células
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
L.	Lineu
MCF-7	Células de adenocarcinoma de mama humana
MOMP	Permeabilização da membrana externa da mitocôndria
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol -2-il)-2,5- difenil-tetrazol
NIH-3T3	Células normais de fibroblastos de camundongos
<i>P.</i>	<i>Psidium</i>
RPMI	Meio de cultura (Roswell Park Memorial Institute)
SFB	Soro fetal bovino
SSC	Granulosidade da célula (do inglês "Side Scatter")
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (do inglês "phosphate buffered saline")
TNF	Tumor Necrosis Factor
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UV-Vis	Ultravioleta visível

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
λ	Comprimento de onda
g	Gramma
L	Litro
μg	Micrograma
μl	Microlitro
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
Kg	Quilo

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - Goiabeira (<i>Psidium guajava</i> L.) (A) e a goiaba (B)	24
FIGURA 2 – Estrutura química do Isopreno	27
FIGURA 3 – Isômeros <i>cis</i> e <i>trans</i> do licopeno	32
FIGURA 4 – Adenocarcinoma ductal e lobular	37
FIGURA 5 – Características morfológicas da morte celular por apoptose e necrose	40
FIGURA 6 – Ativação da apoptose pelas vias extrínseca e intrínseca	41

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Espectro de UV-Vis do padrão do todo- <i>trans</i> -licopeno de tomate (Sigma Aldrich) e extrato rico em licopeno da goiaba vermelha (ELG).....	60
FIGURA 2A – MS/MS no intervalo de m/z 50 a 550 do ELG.....	62
FIGURA 2B - Resultados FTIR para o ELG experimental (linha preta), IR teórico do todo- <i>trans</i> -licopeno (linha verde), 13- <i>cis</i> -licopeno (linha vermelha) e 5- <i>cis</i> -licopeno (linha azul) (B).....	63
FIGURA 3 - Efeito do ELG na viabilidade em linhagem celular de câncer de mama humano (MCF-7) com exposição após 24 horas (A) e 72 horas (B).....	64
FIGURA 4 - Efeito do ELG sobre a viabilidade em linhagem celular normal de fibroblastos de camundongos (NIH-3T3), com exposição após 24 horas (A) e 72 horas (B).....	65
FIGURA 5 - Citotoxicidade do ELG sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	66
FIGURA 6 - Efeito do ELG sobre a integridade da membrana das células MCF-7, com exposição após 24 horas (A) e 72 horas (B).....	67

FIGURA 7 - Efeito do ELG sobre a proliferação celular em MCF-7 com exposição após 24 e 72 horas.....	68
FIGURA 8 - Efeito do ELG sobre a fragmentação do DNA de células MCF-7 com exposição após 24 horas (A) e 72 horas (B).....	69
FIGURA 9 - Efeito do ELG no ciclo celular de MCF-7 com exposição após 24 horas (A) e 72 horas (B).....	69
FIGURA 10 - Efeito do ELG sobre o potencial da membrana mitocondrial em células de MCF-7, com exposição após 24 (A) e 72 (B) horas. (C) Mostra um gráfico representativo da porcentagem de células com potencial de membrana alterado.....	71
FIGURA 11 - Efeito do ELG sobre FSC-H = tamanho (A) e SSC-H = granularidade (B) de células MCF-7 com exposição após 24 e 72 horas nas concentrações de 400 µg/mL e 800 µg/mL.....	72
FIGURA 12 - Efeito do ELG em células MCF-7 avaliando os parâmetros morfológicos com exposição pós 24 (A, B, C) e 72 horas (D, E, F) nas concentrações de 400 µg/mL (B, E) e 800 µg/mL (C, F) em relação ao controle DMSO (A, D).....	73
FIGURA 13 - Efeito do ELG em células MCF-7 no mecanismo de morte celular com marcação por Anexina-V FITC/PI após exposição de 24 horas nas concentrações de 400 µg/mL (C) e 800 µg/mL (D) em relação ao controle DMSO (A) e controle H ₂ O ₂ (B).....	75
FIGURA 14 - Efeito do ELG em células MCF-7 sobre o mecanismo de morte celular com exposição após 24 horas às concentrações de 400 µg/mL e 800 µg/mL. Células marcadas com PI (A), Anexina-V FITC/PI (B), células viáveis (C) e Anexina-V FITC (D).....	76
FIGURA 15 - Efeito do ELG em células MCF-7 no mecanismo de morte celular (marcação de Anexina-V FITC/PI) após exposição por 72 horas nas concentrações de 400 µg/mL (B) e 800 µg/mL (E) em relação ao controle DMSO (A) e controle H ₂ O ₂ (D). Células MCF-7 expostas ao ELG sem marcação de Anexina-V FITC/PI a 400 µg/mL (C) e 800 µg/mL (F).....	77

FIGURA 16 - Efeito do ELG sobre o mecanismo de morte celular de células MCF-7 com exposição por 72 horas às concentrações de 400 µg/mL e 800 µg/mL. Células marcadas com PI (A), Anexina-V FITC/PI (B), células viáveis (C) e Anexina-V FITC (D).....79

FIGURA 17 - Citotoxicidade do ELG sobre eritrócitos de sangue de carneiro.....80

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO 1

Tabela 1- Estimativa do número de novos casos dos dez tipos de câncer mais comum em mulheres no Brasil para o ano de 2016.....35

CAPÍTULO 2

Tabela 1- Resumo do valor da concentração inibitória máxima (IC_{50}) para células de câncer e células normais tratadas com ELG, conforme avaliado utilizando o método MTT.....66

RESUMO

A espécie *Psidium guajava*, conhecida popularmente como goiabeira, encontra-se amplamente cultivada e tornou-se mundialmente naturalizada em áreas tropicais e subtropicais. O seu fruto, a goiaba, possui grande valor nutritivo, principalmente, pelo seu alto teor de vitamina A, de vitaminas do complexo B, da vitamina C e sais minerais. Na medicina popular a goiaba também tem sido utilizada como hipoalergênico, antidiarreico, anti-inflamatório e antimicrobiano. Esta contém na polpa vermelha o carotenoide mais eficiente na neutralização do oxigênio singlete, o licopeno. O presente estudo avalia a atividade anticâncer do extrato de goiaba rico em licopeno (ELG) em células de adenocarcinoma mamário *in vitro*. O ELG foi analisado por espectrofotometria UV-Vis, espectrometria de massa, Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuado (FTIR-ATR) e estudos computacionais. O efeito citotóxico, por sua vez, foi demonstrado em células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, células de fibroblastos de camundongos NIH-3T3, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e eritrócitos de sangue de carneiro por ensaio de viabilidade celular utilizando o método MTT e citometria de fluxo. Os resultados obtidos por espectrofotometria mostram que o ELG contém 20% de peso seco de licopeno/extrato, enquanto o espectro MS/MS demonstra a presença de um íon molecular $[M]^+$ com valor de m/z 536.4364, assim como, quatro fragmentos principais com valores de m/z 467.3658, 444.3788, 375.3034 e 269.2259 característicos deste carotenoide, e sugerem a presença de isômeros 13-*cis* licopeno e todo-*trans*-licopeno. Os FTIR-ATR experimental e teórico sugerem que ambas as formas estão, em princípio, presentes no extrato. O ELG apresentou uma atividade dose e tempo dependente em células MCF-7 com um IC_{50} de 25 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$ nos tempos de 24 e 72 horas, respectivamente. Em paralelo, o ELG não demonstrou atividade citotóxica tão significativa em linhagem de fibroblastos NIH-3T3, apresentando IC_{50} 1.579 e 911,5 $\mu\text{g/mL}$ após 24 e 72 horas. Em concordância, o tratamento com ELG (800 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$) resultou baixa citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c apresentando IC_{50} superior a 800 $\mu\text{g/mL}$ e ausência de atividade hemolítica. O ELG (400 e 800 $\mu\text{g/mL}$) causou redução na proliferação celular, parada do ciclo celular, fragmentação do DNA, modificações no potencial da membrana mitocondrial e alterações morfológicas de granularidade e tamanho da célula MCF-7, mas não causou danos significativos à membrana celular, não causou necrose e nem apoptose tradicional. Assim, o ELG demonstrou uma atividade citotóxica e citostática em células de adenocarcinoma mamário representando um grande potencial para o tratamento do câncer de mama. No entanto, outras investigações serão realizadas para entender melhor o mecanismo de ação do extrato.

Palavras-chave: Goiaba vermelha; *Psidium guajava*; Licopeno; Câncer; MCF-7.

ABSTRACT

Psidium guajava species, popularly known as guava, is widely cultivated and has become worldwide naturalized in tropical and subtropical areas. Its fruit, guava, has great nutritional value, mainly for its high content of vitamins A, B, C and mineral salts. In popular medicine guava has also been used as hypoallergenic, antidiarrheal, anti-inflammatory and antimicrobial. The red pulp contains the most efficient carotenoid in the neutralization of singlet oxygen: lycopene. This study evaluates the anticancer activity of a lycopene-rich guava extract (LEG), against mammary adenocarcinoma cells *in vitro*. LEG was analysed through spectrophotometry UV Vis, mass spectrometry, Fourier-Transform Infrared with Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) and computational studies. The cytotoxic effect, in turn, was demonstrated in human breast adenocarcinoma cells (MCF-7), murine fibroblasts cells (NIH-3T3), BALB/c murine peritoneal macrophages and lamb blood erythrocytes, through cell viability assay, using MTT method and flow cytometry. Spectrophotometry results showed that LEG contains 20% of dry-weight of lycopene/extract, while the MS/MS spectrum showed the presence of a molecular ion $[M]^+$ with m/z value of 536.4364 as well as four main fragments with the subsequent m/z values 467.3658, 444.3788, 375.3034 and 269.2259, which are characteristic for this carotenoid, and suggest the presence of 13-*cis* isomers lycopene and all-*trans*-lycopene. Experimental and theoretical FTIR-ATR suggest that both forms are, in principle, present in the extract. LEG showed dose and time-dependent activity in MCF-7 cells, with IC_{50} of 25 and 6,25 $\mu\text{g/mL}$, after 24 and 72 hours, respectively. At the same time, LEG did not show significant cytotoxicity against NIH-3T3 fibroblasts cell line, with IC_{50} of 1,579 and 911.5 $\mu\text{g/mL}$ after 24 and 72 hours. In agreement, the treatment with LEG (800 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$) showed low cytotoxicity in BALB/c murine peritoneal macrophages with IC_{50} above 800 $\mu\text{g/mL}$ and absence of haemolytic activity. LEG (400 e 800 $\mu\text{g/mL}$) also reduced cell proliferation and caused cell cycle interruption, DNA fragmentation, modifications in mitochondrial membrane potential and morphological alterations in MCF-7 cells size and granularity, but did not cause significant damage to cell membrane, traditional necrosis or apoptosis. So, LEG demonstrated a cytotoxic and cytostatic activity against breast adenocarcinoma cells, showing a great potential for the treatment of breast cancer. However, other investigations may be performed, in order to understand the mechanism of action of the extract.

Key-words: Red guava; *Psidium guajava*; Lycopene; Cancer; MCF-7.

Introdução

“Frutas com muitas sementes que causam incômodo aqueles que a comem pela primeira vez, alimentos com tal gosto e cheiro divinos poderiam ser considerados pecado.”

Fernández Oviedo

Introdução

A espécie *Psidium guajava* Lineu é conhecida popularmente como goiabeira, possui ampla distribuição em áreas tropicais e subtropicais (AMORIM et al., 2017; SHISHIR et al., 2014). O seu fruto, a goiaba, é composta por fibras alimentares, vitamina C, vitaminas do complexo B, sais minerais, carotenoides e compostos fenólicos, bem como apresenta um sabor agradável e intenso, com propriedades nutricionais, funcionais e sensoriais notáveis (OSORIO; FORERO e CARRIAZO, 2011; NUNES et al., 2016). Na medicina popular, tem sido utilizada como agente hipoalergênico, antidiarreico, anti-inflamatório, antimicrobiano, anti-hipertensiva e analgésica (FLORES et al., 2015; VASCONCELOS, 2015).

Muitos trabalhos relacionam o consumo de frutas com a redução da incidência de doenças degenerativas crônicas devido à presença de compostos bioativos com propriedades antioxidantes (BOSHO e BIN, 2010; NORA et al., 2014; ROSA, 2013; SILVA et al., 2010; SOUZA, 2013; VIDAL et al., 2012). A polpa da goiaba vermelha contém o carotenoide mais eficiente na neutralização do oxigênio singlete, o licopeno, podendo ser encontrado em alimentos como tomate, melancia, toranja, cenoura e pimentão vermelho (SIWACH; TOKAS e SETH, 2016; SINGH et al., 2004; SUWANARUANG, 2016; FISH; VEAZIE e COLLINS, 2002). Esse carotenoide tem chamado atenção nos últimos anos devido ao seu elevado potencial antioxidante, sua possível ação contra doenças cardiovasculares, ação positiva nos tratamentos preventivos contra doenças degenerativas relacionadas com o envelhecimento, além de sua associação com a redução da incidência de alguns tipos de cânceres (GIOVANUCCI, 1999, SHAMI e MOREIRA, 2004).

O interesse da indústria de alimentos em aditivos naturalmente aromatizados e enriquecidos aumentou significativamente devido à demanda dos consumidores pela redução do uso de aditivos alimentares sintéticos que estão relacionados aos riscos para a saúde a curto e longo prazo com o desenvolvimento de várias doenças, inclusive o câncer (OSORIO; FORERO e CARRIAZO, 2011).

O câncer tem sido responsável pelo o óbito de mais de 8 milhões de pessoas por ano no mundo e no Brasil, 223,4 mil óbitos em 2015. Para o câncer de mama, foi estimado em 2012, 522 mil óbitos no mundo e no Brasil foram registrados mais de 14 mil óbitos em 2014 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012).

Para o Brasil, biênio 2016-2017, a estimativa do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) é a ocorrência de 596.070 casos novos de câncer e 57.960 casos novos de câncer de mama para cada um desses anos (INCA, 2017a). O câncer é a segunda

maior causa de morte no país e o câncer de mama representa a principal causa de morte por câncer em mulheres brasileiras depois do câncer de pele não melanoma, representando um grande problema de saúde pública em todo o mundo dada a sua alta incidência de morbimortalidade, como também pelo alto custo no tratamento, seguimento e reabilitação (SILVA e RIUL, 2011).

A prevenção primária do câncer de mama tem como medidas uma alimentação saudável, prática de atividade física regular e manutenção do peso ideal, podendo evitar cerca de 30% dos casos. O ato de amamentar também é considerado um fator protetor (INCA, 2014).

Devido à alta incidência de câncer de mama no Brasil e no mundo e o tratamento atualmente para esse tipo de câncer aprestar uma certa agressividade aos pacientes, tem-se a necessidade pela a busca de novos compostos que apresentem atividade antitumoral e tenha baixa citotoxicidade, então, o nosso objetivo geral é avaliar a atividade anticâncer do extrato de goiaba rico em licopeno em células de adenocarcinoma mamário *in vitro*.

Objetivos

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a atividade anticâncer do extrato de goiaba rico em licopeno em células de adenocarcinoma mamário *in vitro*.

Objetivos específicos

- Obter o extrato rico em licopeno da goiaba vermelha (ELG);
- Quantificar e caracterizar o ELG por espectrofotometria UV-Vis, Espectrometria de Massas e por Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier;
- Analisar os efeitos do ELG na viabilidade celular em células normais de fibroblastos NIH-3T3, macrófagos e eritrócitos *in vitro*;
- Analisar os efeitos do ELG na viabilidade celular, na morfologia, na integridade da membrana e na proliferação de células de câncer de mama MCF-7 *in vitro*;
- Analisar os efeitos do ELG na fragmentação de DNA, no ciclo celular, no potencial de membrana mitocondrial e na exposição de fosfatidilserina (marcador de morte celular por apoptose) em células de câncer de mama MCF-7 *in vitro*.

Capítulo 1

Referencial Teórico

1. Referencial Teórico

1.1. Goiabeira (*Psidium guajava* Lineu)

A família Myrtaceae é composta por pelo menos 133 gêneros e mais de 3800 espécies. Muitos frutos desta família são utilizados como medicamentos tradicionais em práticas etnobotânicas (MEHMOOD et al., 2014). Um dos membros importantes da família Myrtaceae é o gênero *Psidium* representado por aproximadamente 120-150 espécies (MCCOOK-RUSSELL et al., 2012).

A goiabeira (Figura 1A), espécie do gênero *Psidium*, cujo nome científico é *Psidium guajava* foi classificada por Lineu em 1753 (POMMER; MURAKAMI e WATLINGTON, 2006). Esta espécie popularmente conhecida como goiabeira é uma das culturas mais importantes pertencentes ao gênero *Psidium* (BEGUM et al., 2002). Distribuída por muitos países como resultado de sua capacidade de crescer em condições tropicais e subtropicais (DÍAZ-DE-CERIO et al., 2016; FENG et al., 2015; HONG et al., 2012).

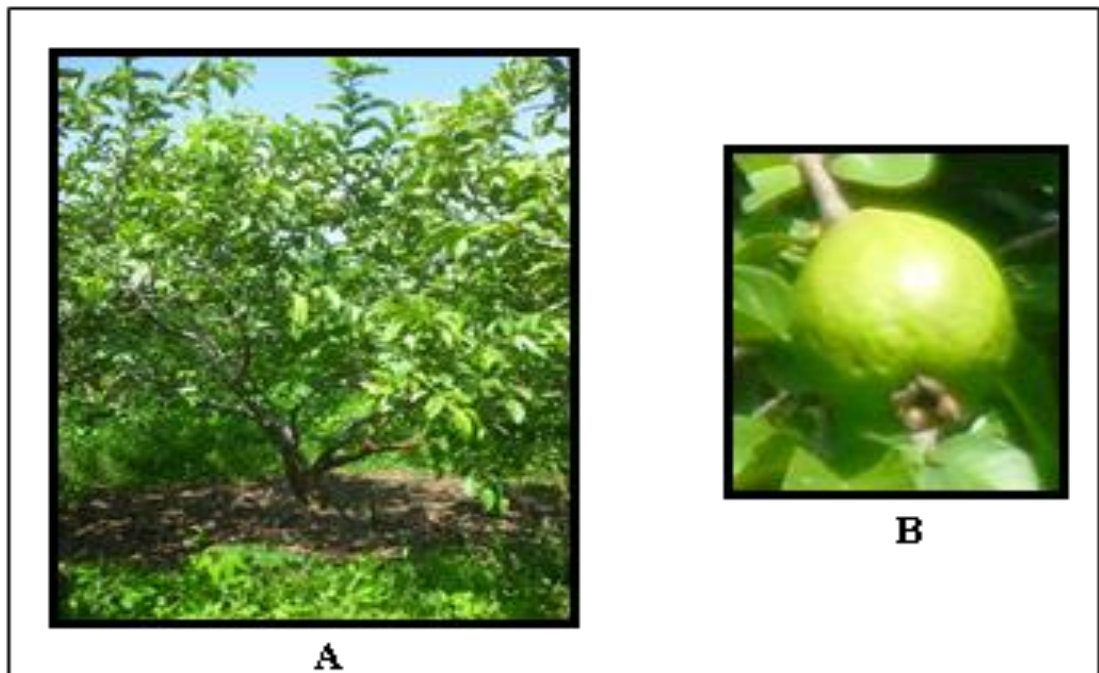


Figura 1 - Goiabeira (*Psidium guajava* L.) (A) e a goiaba (B).
Foto: Adriany das G. N. Amorim (2014).

A goiabeira é uma árvore ou arbusto pequeno, com aproximadamente 10 a 15 metros de altura (JAIARJ et al., 1999), possui ramos grandes e folhas oblongas ou ovaladas, de 5 a 15 cm de comprimento, com veias pinadas proeminentes. As flores têm quatro a seis pétalas brancas e estames brancos com anteras amarelas (FLORES et al., 2015). As árvores crescem

rapidamente e frutificam dentro de 2-4 anos a partir da semente (MCCOOK-RUSSELL et al., 2012), e produzem frutos durante todo o ano (WATANABE et al., 2011).

O fruto, a goiaba (Figura 1B), pode possuir forma arredondada, ovalada ou formato de pera, variando entre 3 a 10 cm de diâmetro e o peso do fruto varia entre 56 a 450 g (LEE et al., 2010). A cor da pele do fruto varia conforme a cultivar, dependendo do tipo e quantidade de pigmentos (FLORES et al., 2015). Geralmente, o fruto maduro tem casca de cor amarela e a cor da polpa pode ser branca, rosa, amarela, creme, laranja ou vermelha. As goiabas variam de frutos com apenas algumas sementes em uma pequena cavidade central, para frutos carnudos com inúmeras sementes em uma grande massa de polpa (MEHMOOD et al., 2014).

Tanto o mercado de frutas para consumo *in natura*, como o mercado de fruta usada como matéria-prima para a indústria apresenta-se promissor para inúmeras espécies frutíferas, como a goiabeira, que encontram condições edafoclimáticas adequadas para ser cultivada em todo o território nacional (WATANABE et al., 2011). Como a goiaba não é consumida apenas *in natura* como também em produtos processados através de polpa congelada, geleias, bebidas de frutas como os néctares (ALAMAR et al., 2016), refrigerantes (OSORIO; FORERO e CARRIAZO, 2011), sorvetes (MEHMOOD et al., 2014) e goma de goiaba, a mesma é considerada um fruto atrativo e de grande interesse para a indústria alimentícia (ANISUZZAMAN et al., 2016).

No cenário científico a goiaba é conhecida por sua grande quantidade de vitaminas e minerais, algumas vezes chamada de "superfruta", devido à sua alta quantidade de antioxidantes e contendo quatro vezes mais vitamina C que a laranja (SANTOS et al., 2017; NIMISHA et al., 2013). A goiaba é um fruto altamente nutritivo, principalmente, pelo seu alto teor de vitamina A, de vitaminas do complexo B, sais minerais como: cálcio, fósforo, ferro e potássio, e além disso, apresenta sabor agradável ao paladar de muitos consumidores (LEE et al., 2010; FENG et al., 2015; HONG et al., 2012; CARAMÊS et al., 2017).

Devido a estas propriedades nutricionais, existe um interesse crescente nas propriedades dos antioxidantes presentes na goiaba, isso pode demonstrar o potencial de uso como um nutracêutico de substâncias isoladas ou não deste fruto e sua inserção em suplementos, como aditivos alimentares, novos alimentos e produtos farmacêuticos, abrindo oportunidades de lucro para pequenos produtores de goiaba em regiões desfavorecidas do Brasil, tais como o da região Nordeste (SANTOS et al., 2017).

As folhas da espécie *P. guajava*, também recebem destaque por serem utilizadas, popularmente, na forma de chá para combater a diarreia (FENG et al., 2015), disenteria e inflamação gastrointestinal aguda (OH et al., 2005), hipertensão, diabetes (DÍAZ-DE-CERIO

et al., 2017), no tratamento de tosse, doenças pulmonares, antitérmico, bronquite, laxante, sangramento nas gengivas (BEGUM et al., 2002), cólera, para reduzir os vômitos e antimicrobiana, principalmente, contra *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* e *Mycobacterium phlei* (JAIARJ et al., 1999). Além disso, muitos estudos demonstram evidências da atividade anti-inflamatória (FENANDES et al., 2014), anti-cárie, no tratamento de feridas oculares, anticancerígena (FLORES et al., 2015), hepatoprotetora (JIAO et al., 2017) e escorbuto (JAIARJ et al., 1999).

A Índia possui a maior produção em massa de goiaba do mundo, seguida do Paquistão, México, Brasil, Egito, Tailândia, Colômbia e Indonésia (MEHMOOD et al., 2014). O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo e diversos tipos de frutas são produzidas no país, tais como: laranja, banana, abacaxi, uva, goiaba, maracujá, entre outros (ALAMAR et al., 2016). A goiaba é um fruto com produção em destaque no Brasil com cerca de 345 mil toneladas/ano, sendo importante para a economia brasileira, especialmente, o setor agroindustrial (CARAMÊS et al., 2017).

O Piauí apresenta importante participação com a produção orgânica da goiaba vermelha no perímetro irrigado Tabuleiros Litorâneos, com comercialização dos frutos no mercado interno e externo (MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL). No contexto atual da agricultura, tem-se destacado e incentivado a produção orgânica certificada, principalmente por ser menos ofensiva ao meio ambiente e ao consumidor, gerando grande aceitabilidade por parte deste (VASCONCELOS, 2015).

O Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC da Universidade Federal do Piauí, localizado em Parnaíba – PI tem como linha de pesquisa o desenvolvimento de produtos naturais com atividade antioxidante e já possuem alguns trabalhos importantes utilizando a goiaba da região dos Tabuleiros Litorâneos (VASCONCELOS et al., 2017; AMORIM et al., 2017).

Assim, o extrato rico em licopeno da goiaba vermelha (ELG) produzido na região dos Tabuleiros Litorâneos, poderá ser utilizado nas indústrias de antioxidantes para cosméticos, nutracêutica e indústria de alimentos, contribuindo no setor econômico e social do Estado do Piauí.

1.2. Carotenoides

As plantas são a maior fonte de carotenoides, e como muitos animais se alimentam de frutas e legumes, as cores de alguns pássaros, como o flamingo e o canário, alguns insetos e

animais marinhos como camarão, lagosta e salmão tem suas cores relacionadas com os carotenoides (UENOJO, JUNIOR e PASTORE, 2007). Os carotenoides também se encontram em microrganismos, nos quais são sintetizados pela rota metabólica dos isoprenoides. Aproximadamente 80 carotenoides diferentes são sintetizados por bactérias fotossintéticas e em alguns fungos filamentosos (DELGADO-VARGAS, JIMÉNEZ E PAREDES-LÓPEZ, 2010).

Os carotenoides são o segundo maior grupo de pigmentos vegetais (ZHOU et al., 2017). Além de atuarem como pigmentos acessórios na fotossíntese, absorvendo a energia luminosa na gama de 450-570 nm e depois transferindo para clorofilas, possuem também papel importante em resposta a estresses ambientais (CHEN et al., 2017).

Estes pigmentos naturais são lipossolúveis e em grande parte responsável pela cor vermelha, laranja e amarelo de frutas e legumes (MUTSOKOTI et al., 2017), também são sintetizados e bioacumulados em organelas de plantas chamadas cromoplastos (SALVIA-TRUJILLO et al., 2017).

Estas substâncias químicas foram isoladas pela primeira vez em 1831 por Wackenroder. Este pesquisador isolou e identificou um pigmento de cor laranja extraído da cenoura e batizou de carotin que, mais tarde, foi denominado caroteno. Em 1911, Tswett propôs a designação carotenoides e sua subdivisão em carotenos e xantofilas (CARVALHO, 1996).

Os carotenoides quimicamente são moléculas com cadeia principal composta de quarenta átomos de carbono (C₄₀), com exceção da crocetina e a bixina (xantofilas) são carotenoides que possuem 20 e 23 átomos de carbono respectivamente. Os carotenoides que possuem cadeia principal composta de quarenta carbonos são formados por oito unidades de isopreno e, portanto, cada unidade de isopreno é composta por cinco átomos de carbono (C₅) (MARTINS e FERREIRA, 2017). O nome científico do isopreno (Figura 2) é 2-metil-1,3-butadieno, é um hidrocarboneto alifático, incolor e volátil que consiste de cinco átomos de carbono e duas ligações duplas (ZEPKA, 2011).

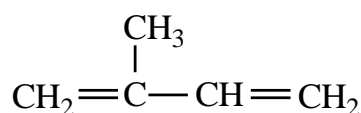


Figura 2 – Estrutura química do Isopreno. Adaptado de Zepka, 2011.

Reações de ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de dupla ligação, encurtamento ou alongamento da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de funções com oxigênio ou a combinação destes processos resultam na diversidade de estruturas dos

carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2016). Os carotenoides podem ser divididos em dois grupos: os carotenos, compostos somente de carbono e hidrogênio, que podem ser cíclicos ou não, e as xantofilas, que são derivados oxigenados, apresentam grupos substituintes com oxigênio, como hidroxilas, grupos ceto e epóxi1 (UENOJO, JUNIOR e PASTORE, 2007). De cerca de 600 carotenoides identificados, somente alguns são encontrados em tecidos humanos, dentre eles estão os carotenos (licopeno, o β -caroteno), e as xantofilas (luteína e a zeaxantina) (CAMPOS et al., 2008).

Nos vegetais, os carotenoides mais comumente encontrados são: o β -caroteno (cenoura; *Daucus carota*), o licopeno (tomate, *Lycopersicum esculentum* e na goiaba, *P. guajava*), várias xantofilas como a zeaxantina, a luteína e outras estruturas oxigenadas (milho, *Zea mays*; manga, *Mango indica* e no mamão, *Carica papaya*), a bixina que é um aditivo culinário e corante dérmico usado por indígenas amazônicos (urucum, *Bixa orellana*), a capsaxantina e capsorubina (páprica, *Capsicum annum*) e a crocina (açafraão, *Crocus sativus*) (SILVA, 2009). Eles representam uma parte de compostos bioativos que atraíram o interesse da indústria de alimentos por causa de seus impactos positivos na saúde humana, assim, pesquisas vêm crescendo com o empenho em identificar formulações alimentares específicas e condições de processamento de modo a maximizar o potencial de alimentos ricos em carotenoides para conferir benefícios à saúde (MUTSOKOTI et al., 2017).

Os seres humanos são incapazes de sintetizar carotenoides e dependem da ingestão dietética (JAKOBSEN et al., 2017). Os benefícios à saúde humana demonstrado pelos carotenoides incluem o seu potencial de funcionar como precursores da vitamina A, principalmente β -caroteno e β -criptoxantina no corpo humano (CHACÓN-ORDÓÑEZ et al., 2017), melhorar o sistema imunológico (CAMPOS et al., 2008), prevenir a degeneração macular, a catarata (SENTANIN e AMAYA, 2007; SILVA, 2009), prevenir ou retardar o aparecimento de várias doenças crônicas como doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (CARRILLHO et al., 2017; FERNÁNDEZ-GARCÍA e PÉREZ-GÁLVEZ, 2017), e ainda, são utilizados como corantes na indústria alimentar, substituem antioxidantes sintéticos com maior potencial alergênico e cancerígeno (KOT et al., 2017), antioxidantes em cosméticos e alimentos processados (ZHANG et al., 2017).

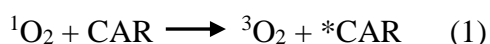
A ação antioxidante dos carotenoides está relacionada à sua capacidade de sequestrar o oxigênio singlete e reagir com radicais livres (SENTANIN e AMAYA, 2007), assim eles são capazes de retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações de oxidação em cadeia. Em geral, existem duas categorias básicas de antioxidantes: os naturais e os sintéticos (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os antioxidantes naturais podem ser compostos fenólicos (tocoferóis, flavonoides e ácidos fenólicos), compostos com nitrogênio (alcaloides, derivados da clorofila, aminoácidos e aminas), carotenoides e ácido ascórbico (HAIDA et al., 2011). Muitos destes fitoquímicos apresentam capacidade antioxidante associados à baixa incidência e baixa mortalidade de câncer em seres humanos (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004; JACQUES e ZAMBIAZI, 2011; LIMA et al., 2012; MARTINS e FERREIRA, 2017; MORAIS, 2007).

Os antioxidantes sintéticos mais conhecidos são butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ), propil galato (PG) (MBA; DUMONT e NGADI, 2017) e tri-hidroxi butilfenona (THBP) (HAIDA et al., 2011), substâncias artificiais utilizadas com a finalidade de estender o prazo de validade de alimentos ricos em lipídeos, principalmente, lipídeos insaturados (RAMALHO e JORGE, 2006). Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de antioxidantes artificiais apresentarem alguns efeitos tóxicos (TACHAKITTIRUNGROD, OKONOGI e CHOWWANAPOOPOHN, 2007), e devido aos resultados de algumas pesquisas, o *Joint Expert Committee on Food Additives* da *Food and Agriculture Organization* e *World Health Organization* têm alterado nos últimos anos o índice de ingestão diária aceitável dos antioxidantes sintéticos (SOARES, 2002).

A indústria de alimentos utiliza inúmeros antioxidantes sintéticos para preservar e/ou melhorar a qualidade de produtos alimentícios. Entretanto, estudos demonstram que os antioxidantes sintéticos utilizados pelas indústrias alimentícias estão relacionados ao desenvolvimento de várias doenças (NIKI et al., 1995; SOARES, 2002). O interesse por antioxidantes naturais tem aumentado devido à percepção negativa dos consumidores sobre a segurança dos antioxidantes sintéticos (MILANI et al., 2010; YESILYURT et al., 2008). Desta forma, pesquisas estão voltadas para a busca de compostos naturais que apresentem esta propriedade funcional, com vista a substituir ou reduzir o uso dos antioxidantes sintéticos (CAETANO et al., 2009).

A estrutura química dos carotenoides com várias ligações duplas alternadas torna-os bastante susceptíveis à isomerização e oxidação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2016). Este tipo de estrutura química possibilita sua atuação como antioxidantes, pois, sequestram as espécies reativas do oxigênio, especialmente os radicais peroxil e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (CAMPOS et al., 2008). A equação 1 mostra a reação de um carotenoide (CAR) frente à presença do oxigênio singlete (UENOJO, JUNIOR e PASTORE, 2007).



Os carotenoides em seu estado excitado (*CAR) pode facilmente retornar ao estado fundamental, dissipando energia na forma de calor. Alguns trabalhos sobre o tema revelam que a capacidade de um determinado carotenoide em quelar o $^1\text{O}_2$ está relacionada com o número de duplas ligações conjugadas e aos grupos ligados às extremidades da cadeia (UENOJO, JUNIOR e PASTORE, 2007). A reação de um carotenoide frente a um radical livre leva a transferência de elétrons como mostra a equação 2 (YOUNG e LOWE, 2001).



A reação do *CAR (carotenoide com um elétron desemparelhado) com uma molécula de oxigênio pode levar à formação de um peróxido, como mostrado na equação 3 (UENOJO, JUNIOR e PASTORE, 2007).



Apesar de bons sequestrantes do oxigênio singlete, os carotenoides podem facilmente sofrer reações de degradação durante o armazenamento, as quais são aceleradas pela alteração de temperatura, exposição ao oxigênio e à luz, sendo ainda influenciadas pelo baixo teor de umidade (COSTA, ORTEGA-FLORES e PENTEADO, 2002; MUTSOKOTI et al., 2017; TALEON et al., 2017). Portanto, a degradação dos carotenoides envolve a perda de suas propriedades físicas, químicas e biológicas, então, as indústrias de alimentos, farmacêutica buscam constantemente novos procedimentos que sejam eficientes e economicamente viáveis para preservar a estabilidade destes antioxidantes (FERNÁNDEZ-GARCÍA e PÉREZ-GÁLVEZ, 2017).

É oportuno destacar que o mercado dos carotenoides é promissor e sua produção industrial cresce desde 1954 e vem gerando cerca de US\$ 300 milhões/ano em carotenoides sintéticos, sendo Hoffmann-La Roche e BASF, as principais indústrias produtoras de β -caroteno, astaxantina e seus isômeros. Os pigmentos naturais produzidos por métodos biológicos são destaque e estão gerando interesse crescente no mercado industrial devido às suas aplicações em alimentos, como suplemento nutricional, e em indústrias cosmética e farmacêutica. O preço do grama de carotenoide com alto grau de pureza pode atingir preços de US\$ 500 a 2.000 dólares (VADUGA et al., 2009).

Vale ressaltar ainda que os carotenoides são atraentes biologicamente porque muitos estudos associam uma dieta rica em frutas e legumes com diminuição do risco de doenças

cardiovasculares, artrite, doença inflamatória, diabetes e certas formas de câncer; fundamentados em evidências epidemiológicas e, por hipótese, diretamente associado ao conteúdo de antioxidantes nestes alimentos (BOEING et al., 2012; HAIDA et al., 2011; LIN e TANG, 2007; PRASAD e AGGARWAL, 2014; ROMAGNOLO e SELMIN, 2017).

1.2.1. Licopeno

O licopeno é um carotenoide responsável pela pigmentação vermelha dos vegetais (AMORIM et al., 2017; SUWANARUANG, 2016). Pode ser encontrado naturalmente em muitos tipos de frutas e legumes (CHENG et al., 2017), como goiaba, tomate, melancia, papaia (YAPING et al., 2002), damasco, toranja (CHALABI e al., 2004) e cenoura (SIWACH; TOKAS e SETH, 2016). No corpo humano, o licopeno é encontrado no plasma sanguíneo, no leite materno (ROLDÁN-GUTIÉRREZ e CASTRO, 2007), nas glândulas adrenais, nos testículos, no fígado e na próstata, onde este predomina (KARPPI et al., 2009).

Este composto químico é isômero acíclico do β -caroteno (AGARWAL e RAO, 2000), é uma molécula lipofílica, constituído de carbono e hidrogênio, tem 40 átomos de carbono na cadeia principal, peso molecular de 536,8g/mol (HERNÁNDEZ-ALMANZA et al., 2016), apolar, completamente insolúvel em água e apenas ligeiramente solúvel em óleo vegetal (MAYER-MIEBACH et al., 2005). Na estrutura química do licopeno podemos observar que existem 11 duplas ligações conjugadas linearmente (BÖHM; FRÖHLICH e BITSCH, 2003), e 2 duplas ligações não conjugadas (CLARETO, 2007; VASCONCELOS et al., 2017), especialmente encontrado na configuração *todo-trans*, mas também presentes em uma grande variedade de isômeros *cis* (Figura 3) (VASCONCELOS, 2015).

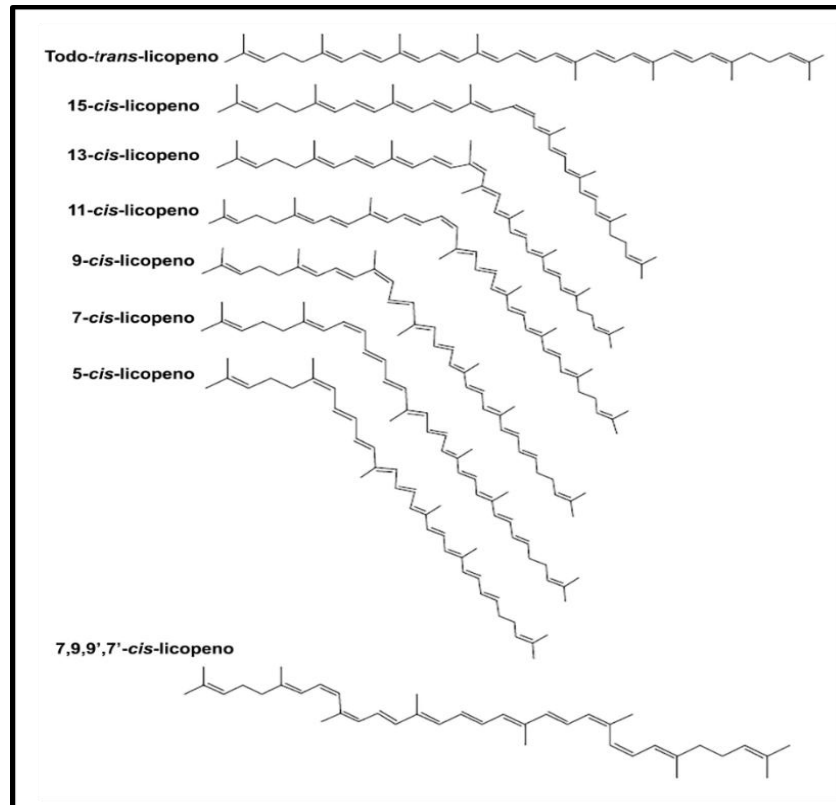


Figura 3 – Isômeros *cis* e *trans* do licopeno. (VASCONCELOS, 2015).

Na maioria dos alimentos crus, o isômero *todo-trans* é quantitativamente o mais importante, e em uma menor proporção os isômeros *cis* (*5-cis*), (*9-cis*) e (*13-cis*) - licopeno são predominantes. No entanto, há frutas em que outros isômeros geométricos de licopeno são prevalentes como, por exemplo, no damasqueiro (*Prunus armeniuca*) o licopeno *di-cis* isômero (*7-cis*, *9-cis*) contribuiu com 53% do total de licopeno, enquanto que, a porção do isômero *todo-trans* é de apenas 8% (SCHIERLE et al., 1997).

O licopeno é sintetizado através de quatro reações de desaturação do caroteno incolor, o fitoeno. Estas reações ocorrem em organelas (plastídios) de plantas superiores e são catalisadas por duas enzimas, fitoeno desaturase e ζ -caroteno desaturase (BRAMLEY, 2000). Em plastídios de tomate é requerida a atividade adicional de outra enzima, a carotenoide isomerase, para transformar os *cis*-licopeno em seu isômero *trans*-licopeno (MORAIS, 2007).

O *todo-trans*-licopeno é o mais eficiente dos carotenoides relatado como antioxidante e extintor de oxigênio singlete (KONG et al., 2010a; VASCONCELOS et al., 2017), bem como um eliminador de outras espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como radicais: superóxido, radicais de peróxil e radicais de hidroxil (LI et al., 2017), assim protege lipídios celulares, lipoproteínas, proteínas (KARPPPI et al., 2009) e danos oxidativos à molécula do DNA (SINGH et al., 2004).

Os radicais são espécies reativas que desempenham um papel fisiológico crucial para o desenvolvimento de várias doenças humanas (FENG et al., 2015). Há evidências crescentes de que o estresse oxidativo, particularmente o estresse causado por EROs e espécies reativas de nitrogênio, pode levar a numerosas doenças inflamatórias e degenerativas (KONG et al., 2010b). A capacidade do licopeno para atuar como antioxidante e proteger as células contra danos oxidativos, muitas vezes associados ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas, é uma das chaves do mecanismo para seus efeitos benéficos à saúde humana (BÖHM; FRÖHLICH e BITSCH, 2003) e por esta razão, o licopeno tem recebido grande atenção nos últimos anos (POOJARY e PASSAMONTI, 2015).

Estudos epidemiológicos revelaram que o consumo de alimentos ricos em licopeno é inversamente associado ao risco de doença cardiovascular (ALLEN et al., 2002; MAYER-MIEBACH et al., 2005; PAES, CUNHA e VIOTTO, 2015) aterosclerose, comprometimento cognitivo, atividade anti-inflamatória (VASCONCELOS et al., 2017), nos cânceres de próstata, (KONG e ISMAIL, 2011), do trato digestivo superior, como cavidade oral, faringe, laringe e esôfago (SINGH et al., 2004), câncer de estômago, cólon, pâncreas (AGARWAL e RAO, 2000) e câncer de mama (CHALABI e al., 2004).

Pesquisas tem demonstrado quantidades significativas de licopeno no tomate e em seus derivados e, por este motivo, são considerados os principais alimentos que contribuem para a ingestão dietética de licopeno em seres humanos (BOHM, FROHLICH e BITSCH, 2003; FABBRI, 2009; CLARETO, 2007; LI et al., 2017). Outras pesquisas ainda mostram que a absorção do licopeno provenientes de produtos processados de tomate é mais eficiente que a absorção do composto no produto *in natura*, porque durante o processamento térmico, o licopeno ligado quimicamente a outros compostos é convertido em uma forma livre e mais facilmente absorvível (ALLEN et al., 2002; BRAMLEY, 2000). Além disso, o isômero *cis* é mais biodisponível do que a forma *todo-trans* e a sua absorção em células da mucosa intestinal é auxiliada pela formação de micelas de ácido biliar (VASCONCELOS, 2015).

O teor de licopeno na goiaba é de 4-6 mg/100g na porção comestível, maior que o de outras fontes conhecidas, como por exemplo o tomate, a melancia, a manga e o mamão (MANGELS et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2010; VARGAS-MURGA et al., 2016). Durante a produção de purê de goiaba, são criados subprodutos que compõem 25% do peso total da carga. Três tipos de subprodutos são descartados de três etapas de processamento diferentes: refinador, peneirador e decantador. A porção decantada é a última fração do subproduto, e tem relatado possuir alto teor de licopeno (KONG et al., 2010a). A utilização desses subprodutos

poderia contribuir na produção de uma nova fonte de antioxidantes e também auxiliar na reciclagem do subproduto da indústria de transformação (KONG et al., 2010b).

Os solventes usualmente utilizados na extração do licopeno são solventes orgânicos como hexano, acetona, etanol, clorofórmio e éter de petróleo (ROLDÁN-GUTIÉRREZ e CASTRO, 2007). Uma vez que o licopeno extraído utilizando hexano/acetona ou hexano/etanol é mais estável do que o licopeno obtido utilizando metanol ou diclorometano; a uma mistura de solventes composta por hexano/acetona, hexano/acetona/etanol é frequentemente utilizado (POOJARY e PASSAMONTI, 2015).

Devido às propriedades biológicas do licopeno, foram desenvolvidas metodologias biotecnológicas alternativas para produzir maior quantidade de licopeno e mais estável, como por exemplo, o uso de microrganismos, incluindo alguns fungos, leveduras, algas e bactérias (HERNÁNDEZ-ALMANZA et al., 2016).

Vários métodos são utilizados para a extração de licopeno como extração de fluido supercrítico, extração assistida por ultrassom, extração de ultrassom e micro-ondas e extração assistida por enzimas (POOJARY e PASSAMONTI, 2015). O ELG foi produzido utilizando metodologia limpa, visando diminuir a toxicidade do produto desenvolvido para possíveis aplicações.

O licopeno tem atraído cada vez mais atenção devido à conscientização sobre os benefícios saudáveis do seu consumo (CHENG et al., 2017). Na indústria, o licopeno é amplamente utilizado como suplemento em alimentos funcionais, alimentos nutracêuticos, produtos farmacêuticos, como aditivo em cosméticos (HERNÁNDEZ-ALMANZA et al., 2016) e aditivo alimentar para manter a qualidade nutricional, sensorial e prevenir a oxidação destes produtos finais durante as etapas de processamento e/ou armazenamento (KONG e ISMAIL, 2011).

1.3. Câncer de mama (CM)

As doenças crônicas não transmissíveis são doenças multifatoriais, não infecciosas e não transmissíveis, que se caracterizam por apresentar longo período de latência, tempo de evolução prolongado, lesões irreversíveis e complicações que acarretam graus variados de incapacidade ou óbito, e vêm se destacando no perfil de morbi-mortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento (MARIATH et al., 2007).

As doenças crônicas não transmissíveis são consideradas um sério problema de saúde pública, e são responsáveis pela morte anual de 36 milhões de pessoas no mundo, com destaque

as doenças cardiovasculares, os cânceres, as doenças respiratórias e as diabetes. No Brasil, as doenças crônicas não transmissíveis são também a principal causa de mortalidade, representando 74% das mortes (DUNCAN et al., 2012; BRASIL, 2011). O câncer ocupa a segunda colocação entre as doenças crônicas não transmissíveis de maior incidência no mundo e no Brasil (KARPPI et al., 2009; LESSA, 2004), sendo responsável por aproximadamente 8,2 milhões de mortes por ano no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012).

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células *in situ* que tendem a invadir outros tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo, que se dá a partir de alterações genéticas (hereditárias ou adquiridas) (RODRIGUES; CRUZ e PAIXÃO, 2015; FONSECA et al., 2016).

O câncer de mama (CM) é o segundo tipo de câncer mais incidente no mundo com 1,67 milhão de novos casos (INCA, 2015). No Brasil, o CM é o tipo mais comum depois do câncer de pele não melanoma, e também o que causa mais mortes por câncer em mulheres, representando 28,1% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres (INCA, 2015). Em 2016, foram esperados 57.960 casos novos de CM, principalmente nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (INCA, 2015). Na tabela 1, pode-se observar a estimativa de novos casos de CM em comparação com outros tipos de cânceres que acometem as mulheres no Brasil em 2016 (INCA, 2015).

Tabela 1- Estimativa do número de novos casos dos dez tipos de câncer mais comum em mulheres no Brasil para o ano de 2016.

LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA	NOVOS CASOS	%
Mama feminina	57.960	28,1
Cólon e Reto	17.620	8,6
Colo do útero	16.340	7,9
Traqueia, brônquios e pulmão	10.890	5,3
Estômago	7.600	3,7
Corpo do útero	6.950	3,4
Ovário	6.150	3,0
Glândula tireoide	5.870	2,9
Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4
Sistema nervoso central	4.830	2,3

Fonte: Adaptada de INCA, 2015.

Em 2012, foram estimados 522 mil óbitos por CM em todo o mundo (INCA, 2015) e em 2014, foram registrados 14.622 óbitos no Brasil. Os homens também podem desenvolver CM, mas isso é raro e ocorre em apenas 1% dos casos (INCA, 2016).

O Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) relata que ainda não se conhece a causa principal do surgimento do CM (INCA, 2017b). Porém, vários fatores

de risco podem atuar como agentes carcinogênicos, tais como fatores comportamentais/ambientais, história reprodutiva/hormonais e fatores hereditários/genéticos, também classificados como fatores modificáveis e não modificáveis ou intrínsecos (AGARWAL e RAO, 2000). A presença de um ou mais desses fatores de risco não significa que a mulher terá necessariamente CM (INCA, 2016).

Fatores comportamentais/ambientais - obesidade e sobrepeso após a menopausa, sedentarismo, consumo de bebida alcoólica, tabaco, exposição frequente a radiações ionizantes (raios X, mamografia e tomografia). De todos os casos de câncer, cerca de 80 a 90% estão associados a fatores comportamentais/ambientais (INCA, 2017a).

Fatores relacionados a história reprodutiva/hormonais - menarca antes de 12 anos, não ter tido filhos, primeira gravidez após os 30 anos, não ter amamentado, menopausa após os 55 anos, ter feito uso de contraceptivos orais por tempo prolongado, ter feito reposição hormonal pós-menopausa, principalmente por mais de cinco anos (INCA, 2016).

Fatores hereditários/genéticos - histórico familiar de: câncer de ovário, câncer de mama em homens, câncer de mama em mulheres, principalmente antes dos 50 anos (SILVA e RIUL, 2012). Mulheres que possuem alterações genéticas herdadas na família, especialmente nos genes BRCA1 e BRCA2, possuem risco elevado de desenvolver CM (RODRIGUES; CRUZ e PAIXÃO, 2015; CHALABI et al., 2004). O câncer relacionado a fatores hereditários/genéticos é responsável por 5-10% do CM feminino (FONSECA et al., 2016).

Existem vários tipos de câncer de mama. Alguns evoluem de forma rápida, outros, não. A maioria dos casos tem boa resposta ao tratamento, principalmente quando diagnosticado e tratado no início (INCA, 2016). Como mostrado na figura 4, os principais tipos de CM são: adenocarcinoma ductal, que tem origem nos ductos mamários e há vários subtipos, é o mais comum, encontrado em cerca de 80% dos casos; e o adenocarcinoma lobular, que tem origem nos lóbulos, que são responsáveis pela produção do leite materno, é diagnosticado em cerca de 5% a 10% dos casos (INCA, 2014).

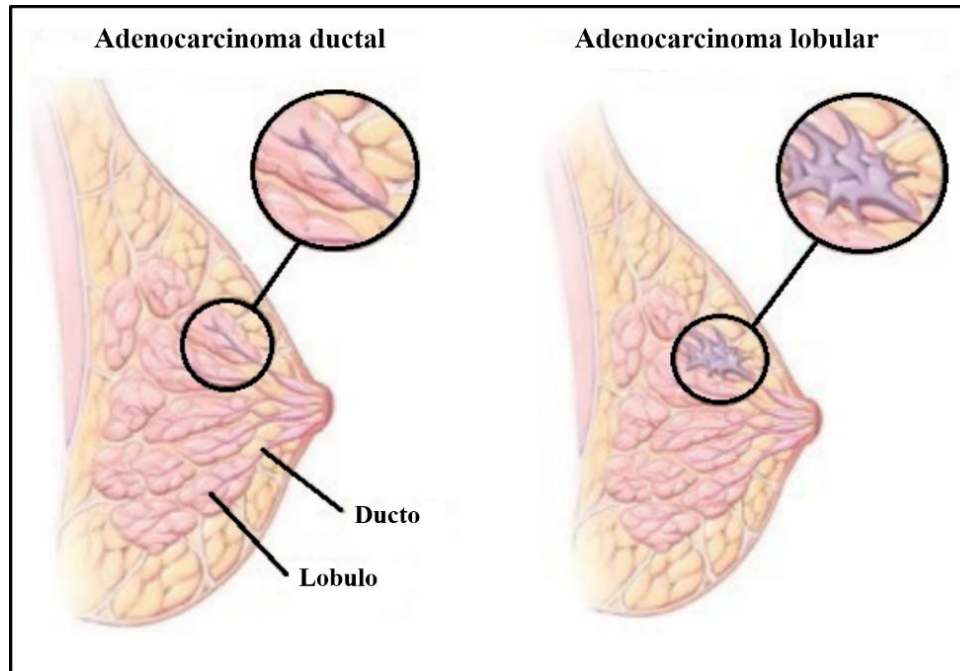


Figura 4 – Adenocarcinoma ductal e lobular.
 Fonte: Adaptado de drfelipeades.com

O CM pode ser percebido em fases iniciais, na maioria dos casos, apresentando os seguintes sinais e sintomas:

- Nódulo (caroço), fixo e geralmente indolor: é a principal manifestação da doença, estando presente em cerca de 90% dos casos quando o câncer é percebido pela própria mulher.
- Pele da mama avermelhada, retraída ou parecida com casca de laranja.
- Alterações no mamilo.
- Pequenos nódulos nas axilas ou no pescoço.
- Saída de líquido anormal das mamas (SILVA e RIUL, 2012).

No entanto, esses sinais e sintomas devem sempre ser investigados, pois, podem estar relacionados a doenças benignas da mama (INCA, 2017b).

A mamografia bienal para mulheres entre 50 a 69 anos é a estratégia recomendada pelo Ministério da Saúde no Brasil para o rastreamento do CM (INCA, 2016). O Ministério da Saúde realiza campanha durante todo o ano na prevenção do CM, em especial no mês de outubro (outubro rosa) com a distribuição de panfletos, carreatas e palestras, alertando a população feminina da importância da realização do exame periódico na mama.

Quanto antes o câncer for detectado e tratado, mais efetivo o tratamento tende a ser, maior a probabilidade de cura e melhor a qualidade de vida do paciente (INCA, 2017a). Para o diagnóstico do CM, além da mamografia, outros exames como palpação das mamas por um

médico ou enfermeiro treinados, ultrassonografia, ressonância nuclear magnética pode detectar alterações nas mamas. No entanto, o único que confirma o CM é a biópsia (INCA, 2014).

Apesar de ser considerado um câncer relativamente de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por CM continuam elevadas no Brasil (FONSECA et al., 2016).

Existem três formas principais de tratamento do câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Elas podem ser usadas em conjunto, variando apenas quanto à suscetibilidade dos tumores a cada uma das modalidades terapêuticas e à melhor sequência de sua administração. Poucos são os cânceres tratados com apenas uma modalidade terapêutica (INCA, 2017a).

O mecanismo de divisão celular é um processo rigorosamente controlado e a progressão de uma fase para outra é controlada por uma maquinaria bioquímica conservada, que além de coordenar esse evento, também está ligada a sinais extracelulares de controle de crescimento e proliferação celular (PEREIRA, 2014). No entanto, as células tumorais perdem a capacidade de regular esses sinais, resultando no descontrole da proliferação e ausência de morte celular, contribuindo para o desenvolvimento dos tumores (DUARTE, 2010). Tendo em vista este descontrole celular, é de fundamental importância o estudo de novas substâncias de origem vegetal com baixa citotoxicidade que possam estar atuando na regulação desse mecanismo.

Mais atenção tem sido focada em pesquisas na busca de constituintes bioativos naturais por causa de suas menores toxicidades e maior segurança em comparação aos sintéticos, que causam mais efeitos colaterais (FENG et al., 2015).

Sabe-se que os compostos derivados de plantas são fontes potenciais de novos antibióticos, fármacos anticancerígenos, anti-HIV entre outros compostos farmacêuticos (FENANDES et al., 2014).

O licopeno é encontrado no plasma sanguíneo humano e isso despertou considerável interesse devido ao seu efeito benéfico na saúde humana (HERNÁNDEZ-ALMANZA et al., 2016), como a prevenção de vários tipos de cânceres humano como o câncer de próstata, mama e câncer de pulmão e melhora a densidade óssea, diminui o risco de diabetes (CHENG et al., 2017), proteção cardiovascular (BÖHM; FRÖHLICH e BITSCH, 2003) e atividades antioxidantes (BRAMLEY, 2000).

Assim, o ELG apresenta-se como uma alternativa promissora, podendo influenciar o processo carcinogênico, reduzindo seus efeitos nocivos e, por conseguinte, diminuindo o risco do desenvolvimento de CM.

1.4. Morte celular

A lesão celular ocorre quando as células são submetidas a condições de estresse em excesso não sendo mais capazes de se adaptar. As principais causas de lesões celulares são: privação de oxigênio (hipoxia), agentes físicos (traumatismos mecânicos, extremos de temperatura, radiação e choque elétrico), agentes químicos e drogas, agentes infecciosos, reações imunológicas, defeitos genéticos e desequilíbrios nutricionais (CHAVES, 2009; PAROLIN e REASON, 2001)

Algumas lesões podem ser reversíveis, normalmente isso ocorre nos estágios iniciais ou nas formas leves de injúria, se o estímulo nocivo for removido. No entanto, quando o mecanismo de injúria persiste, a lesão torna-se irreversível e, com o tempo, a célula não consegue se recuperar e conseqüentemente ocorre a morte da célula (PAROLIN e REASON, 2001). A morte celular pode ocorrer por pelo menos dois mecanismos diferentes: apoptose e necrose, que apresentam um conjunto de alterações morfológicas e bioquímicas distintas (DUARTE, 2010).

Apoptose

A morte celular fisiológica ou programada ou apoptose é um fenômeno extremamente importante na regulação da população de células, homeostase e também em certas condições patológicas, como câncer (ANDREOTTI, 2006; ELMORE, 2007).

A apoptose ocorre em células individualizadas geralmente rodeadas por células saudáveis (BATISTA, 2008), apresentando a condensação da cromatina, fragmentação do DNA, redução do tamanho celular, integridade da membrana plasmática e alterações na superfície celular como “enrugamento” ou bolhas e externalização da fosfatidilserina, que em células viáveis mantêm-se na face interna da membrana plasmática (DUARTE, 2010; PAROLIN e REASON, 2001), possibilitando o rápido reconhecimento e o englobamento dos corpos apoptóticos que são fagocitados pelos macrófagos não havendo liberação de componentes citosólicos e nenhuma resposta inflamatória (Figura 5) (CESCATO, 2010; GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007).

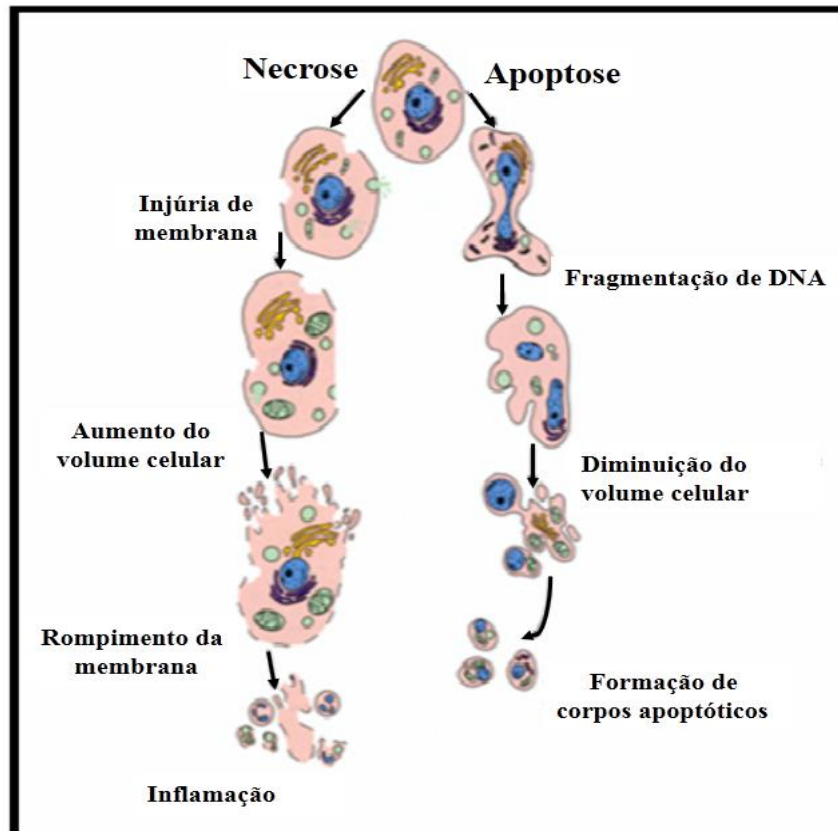


Figura 5 – Características morfológicas da morte celular por apoptose e necrose. (Andreotti, 2006).

A maquinaria responsável pelo processo de apoptose depende de uma família de proteases, as caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*), que tem uma cisteína no seu sítio ativo e clivam essas proteínas no seu ácido aspártico específico (GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007). Estão presentes no citosol sob a forma de precursores inativos, as procaspases, que são geralmente ativadas pela clivagem na região do ácido aspártico por outras caspases (ANDREOTTI, 2006; RODRIGUES, 2013).

Há duas vias principais de regulação da apoptose, a apoptose mediada por receptores de morte pertencente a superfamília TNF (Tumor Necrosis Factor) como TNFR1, TRAMP, TRAIL e Fas, presentes na membrana plasmática, denominada via extrínseca e a apoptose mediada pela mitocôndria denominada via intrínseca (DUARTE, 2010; PEREIRA, 2014).

Tanto a via extrínseca quanto a intrínseca possuem um grupo independente de caspases iniciadoras (2, 8, 9 e 10) que darão início ao processo de apoptose e convergem sinais para o mesmo grupo de caspases efetoras ou executoras (3, 6 e 7) que são responsáveis pelo “empacotamento” das células durante a apoptose, através da proteólise de diferentes substratos, que irão acarretar na externalização de fosfolípidos, na condensação e fragmentação nuclear e na desmontagem do citoesqueleto (CESCATO, 2010; PEREIRA, 2014).

A *via intrínseca da apoptose* é definida por um evento primordial, a permeabilização da membrana externa da mitocôndria (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization-MOMP) liberando para o citosol diversas proteínas responsáveis pelo desencadeamento da apoptose (Figura 6) (GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007).

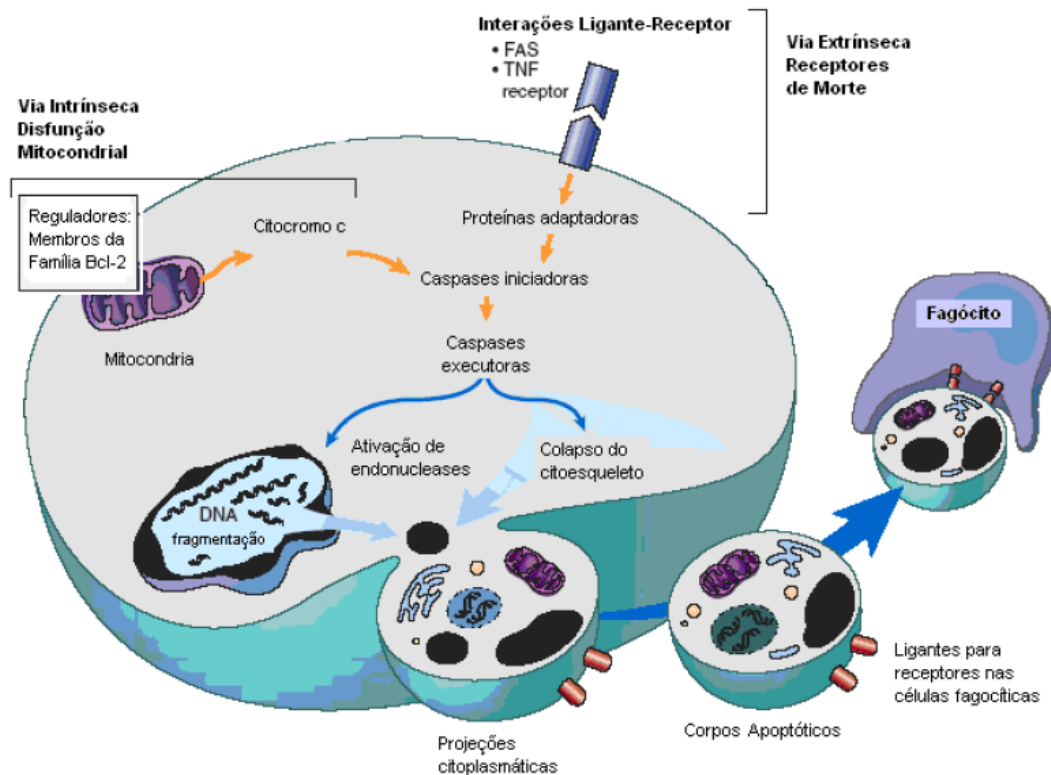


Figura 6 - Ativação da apoptose pelas vias extrínseca e intrínseca. (Rodrigues, 2013).

A mitocôndria participa da manutenção de funções celulares vitais, como respiração celular e síntese de ATP, modulação do estado redox da célula, regulação osmótica, controle do pH, homeostasia do cálcio no citosol e sinalização intra-celular (PAROLIN e REASON, 2001).

Controlando essa permeabilização estão as proteínas da família Bcl-2, divididas entre proteínas pró-apoptóticas (promovem MOMP) e anti-apoptóticas (inibem MOMP). Estas proteínas são divididas em três grupos: Bcl2 (Bcl-2, Bcl-x1, Mcl-1), “BH3-only” (Bim, Bik, Bad, Puma, Bid, Noxa) e Bax (Bax, Bak, Bok) (BATISTA, 2008).

A ativação das proteínas do grupo Bax (pró-apoptótico) é fundamental para o desencadeamento de MOMP, pois, ocasionam a abertura de poros na membrana externa da mitocôndria. Estas proteínas encontram-se normalmente reprimidas pelas proteínas do grupo Bcl2 (anti-apoptóticas), no entanto, quando existe um sinal indutor de apoptose, as proteínas do grupo “BH3-only” (pró-apoptóticas) irão inibir as proteínas do grupo Bcl2, levando a abertura

dos poros na membrana externa da mitocôndria pelas proteínas do grupo Bax (AMGALAN, PEKSON e KITSIS, 2017; ANDREOTTI, 2006).

A sinalização para apoptose é basicamente determinada pela concentração de proteínas pró e anti-apoptóticas no citoplasma. Uma das proteínas liberadas pela MOMP é o citocromo c que, quando no citosol, vai se ligar ao fator de ativação da protease apoptose 1 (Apoptotic Protease Activating Factor - APAF-1), causando neste uma mudança conformacional. Esta mudança permite a oligomerização de APAF-1 e o recrutamento de caspase iniciadora 9, formando o apoptossomo. Quando ativada, no apoptossomo, a caspase 9 irá por sua vez ativar as caspases efetadoras 3,6 e 7, que irão iniciar a degradação celular (BATISTA, 2008).

A *via extrínseca da apoptose* é iniciada pela ativação dos receptores de membrana da superfamília TNF como por exemplo Fas, (Figura 6). Quando o Fas é ativado pelo seu ligante específico como Fas-L, são também chamados de “receptores de morte”, o que por sua vez possibilita a ligação de uma proteína adaptadora na região citoplasmática desse receptor, o FADD (Domínio de morte associado ao Fas). FADD então recruta a procaspase 8, levando a ativação da caspase 8 e formando o DISC (complexo de sinalização de indução de morte), que por sua vez levava a ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7, que irão desmontar a estrutura celular (PEREIRA, 2014).

A caspase 8 pode também ativar as proteínas pró-apoptóticas, em especial Bid e Bim, levando a MOMP e conseqüente a liberação de outras proteínas pró-apoptóticas pela mitocôndria. A via extrínseca é também chamada de via de amplificação de sinal, já que contribui para a ativação da apoptose pela via mitocondrial (PAROLIN e REASON, 2001).

Necrose

A morte celular patológica ou acidental ou necrose, ocorre quando as células são expostas a uma variação extrema de suas condições fisiológicas e conseqüentemente danificando a membrana plasmática (ANDREOTTI, 2006).

Na morte celular por necrose ocorrem alterações na função mitocondrial, diminuindo a produção de ATP e interferindo na função da bomba de Na⁺ /K⁺, levando a tumefação celular devido ao aumento de Na⁺ no citoplasma. O aumento do Ca²⁺ citosólico provoca ativação de fosfolipases e de proteases, que juntamente com o aumento de EROs induzem diversas alterações celulares (ANAZETTI e MELO, 2007).

A necrose é caracterizada por uma forma violenta e rápida de degradação celular que afeta um grande número de células numa população, apresenta um aumento no volume

citoplasmático, destruição de organelas e rompimento da membrana citoplasmática (BATISTA, 2008), levando à liberação de fluidos para o meio extracelular e induzem uma resposta inflamatória (Figura 5) (AMGALAN, PEKSON e KITSIS, 2017; PEREIRA, 2014).

Capítulo 2

- Periódico: *Food Research International*
- Fator de impacto: 3,086
- QUALIS A2 em Biotecnologia

Nota: O artigo apresentado a seguir encontra-se publicado e traduzido para a língua portuguesa.

Extrato rico em licopeno da goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.) apresenta efeito citotóxico na linhagem celular adenocarcinoma de mama humano MCF-7 por via tipo apoptótica

Raimunda C. dos Santos^a, Alicia S. Ombredane^b, Jéssica Maria T. Souza^a, Andreeane G. Vasconcelos^a, Alexandra Plácido^c, Adriany das G. N. Amorim^a, Eder A. Barbosa^{d,e}, Filipe C. D. A. Lima^f, Cristina D. Ropke^g, Michel M. M. Alves^h, Daniel D. R. Arcanjo^h, Fernando A. A. Carvalho^h, Cristina Delerue-Matos^c, Graziella A. Joanitti^{b,i}, José Roberto de S. A. Leite^{j,*}.

^aNúcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, Biotec, *Campus* Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brasil;

^bLaboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Biologia, *Campus* Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil;

^cREQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto, Porto, Portugal;

^dLaboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas, LSAB, Instituto de Química, *Campus* Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil;

^eLaboratório de Espectrometria de Massa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil;

^fInstituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo, Matão, SP, Brasil;

^gPhytobios LTDA, Barueri, SP, São Paulo, Brasil;

^hNúcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil;

ⁱ*Campus* Ceilândia, Centro Metropolitano, Universidade de Brasília, Ceilândia, Brasília, DF, Brasil;

^jÁrea de Morfologia, Faculdade de Medicina, *Campus* Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

*Autor correspondente:

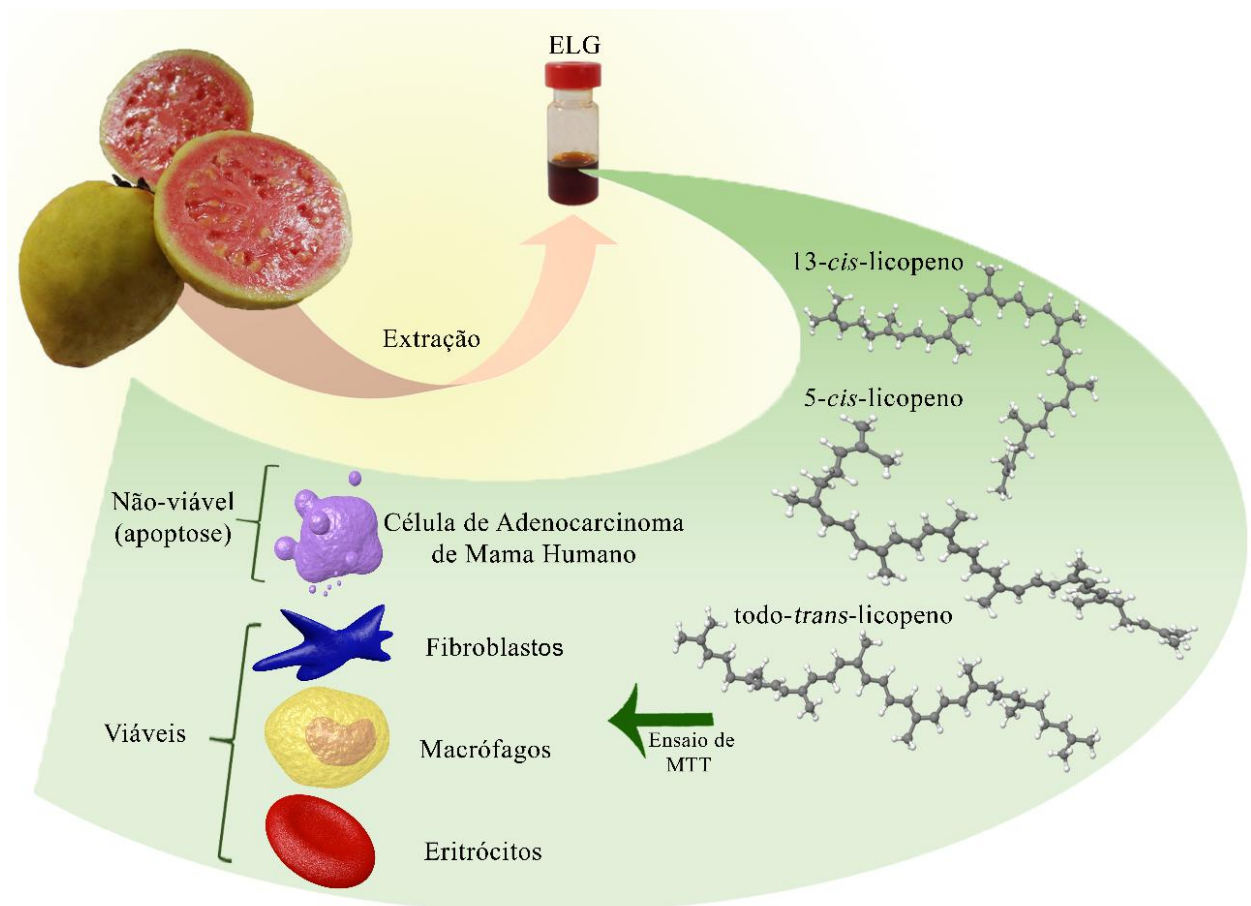
E-Mail: jrsaleite@gmail.com; jrleite@pq.cnpq.br.

Telefone: ++ 55 61 31071891.

Destaques

1. O extrato rico em licopeno da goiaba vermelha (ELG) contém principalmente o *todo-trans*-licopeno;
2. O ELG apresentou citotoxicidade contra células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7;
3. As células de fibroblastos NIH-3T3 e os macrófagos BALB/c tratados com ELG permaneceram viáveis;
4. O ELG não apresentou atividade hemolítica em eritrócitos de sangue de carneiro;
5. O ELG induziu efeitos citostático e citotóxico em MCF-7 por via tipo apoptótica.

Resumo gráfico



Resumo

Este estudo investigou um extrato rico em licopeno da goiaba vermelha (ELG) em termos de composição química utilizando espectrofotometria, espectrometria de massa, Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflexo Total Atenuado (FTIR-ATR) e estudos computacionais. A atividade citotóxica e mecanismo de citotoxicidade do ELG foram estudados em linhagem celular de adenocarcinoma de mama humana MCF-7, células de fibroblastos de camundongos NIH-3T3, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e eritrócitos de sangue de carneiro, avaliando a viabilidade celular utilizando o método MTT e citometria de fluxo. Os resultados obtidos por espectrofotometria mostraram que a ELG contém 20% de licopeno por extrato seco. O FTIR-ATR experimental e teórico sugerem a presença de licopeno, enquanto os espectros MS/MS obtidos após a fragmentação do íon molecular $[M]^+$ de 536.4364 mostram íons fragmentados em m/z 269.2259, 375.3034, 444.3788 e 467.3658, corroborando a presença de licopeno principalmente relacionado à configuração de todo-*trans*. O tratamento com ELG (1.600 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$) após 24 e 72 horas afetou significativamente a viabilidade das células MCF-7 (IC_{50} =29,85 e 5,964 $\mu\text{g/mL}$) respectivamente, enquanto que as células NIH-3T3 permaneceram viáveis (IC_{50} =1.579 e 911,5 $\mu\text{g/mL}$) respectivamente. Da mesma forma, o tratamento com ELG (800 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$) apresentou baixa citotoxicidade em macrófagos peritoneais BALB/c com IC_{50} superior a 800 $\mu\text{g/mL}$ após 48 horas e ausência de atividade hemolítica. O ELG (400 e 800 $\mu\text{g/mL}$) causou redução na proliferação celular, parada do ciclo celular, fragmentação do DNA, modificações no potencial da membrana mitocondrial e alterações morfológicas relacionadas à granularidade e tamanho nas células MCF-7, no entanto, não causou danos significativos à membrana celular, não causou necrose e nem apoptose tradicional. Em conclusão, o ELG foi capaz de induzir efeitos citostático e citotóxico em células de câncer de mama, provavelmente induzindo morte celular apoptótica.

Palavras-chave: Carotenoides; Antioxidante; Câncer de mama; Citotoxicidade.

2.1. Introdução

Psidium guajava L., popularmente conhecida como goiaba vermelha ou simplesmente goiabeira, é uma planta tropical, e sua fruta é amplamente consumida em virtude de seus benefícios nutricionais e sabor agradável (LEE et al., 2010). Estudos clínicos e farmacológicos demonstraram importante atividade biológica de compostos desta planta contra várias doenças, incluindo câncer. Os extratos acetônico da goiaba (*Psidium guajava* L.) tiveram efeitos citotóxicos nas células de câncer de cólon humano HT-29, avaliadas pelo ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol) (LEE e PARK, 2010). Complementarmente, a fração de hexano das folhas da goiaba foi um indutor potente de efeitos citotóxico e apoptótico em linhagem celulares de câncer de próstata humana PC-3 através de mecanismos relacionados à proteína quinase B (AKT)/alvo mecânico da rapamicina (mTOR)/S6 quinase beta-1 (S6K1) e vias de sinalização de proteína quinase (MAPK) ativada por mitógenos (RYU et al., 2012).

A goiaba vermelha é um fruto rico em proteínas, lipídios, fibras alimentares, minerais e compostos funcionais, como antocianinas e carotenoides (NORA et al., 2014). Os carotenoides são pigmentos naturais encontrados em legumes e frutas, que podem ser usados como aditivos alimentares, como corantes vermelho-amarelados, e possuem importantes propriedades fisiológicas (VARGAS-MURGA et al., 2016); entre os carotenoides de importância para a saúde destaca-se o licopeno.

O licopeno é um hidrocarboneto poli-insaturado de cadeia aberta, com fórmula molecular $C_{40}H_{56}$ e massa atômica teórica de 536.4376. O licopeno contém 11 ligações duplas conjugadas e 2 não conjugadas e é de natureza lipofílica (GANESH, LAKSHMI e CHANDY, 2016). As formas isoméricas *cis* e *trans* de licopeno podem ser encontradas na natureza, sendo as formas mais comumente identificadas *todo-trans*, *5-cis*, *9-cis*, *13-cis* e *15-cis*.

As ligações duplas conjugadas do licopeno o tornam um poderoso antioxidante, capaz de eliminar o oxigênio singlete e vários cátions radicais ou outras espécies reativas de oxigênio (EROs), como radicais superóxidos, radicais peroxil e radicais hidroxila (BÖHM, 2012; BRAMLEY, 2000; DI MASCIO, KAISER e SIES, 1989). Esta propriedade antioxidante é considerada responsável por seus efeitos benéficos para a saúde humana.

O *todo-trans* licopeno obtido da Sigma-Aldrich tem mostrado atividades neuroprotetora (HU et al.; 2017), hepatoprotetora (BANDEIRA et al., 2017; PINTO et al., 2013), antifúngico (CHOI e LEE, 2015), como também o *todo-trans*-licopeno obtido da Jagsonpal Pharmaceuticals Limited mostrou atividade cardioprotetora (OJHA et al., 2013), o extrato de

tomate com atividade anticancerígena (MARIANI et al., 2014) e o extrato rico em licopeno da goiaba vermelha mostrou atividade anti-inflamatória (VASCONCELOS et al., 2017). O tratamento prévio com o todo-*trans*-licopeno (Sigma-Aldrich) em várias doses retardou significativamente a formação e crescimento do tumor, reduzindo a carcinogênese na pele de camundongos fêmeas do tipo ICR – International Cancer Research (SHEN et al., 2014). O todo-*trans*-licopeno (Sigma-Aldrich) também inibiu a formação de espécies reativas de oxigênio e malondialdeído, impediu a perda de glutatona e afetou as atividades de uma gama de enzimas antioxidantes na pele de camundongos (SHEN et al., 2014). Além disso, o todo-*trans*-licopeno (Sigma-Aldrich) inibe a proliferação celular, detém o ciclo celular em diferentes fases e aumenta a apoptose, principalmente nas células de câncer de mama, cólon e próstata (TEODORO et al., 2012).

O câncer é um grupo de doenças de causas variadas, que é caracterizado por um crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos e pode se espalhar para outras regiões do corpo. O câncer de mama é um dos mais predominantes no mundo e o seu tratamento inclui cirurgia de conservação da mama ou, em alguns casos, mastectomia devido a grandes ou múltiplos tumores, relutância em se submeter à radioterapia ou medo de recorrência (DESANTIS et al., 2014). Assim, a abordagem preventiva ao consumidor de alimentos funcionais tornou-se muito importante.

Este estudo apoia a aplicação potencial do extrato rico em licopeno obtido a partir da goiaba vermelha (*Psidium gajava* L.) (ELG) como fonte natural, acessível e vantajosa, na prevenção e tratamento do câncer de mama.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Químicos e Reagentes

Etanol, metanol, ácido fórmico, o padrão do todo-*trans*-licopeno, MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol), penicilina, estreptomicina, meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) e dimetil sulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e clorofórmio da Dinâmica® Química Contemporânea Ltda (Brasil). O tiopental e a lidocaína foram adquiridos da empresa Syntec Co. (Santana de Parnaíba, SP, Brasil). Utilizou-se também o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) que foi adquirido da Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, USA).

2.2.2. Extração e Quantificação

O ELG foi obtido de acordo com a metodologia desenvolvida por Amorim, Ropke e Leite (2016), detalhada na patente N° BR102016030594-2, com adaptações. A goiaba vermelha, espécie *Psidium guajava* L. foi adquirida no mercado local, oriunda da produção orgânica da região dos Tabuleiros Litorâneos, cidade de Parnaíba, estado do Piauí, Brasil. As goiabas em alto grau de maturação (500 g), foram submetidas a tratamento térmico (congelamento seguido de aquecimento). A extração com solvente orgânico (etanol) foi realizada com agitação constante durante toda a extração. O extrato foi seco sob vácuo de mbar (rota-evaporador R215, Buchi, Suíça), à temperatura ambiente e com uso de pressão reduzida (vácuo de 175 mbar). Todos os passos foram realizados protegendo o material da luz e do oxigênio, mantendo a atmosfera inerte com o uso do nitrogênio. O ELG foi quantificado em termos de conteúdo de licopeno e submetido a análises químicas e biológicas.

A quantificação do licopeno no extrato foi realizada no Espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu UV-1800 (Tóquio, Japão), utilizando um padrão externo *todo-trans*-licopeno (Sigma-Aldrich). O padrão de *todo-trans*-licopeno foi dissolvido em clorofórmio e diluído em etanol (relação 1:20, clorofórmio:etanol) para preparar as concentrações de 1 a 10 mg/L, para a construção da curva de calibração. O espectro de absorvância do ELG foi obtido por varredura na região de comprimento de onda (λ) entre 600 e 350 nm, utilizando o etanol (P.A.) como branco com varredura na região de comprimento de onda (λ) entre 1100 a 190 nm. As medidas com comprimentos de onda de 471 nm foram escolhidas para a análise quantitativa com base na banda máxima de absorvência observada pela varredura espectrofotométrica e de acordo com o que foi previamente relatado na literatura (OBERMÜLLER-JEVIC et al., 2003).

2.2.3. Estudos Químicos

2.2.3.1. Análises de espectrometria de massas

O ELG foi analisado por espectrometria de massas de alta resolução para identificar a presença de licopeno no extrato. Uma fração da amostra, previamente dissolvida em clorofórmio, foi misturada com uma solução constituída por ácido fórmico a 0,1% em metanol:água (1:1), resultando na concentração de 5 ppm. As amostras foram injetadas diretamente em um Espectrômetro de Massas Impact II (Bruker, Daltonics), sob um fluxo de 180 μ L/h, acoplado a uma fonte de íons do tipo eletrospray (ESI) operando no modo positivo. Os parâmetros gerais foram: temperatura do gás seco igual a 200°C e taxa de fluxo de 4 L/min,

pressão do nebulizador a 0,3 bar, potencial capilar de 4,5 KV e deslocamento da placa de -500 V. A aquisição da varredura completa foi ajustada para um intervalo de massa entre m/z 50 a 1500. A fragmentação de íons precursores (MS/MS) foi realizada utilizando nitrogênio como gás de colisão e uma energia de 15 eV. O espectrômetro de massa foi controlado pelo software OTOFControl 3.2 e a análise foi realizada utilizando o software Data Analysis 4.3. Antes das aquisições, o espectrômetro de massas foi calibrado utilizando uma solução de formiato de sódio (10 mM).

2.2.3.2. Estudos experimentais de FTIR-ATR

O Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR - ATR) foi utilizado para investigar a composição do ELG e identificar o licopeno. O ELG foi inicialmente seco usando fluxo de gás nitrogênio. O FTIR utilizando um espectrômetro Thermo Nicolet 6700 e um divisor de feixe de brometo de potássio e um detector de sulfato de triglicina deuterado foram utilizados para todas as leituras realizadas para a identificação. Foi utilizado o acessório ATR na faixa espectral entre 4000 a 650 cm^{-1} para cada espectro com uma resolução espectral de 1 e 32 varreduras.

2.2.4. Estudos computacionais

As simulações teóricas foram realizadas utilizando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT), utilizando o software Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009). Foi empregado o funcional de troca e correlação B3LYP e a base estabelecida 6-311g (d,p) (LEE, YANG e PARR, 1988). Os isômeros *todo-trans*-licopeno, *5-cis*-licopeno e *13-cis*-licopeno foram estruturalmente otimizados, minimizando as forças de interação entre os átomos. Um fator de escala de 0,952 foi aplicado para corrigir o desvio vibracional da DFT, conforme discutido na literatura por Alecu et al. (2010). Estes cálculos foram simulados em condições de vácuo e sem efeitos de temperatura, uma vez que esta configuração mostrou concordância muito boa entre espectros de vibração teóricos e experimentais para moléculas orgânicas (BENTO et al., 2009; CUNHA et al., 2014; CUNHA et al., 2012; MARENICH et al., 2014; ROCHA et al., 2016; VÉRAS et al., 2013).

2.2.5. Estudos biológicos

2.2.5.1. Animais

Foram utilizados dez camundongos machos e fêmeas BALB/c (20-30g, 4-5 semanas), obtidos do biotério do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí (Brasil) para ensaio de viabilidade celular. Os animais foram mantidos a uma temperatura de 25 ± 1 °C, em ciclo de claro/escuro de 12 horas, com água e ração à vontade. Foi utilizada uma sobredose de anestesia por injeção intraperitoneal de uma associação de tiopental (150 mg/kg) e lidocaína (10 mg/kg) para eutanásia dos animais. Os macrófagos foram coletados das cavidades peritoneais e cultivados em meio RPMI 1640 (20% de soro fetal bovino inativado pelo calor [SFB], 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina a 37°C e 5% de CO₂). Foram obtidos glóbulos vermelhos através da centrifugação do sangue de carneiro (9 meses) para ensaio de viabilidade dos glóbulos vermelhos. O carneiro foi obtido do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (Brasil).

Todos os procedimentos foram realizados após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (permissão nº 008/2012), de acordo com a Resolução 1000 (11 de maio de 2012) do Conselho Federal de Medicina Veterinária e com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal para a prática da eutanásia.

2.2.5.2. Culturas de células MCF-7 e NIH-3T3

As células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e células de fibroblastos de camundongos (NIH-3T3) foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e do banco de células do Rio de Janeiro (Brasil), respectivamente. Ambas foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) (Life, USA), completado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Life, USA) e 1% de solução de antibiótico (100 UI/mL de penicilina - 100 µg/mL de estreptomicina, Life, USA) a 37° C e 5% de CO₂.

2.2.5.3. Tratamento celular

Para o ensaio de viabilidade, os macrófagos foram semeados a uma densidade de 2×10^5 células por poço em meio de cultura RPMI em placa de cultivo de 96 poços durante 4 horas a 37 °C, 5% CO₂. Posteriormente, foram feitas duas lavagens com meio suplementado RPMI e

foram adicionados 1% de DMSO no ELG nas concentrações de 800 a 6,25 µg/mL, utilizando DMSO 1% como controle. As placas foram incubadas durante 48 horas a 37 °C, 5% CO₂ em atmosfera úmida.

As células MCF-7 e NIH-3T3 foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços a uma densidade de 3×10^3 células por poço em meio de cultura DMEM *overnight* a 37 °C, 5% CO₂ em atmosfera úmida. Em seguida, o meio foi removido e substituído e várias concentrações do ELG reconstituído em 1% de DMSO foram aplicadas (1.600 a 6,25 µg/mL). O DMSO 1% foi usado como controle. As placas foram incubadas durante 24 e 72 horas a 37 °C, 5% CO₂ em atmosfera úmida.

Para os experimentos de citometria de fluxo, as células MCF-7 foram dispostas em placas de cultivo de 12 poços a uma densidade de 5×10^4 células por poço. Após a incubação durante 24 horas a 37 °C, 5% CO₂ em atmosfera úmida, as células foram incubadas com 1 mL de ELG a 400 e 800 µg/mL por 24 e 72 horas. Células incubadas com DMSO (DMSO <1%) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 1 mM) foram utilizadas como controle. Após 24 e 72 horas de tratamento, as células foram obtidas por tripsinização com 5 minutos de exposição a tripsina (Life, USA) a 37 °C, 5% de CO₂ em atmosfera úmida. Em seguida, a tripsina foi neutralizada com meio de cultura completo e as células foram centrifugadas a 3083 G durante 5 minutos a 4 °C para serem ainda preparadas para os ensaios descritos abaixo.

2.2.5.4. Ensaio de viabilidade das células MCF-7 e NIH-3T3

O ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando o método de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol). O ensaio do MTT baseia-se na redução de derivados de tetrazol em células vivas por desidrogenases mitocondriais, permitindo a estimativa metabólica das células. Este ensaio permite a avaliação da viabilidade celular e da proliferação celular como parâmetros de sobrevivência e crescimento celular (SLIWKA et al., 2016). Após 24 e 72 horas de incubação, foram adicionados 15 µL da solução de MTT (5 mg/mL em tampão de fosfato) em cada poço e as placas foram incubadas durante 2 horas a 37 °C e 5% CO₂ em atmosfera úmida. O sobrenadante foi descartado e 100 µL de DMSO foram adicionados em cada poço. A absorbância foi monitorada usando um espectrofotômetro com um leitor de microplacas a 595 nm (Molecular Devices, USA). Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

2.2.5.5. Ensaio de viabilidade dos macrófagos

A citotoxicidade do ELG sobre macrófagos foi também avaliada pelo método do MTT. Após 48 horas de incubação com ELG em concentrações variando de 6,25 a 800 µg/mL, foram adicionados 10 µL de MTT, diluídos em meio RPMI a 5 mg/mL. As células foram incubadas durante 4 horas a 37 °C com 5% CO₂, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de DMSO em cada poço. Posteriormente, a placa foi submetida à agitação durante cerca de 30 minutos num agitador Kline (modelo AK 0506), à temperatura ambiente, até que o formazan fosse completamente dissolvido. Finalmente, um leitor de placas foi usado para ler as amostras a 550 nm.

2.2.5.6. Integridade da membrana plasmática e contagem das células

A integridade da membrana celular das células MCF-7 foi avaliada pelo ensaio de azul de tripan como parte da investigação do mecanismo da ação do ELG em células de câncer. O teste azul de tripan avalia o grau de comprometimento estrutural da membrana plasmática, sendo um corante macromolecular, não sendo possível a absorção pelos poros da membrana plasmática de células viáveis. No entanto, quando a membrana plasmática sofre alterações estruturais e se torna permeável ao corante, as células são coradas em azul (ALBURQUERQUE, 2008).

As células com membrana não danificadas/íntegras não mostram coloração do corante no interior das células e as células com membrana lesionada/danificada apresentaram coloração do corante no interior das células (CARVALHO, 2010; JOANITTI, AZEVEDO e FREITAS, 2010; PEREIRA, 2014). Células vivas não são coradas devido aos seus controles de transporte transmembrana que não permitem a ligação do azul tripan (DIB et al., 2009).

Resumidamente, as células foram expostas a 400 e 800 µg/mL do ELG durante 24 e 72 horas. Em seguida, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 3083 G durante 5 minutos a 4°C. O *pellet* foi resuspendido em 100 µL de PBS 1x e 10 µL dessa suspensão foram adicionados a 20 µL de solução de azul de tripan (0,4% em tampão fosfato - Sigma, EUA). As células foram contadas usando a câmara de Neubauer e foram classificadas como células com membrana lesionada/danificada e células íntegras ou sem danos na membrana de acordo com a presença ou ausência de corante no citoplasma.

2.2.5.7. Ensaio de fragmentação de DNA e ciclo celular

Para complementar os dados, a fim de compreender melhor o possível mecanismo de ação do ELG, foram realizados análises de fragmentação de DNA e ensaio de ciclo celular.

A avaliação da fragmentação de DNA e ciclo celular das células tratadas com ELG foi determinada com a adição de iodeto de propídeo (PI). O PI é um dos corantes com afinidade por DNA mais utilizados em citometria de fluxo por ser capaz de se intercalar entre pequenas sequências de nucleotídeos (MARTINS, 2009; OMBREDANE, 2016), sendo que o sinal fluorescente emitido é diretamente proporcional à quantidade de DNA da célula. (CAMPAGNARO, 2012). Esta metodologia permite estimar a distribuição do ciclo celular e também a quantidade de células que apresentam DNA fragmentado (CAMPAGNARO, 2012; CHAVES, 2013).

As fases do ciclo celular podem ser caracterizadas por variações no seu conteúdo de DNA. A marcação com PI permite quantificar o percentual de células em cada fase do ciclo celular, e por isso tem sido utilizada na verificação de possíveis arrastes ou acúmulos anormais de células em determinada fase do ciclo celular (OLIVEIRA, 2015; PEREIRA, 2014).

O ciclo celular compreende os processos de duplicação do DNA e divisão celular (mitose) resultando na produção de uma nova célula. O ciclo celular é dividido em duas etapas principais: interfase e mitose (M). A interfase é caracterizada por ser um período de intenso metabolismo para a célula e inclui a fase G₁, S e G₂. A fase G₁ é caracterizada pelo reinício da síntese de RNA e proteínas, que estavam interrompidas durante a mitose. Essa é a fase mais longa do ciclo e onde a célula decide se continua proliferando ou interrompe a fase G₁ e entra em estado de quiescente (G₀). Na fase S (síntese) ocorre a replicação do DNA seguindo para a fase G₂ que é caracterizada pelo crescimento celular e pela a síntese de proteínas em preparação para a mitose. Na mitose ocorre a separação dos cromossomos filhos e a divisão da célula em duas (AGUIAR, 2011).

As células MCF-7 foram resuspendidas em 1 mL de etanol frio (70%) e armazenadas a -20 °C durante 24 horas. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e 100 µl de RNase (50 µM) foram acondicionadas por 30 minutos a 37 °C, protegidos da luz. Em seguida, incubaram-se 100 µL de iodeto de propídeo (PI – 20 µg/mL, Probes, Thermo Fisher, EUA) em PBS 1x durante 30 minutos à temperatura ambiente, protegidos da luz. A fragmentação do DNA e o ciclo celular foram analisados usando um citômetro de fluxo (BD FACSVerser™ 250, USA). Um total de 10.000 eventos foram coletados por amostra.

2.2.5.8. Potencial de membrana mitocondrial e aspectos morfológicos MCF-7

A análise do potencial de membrana mitocondrial foi realizada para avaliar o mecanismo associado a apoptose (PEREIRA, 2014), utilizando Rodamina 123, uma sonda fluorescente catiônica capaz de se acumular especificamente nas mitocôndrias devido ao potencial transmembranar negativo das mitocôndrias em células vivas (CARVALHO et al., 2015; RNOT et al., 1986). Alterações no potencial mitocondrial transmembranar levam ao efluxo da Rodamina 123 de dentro da mitocôndria, gerando menor fluorescência (MARTINS, 2009).

Quando os sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna e a transição da permeabilidade mitocondrial. Ao mesmo tempo, a água do espaço entre membranas passa para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e consequentemente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma. Ocorre também a perda da homeostase celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de EROs (AGUIAR, 2011).

A citometria de fluxo é bastante utilizada para identificação de determinadas células em suspensão, promovendo a identificação e a quantificação de células pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência destas células (NAKAGE et al., 2005). Os dois parâmetros morfológicos, o desvio frontal (forward scatter, FSC, menos de 2°) e o desvio lateral (side scatter, SSC, a 90°) da luz indicam, respectivamente, o tamanho celular, proporcional à área de corte transversal da célula e à granulosidade celular, ou melhor, o grau de diferença entre o índice de refração dos grânulos de uma célula em relação ao índice de refração do seu citoplasma (JORGE e CASTRO, 2000).

As células MCF-7 foram lavadas duas vezes em PBS 1x e depois foram adicionadas a cada amostra 300 µL de Rodamina 123 (5 µg/mL em PBS 1x, Thermo Fisher, USA) e incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e foram analisadas por citometria de fluxo (BD FACSVerser™, USA). Um total de 10.000 eventos foram coletados por amostra. Em paralelo, os parâmetros relacionados ao tamanho e granulosidade das células tratadas também foram obtidos por citometria de fluxo (BD FACSVerser™, USA) usando os canais FSC e SSC, respectivamente. Um total de 10.000 eventos foram coletados por amostra.

2.2.5.9. Marcação por Anexina-V FITC/ Iodeto de propídeo (PI)

A coloração anexina-V FITC/PI foi aplicada para distinguir as células apoptóticas das células necróticas. A anexina-V recombinante conjugada com o corante FITC detecta a externalização da fosfatidilserina em células apoptóticas. Por outro lado, o PI, detecta um ácido nucléico intercalado com vermelho fluorescente popular, não é permeável as células vivas, sendo comumente usados para detectar células necróticas.

A fosfatidilserina é um fosfolípídeo encontrado na face interna da membrana plasmática das células viáveis. Durante o processo de apoptose, a fosfatidilserina é translocada para a camada externa da membrana funcionando como sinalizador para os fagócitos (DUARTE, 2010; PALMA, 2005).

A anexina-V é uma proteína endógena que está amplamente distribuída no meio intracelular, com elevadas concentrações na placenta, e baixas concentrações em células do endotélio, rins, miocárdio, músculo esquelético, epiderme, eritrócitos, plaquetas e monócitos (GUIMARÃES, 2010). A Anexina-V é utilizada para identificar as células em fase inicial de apoptose por possuir uma alta afinidade à fosfatidilserina. Nas análises por citometria, a Anexina-V está associada a um fluorocromo tipo FITC e é usada simultaneamente com o PI. Somente as células mortas ou com membrana danificada são permeáveis ao PI, que é um indicador de apoptose tardia e/ou de morte celular por necrose (ANDREOTTI, 2006; CAMPAGNARO, 2012; OMBREDANE, 2016).

Após 24 e 72 horas de incubação, as células foram lavadas em PBS 1x e novamente resuspensas em 100 µL de tampão de ligação [10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂]. Em seguida, foram adicionados 5 µL de Anexina-V FITC (BD, EUA) e 10 µL de PI (50 µg/mL) e as células foram incubadas durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Duzentos microlitros de tampão de ligação foram adicionados e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (BD FACSVerser™ 273, EUA). Um total de 10.000 eventos foram coletados por amostra.

2.2.5.10. Atividade hemolítica

O teste de hemólise *in vitro* é usado como método de triagem para toxicidade de substâncias estimando o dano, que podem induzir *in vivo*, nos eritrócitos (PITA, 2010). A hemólise é caracterizada por ruptura do eritrócito com liberação de hemoglobina. A hemoglobina livre no plasma é prejudicial à saúde causando sérios danos em órgãos vitais tais

como fígado, rins e coração, sendo importante a observação desta atividade (BEDNARCZUK et al., 2010).

Para avaliar a atividade hemolítica, como parte do estudo para obter informações breves de biocompatibilidade, foram coletados 4 mL de sangue de carneiro com anticoagulante (EDTA), para a aquisição dos eritrócitos. A concentração de sangue foi ajustada para 5% de eritrócitos em 80 μ L de PBS e 20 μ L de LEG foram adicionados nas concentrações de 800 a 6,25 μ g/mL. As amostras foram incubadas durante 1 hora a 37° C e a reação foi interrompida pela adição de 200 μ L de PBS. Após centrifugação a 1000 G durante 10 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi submetido à análise espectrofotométrica a 550 nm, a fim de avaliar a atividade hemolítica. A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas substituindo a solução da amostra testada pelo mesmo volume de PBS e água, respectivamente.

2.2.6. Análise estatística

As diferenças estatísticas entre controle e células tratadas foram avaliadas por ANOVA e teste post hoc de Bonferroni, em um nível de significância de 0,05, em Graph Pad Prism 5.03 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA). Os valores médios de IC₅₀ com limites de confiança de 95% foram determinados por regressão do probits usando software Graph Pad Prism. Todos os valores foram expressos como médias \pm EPM e $p < 0,05$ foi definido como significância estatística. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Caracterização química

Estudar o papel das substâncias bioativas contra o câncer de mama, especialmente de fonte natural, tem importância vital devido, em parte, à alta incidência deste tipo de câncer e seu difícil tratamento. Neste contexto, o licopeno é uma molécula frequentemente relacionada como potencial agente anticancerígeno (TEODORO et al., 2012), que pode ser usado como alternativa às várias terapias atualmente aplicadas no tratamento do câncer de mama. O teor de licopeno na goiaba vermelha é maior que o de outras fontes conhecidas, como o tomate, a melancia, a manga e o mamão (MANGELS et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2010; VARGAS-MURGA et al., 2016). Além disso, a goiaba vermelha é popularmente usada como alimento e

remédios, mas há poucos estudos farmacológicos demonstrando sua atividade biológica contra o câncer. Assim, avaliamos o LEG por seus efeitos citotóxicos nas linhas celulares normais e cancerígenas e estudamos seu mecanismo de ação.

As informações químicas sobre o ELG foram obtidas por técnicas sensíveis, o que permitiu a determinação e identificação do conteúdo de licopeno, componente principal no extrato, demonstrando que o processo de extração aplicado foi bem-sucedida. Alguns estudos mostram que o etanol foi empregado em várias metodologias para obter alto teor de carotenoides de alimentos (KONG et al., 2010; MACÍAS-SÁNCHEZ et al., 2008; SADLER, DAVIS e DEZMAN, 1990; SANTAMARIA et al., 2000). A aplicação deste solvente permitiu a extração de 73% de carotenoides do pimentão vermelho (*Capsicum annuum*), sugerindo uma alternativa para a substituição de hexano em processos industriais (SANTAMARIA et al., 2000). Além disso, extração com solventes orgânicos incluindo etanol utilizado por Kong et al. (2010) resultaram em um alto conteúdo de carotenoides, mais concentrado de licopeno, bem como o maior teor de licopeno apresentou maior atividade de eliminação de radicais. Aliado a isso, há um efeito sinérgico nas propriedades antioxidantes do licopeno em misturas de carotenoides (STAHL et al., 1998; STAHL e SIES, 2003; SHI, KAKUDA e YEUNG, 2004).

A detecção por espectrofotometria UV-Vis foi empregada com sucesso para a determinação simples e rápida do teor de licopeno no extrato da goiaba vermelha. A análise espectrofotométrica do ELG, dissolvido em clorofórmio:etanol (1:20), revelou três bandas de absorção máxima em $\lambda_{\text{máx}} \sim 501, 471$ e 444 nm que foram semelhantes aos picos máximos de absorbância do padrão do todo-*trans*-licopeno de tomate em $\lambda_{\text{máx}} \sim 504, 474$ e 447 nm (Figura 1). A análise quantitativa realizada na banda com comprimento de onda 471 nm, usando a curva de calibração ($y = 0,016 x + 0,045$ [$r^2 = 0,993$]) revelou a aplicação bem-sucedida da metodologia de extração de Amorim, Ropke e Leite (2016) para obter um extrato rico em licopeno (20% de licopeno por peso do extrato seco).

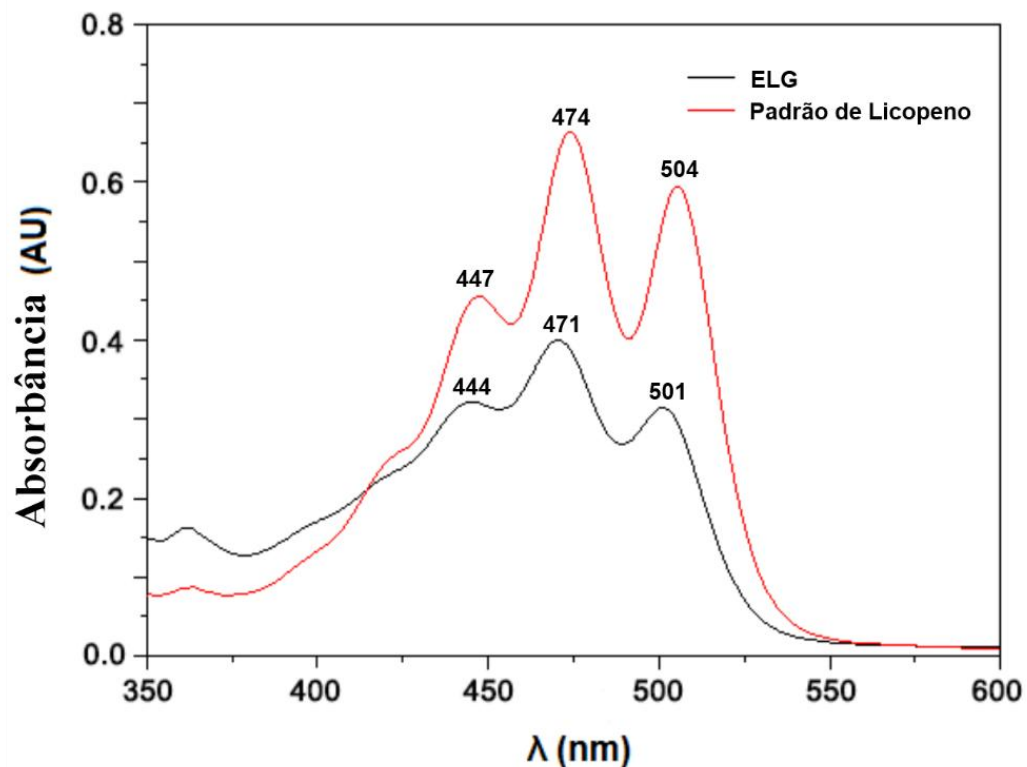


Figura 1 - Espectro de UV-Vis (600 a 350 nm) do padrão do todo-*trans*-licopeno de tomate (Sigma-Aldrich) e extrato rico em licopeno da goiaba vermelha (ELG). O padrão externo do tomate foi dissolvido em clorofórmio:etanol (1:20) em concentrações de 1 a 10 mg/L.

Os picos de absorção obtidos com espectrofotometria UV-Vis para ELG corresponderam com dados previamente estabelecidos para licopeno de outras fontes. A literatura relata que a análise do extrato metanólico para o licopeno a partir do tomate, realizado por UV-Vis, apresenta bandas de absorção nos comprimentos de onda máximos de 447,2; 473,2 e 504,2 nm, os quais são característicos do todo-*trans*-licopeno (AGHEL, RAMEZANI e AMIRFAKHRIAN, 2007). Honda et al. (2015) relataram que as bandas de absorção nos comprimentos de onda máximos para o todo-*trans*-licopeno e 5-*cis*-licopeno foram 444, 470 e 501 nm quando dissolvidos em hexano, os valores correspondem aos dados obtidos em nosso trabalho (Figura 1). Além disso, foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os comprimentos de onda máximos para os isômeros de licopeno em amostras de produtos de tomate; sendo possível ver após a análise por espectrofotometria UV-Vis que o todo-*trans*-licopeno apresentou bandas de absorção no $\lambda_{\text{máx}} = 445, 472$ e 502 nm, enquanto 5-*cis*-licopeno apresentou bandas de absorção $\lambda_{\text{máx}} = 446, 471$ e 502 nm quando preparado em acetato de etila (STINCO et al., 2013). Valores semelhantes encontrado na literatura foram relatados para ELG nesse trabalho.

A identificação do licopeno no ELG foi realizada por espectrometria de massa de alta resolução, usando uma fonte de íons ESI operando no modo positivo. Os resultados mostram que o licopeno ioniza como íon molecular de $[M]^{+\bullet} = 536.4364$. Após o experimento de fragmentação induzida por colisão, resultou em quatro fragmentos principais correspondentes aos íons m/z 467.3658, 444.3788, 375.3034 e 269.2259 (Figura 2A).

O espectro de massa obtido após a fragmentação induzida por colisão realizada para o íon molecular m/z 536.4364 apresentou fragmentos esperados para o licopeno (m/z 467.3658, 444.3788 e 375.3034). O espectro de licopeno pode ser distinguido do β -caroteno pela presença do fragmento m/z 467 (ARATHI et al., 2015). Além disso, alguns estudos indicam também a presença do fragmento m/z 521 como o íon de diagnóstico para *cis*-licopeno (ARATHI et al., 2015; DONG et al., 2010). Uma vez que no nosso espectro MS/MS este fragmento estava ausente, nossos resultados sugerem que ELG contém principalmente todo-*trans*-licopeno.

2010). Uma vez que no nosso espectro MS / MS este fragmento estava ausente, nossos resultados sugerem que LEG contém principalmente todo-*trans*-licopeno. Os resultados experimentais FTIR-ATR do ELG, bem como os resultados teóricos do todo-*trans*-licopeno, 13-*cis*-licopeno e 5-*cis*-licopeno, são mostrados na figura 2B. As regiões entre 2840 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} foram omitidas para uma visão mais clara da atividade molecular. Quanto aos resultados teóricos, os espectros de IR são muito similares, uma vez que a principal diferença está relacionada a uma isomerização *cis-trans* posicional. Em comparação ao 5-*cis*-licopeno, a maior discrepância observada no espectro do 13-*cis*-licopeno está relacionada com os picos a 2931 cm^{-1} , e a ausência do pico a 1233 cm^{-1} . No que diz respeito às atribuições vibracionais gerais das regiões mais intensas para ambos os sistemas, obteve-se o seguinte: $955 - 1000\text{ cm}^{-1}$ mostra curvatura C-H fora do plano; $1077 - 1282\text{ cm}^{-1}$ mostra principalmente o estiramento C-C, também alguns modos angulares C=C e C-H espalhados em toda a molécula; 1348 cm^{-1} mostra a vibração de ligações CH_3 ; em $1420 - 1425\text{ cm}^{-1}$ mostra deformação do CH_3 ; $1511 - 1606\text{ cm}^{-1}$ indica estiramento do C=C; os valores mais altos ($2870, 2903, 2931$ e 2968 cm^{-1}) representam o estiramento do C-H. Uma vez que também existem outros componentes no extrato rico em licopeno, espera-se que as interações intermoleculares possam mudar os espectros vibracionais e outros modos vibracionais também estão presentes. No entanto, as bandas entre 1366 e 1454 cm^{-1} indicam uma impressão digital confiável que mostrou o estiramento do C=C do licopeno.

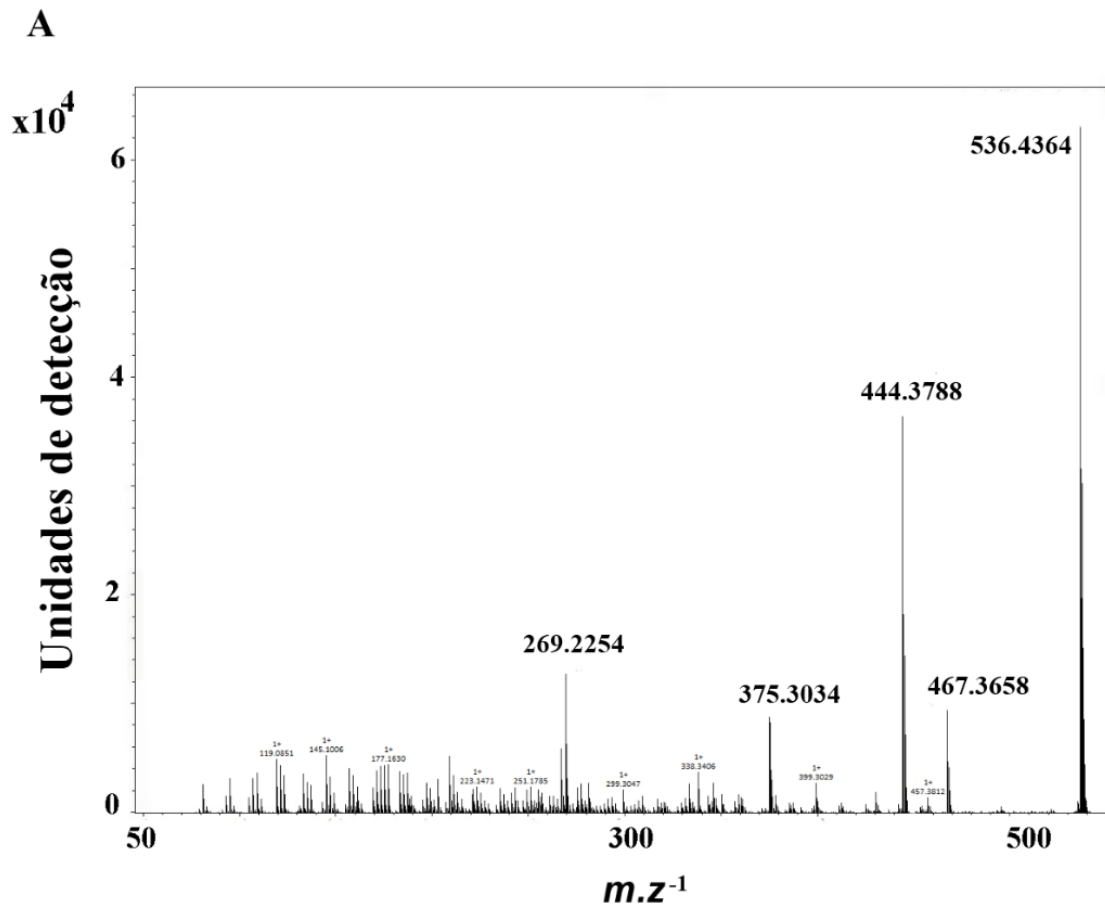


Figura 2A - MS/MS no intervalo de m/z 50 a 550 do ELG.

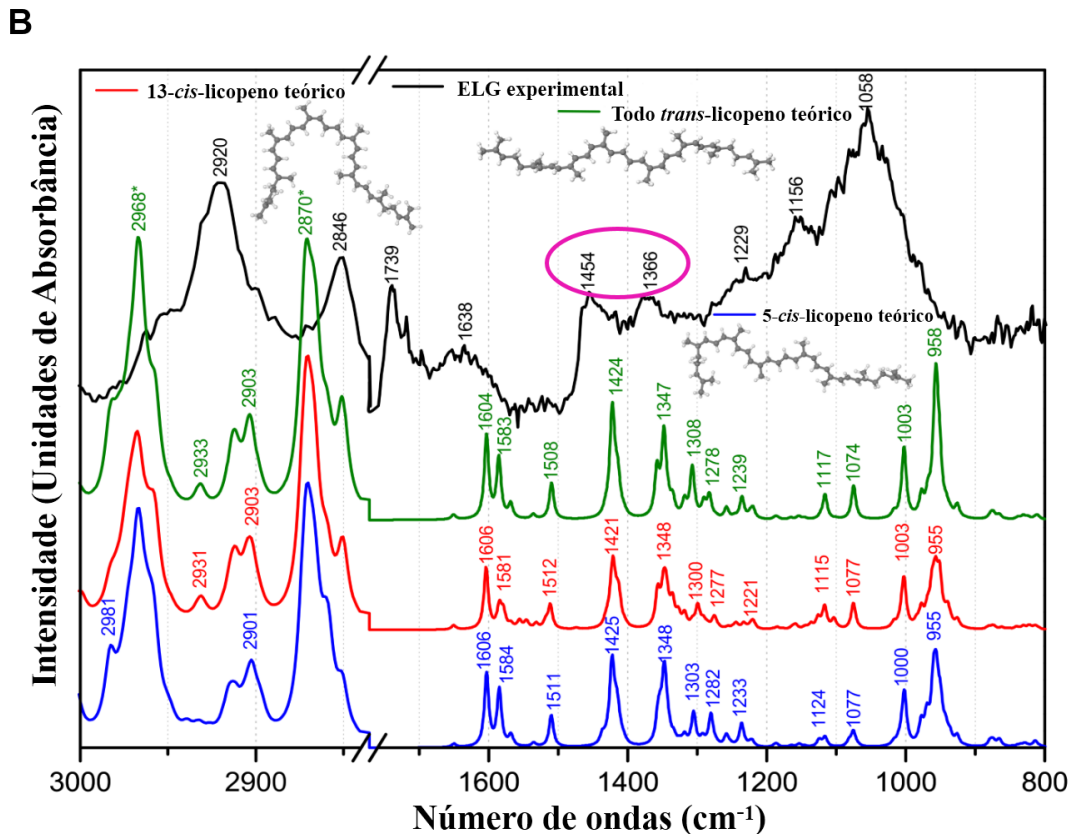


Figura 2B - Resultados FTIR para o ELG experimental (linha preta), IR teóricos do todo-*trans*-licopeno (linha verde), 13-*cis*-licopeno (linha vermelha) e 5-*cis*-licopeno (linha azul). Os números acima das bandas indicam o número de onda respectivo e as figuras inseridas ilustram, abaixo da legenda, sua respectiva forma de isômero de licopeno após a otimização de DFT. * Essas bandas teóricas tem o mesmo número de onda.

O FTIR vibracional da amostra, em comparação com os cálculos teóricos da DFT, indica algumas impressões digitais, em estiramento C=C especialmente na região $1366\text{-}1454\text{ cm}^{-1}$. Por outro lado, o método teórico não foi capaz de capturar a diferença entre os isômeros, mas infere que ambas as formas estão, em princípio, presentes no ELG. Devido às suas 11 ligações duplas conjugadas, o licopeno pode assumir cerca de 72 *cis*-isômeros estruturalmente favoráveis e sua estabilidade química pode ser afetada por três fatores principais: calor, luz e oxigênio, bem como solventes, o que pode causar isomerização de todo-*trans* para as formas mono ou poli-*cis* (SRIVASTAVA e SRIVASTAVA, 2015). Embora nossos resultados indiquem que o ELG é constituído principalmente por todo-*trans*-licopeno, os isômeros *cis* podem estar presentes em concentrações mais baixas.

Estudos de propriedades vibracionais de licopeno também foram realizados previamente na literatura. Baranska, Schütze e Schulz (2006) mostraram que o FTIR poderia ser um método de caracterização bom, rápido e não destrutivo para a quantificação do licopeno. Mais tarde,

estes métodos também foram melhorados de diferentes maneiras, por exemplo: usando em combinação com Infravermelho com Reflexão Total Atenuada (NARDO et al., 2009), com análise estatística multivariada (GIUSTI et al., 2011), com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (KIM et al., 2015) ou Raman *in situ* para monitorização do amadurecimento de tomate (TREBOLAZABALA et al., 2017).

2.3.2. O ELG exibiu citotoxicidade contra células cancerosas, mas não em linhagem celular normal

Em relação aos ensaios biológicos, os resultados do ensaio MTT mostraram que o ELG foi eficaz como agente anticancerígeno em todas as concentrações testadas e para ambos os tempos (24 e 72 horas) avaliados (Figura 3). Esta atividade foi avaliada em células MCF-7, uma linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano isolada de uma mulher Caucasiana de 69 anos em 1970 (YALVAC et al., 2009).

A viabilidade celular foi avaliada por ensaio MTT em MCF-7 e NIH-3T3, com tratamento por 24 e 72 horas e em macrófagos, com tratamento durante 48 horas. O DMSO, o veículo do ELG, foi utilizado como controle para cultura celular e não afetou a viabilidade celular. O tratamento com ELG afetou significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade celular na linhagem de células de câncer de mama humano MCF-7, de uma maneira dose e tempo-dependente apresentando o valor da média da concentração inibitória (IC_{50}) de 29,85 $\mu\text{g/mL}$ e 5,964 $\mu\text{g/mL}$ para 24 e 72 horas, respectivamente (Figura 3).

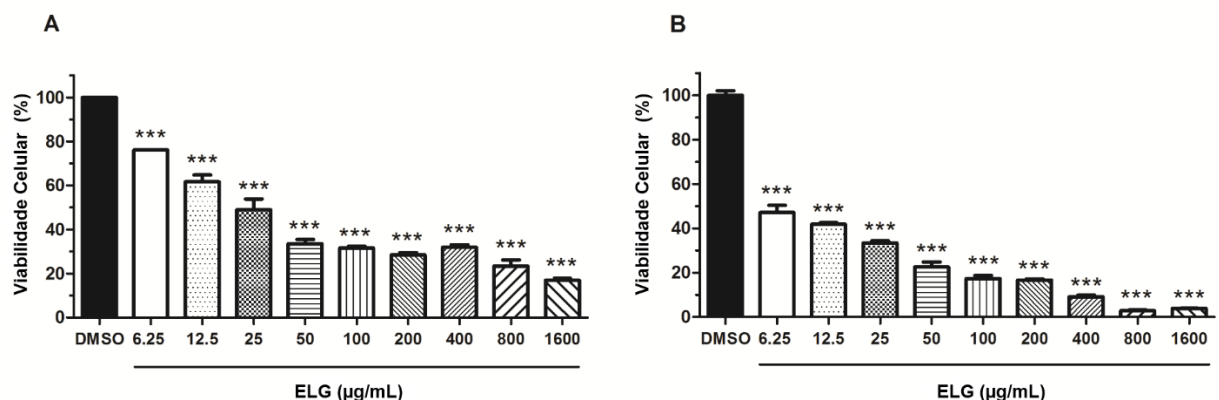


Figura 3 - Efeito do ELG na viabilidade em linhagem celular de câncer de mama humano (MCF-7) com exposição após 24 horas (A) e 72 horas (B). O ensaio foi realizado utilizando o método MTT, monitorando a absorbância a 595 nm. Os valores são expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,0001$ vs grupo controle DMSO.

O ELG apresentou valor de IC_{50} semelhante no tempo de 72 horas (Figura 3B) em comparação ao encontrado em composto anticancerígeno tradicional em MCF-7, como 5-FU (IC_{50} de 10 μ M ou 1,3 μ g/mL) (HERNANDEZ-VARGAS et al., 2006).

Gloria et al. (2014) descrevem que o licopeno (10%) adquirido da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA) causou uma diminuição significativa no número de células viáveis de câncer de mama: uma detenção do ciclo celular seguida da diminuição da viabilidade celular após 96 horas e um aumento na apoptose. Esses dados são semelhantes aos resultados obtidos neste estudo, em que o ELG diminuiu o número de células MCF-7 viáveis, causando detenção do ciclo celular e fragmentação do DNA.

Alguns relatos da literatura sugerem que há uma relação entre a suplementação de licopeno, ou mesmo o consumo de alimentos contendo alto teor de licopeno e a redução do câncer. Mariani et al. (2014), verificou em trinta e dois pacientes com neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (NIPAG), suplementado com uma dieta enriquecida com licopeno (20-25 mg/dia de licopeno, através de 30 g/dia de extrato de tomate triplo concentrado) durante 6 meses, que pacientes com câncer de próstata mostraram a baixa concentração de licopeno na próstata em comparação com os pacientes com NIPAG, apoiando o papel benéfico da acumulação de licopeno contra o desenvolvimento do câncer de próstata.

As células de fibroblastos de camundongos NIH-3T3 tratadas com ELG permaneceram viáveis (Figura 4), particularmente na faixa de concentração de 6,25 a 25 μ g/mL, em exposição após 24 horas, enquanto na exposição por 72 horas uma redução no número de células viáveis de 12% na concentração de 50 μ g/mL foi observada, em comparação com o grupo controle. O valor IC_{50} foi de 1.579 μ g/mL e 911,5 μ g/mL para 24 e 72 horas, respectivamente.

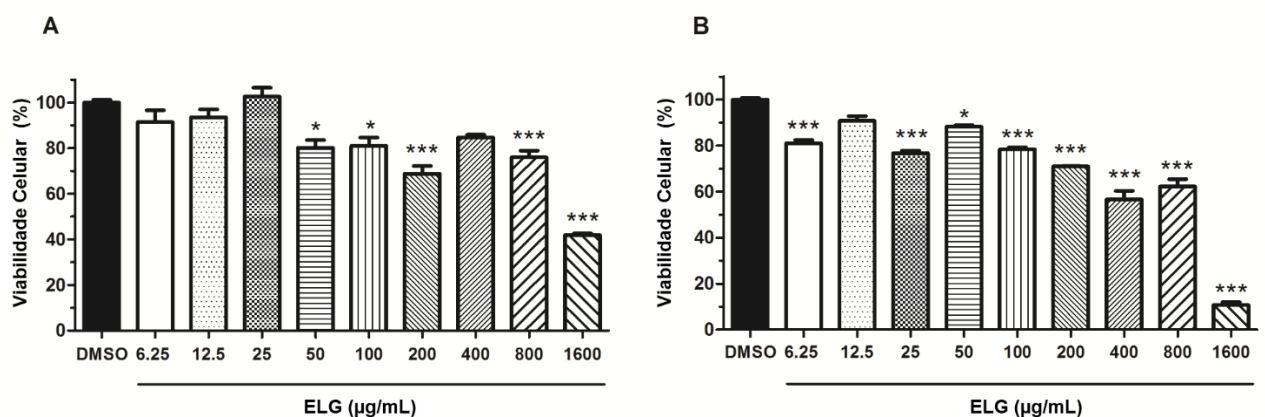


Figura 4 - Efeito do ELG sobre a viabilidade em linhagem celular normal de fibroblastos de camundongos (NIH-3T3), com exposição após 24 horas (A) e 72 horas (B). O ensaio foi realizado utilizando o método MTT, monitorando a absorbância a 595 nm. Os valores são expressos como média \pm EPM * $p < 0,05$ vs grupo controle DMSO; *** $p < 0,0001$ vs grupo controle DMSO.

Os resultados de citotoxicidade do ELG em macrófagos de camundongos BALB/c são expressos na figura 5. É possível observar uma redução dose-dependente na porcentagem de viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos, com um valor IC_{50} superior a 800 $\mu\text{g/mL}$, o ELG diminuiu a viabilidade em cerca de 40% células NIH-3T3 e mais de 90% das células MCF-7 em 72 horas. Estes resultados indicam que LEG exibe maior seletividade em relação às células MCF-7 do que em células NIH-3T3 ou macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

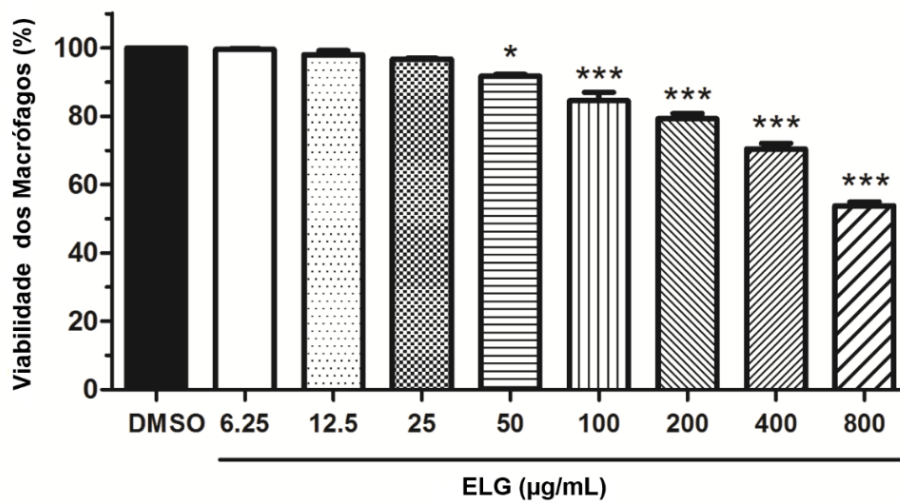


Figura 5 - Citotoxicidade do ELG sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. O ensaio foi realizado utilizando o método MTT, monitorando a absorbância a 550 nm. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs grupo controle DMSO; *** $p < 0,0001$ vs grupo controle DMSO.

A exposição a longo prazo (72 horas) das células MCF-7 ao LEG resultou em valores inferiores de IC_{50} em comparação com células normais como os macrófagos peritoneais BALB/c e NIH-3T3. A seletividade preferível em relação as células cancerosas sugerem o seu potencial na aplicação como agente anticancerígeno. Os valores de IC_{50} estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1- Resumo do valor da concentração inibitória máxima (IC_{50}) para células de câncer e células normais tratadas com ELG, conforme avaliado utilizando o método MTT.

Linhagem celular	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	24 h	48 h	72 h
Células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7)	28,85	-	5,964
Células de fibroblastos de camundongos (NIH-3T3)	1.579	-	911,5
Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c	-	> 800	-

2.3.3. O ELG não danificou a membrana celular das células MCF-7

A análise do efeito do ELG sobre a integridade da membrana das células MCF-7 revelou que o tratamento com ELG, nas duas concentrações testadas (400 e 800 µg/mL), não causou danos significativos (ruptura) à membrana celular, tanto após 24 e 72 horas, quando comparado ao grupo controle (Figura 6).

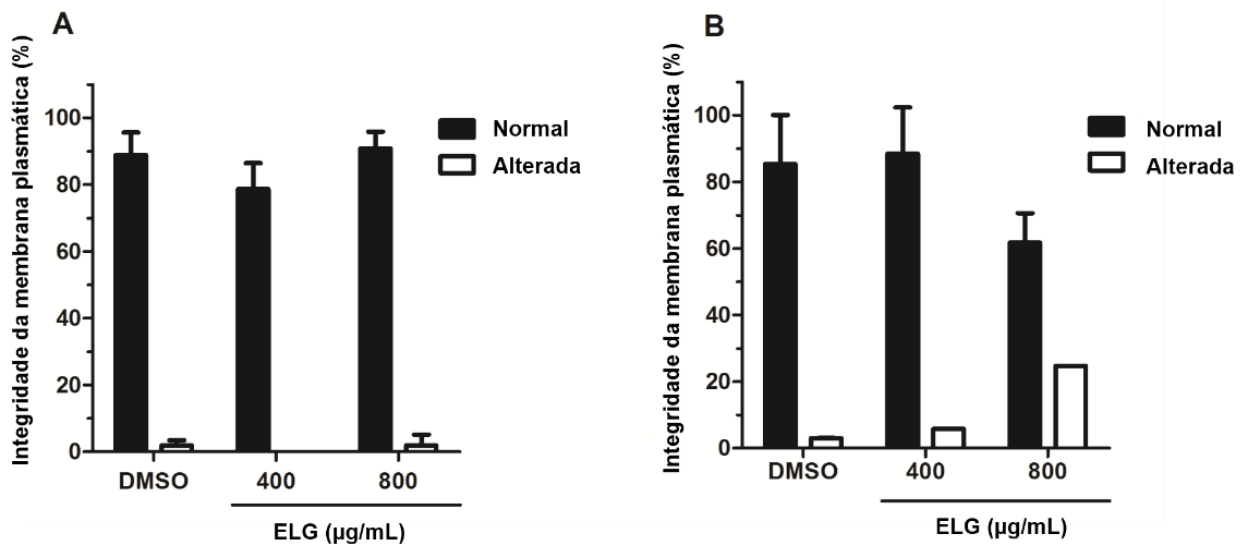


Figura 6 - Efeito do ELG sobre a integridade da membrana das células MCF-7, com exposição após 24 horas (A) e 72 horas (B). O ensaio foi realizado por método de coloração com azul de tripan, as células foram contadas usando a câmara de Neubauer e foram divididas em células alteradas (membranas danificadas, coradas) e normais (membrana não danificada). Os valores são expressos como média \pm EPM. Nenhuma diferença significativa foi observada quando comparada com o grupo controle DMSO.

Sabe-se que a ruptura da membrana plasmática e o colapso metabólico são características típicas de necrose, enquanto que a apoptose é caracterizada por condensação da cromatina, clivagem sistemática do DNA e encolhimento celular (DIVE et al., 1992, YANG et al., 2017).

2.3.4. O ELG afetou a proliferação das células MCF-7

Conforme mostrado na figura 7, o número de células de câncer de mama humano MCF-7 não foi significativamente afetado pela exposição ao ELG a 400 µg/mL ($94 \pm 11 \times 10^4$ células/mL) e 800 µg/mL ($71 \pm 5 \times 10^4$ células) durante 24 horas quando comparado com o controle ($97 \pm 3 \times 10^4$ células). Por outro lado, em 72 horas de exposição, foi possível notar uma redução significativa ($p < 0,05$) na proliferação celular a 400 µg/mL ($98 \pm 14 \times 10^4$ células) e 800 µg/mL ($35 \pm 9 \times 10^4$ células) quando comparado com o grupo controle ($216 \pm 31 \times 10^4$ células).

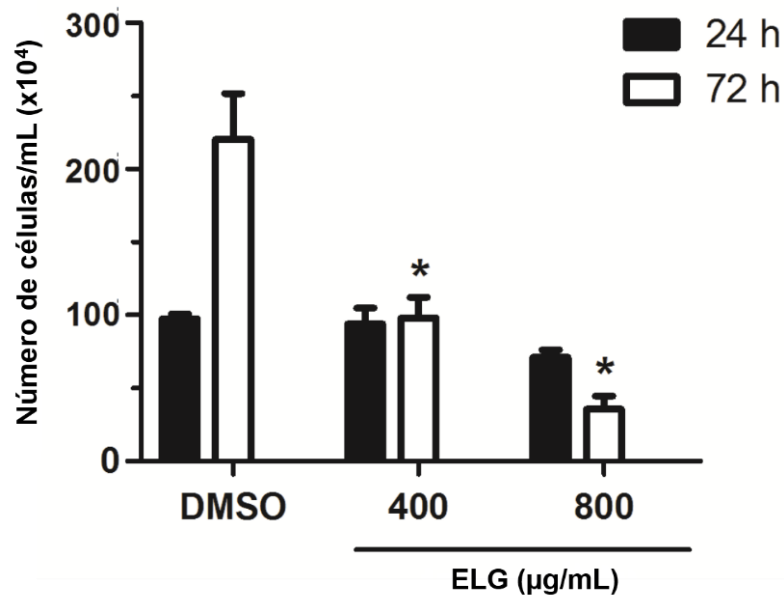


Figura 7 - Efeito do ELG sobre a proliferação celular em MCF-7 com exposição após 24 e 72 horas. Os valores são representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs grupo controle DMSO.

Inúmeras pesquisas investigando os efeitos do licopeno em células cancerosas, particularmente em células MCF-7, foram publicadas nos últimos anos. Coletivamente, os achados incluem: redução da viabilidade das células MCF-7; inibição da proliferação celular e parada do ciclo celular; modulação das proteínas do ciclo celular; aumento de BRCA1 e BRCA2 (genes oncosupressores no câncer de mama); alterações do perfil de expressão gênica de várias outras vias moleculares, como apoptose (p53 e Bax), comunicação celular, MAPK e ciclo celular, bem como metabolismo xenobiótico e biossíntese de ácidos graxos (CHALABI et al., 2004; CHALABI et al., 2006; CHALABI et al., 2007; KING-BATOON, LESZCZYNSKA e KLEIN, 2008; LEVY et al., 1995; PENG et al., 2017; REDDY, ALEXANDER-LINDO e NAIR, 2005; TAKESHIMA et al., 2014; UPPALA et al., 2013).

2.3.5. O ELG aumentou a fragmentação do DNA e deteve o ciclo celular em MCF-7

Foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) na fragmentação do DNA de células MCF-7 tratadas com ELG a 400 e 800 µg/mL após 24 e 72 horas de exposição (Figura 8).

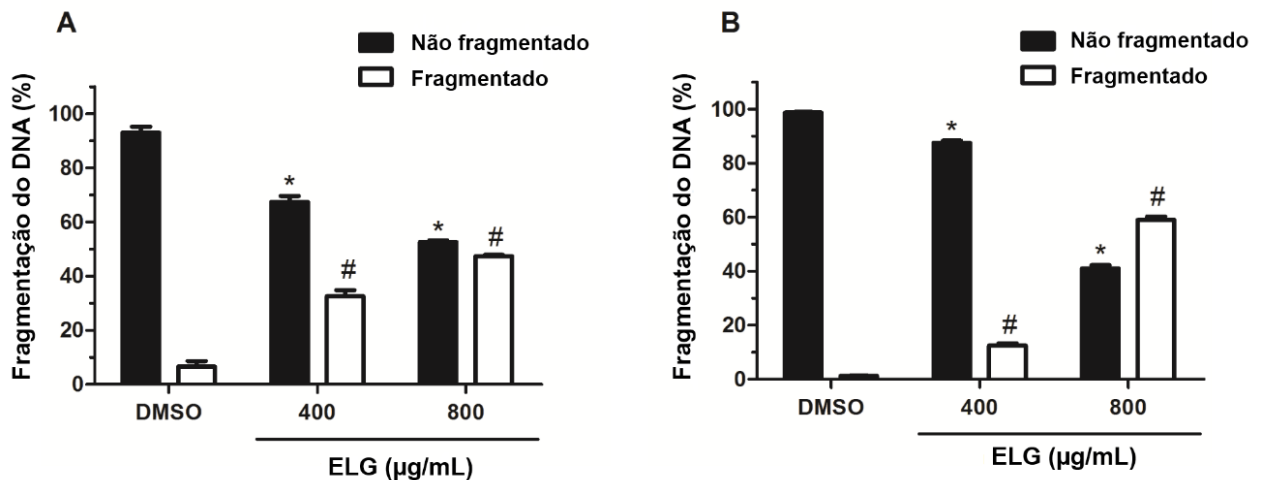


Figura 8 - Efeito do ELG sobre a fragmentação do DNA de células MCF-7 com exposição após 24 horas (A) e 72 horas (B). As células foram incubadas com iodeto de propídeo durante 30 minutos à temperatura ambiente e a fragmentação do DNA foi analisada por citometria de fluxo (10.000 eventos/amostra). Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs grupo de controle DMSO não Fragmentado; # $p < 0,05$ vs grupo de controle DMSO fragmentado.

A fragmentação do DNA exibida em células de adenocarcinoma de mama humano tratadas com ELG é uma característica importante de morte celular através de apoptose.

Em relação ao ciclo celular, o ELG afetou significativamente as fases do ciclo celular de MCF-7 em ambas as doses testadas e nos dois tempos avaliados (Figura 9). Após a exposição por 24 e 72 horas, observou-se a parada do ciclo celular na fase G1 a 400 e 800 $\mu\text{g/mL}$ (Figuras 9 A e 9B). Além disso, após a exposição por 72 horas, o ELG na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ afetou significativamente as fases G2/M, enquanto o ELG na concentração de 800 $\mu\text{g/mL}$ afetou a fase S (Figura 9B).

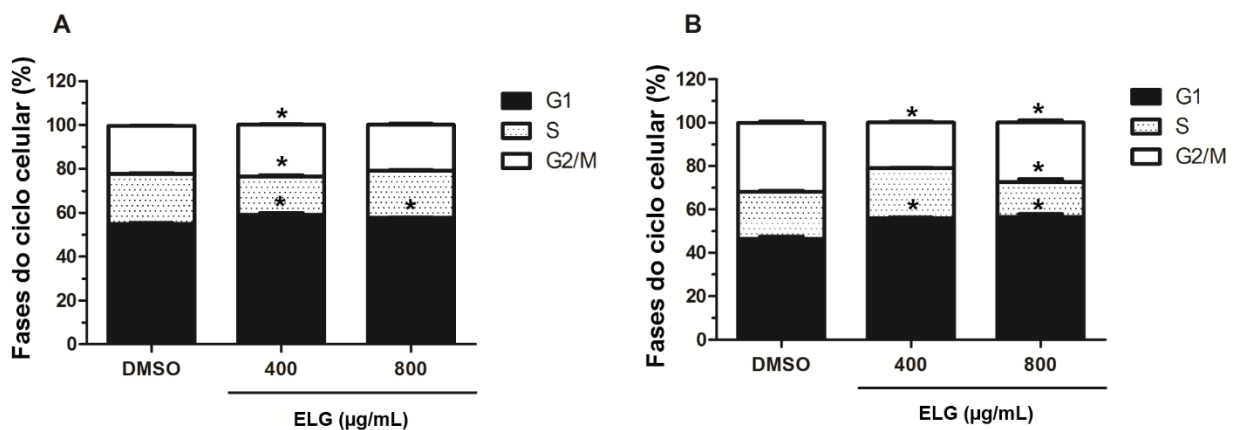


Figura 9 - Efeito do ELG no ciclo celular de MCF-7 com exposição após 24 (A) e 72 (B) horas. As células foram incubadas com iodeto de propídeo durante 30 minutos à temperatura ambiente e o ciclo celular foi analisado por citometria de fluxo (10.000 eventos/amostra). Os valores são representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs grupo controle DMSO.

A detenção do ciclo celular na fase G1, em conjunto com a redução da proliferação de células tratadas com ELG, indica efeitos citostáticos na linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano. Durante a fase G1 do ciclo celular, a célula pode continuar o ciclo e dividir ou permanecer em um estado de não divisão, e a transição da fase G1 para a fase S é crucial para o controle da proliferação celular eucariótica, de modo que sua desregulação promove a oncogênese (BERTOLI, SKOTHEIM e BRUIN, 2013). Assim, a parada do ciclo celular na fase G1 induzida pelo ELG em células MCF-7 sugere a capacidade de prevenir a divisão e proliferação de células cancerosas.

2.3.6. O ELG induziu alterações no potencial da membrana mitocondrial nas células MCF-7

A exposição das células MCF-7 ao ELG após 24 e 72 horas induziu modificações significativas ($p < 0,05$) no potencial da membrana mitocondrial. Os dados de citometria de fluxo mostraram um declínio na população de células apresentando marcação positiva de Rodamina 123, com tratamento a 400 e 800 $\mu\text{g/mL}$ em ambos os tempos avaliados, demonstrando a despolarização da membrana mitocondrial (Figuras 10A e 10B). A população de células com potencial de membrana alterada foi de cerca de 62% e 63% quando tratados com 400 $\mu\text{g/mL}$ do ELG por 24 horas e 800 $\mu\text{g/mL}$ do ELG por 72 horas, respectivamente (Figura 10C).

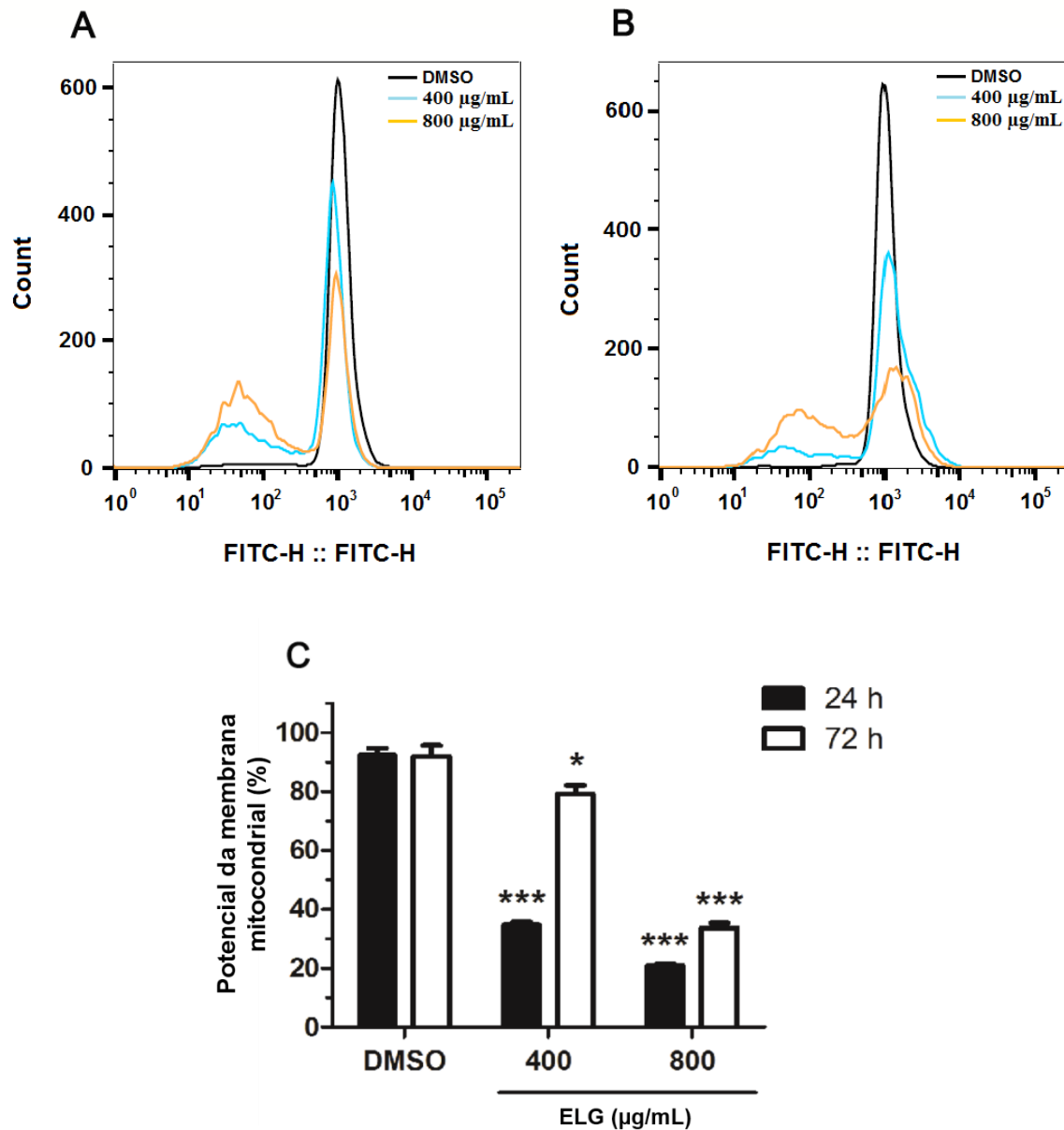


Figura 10 - Efeito do ELG sobre o potencial da membrana mitocondrial em células de MCF-7, com exposição após 24 (A) e 72 (B) horas, avaliada por citometria de fluxo. (C) Mostra um gráfico representativo da porcentagem de células com potencial de membrana alterado. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs grupo controle DMSO; *** $p < 0,0001$ vs grupo controle DMSO.

O ELG não causou danos significativos à membrana plasmática das células MCF-7, mas induziu modificações significativas no potencial da membrana mitocondrial das células MCF-7. O potencial de membrana mitocondrial é importante para a formação de ATP, para a sobrevivência celular e está associado a apoptose (JOANITTI, AZEVEDO e FREITAS, 2010).

2.3.7. Alterações morfológicas induzidas pelo ELG em células MCF-7

A análise por citometria de fluxo dos parâmetros morfológicos das células MCF-7 mostrou que o ELG causou redução significativa ($p < 0,05$) no tamanho celular em comparação com o grupo controle DMSO, com exposição após 24 e 72 horas, indicativo de morte celular por apoptose (Figura 11A). Por outro lado, as modificações na granularidade celular foram menos expressivas, mostrando um ligeiro aumento com exposição após 24 e 72 horas (Figura 11B).

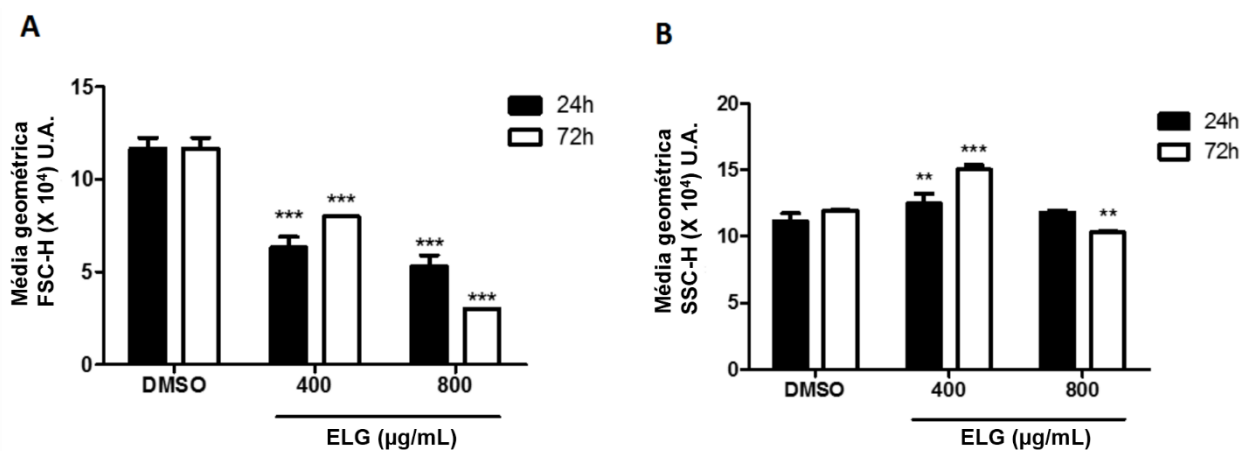


Figura 11 - Efeito do ELG sobre FSC-H = tamanho (A) e SSC-H = granularidade (B) de células MCF-7 com exposição após 24 e 72 horas nas concentrações de 400 µg/mL e 800 µg/mL. As células foram analisadas por citometria de fluxo (10.000 eventos/amostra). ** $p < 0,001$ vs grupo controle DMSO; *** $p < 0,0001$ vs grupo controle DMSO.

Em comparação com o grupo controle, as células tratadas com LEG durante 24 e 72 horas a 400 e 800 µg/mL apresentaram alterações morfológicas sugestivas de encolhimento celular (Figura 12).

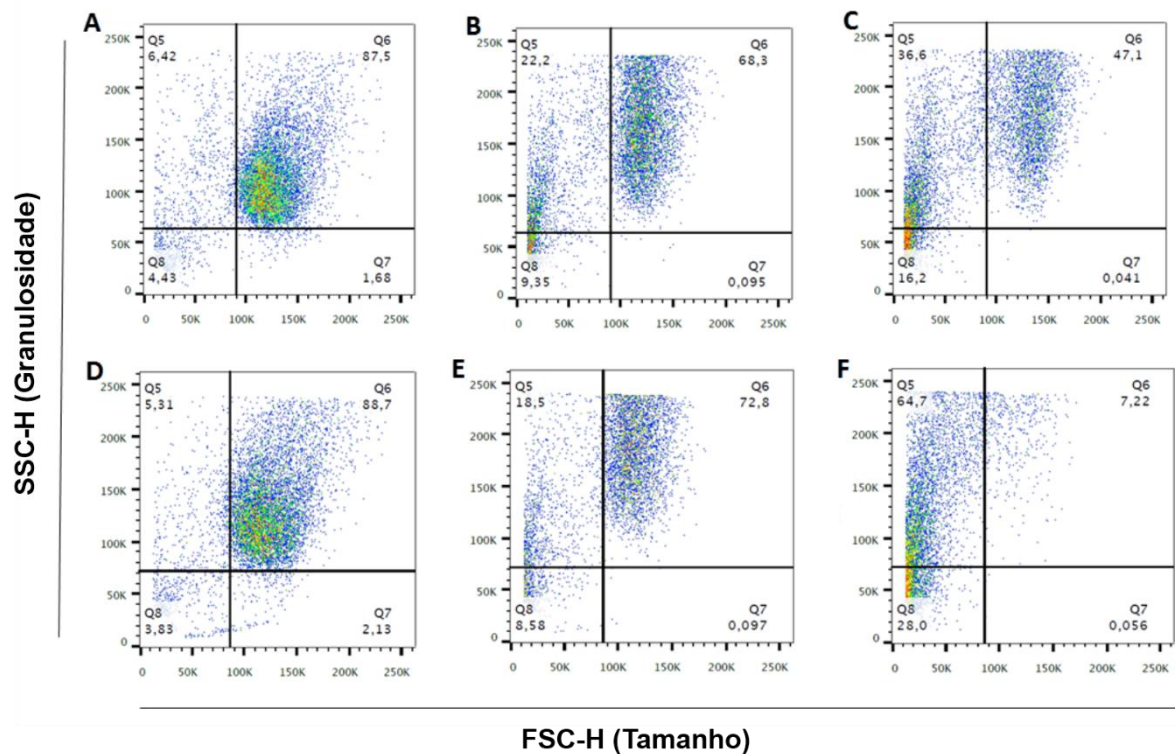


Figura 12 - Células MCF-7 analisadas por citometria de fluxo (10.000 eventos/amostra) demonstrando o efeito do ELG em parâmetros morfológicos com exposição pós 24 horas (A, B, C) e 72 horas (D, E, F) nas concentrações de 400 µg/mL (B, E) e 800 µg/mL (C, F) em relação ao controle DMSO (A, D). FSC-H = tamanho; SSC-H = granulosidade.

Onde, o deslocamento das células (representado por pontos coloridos – Figura 12) para direita está relacionado ao aumento do tamanho celular e para a esquerda, a diminuição do tamanho celular, em comparação com controle. A diferença na granulosidade pode ser observada pelo deslocamento das células (representado por pontos coloridos – Figura 12) para cima, onde mostra o aumento da granulosidade e para baixo, diminuição da granulosidade na superfície celular, em comparação com o controle. A concentração das células pode ser notada de acordo com o degrade das cores: vermelho > amarelo > verde > azul, onde o vermelho representa um grande concentrado de células e o azul, uma menor concentração de células.

Mudanças morfológicas na granulosidade e tamanho das células MCF-7 tratadas com ELG indicaram um padrão de encolhimento celular, adicionando mais evidências para entender melhor o mecanismo de ação do ELG nesta linhagem celular.

2.3.8 O ELG não induziu necrose ou apoptose tradicional em células MCF-7

O efeito do ELG no mecanismo de morte celular com marcação por Anexina-V FITC/PI nas células MCF-7 foi analisado por citometria de fluxo demonstrado nas figuras 13 e 15. Tanto

em 13A – 13 D como em 15 A -15 F os dados são mostrados em quadrantes em cada uma das figuras. As células com morte celular por necrose possuem afinidade pelo PI e são representadas graficamente no quadrante Q1. No quadrante Q2, aparecem as células em apoptose tardia e/ou morte celular por necrose, com a dupla marcação Anexina-V/PI. A fosfatidilserina nas células em apoptose inicial se ligam a Anexina-V e são representadas no quadrante Q3, e finalmente no quadrante Q4 encontram-se as células viáveis, que não apresentam nenhuma marcação.

Após 24 e 72 horas de exposição a 400 e 800 µg/mL do ELG, a análise de citometria de fluxo das células MCF-7 não demonstrou um aumento significativo da intensidade de Anexina-V FITC, marcador de morte celular por apoptose (Figuras 13-16). Por outro lado, um aumento da intensidade da fluorescência de PI ($p < 0,0001$) em ambas as concentrações avaliadas do ELG foi observado quando comparado com o grupo controle DMSO. O PI só é capaz de penetrar em células que apresentam membrana lesionada, característica de células em processo de morte celular por necrose. Análises adicionais de citometria de fluxo mostraram que esse aumento é devido a uma propriedade de autofluorescência do ELG (Figuras 15C e 15F) e, por tanto, não está associado à ruptura da membrana plasmática.

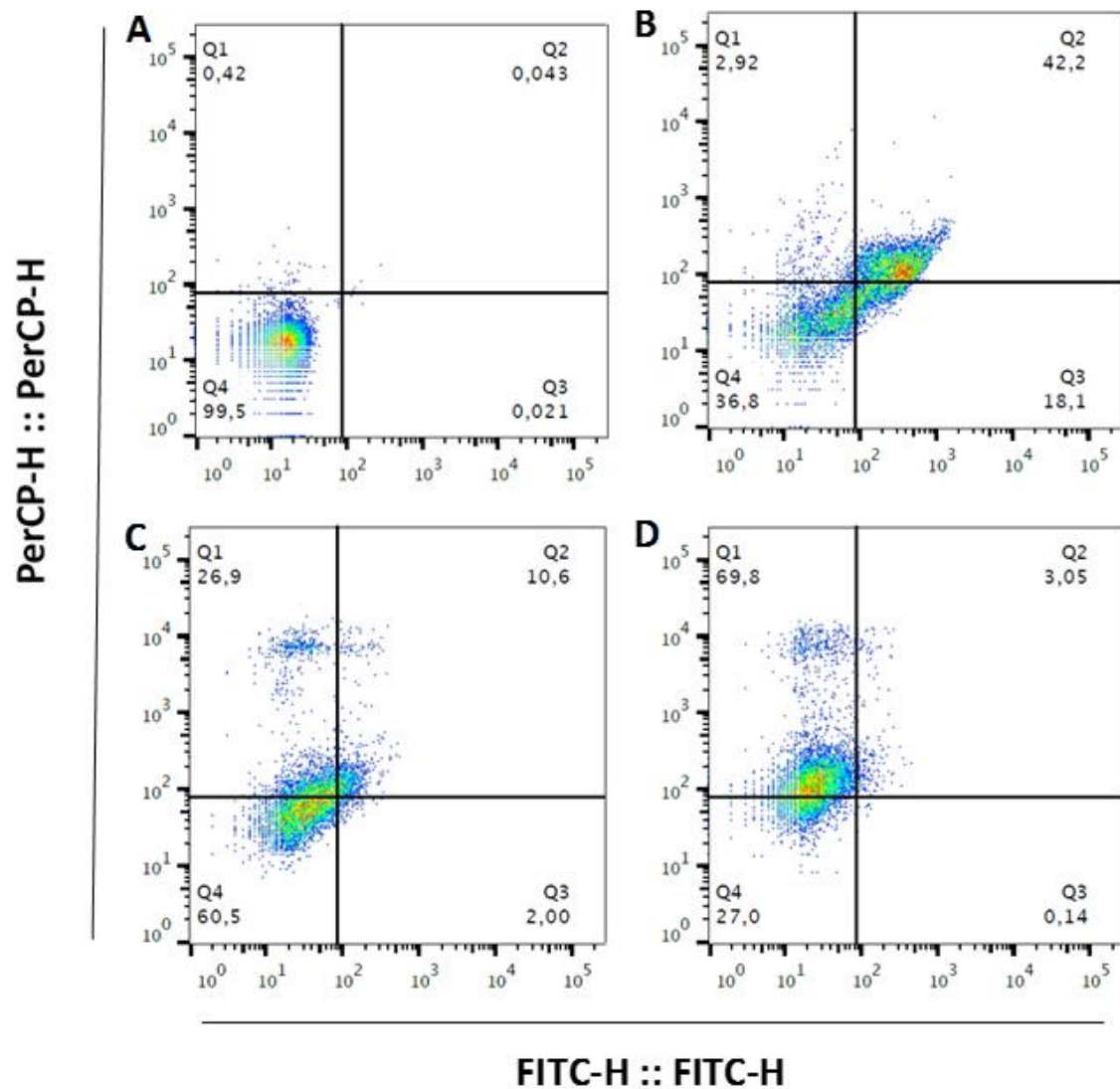


Figura 13 - Células MCF-7 analisadas por citometria de fluxo (10.000 eventos/amostra) avaliando o efeito do ELG no mecanismo de morte celular com marcação por Anexina-V FITC/PI após exposição de 24 horas, controles DMSO (A), H_2O_2 (B), concentrações de 400 $\mu\text{g/mL}$ (C) e 800 $\mu\text{g/mL}$ (D). Quadrante Q1: células marcadas apenas com PI (necrose); quadrante Q2: células marcadas com Anexina-V/PI (apoptose tardia e/ou necrose); quadrante Q3: células marcadas apenas com Anexina-V (apoptose inicial) e quadrante Q4: células não marcadas (células viáveis).

A figura 14 mostra os dados obtidos por citometria de fluxo no tempo de 24 horas de uma outra forma (gráfico em barras) para uma melhor compreensão dos resultados nas concentrações de 400 e 800 $\mu\text{g/mL}$ do ELG. Onde o gráfico A está representado o percentual das células que possui afinidade e foram marcadas pelo PI, no gráfico B mostra o percentual das células marcadas tanto por Anexina-V como pelo PI, no gráfico C mostra o percentual das células viáveis e no gráfico D mostra o percentual das células que possuem afinidade e foram marcadas por Anexina-V.

No gráfico C onde mostra o percentual das células viáveis, podemos observar que as células MCF-7 tratadas com ELG na concentração de 400µg/mL possui 60,5% das células viáveis, mostrando que houve a morte de 39,5% das células MCF-7. Desses 39,5% das células mortas, 26,9% das células foram marcadas com PI como mostrado no gráfico A, 10,6% apresentaram a marcação com Anexina-V e PI como mostrado no gráfico B e 2% das células foram marcadas com Anexina-V como mostrado no gráfico D.

No gráfico C também está representado o percentual das células viáveis de MCF-7 quando tratadas com ELG na concentração 800µg/mL, onde pode-se observar 27% de células viáveis, mostrando que houve a morte de 72,99% das células MCF-7. Desses 72,99% das células mortas, 69,8% das células foram marcadas com PI como mostrado no gráfico A, 3,05% apresentaram a marcação com Anexina-V e PI como mostrado no gráfico B e apenas 0,14% das células foram marcadas com Anexina-V como mostrado no gráfico D.

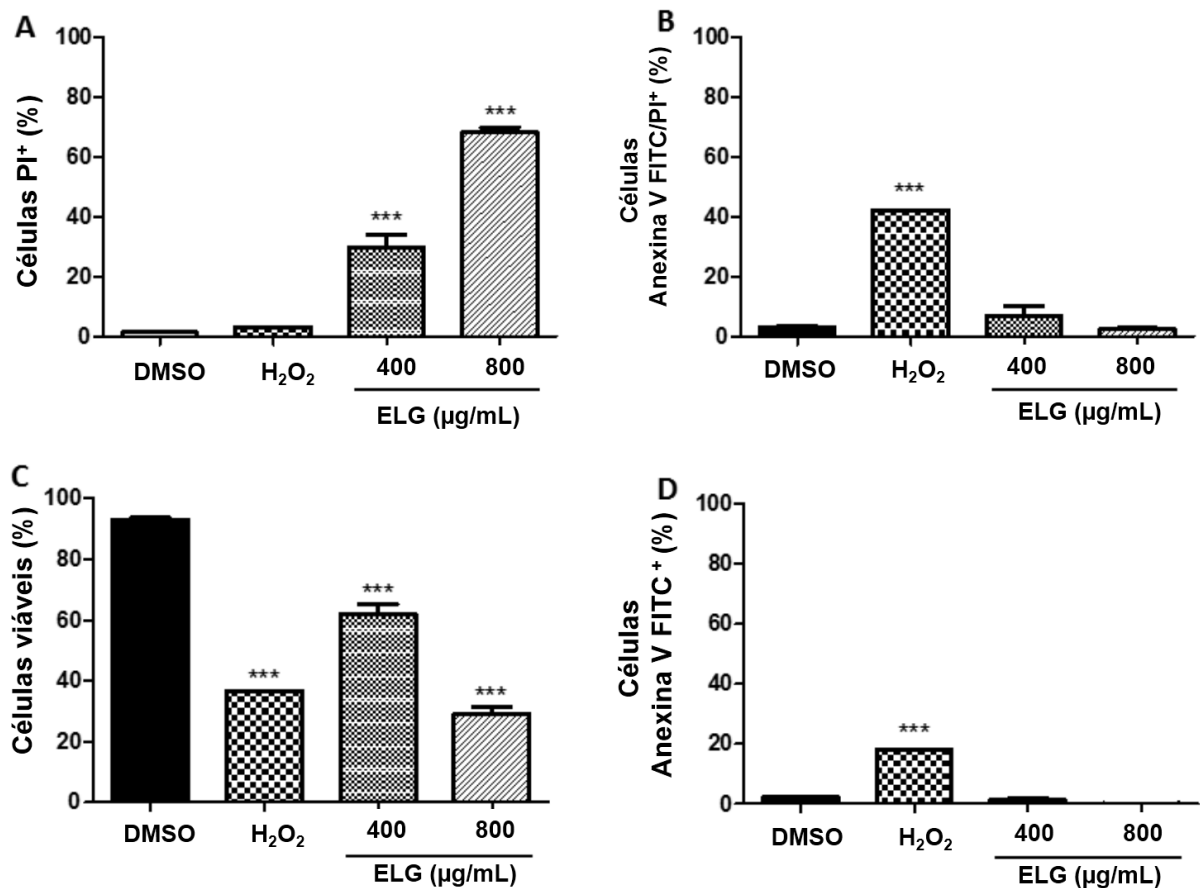


Figura 14 - Efeito do ELG sobre o mecanismo de morte celular de células MCF-7 com exposição após 24 horas às concentrações de 400 µg/mL e 800 µg/mL. Células marcadas com PI (A), Anexina-V FITC/PI (B), células viáveis (C) e Anexina-V FITC (D). As células foram analisadas por citometria de fluxo (10.000 eventos/amostra). ** $p < 0,001$ vs grupo controle DMSO; *** $p < 0,0001$ vs grupo controle DMSO.

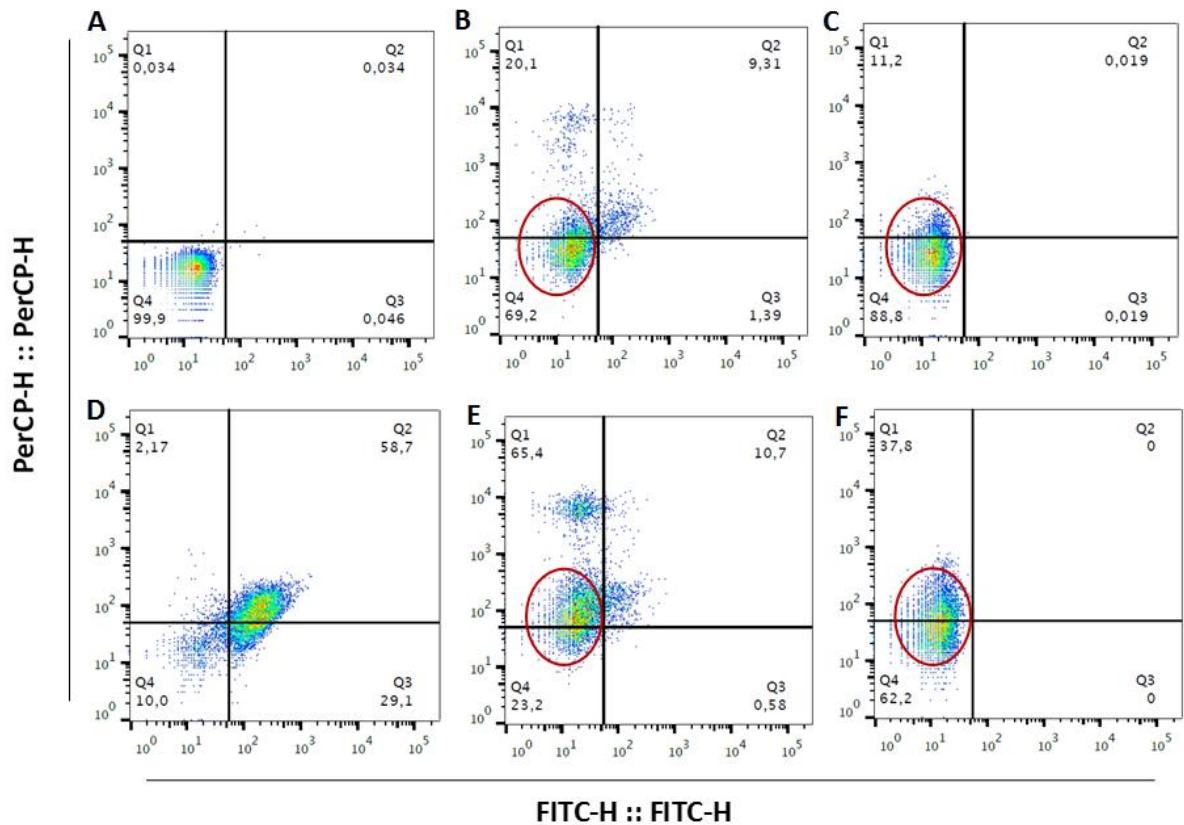


Figura 15 - As células MCF-7 analisadas por citometria de fluxo (10.000 eventos/amostra) avaliando o efeito do ELG no mecanismo de morte celular (marcação de Anexina-V FITC/PI) após exposição por 72 horas nas concentrações de 400 µg/mL (B) e 800 µg/mL (E) em relação ao controle DMSO (A) e controle H₂O₂ (D). Células MCF-7 expostas ao ELG sem marcação de Anexina-V FITC/PI a 400 µg/mL (C) e 800 µg/mL (F). Quadrante Q1: células marcadas apenas com PI (necrose); quadrante Q2: células marcadas com Anexina-V/PI (apoptose tardia e/ou necrose); quadrante Q3: células marcadas apenas com Anexina-V (apoptose inicial) e quadrante Q4: células não marcadas (células viáveis).

A figura 16 mostra os dados obtidos por citometria de fluxo no tempo de 72 horas de uma outra forma (gráfico em barras) para uma melhor compreensão dos resultados nas concentrações de 400 e 800µg/mL do ELG. Onde o gráfico A está representado o percentual das células que possui afinidade e foram marcadas pelo PI, no gráfico B mostra o percentual das células marcadas tanto por Anexina-V como pelo PI, no gráfico C mostra o percentual das células viáveis e no gráfico D mostra o percentual das células que possuem afinidade e foram marcadas por Anexina-V. Nesse experimento foram analisadas as células tratadas com ELG nas concentrações de 400 e 800µg/mL e marcadas com Anexina-V e PI, e também as células tratadas com ELG nas concentrações de 400 e 800 µg/mL sem a adição de nenhum marcador, para observar se o ELG apresentava alguma fluorescência no mesmo canal dos marcadores utilizados neste trabalho (Anexina-V e PI).

No gráfico C onde mostra o percentual das células viáveis de MCF-7, podemos observar que as células MCF-7 tratadas com ELG e com a adição dos dois marcadores na concentração 400µg/mL apresentaram 69,2% das células viáveis, mostrando que houve a morte de 30,8% das células MCF-7. Desses 69,2% das células mortas, 20,1% das células foram marcadas com PI como mostrado no gráfico A, 9,31% apresentaram a marcação com Anexina-V e PI como mostrado no gráfico B e 1,39% das células foram marcadas com Anexina-V como mostrado no gráfico D.

No gráfico C também está representado o percentual das células viáveis de MCF-7 quando tratadas com ELG na concentração 800µg/mL, onde pode-se observar 23% de células viáveis, mostrando que houve a morte de 77% das células MCF-7. Desses 77% das células mortas, 65,4% das células foram marcadas com PI como mostrado no gráfico A, 10,7% apresentaram a marcação com Anexina-V e PI como mostrado no gráfico B e apenas 0,58% das células foram marcadas com Anexina-V como mostrado no gráfico D.

Na figura 16 pode ser observado os dados das células MCF-7 tratadas com o ELG e sem a adição dos marcadores Anexina-V e PI. Nas duas concentrações testadas (400 e 800 µg/mL) do ELG foi observado que o extrato apresentava fluorescência no mesmo canal do PI, onde as células MCF-7 tratadas com ELG na concentração de 400µg/mL apresentaram percentual de 88,8% de células viáveis como mostrado no gráfico C, resultando na morte e/ou fluorescência de 11,2% das células MCF-7 como mostrado no gráfico A.

As células MCF-7 avaliadas com o ELG na concentração de 800µg/mL e sem a adição de nenhum marcador mostraram o percentual de 62,2% de células viáveis, apresentando morte e/ou fluorescência de 37,8% das células MCF-7 no mesmo canal do PI como mostrado no gráfico A.

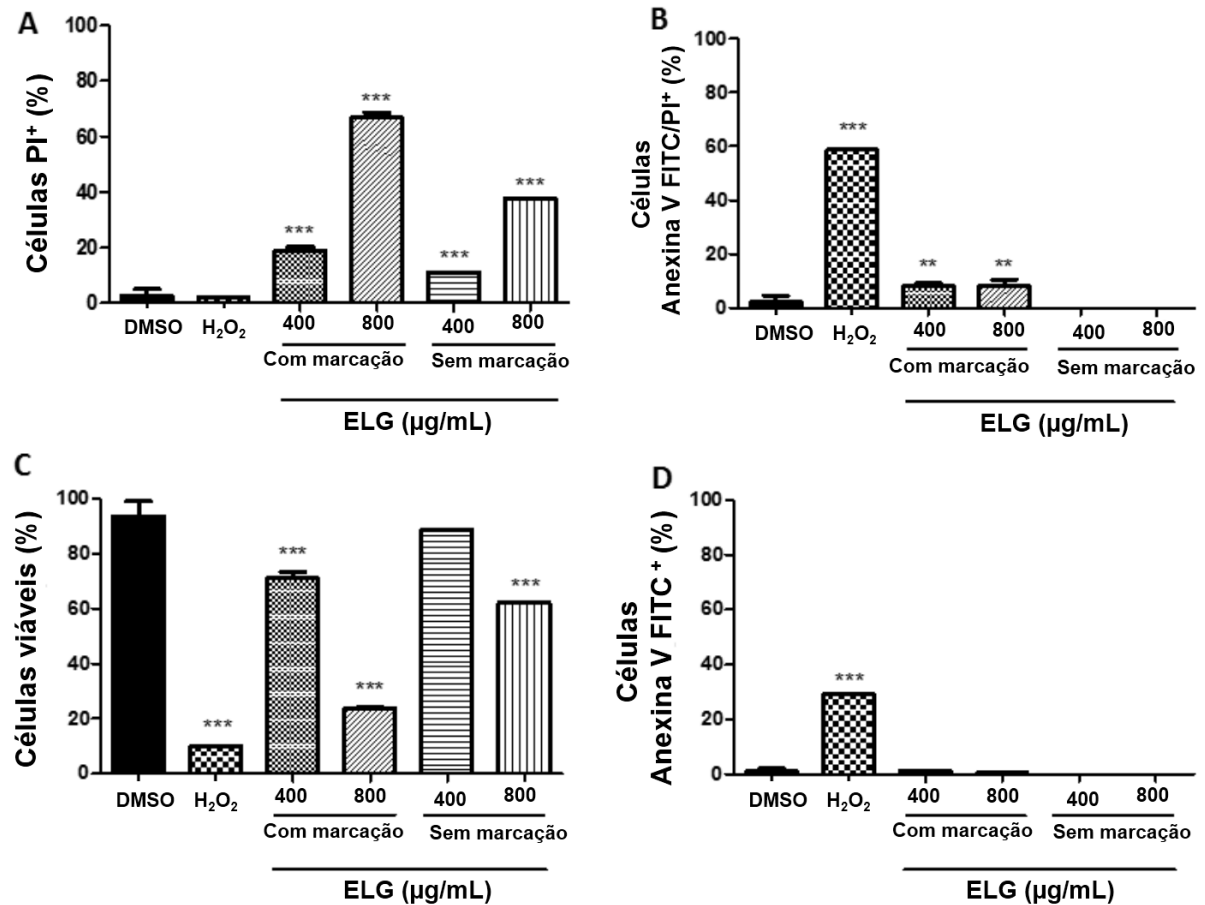


Figura 16 - Efeito do ELG sobre o mecanismo de morte celular de células MCF-7 com exposição por 72 horas às concentrações de 400 µg/mL e 800 µg/mL. Células marcadas com PI (A), Anexina-V FITC/PI (B), células viáveis (C) e Anexina-V FITC (D). As células foram analisadas por citometria de fluxo (10.000 eventos/amostra). ** $p < 0,001$ vs grupo controle DMSO; *** $p < 0,0001$ vs grupo controle DMSO.

A exposição da fosfatidilserina fora da membrana interna é outra via de sinalização reguladora de apoptose (JAIN et al., 2013). A anexina-V, uma proteína de alta afinidade para a fosfatidilserina, é usada para detectar a fase inicial de apoptose. No entanto, apenas 10% das células MCF-7 expostas ao ELG demonstraram coloração de Anexina-V após 72 horas. Este resultado sugere que o mecanismo de morte celular não foi associado à exposição de fosfatidilserina que ocorre na via de apoptose tradicional. Além disso, a investigação de evidências de detecção de necrose por citometria de fluxo não foi conclusiva, uma vez que o ELG demonstrou uma fluorescência vermelha no mesmo comprimento de onda do que o PI, marcador usado para detectar danos da membrana plasmática, podendo se ligar ao ácido nucleico. No entanto, nenhum dano na membrana plasmática foi detectado por ensaio de azul de tripan. Esses resultados sugerem que a via da necrose não pode estar envolvida na morte das

células MCF-7, mas o ELG exibe atividade anticancerígena envolvendo parcialmente a morte celular por via tipo apoptótica.

2.3.9. O ELG não mostrou atividade hemolítica

A redução da viabilidade dos eritrócitos incubados com ELG à concentração de 800 µg/mL foi de apenas 5% (Figura 17). Portanto, a concentração hemolítica média (CH_{50}) não foi determinada, o que indica ausência de citotoxicidade para as membranas plasmáticas no modelo utilizado.

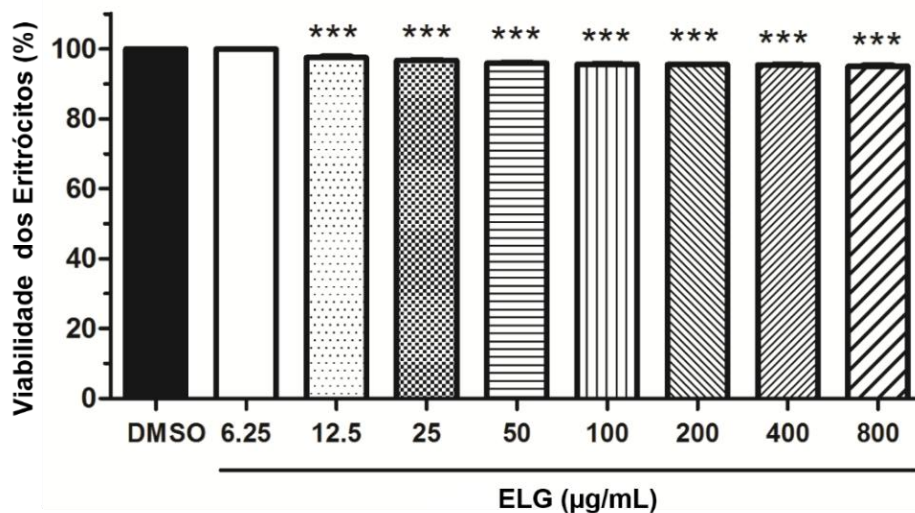


Figura 17 - Citotoxicidade do ELG sobre eritrócitos de sangue de carneiro. Os valores são expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,0001$ vs grupo de controle DMSO.

De acordo com Chisté et al. (2014), que avaliaram o potencial dos carotenoides para inibir a hemólise de eritrócitos humanos mediados pela toxicidade de radicais peróxil, o licopeno foi o mais eficiente para prevenir a hemólise ($IC_{50} = 0.24 \pm 0.05$ µM). Esses resultados demonstram que o ELG pode ser não tóxico para células saudáveis.

Os resultados obtidos ganham mais importância em face da baixa citotoxicidade do ELG em células normais de fibroblastos de camundongos NIH-3T3 e macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, demonstrados pelo ensaio MTT. A baixa citotoxicidade do ELG também foi confirmada pela avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro neste estudo.

2.4. Conclusões

Os resultados obtidos nas condições experimentais aplicadas indicam que o extrato rico em licopeno da goiaba vermelha contém 20% de licopeno principalmente na forma do isômero todo-*trans*-licopeno. O ELG foi capaz de diminuir a viabilidade celular em células de adenocarcinoma de mama humano sem afetar significativamente as células normais de fibroblastos NIH-3T3, macrófagos BALB/c e eritrócitos. É possível inferir que o mecanismo de ação parcial envolve a fragmentação do DNA, a parada do ciclo celular, a despolarização da membrana mitocondrial e as alterações nas características morfológicas, induzindo efeitos citostáticos e citotóxicos sugerindo morte celular tipo apoptótica. Nossos resultados sugerem as possíveis aplicações do licopeno da goiaba vermelha no desenvolvimento de produtos anticancerígenos economicamente viáveis e sustentáveis.

Agradecimentos

Os autores agradecem o tempo computacional fornecido pelo CENAPAD/SP no projeto proj697. Alexandra Plácido agradece a FCT por sua concessão SFRH/BD/97995/2013, financiada pela POPH-QREN-Tipologia 4.1-Formação Avançada, subsidiada pelo Fundo Social Europeu e pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior. O trabalho na REQUIMTE/LAQV recebeu apoio financeiro da União Europeia (fundos FEDER através do COMPETE) e Fundos Nacionais (FCT) através do projeto UID/ QUI/50006/2013. Adriany das G. N. Amorim agradece a CAPES pelo processo de bolsa de doutorado n ° 555 99999.004236/2014-09 na Universidade Federal do Piauí (UFPI). Eder A. Barbosa agradece a PNPd/CAPES pela sua bolsa de pós-doutorado.

Considerações Finais e Perspectivas

Considerações Finais e Perspectivas

- Neste trabalho foi obtido um extrato rico em licopeno extraído da goiaba vermelha;
- Os ensaios biológicos mostraram resultados satisfatórios, mostrando citotoxicidade em células de câncer de mama e pouca citotoxicidade em células normais;
- O extrato rico em licopeno extraído da goiaba vermelha tem potencial para o uso preventivo contra o câncer de mama;
- Outros ensaios como verificação da atividade das caspases e EROs serão realizados com o intuito de esclarecer o mecanismo de ação do extrato rico em licopeno em células de câncer de mama;
- Estudos futuros com outras linhagens cancerosas serão realizados utilizando o extrato rico em licopeno obtido;
- Um produto nanoestruturado e padronizado será formulado a partir do extrato rico em licopeno economicamente viável e de produção sustentável;
- Futuras aplicações biotecnológicas *in vitro* e *in vivo* utilizando o nanoestruturado.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

AGARWAL, S.; RAO, A. V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **Canadian Medical Association Journal**, v. 19, n. 163, p. 739-744, 2000.

AGHEL, N.; RAMEZANI, Z.; AMIRFAKHRIAN, S. Isolation and quantification of lycopene from tomato cultivated in Dezfool, Iran. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 6, p. 9-15, 2011.

AGUIAR, J. S. **Estudos das atividades antimicrobiana e anticâncer de *Erythroxyllum caatingae* Plowman e *Erythroxyllum subrotundum* A. St - Hil.** Recife – PE, 2011, p. 115. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

ALAMAR, P. D.; CARAMÊS, E. T. S.; POPPI, R. J.; PALLONE, J. A. L. Quality evaluation of frozen guava and yellow passion fruit pulps by NIR spectroscopy and chemometrics. **Food Research International**, v. 85, p. 209 - 214, 2016.

ALBUQUERQUE, I. O. **Citotoxicidade *in vitro* da terapia fotodinâmica com alumínio-cloro-ftalocianina lipossomal em melanoma murino (B16F10).** Brasília – DF, 2008, p. 66. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Distrito Federal.

ALECU, I.; ZHENG, J.; ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. Computational thermochemistry: scale factor databases and scale factors for vibrational frequencies obtained from electronic model chemistries. **Journal of Chemical theory and Computation**, v. 6, n. 9, p. 2872-2887, 2010.

ALLEN, C. M.; SMITH, A. M.; CLINTON, S. K.; SCHWARTZ, S. J. Tomato consumption increases lycopene isomer concentrations in breast milk and plasma of lactating women. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 102, p. 1257-1262, 2002.

AMGALAN, D.; PEKSON, R.; KITSIS, R. N. Troponin release following brief myocardial ischemia: Apoptosis versus Necrosis. **JACC: Basic to Translational Science**, v. 2, n. 2, p. 118-121, 2017.

AMORIM, A. G. N.; ROPKE, C. D.; LEITE, J. R. S. A. Brazil Patent N° BR102016030594-2. **Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI)**, 2016.

AMORIM, A. G. N.; SOUZA, J. M. T.; SANTOS, R. C.; GULLÓN, B.; OLIVEIRA, A.; SANTOS, L. F. A. VIRGINO, A. L. E.; MAFUD, A. C.; PETRILLI, H. M.; MASCARENHAS, Y. P.; DELERUE-MATOS, C.; PINTADO, M. E.; LEITE, J. R. S. A. HPLC-DAD, ESI - MS/MS and NMR of lycopene isolated from *P. guajava* L. and its biotechnological applications. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2017.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ANDREOTTI, P. F. **Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células epiteliais. Caracterização de prováveis fatores de virulência.** Araraquara-SP, 2006, p. 145. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

ANISUZZAMAN, S. M.; JOSEPH, C. G.; KRISHNAIAH, D.; BONO, A.; SUALI, E.; ABANG, S.; FAI, L. M. Removal of chlorinated phenol from aqueous media by guava seed (*Psidium guajava*) tailored activated carbon. **Water Resources and Industry**, v. 16, p. 29-36, 2016.

ARATHI, B. P.; SOWMYA, P. R. R.; VIJAY, K., DILSHAD, P.; SAIKAT, B.; GOPAL, V.; LAKSHMINARAYANA, R. An improved method of UPLC-PDA-MS/MS analysis of lycopene isomers. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 8, p.1962-1969, 2015.

BANDEIRA, A. C. B.; SILVA, R. C.; ROSSONI, J. V.; FIGUEIREDO, V. P.; TALVANI, A.; CANGUSSÚ, S. D.; COSTA, D. C. Lycopene pretreatment improves hepatotoxicity induced by acetaminophen in C57BL/6 mice. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, n. 3, p. 1057-1065, 2017.

BARANSKA, M.; SCHÜTZE, W.; SCHULZ, H. Determination of lycopene and β -carotene content in tomato fruits and related products: comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 24, p. 8456-8461, 2006.

BASHO, S. M.; BIN, M. C. Propriedades dos alimentos funcionais e seu papel na prevenção e controle da hipertensão e diabetes. **Interbio**, v.4, n.1, 2010.

BATISTA, L. F. Z. **Mecanismos de indução de apoptose pela presença de danos ao DNA: Um estudo sobre o papel de p53 na resistência de células de glioma a agentes quimioterápicos.** São Paulo – SP, 2008, p. 159. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p. 43 – 50, 2010.

BEGUM, S.; HASSAN, S. I.; SIDDIQUI, B. S.; SHAHEEN, F.; GHAYUR, M. N.; ANWAR H. GILANI, A. H. Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 399 - 403, 2002.

BENTO, R.; FREIRE, P.; TEIXEIRA, A.; SILVA, J.; LIMA JR, J.; OLIVEIRA, M.; PONTES, F. Vibrational spectra of pilocarpine hydrochloride crystals. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, n. 1, p. 62-68, 2009.

BERTOLI, C.; SKOTHEIM, J. M.; BRUIN, R. A. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 8, p. 1 - 28, 2013.

BÖHM, V. Lycopene and heart health. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, n. 2, p. 296-303, 2012.

BÖHM, V.; FRÖHLICH, K.; BITSCH, R. Rosehip - a “new” source of lycopene? **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, p. 385-389, 2003.

- BOEING, H.; BECHTHOLD, A.; BUB, A.; ELLINGER, S.; HALLER, D.; KROKE, A.; LESCHIK-BONNET, E.; MULLER, M. J.; OBERRITTER, H.; SCHULZE, M.; STEHLE, P.; WATZL, B. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **European Journal of Nutrition**, v. 51, p. 637–663, 2012.
- BRAMLEY, P. M. Is lycopene beneficial to human health. **Phytochemistry**, v. 54, n. 3, p. 233-236, 2000.
- BRAMLEY, P. M. Is lycopene beneficial to human health? **Phytochemistry**, v. 54, p. 233-236, 2000.
- BRASIL. Ministério da Integração Nacional. Portal Brasil. Infraestrutura. Cultivo. No Piauí. ‘Tabuleiros Litorâneos’ se destaca na produção de orgânicos. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/infraestrutura/2014/01/2018tabuleiros-litoraneos2019-se-destaca-na-producao-de-organicos>>. Acessado em junho de 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância à Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011.
- CAETANO, A. C. S.; MELO, E. A.; LIMA, V. L. A. G.; MACIEL, M. I. S.; ARAÚJO, C. R. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 2, p. 155-160, 2009.
- CAMPAGNARO, B.P. **Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre células sanguíneas, endoteliais e da medula óssea de camundongos**. Vitória – ES, 2012, p. 159. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo - Espírito Santo.
- CAMPOS, F. M.; MARTINO; H. S. D.; SABARENSE, C. M.; PINHEIRO-SANT’ANA, H. M. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: Uma revisão. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.4, p. 481-490, 2008.
- CARAMÊS, E. T. S.; ALAMAR, P. D.; POPPI, R. J.; PALLONE, J. A. L. Quality control of cashew apple and guava nectar by near infrared spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 56, p. 41 – 46, 2017.
- CARRILHO, C.; BUVÉ, C.; PANOZZO, A.; GRAUWET, T.; HENDRICKX, M. Role of structural barriers in the *in vitro* bioaccessibility of anthocyanins in comparison with carotenoids. **Food Chemistry**, v. 227, p. 271-279, 2017.
- CARVALHO, A. C.; MÁRQUEZ, C. A. P.; AZEVEDO, R. B.; JOANITTI, G. A.; JÚNIOR, O. R. P., FONTES, W.; CASTRO, M. S. Cytotoxic activity and antiproliferative effects of crude skin secretion from *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae) on *in vitro* melanoma cells. **Toxins**, v. 7, n.10, p. 3989-4005, 2015.
- CARVALHO, C. R. L. **Determinação de isômeros geométricos de alguns carotenoides provitamínicos A por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Campinas – SP, 1996, p. 142. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas – São Paulo.

- CARVALHO, P. S. L. **Avaliação de compostos derivados de plantas brasileiras na busca de protótipos a fármacos com atividade antileishmanial.** Belo Horizonte – MG, 2015, p. 126. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- CESCATO, V. A. S. **Expressão dos genes relacionados à apoptose, Bcl-2, bax, e caspase-3 nos adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes e seu potencial como marcador do comportamento tumoral.** São Paulo – SP, 2010, p. 95. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de São Paulo, São Paulo.
- CHACÓN-ORDÓNEZ, T.; SCHWEIGGERT, R. M.; BOSY-WESTPHAL, A.; JIMÉNEZ, V. M.; CARLE, R.; ESQUIVEL, P. Carotenoids and carotenoid esters of orange-and yellow-fleshed mamey sapote (*Pouteria sapoa* (Jacq.) H. E. Moore & Stearn) fruit and their post-prandial absorption in humans. **Food Chemistry**, v. 221, p. 673-682, 2017.
- CHALABI, L.; CORRE, L.; MAURIZIS, J. C.; BIGNON, Y. J.; BERNARD-GALLON, D. J. The effects of lycopene on the proliferation of human breast cells and BRCA1 and BRCA2 gene expression. **European Journal of Cancer**, v. 40, p.1768–1775, 2004.
- CHALABI, N.; DELORT, L.; LE CORRE, L.; SATHI, S.; BIGNON, Y. J.; BERNARD-GALLON, D. Gene signature of breast cancer cell lines treated with lycopene. **Pharmacogenomics**, v. 7, n. 5, p. 663-672, 2006.
- CHALABI, N.; LE CORRE, L.; MAURIZIS, J. C.; BIGNON, Y. J.; BERNARD-GALLON, D. J. The effects of lycopene on the proliferation of human breast cells and BRCA1 and BRCA2 gene expression. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 11, p. 1768-1775, 2004.
- CHALABI, N.; SATHI, S.; DELORT, L.; BIGNON, Y. J.; BERNARD-GALLON, D. J. Expression profiling by whole-genome microarray hybridization reveals differential gene expression in breast cancer cell lines after lycopene exposure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1769, n. 2, p. 124-130, 2007.
- CHAVES, A. T. **Avaliação do papel da apoptose nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.** Belo Horizonte – MG, 2009, p. 174. Tese (Doutorado em Clínica Médica e Biomedicina) – Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, Minas Gerais.
- CHAVES, N. L. **Estudo de morte celular em células MCF-7 tratadas com citrato de ródio associado a nanopartículas de maghemita.** Brasília – DF, 2013, p. 67. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Distrito Federal.
- CHENG, Y.; LU, P.; HUANG, C.; WU, J. Encapsulation of lycopene with lecithin and α -tocopherol by supercritical antisolvent process for stability enhancement. **The Journal of Supercritical Fluids**, p. 1-7, 2017.
- CHISTÉ, R. C.; FREITAS, M.; MERCADANTE, A. Z.; FERNANDES, E. Carotenoids are effective inhibitors of in vitro hemolysis of human erythrocytes, as determined by a practical and optimized cellular antioxidant assay. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 9, p. H1841-H1847, 2014.

CHOI, H.; LEE, D. G. Lycopene induces apoptosis in *Candida albicans* through reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction. **Biochimie**, v. 115, p. 108-115, 2015.

CLARETO, S. S. **Estudo da concentração de licopeno da polpa de goiaba utilizando o processo de microfiltração**. Campinas – SP, 2007, p. 173. Tese (Doutorado Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

COSTA, M. A. L.; ORTEGA-FLORES, C. I.; PENTEADO, M. D. V. C. Alterações estruturais in vivo dos isômeros *trans*, *9-cis* e *13-cis* do β -caroteno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 224-228, 2002.

CUNHA, V. R.; IZUMI, C. M.; PETERSEN, P. A.; MAGALHAES, A.; TEMPERINI, M. L.; PETRILLI, H. M.; CONSTANTINO, V. R. Mefenamic acid anti-inflammatory drug: probing its polymorphs by vibrational (IR and Raman) and solid-state NMR spectroscopies. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 16, p. 4333-4344, 2014.

CUNHA, V. R.; PETERSEN, P. A.; GONCALVES, M. B.; PETRILLI, H. M.; TAVIOT-GUEHO, C.; LEROUX, F.; CONSTANTINO, V. R. Structural, spectroscopic (NMR, IR, and Raman), and DFT investigation of the self-assembled nanostructure of pravastatin-LDH (layered double hydroxides) systems. **Chemistry of Materials**, v. 24, n. 8, p. 1415-1425, 2012.

DALLA NORA, C.; JABLONSKI, A.; RIOS, A. D. O.; HERTZ, P. F.; JONG, E. V.; FLÔRES, S. H. The characterisation and profile of the bioactive compounds in red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) and guabiju (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 8, p. 1842-1849, 2014.

DE NARDO, T.; SHIROMA-KIAN, C.; HALIM, Y.; FRANCIS, D.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. Rapid and simultaneous determination of lycopene and β -carotene contents in tomato juice by infrared spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1105-1112, 2009.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains – características, biosynthesis, processing and stability. **Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2010.

DESANTIS, C. E.; LIN, C. C.; MARIOTTO, A. B.; SIEGEL, R. L.; STEIN, K. D.; KRAMER, J. L.; JEMAL, A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, n. 4, p. 252-271, 2014.

DIB, E.; RODRIGUES, E. B.; MAIA, M.; MEYER, C. H.; PENHA, F. M.; FURLANI, B. A.; COSTA, E. P. F.; FARAH, M. E. Corantes vitais em cromovitrectomia. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 72, n. 6, p. 845 – 850, 2009.

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 274, n. 2, p. 532-538, 1989.

DÍAZ-DE-CERIO, E.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; VERARDO, V.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. Determination of guava (*Psidium guajava* L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 376 - 388, 2016.

DÍAZ-DE-CERIO, E.; RODRÍGUEZ-NOGALES, A.; ALGIERI, F.; ROMERO, M.; VERARDO, V.; SEGURA-CARRETERO, A.; DUARTE, J.; GALVEZ, J. The hypoglycemic effects of guava leaf (*Psidium guajava* L.) extract are associated with improving endothelial dysfunction in mice with diet-induced obesity. **Food Research International**, v. 96, p. 64 – 71, 2017.

DIVE, C.; GREGORY, C. D.; PHIPPS, D. J.; EVANS, D. L.; MILNER, A. E.; WYLLIE, A. H. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1133, n. 3, p. 275-285, 1992.

DOBIÁS, P.; PAVLÍKOVÁ, P.; ADAM, M.; EISNER, A.; BENOVÁ, B.; VENTURA, K. Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity. **Central European Journal of Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 87-95, 2010.

DONG, L.; SHION, H.; DAVIS, R. G.; TERRY-PENAK, B.; CASTRO-PEREZ, J.; VAN BREEMEN, R. B. Collision cross-section determination and tandem mass spectrometric analysis of isomeric carotenoids using electrospray ion mobility time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 21, p. 9014-9021, 2010.

DUARTE, R. A. **Sinalização celular para apoptose em linhagem celular de adenocarcinoma (MCF-7) e carcinoma ductal invasivo de mama (ZR 7531) tratadas com alcaloides isolados de *Pterogyne nitens***. Araraquara – SP, 2010, p. 153. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

DUNCAN, B. B.; CHOR, D.; AQUINO, E. M. L.; BENSENOR, I. M.; MILL, J. G.; SCHMIDT, M. I.; LOTUFO, P. A.; VIGO, A.; BARRETO, S. M.; Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, p.126-34, 2012.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 495–516, 2007.

FABBRI, A. D. T. **Estudo da radiação ionizante em tomates *in natura* (*Lycopersicon esculentum* MILL) e no teor de licopeno do molho**. São Paulo – SP, 2009, p. 85. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) - Autarquia Associada à Universidade de São Paulo.

FENG, X.; WANG, Z.; MENG, D.; LI, X. Cytotoxic and antioxidant constituents from the leaves of *Psidium guajava*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 2193–2198, 2015.

FERNANDES, M. R. V.; DIAS, A. L. T.; CARVALHO, R. R.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 39 – 44, 2014.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoide: β -ciclodextrin stability is independent of pigment structure. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1317-1321, 2017.

FISH, W. W.; VEAZIE, P. P.; COLLINS, J. K. A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 309-317, 2002.

FLORES, G.; WU, S.; NEGRIN, A.; KENNELLY, E. J. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. **Food Chemistry**, v. 170, p. 327 - 335, 2015.

FONSECA, A. B. C.; RODRIGUES, E. S. R. C.; NÓBREGA, M. M.; NOBRE, J. O. C.; FRANÇA, G. J.; SILVA, L, P. Estimativa para o câncer de mama feminino: E a assistência de enfermagem na prevenção. **Temas em Saúde**, v.16, n.4, p. 14-30, 2016.

FRISCH, M.; TRUCKS, G.; SCHLEGEL, H.; SCUSERIA, G.; ROBB, M.; CHEESEMAN, J.; PETERSSON, G. Gaussian 09, revision D. 01: Gaussian, Inc., Wallingford CT. 2009.

GANESH, N. S.; LAKSHMI, K. B.; CHANDY, V. Lycopene properties and it's benefits in human health: A brief review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 12, p. 424-436, 2016.

GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, Tomato-Based Products, Lycopene, and Cancer: Review of the Epidemiologic Literature. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 4, p. 317-331, 1999.

GIUSTI, M. M.; ATNIP, A.; SWEENEY, C.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. (2011). Rapid authentication of fruit juices by infrared spectroscopic techniques. **Progress in Authentication of Food and Wine**, v. 1081, p. 275-299, 2011.

GLORIA, N. F.; SOARES, N.; BRAND, C.; OLIVEIRA, F. L.; BOROJEVIC, R.; TEODORO, A. J. Lycopene and beta-carotene induce cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cell lines. **Anticancer Research**, v. 34, n. 3, p. 1377-1386, 2014.

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

GUIMARÃES, P. H. G. **Atividade citotóxica e pró-apoptótica de antígenos de *Ancylostoma ceylanicum*: implicações na modulação da resposta imune na ancilostomíase**. Belo Horizonte – MG, 2010, p. 97. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

- HAIDA, K. S.; BARON, A.; SILVA, F. J.; ARCELES, M. L.; FERNANDES, A.; ANDREAZZA, A. P.; COSTA, J. H. B. Propriedade sequestrante de radicais livres e determinação do teor de fenólicos totais da sálvia e eucalipto. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 61-66, 2011.
- HERNÁNDEZ- VARGAS, H.; BALLESTAR, E.; CARMONA- SAEZ, P.; VON KOBBE, C.; BAÑÓN- RODRÍGUEZ, I.; ESTELLER, M.; PALACIOS, J. Transcriptional profiling of MCF7 breast cancer cells in response to 5- Fluorouracil: Relationship with cell cycle changes and apoptosis, and identification of novel targets of p53. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 5, p. 1164-1175, 2006.
- HERNÁNDEZ-ALMANZA, A.; MONTANEZ, J.; MARTÍNEZ, G.; AGUILAR-JIMÉNEZ, A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR, C. N. Lycopene: Progress in microbial production. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, p.142-148, 2016.
- HONDA, M.; TAKAHASHI, N.; KUWA, T.; TAKEHARA, M.; INOUE, Y.; KUMAGAI, T. Spectral characterisation of Z-isomers of lycopene formed during heat treatment and solvent effects on the E/Z isomerisation process. **Food Chemistry**, v. 171, p. 323-329, 2015.
- HONG, K.; XIE, J.; ZHANG, L.; SUN, D.; GONG, D. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. **Scientia Horticulturae**, v. 144, p. 172 - 178, 2012.
- HU, W.; WANG, H.; LIU, Z.; LIU, Y.; WANG, R.; LUO, X.; HUANG, Y. Neuroprotective effects of lycopene in spinal cord injury in rats via antioxidative and anti-apoptotic pathway. **Neuroscience Letters**, v. 642, p. 107-112, 2017.
- INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) disponível em: <http://www.inca.gov.br>, acessado em junho de 2017b.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **A mulher e o câncer de mama no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. ISBN 978-85-7318244-6.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015. ISBN 978-85-7318-284-2.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Câncer de mama: é preciso falar disso**. Rio de Janeiro: INCA, 2016.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **ABC do câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2017a.
- JACQUES, A. C.; ZAMBIAZI, R. C. Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* spp). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 245-260, 2011.

JAIARJ, P.; KHOOHASWAN, P.; WONGKRAJANG, Y.; PEUNGVICHA, P.; SURIYAWONG, P.; SARAYA, M. L. S.; RUANGSOMBOON, O. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 203 - 212, 1999.

JAIN, M. V.; PACZULLA, A. M.; KLONISCH, T.; DIMGBA, F. N.; RAO, S. B.; ROBERG, K.; PALICHARLA, V. R. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 17, n. 1, p. 12-29, 2013.

JAKOBSEN, L. H.; WIRTH, R.; SMOLINER, C.; KLEBACH, M.; HOFMAN, Z.; KONDRUP, J. Gastrointestinal tolerance and plasma status of carotenoids, EPA and DHA with a fiber – enriched tube feed in hospitalized patients initiated on tube nutrition: Randomized controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 36, p. 380-388, 2017.

JANG, M.; JEONG, S.; CHO, S. K.; YANG, H. J.; YOON, D.; KIM, J.; PARK, K. Improvement in the anti-inflammatory activity of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts through optimization of extraction conditions. **Journal of Functional Foods**, p.161–168, 2014.

JIAO, Y.; ZHANG, M.; WANG, S.; YAN, C. Consumption of guava may have beneficial effects in type 2 diabetes: A bioactive perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 543 - 552, 2017.

JOANITTI, G. A.; AZEVEDO, R. B.; FREITAS, S. M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman–Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. **Cancer Letters**, v. 293, n. 1, p. 73-81, 2010.

JORGE, T.C. A.; CASTRO, S. L. **Doença de chagas: manual para experimentação animal**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85-5676-75-2. <http://books.scielo.org>.

KARPPI, J.; KURL, S.; NURMI, T.; RISSANEN, T. H.; PUKKALA, E.; NYSSONEN, K. Serum lycopene and the risk of cancer: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor (KIHD) study. **Annals of Epidemiology**, v.19, n. 7, p. 512–518, 2009.

KIM, S. W.; AHN, M. S.; KWON, Y. K.; SONG, S. Y.; KIM, J. K.; HA, S.-H.; LIU, J. R. Monthly metabolic changes and PLS prediction of carotenoid content of citrus fruit by combined Fourier transform infrared spectroscopy and quantitative HPLC analysis. **Plant Biotechnology Reports**, v. 9, n. 4, p. 247-258, 2015.

KING-BATOON, A.; LESZCZYNSKA, J. M.; KLEIN, C. B. Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 49, n. 1, p. 36-45, 2008.

KONG, K. W.; ISMAIL, A. Lycopene content and lipophilic antioxidant capacity of by-products from *Psidium guajava* fruits produced during puree production industry. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 53-61, 2011.

KONG, K. W.; ISMAIL, A.; TAN, C. P.; RAJAB, N. F. Optimization of oven drying conditions for lycopene content and lipophilic antioxidant capacity in a by-product of the pink guava puree industry using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 729-735, 2010a.

KONG, K. W.; RAJAB, N. F.; K. PRASAD, N.; ISMAIL, A.; MARKOM, M.; TAN, C. P. Lycopene-rich fractions derived from pink guava by-product and their potential activity towards hydrogen peroxide-induced cellular and DNA damage. **Food Chemistry**, v. 123, p. 1142-1148, 2010b.

KONG, K. W.; RAJAB, N. F.; PRASAD, K. N.; ISMAIL, A.; MARKOM, M.; TAN, C. P. Lycopene-rich fractions derived from pink guava by-product and their potential activity towards hydrogen peroxide-induced cellular and DNA damage. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1142-1148, 2010.

KOT, A. M.; BLAZEJAK, S.; KURCZ, A.; BRYŚ, J.; GIENKA, I.; BZDCHA-WRÓBEL, A.; MALISZEWSKA, M.; RECZEK, L. Effect of initial pH of medium with potato wastewater and glycerol on protein, lipid and carotenoid biosynthesis by *Rhodotorula glutinis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 25-31, 2017.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, n. 2, p. 785-789, 1988.

LEE, S. B.; PARK, H. R. Anticancer activity of guava (*Psidium guajava* L.) branch extracts against HT-29 human colon cancer cells. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 10, p. 891-896, 2010.

LEE, S.; CHOI, H.; CHO, S. K.; KIM, Y. Metabolic analysis of guava (*Psidium guajava* L.) fruits at different ripening stages using different data-processing approaches. **Journal of Chromatography B**, p. 878, p. 2983 2 - 988, 2010.

LESSA, I. Doenças crônicas não-transmissíveis no Brasil: um desafio para a complexa tarefa da vigilância. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, n. 4, p. 931-943, 2004.

LEVY, J.; BOSIN, E.; FELDMAN, B.; GIAT, Y.; MIINSTER, A.; DANILENKO, M.; SHARONI, Y. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either α - carotene or β - carotene. **Nutrition and Cancer**, v. 2, n. 3, p. 257-66, 1995.

LI, W.; JIANG, B.; CAO, X.; XIE, Y.; HUANG, T. Protective effect of lycopene on fluoride-induced ameloblasts apoptosis and dental fluorosis through oxidative stress-mediated caspase pathways. **Chemico-Biological Interactions**, v. 261, n. 27-34, 2017.

LIMA, J. P. LOPES, C. O. DIAS, N. A. A. PEREIRA, M. C. A. Atividade e biodisponibilidade dos carotenoides no organismo. **Revista Ciências em Saúde**, v. 2, n. 1, 2012.

LIN, J.; TANG, C. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry**, v. 101, p. 140-147, 2007.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; MANTELL SERRANO, C.; RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E.; LUBIÁN, L. M.; MONTERO, O. Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 8, p. 1352-1362, 2008.

MANGELS, A. R.; HOLDEN, J. M.; BEECHER, G. R.; FORMAN, M. R.; LANZA, E. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 93, n. 3, p. 284-296, 1993.

MARENICH, A. V.; HO, J.; COOTE, M. L.; CRAMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. Computational electrochemistry: prediction of liquid-phase reduction potentials. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 29, p. 15068-15106, 2014.

MARIANI, S.; LIONETTO, L.; CAVALLARI, M.; TUBARO, A.; RASIO, D.; DE NUNZIO, C.; SIMMACO, M. Low prostate concentration of lycopene is associated with development of prostate cancer in patients with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 1, p. 1433-1440, 2014.

MARIATH, A. B.; GRILLO, L. P.; SILVA, R. O.; SCHMITZ, P.; CAMPOS, I. C.; MEDINA, J. R. P.; KRUGER, R. M. Obesidade e fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis entre usuários de unidade de alimentação e nutrição. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 4, p. 897-905, 2007.

MARTINS, G. V. F. **Avaliação do potencial citotóxico das lectinas de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda***. João Pessoa – PB, 2009, p. 125. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

MARTINS, N.; FERREIRA, I. C. F. R. Wastes and by-products: Upcoming sources of carotenoids for biotechnological purposes and health-related applications. **Trends in Food Science & Technology**, v.62, p. 33-48, 2017.

MAYER-MIEBACH, E.; BEHSNILIAN, D.; REGIER, M.; SCHUCHMANN, H. P. Thermal processing of carrots: Lycopene stability and isomerisation with regard to antioxidant potential. **Food Research International**, v. 38, p. 1103-1108, 2005.

MBA, O. I.; DUMONT, M.; NGADI, M. Thermostability and degradation kinetics of tocochromanols and carotenoids in palm oil, canola oil and their blends during deep-fat frying. **LWT – Food Science and Technology**, v. 82, p. 131 – 138, 2017.

MCCOOK-RUSSELL, K. P.; MURALEEDHARAN G. NAIR, M. G.; FACEY, P. C.; BOWEN-FORBES, C. S. Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican *Psidium cattleianum* (strawberry guava) and *Psidium guajava* (common guava) fruits. **Food Chemistry**, v. 134 p. 1069 - 1073, 2012.

MEHMOOD, A.; JASKANI, M. J.; KHAN, I. A.; AHMAD, S.; AHMAD, R.; LUO, S.; AHMAD, N. M. Genetic diversity of Pakistani guava (*Psidium guajava* L.) germplasm and its implications for conservation and breeding. **Scientia Horticulturae**, v. 172, p. 221 - 232, 2014.

MILANI, L. I. G.; TERRA, N. N.; FRIES, L. L. M.; REZER, A. N. S.; FERREIRA, S. F.; CICHOSKI, A. J.; VALENTE, C. R. F. Oxidação lipídica, características sensoriais e cor da carne de frango adicionada de extratos de caqui (*Diospyros kaki*, L.) e submetida a tratamento térmico. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 4, p. 242-250, 2010.

MORAIS, A. H. A. **Diversidade de carotenoides antioxidantes em frutos de espécies de *Solanum* (seção *Lycopersicon*): Caracterização via Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAE) e análise filogenética do gene codificador da enzima licopeno- β -ciclase**. Brasília – DF, 2007, p. 131. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Distrito Federal.

MUTSOKOTI, L.; PANOZZO, A.; TONGONYA, J.; KEBEDE, B. T.; LOEY, A. V.; HENDRICKX, M. Carotenoid stability and lipid oxidation during storage of low-fat carrot and tomato based systems. **LWT – Food Science and Technology**, v.80, p. 470-478, 2017.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; COELHO, P. S. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n.4, p. 966-973, 2005.

NIKI, E., NOGUSHI, N., TSUCHIHASHI, H., GOTOH, N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, n.6, p.1322-1326, 1995.

NIMISHA, S.; KHERWAR, D.; AJAY, K.M.; SINGH, B.; USHA, K. Molecular breeding to improve guava (*Psidium guajava* L.): Current status and future prospective **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 578 – 588, 2013.

NORA, C. D.; MULLER, C. D.; BONA, G. S.; RIOS, A. O.; HERTZ, P. F.; JABLONSKI, A.; JONG, E. V.; FLÔRES, S. H. Effect of processing on the stability of bioactive compounds from red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) and guabiju (*Myrcianthes pungens*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 34, p.18-25, 2014.

NUNES, J. C.; LAGO, M. G.; CASTELO-BRANCO, V. N.; OLIVEIRA, F. R.; TORRES, A. G.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. Effect of drying method on volatile compounds, phenolic profile and antioxidant capacity of guava powders. **Food Chemistry**, v. 197, p. 881-890, 2016.

OBERMÜLLER-JEVIC, U. C.; OLANO-MARTIN, E.; CORBACHO, A. M.; EISERICH, J. P.; VAN DER VLIET, A., VALACCHI, G.; CROSS, C. E.; PACKER, L. Lycopene inhibits the growth of normal human prostate epithelial cells in vitro. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 11, p. 3356-3360, 2003.

OH, W. K.; LEE, C. H.; LEE, M. S.; BAE, E. Y.; SOHN, C. B.; OH, H.; KIM, B. Y.; AHN, J. S. Antidiabetic effects of extracts from *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 411 - 415, 2005.

OJHA, S.; GOYAL, S.; SHARMA, C.; ARORA, S.; KUMARI, S.; ARYA, D. Cardioprotective effect of lycopene against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 32, n. 5, p. 492-503, 2013.

OLIVEIRA, D. D. S.; LOBATO, A. L.; RIBEIRO, S. M. R.; SANTANA, Â. M. C.; CHAVES, J. B. P.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Carotenoids and vitamin C during handling and distribution of guava (*Psidium guajava* L.), mango (*Mangifera indica* L.), and papaya (*Carica papaya* L.) at commercial restaurants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 6166-6172, 2010.

OLIVEIRA, E. E. **Avaliação do efeito dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* e *mentha x villosa* em linhagem de células de adenocarcinoma humano de pulmão: citotoxicidade, ciclo celular e produção de TGF- β 1.** Juiz de Fora – MG, 2015, p. 66. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.

OMBREDANE, A. S. **Síntese verde de nanopartículas de prata a partir de extrato aquoso do tubérculo de *Curcuma longa* L. associadas à quitosana e avaliação da atividade antitumoral *in vitro* em câncer de pele não melanoma (linhagem A431).** Brasília- DF, 2016, p. 163. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) – Universidade de Brasília – Distrito Federal.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012 <http://www.who.int/en/>

OSORIO, C.; FORERO, D. P.; CARRIAZO, J. G. Characterisation and performance assessment of guava (*Psidium guajava* L.) microencapsulates obtained by spray-drying. **Food Research International**, v. 44, p. 1174 - 1181, 2011.

PAES, J.; CUNHA, C. R.; VIOTTO, L. A. Concentration of lycopene in the pulp of papaya (*Carica papaya* L.) by ultrafiltration on a pilot scale. **Food and Bioproducts Processing**, v. 96, p. 296-305, 2015.

PALMA, P. R. **Avaliação da Anexina V e Calceína AM como marcadores de apoptose em linfócitos.** Florianópolis – SC, 2005, p. 91. Dissertação (Mestrado em farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.

PENG, S. J.; LI, J.; ZHOU, Y.; TUO, M.; QIN, X. X.; YU, Q.; CHENG, H.; LI, Y. M. In vitro effects and mechanisms of lycopene in MCF-7 human breast cancer cells. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 16, n. 2, p. 1-8, 2017.

PEREIRA, F. C. **Mecanismo de morte celular induzida por complexos de rutênio em diferentes linhagens tumorais.** Goiânia – GO, 2014, p. 153. Tese (Doutora em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiás.

PINTO, C.; RODRÍGUEZ-GALDÓN, B.; CESTERO, J. J.; MACÍAS, P. Hepatoprotective effects of lycopene against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1601-1610, 2013.

PITA, J. C. L. R. **Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do trachylobano-360 de *Xylopiya langsdorffiana* st. Hil. & Tull (Annonaceae)**. João Pessoa – PB, 2010, p. 105. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba – Paraíba.

POMMER, C. V.; MURAKAMI, K. R. N.; WATLINGTON, F. Goiaba no Mundo. **O Agrônômico**, v. 58, p. 22-26, 2006.

POOJARY, M. M.; PASSAMONTI, P. Extraction of lycopene from tomato processing waste: Kinetics and modelling. **Food Chemistry**, v. 173, p. 943-950, 2015.

PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Chronic diseases caused by chronic inflammation require chronic treatment: Anti-inflammatory role of dietary spices. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, 2014.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

REDDY, M. K.; ALEXANDER-LINDO, R. L.; NAIR, M. G. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 9268-9273, 2005.

ROCHA, M. A.; PETERSEN, P. A.; TEIXEIRA-NETO, E.; PETRILLI, H. M.; LEROUX, F.; TAVIOT-GUEHO, C.; CONSTANTINO, V. R. Layered double hydroxide and sulindac coiled and scrolled nanoassemblies for storage and drug release. **RSC Advances**, v. 6, n. 20, p. 16419-16436, 2016.

ROCKENBACH, I. I.; RODRIGUES, E.; CATANEO, C.; GONZAGA, L.V.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. **Alimentos e Nutrição**. v. 19, n. 3, p. 271-276, 2008.

RODRIGUES, J. D.; CRUZ, M. S.; PAIXÃO, A. N. Uma análise da prevenção do câncer de mama no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 20, n. 10, p. 3163-3176, 2015.

RODRIGUES, M. F. **Papel do Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e seus receptores na modulação da apoptose de macrófagos durante a infecção com *Mycobacterium bovis***. Juiz de Fora -MG, 2013, p. 114. Tese (Doutorado em Saúde) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Food carotenoids: Chemistry, biology and technology**. USA: IFT Press, 2016. 327 p.

ROLDÁN-GUTIÉRREZ, J. M.; CASTRO, M. D. L. Lycopene: The need for better methods for characterization and determination. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 163-170, 2007.

ROMAGNOLO, D. F.; SELMIN, O. I. Mediterranean diet and prevention of chronic diseases. **Nutrition Today**, v. 52, n. 5, 2017.

RONOT, X.; BENEL, L.; ADOLPHE, M.; MOUNOLOU, J. Mitochondrial analysis in living cells: the use of rhodamine 123 and flow cytometry. **Biology of the Cell**, v. 57, n. 1, p. 1-7, 1986.

ROSA, F. R. **Atividade antioxidante de frutos do Cerrado e identificação de compostos em *Bactris setosa* Mart., *Palmae* (tucum-do-Cerrado)**. Brasília – DF, 2013, p. 146. Tese (Doutorado em Nutrição Humana) – Universidade de Brasília, Distrito federal.

RYU, N. H., PARK, K.-R., KIM, S.-M., YUN, H.-M., NAM, D., LEE, S. G.; JANG, H. J.; AHN, K. S.; KIM, S. H.; SHIM, B. S.; CHOI, S. H.; MOSADDIK, A.; CHO, S. K.; AHN, K. S. 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.

SADLER, G.; DAVIS, J.; DEZMAN, D. Rapid extraction of lycopene and β - carotene from reconstituted tomato paste and pink grapefruit homogenates. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 5, p. 1460-1461, 1990.

SALVIA-TRUJILLO, L.; VERKEMPINCK, S. H. E.; SUN, L.; LOEY, A. M. V.; GRAUWET, T.; HENDRICKX, M. E. Lipid digestion, micelle formation and carotenoid bioaccessibility kinetics: Influence of emulsion droplet size. **Food Chemistry**, v. 229, p. 653-662, 2017.

SANTAMARIA, R.; REYES-DUARTE, M.; BARZANA, E.; FERNANDO, D.; GAMA, F.; MOTA, M.; LOPEZ-MUNGUIA, A. Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chili guajillo puya (*Capsicum annuum* L.) using ethanol as solvent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 3063-3067, 2000.

SANTOS, W. N. L.; SAUTHIER, M. C. S.; SANTOS, A. M. P.; SANTANA, D. A.; AZEVEDO, R. S. A.; CALDAS, J.C. Simultaneous determination of 13 phenolic bioactive compounds in guava (*Psidium guajava* L.) by HPLC-PAD with evaluation using PCA and Neural Network Analysis (NNA). **Microchemical Journal**, v. 133, p.583 – 592, 2017.

SCHIERLE, J.; BRETZEL, W.; BIIHLER, I.; FACCIN, N.; HESS, D.; KURT STEINER, K.; SCHIIEP, W. Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. **Food Chemistry**, v. 59, p. 459-465, 1997.

SENTANIN, M. A.; AMAYA, D. B. R. Teores de carotenoides em mamão e pêssego determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.1, p. 13-19, 2007.

SHAMI, N.J.I.E; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v.17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SHEN, C.; WANG, S.; SHAN, Y.; LIU, Z.; FAN, F.; TAO, L.; WU, H. Chemomodulatory efficacy of lycopene on antioxidant enzymes and carcinogen-induced cutaneous carcinoma in mice. **Food & Function**, v. 5, n. 7, p. 1422-1431, 2014.

SHI, J.; KAKUDA, Y.; YEUNG, D. Antioxidative properties of lycopene and other carotenoids from tomatoes: synergistic effects. **Biofactors**, v. 21, p. 203-210, 2004.

SHISHIR, M.R.I.; TAIP, F.S.; AZIZ, N.A.; TALIB, R.A. Physical properties of spray-dried pink guava (*Psidium guajava*) powder. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 74-81, 2014.

SILVA, D. A. **Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*) utilizando água de parboilização do arroz**. Rio Grande – RS, 2009, p. 93. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande – Rio Grande do Sul.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, P. A.; RIUL, S. S. Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 64, n. 6, p. 1016-1021, 2011.

SINGH, M.; KRISHANAPPA, R.; BAGEWADI, A.; KELUSKAR, V. Efficacy of oral lycopene in the treatment of oral leukoplakia. **Oral Oncology**, v. 40, p. 591-596, 2004.

SIWACH, R.; TOKAS, J.; SETH, R. Use of lycopene as a natural antioxidant in extending the shelf-life of anhydrous cow milk fat. **Food Chemistry**, v. 199, p. 541-546, 2016.

ŚLIWKA, L.; WIKTORSKA, K.; SUCHOCKI, P.; MILCZAREK, M.; MIELCZAREK, S.; LUBELSKA, K.; CIEERPIAL, T.; LYZWA, P.; KIELBASINSKI, P.; JAROMIN, A.; FLIS, A.; CHILMONCZYK, Z. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. **PloS One**, v. 11, n. 5, p. 1-17, 2016.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUZA, V. R. **Compostos bioativos e o processamento de pequenas frutas vermelhas cultivadas em clima subtropical**. Lavras – MG, 2013, p. 196. Tese (Doutorado em Ciências dos alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Minas gerais.

SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Lycopene; chemistry, biosynthesis, metabolism and degradation under various abiotic parameters. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 41-53, 2015.

STAHL, W.; JUNGHANS, A.; DE BOER, B.; DRIOMINA, E. S.; BRIVIBA, K.; SIES, H. Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. **FEBS Letters**, v. 427, n. 2, p. 305-308, 1998.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, p. 6, p. 345-351, 2003.

STINCO, C. M.; RODRÍGUEZ-PULIDO, F. J.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; GORDILLO, B.; VICARIO, I. M.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J. Lycopene isomers in fresh and processed tomato products: Correlations with instrumental color measurements by digital image analysis and spectroradiometry. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 111-120, 2013.

SUWANARUANG, T. Analyzing Lycopene Content in Fruits. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 11, p. 46-48, 2016.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOJI, S.; CHOWWANAPOOPOHN, S. Study on antioxidante activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidante action of guava leaf extract. **Food Chemistry**, v. 103, p. 381-388, 2007.

TAKESHIMA, M.; ONO, M.; HIGUCHI, T.; CHEN, C.; HARA, T.; NAKANO, S. Anti-proliferative and apoptosis- inducing activity of lycopene against three subtypes of human breast cancer cell lines. **Cancer Science**, v. 105, n. 3, p. 252-257, 2014.

TALEON, V.; MUGODE, L.; CABRERA-SOTO, L.; PALACIOS-ROJAS, N. Carotenoid retention in biofortified maize using diferent post-harvest storage and packaging methods. **Food Chemistry**, v. 232, p. 60-66, 2017.

TEODORO, A. J.; OLIVEIRA, F. L.; MARTINS, N. B.; AZEVEDO, M., G.; MARTUCCI, R. B.; BOROJEVIC, R. Effect of lycopene on cell viability and cell cycle progression in human cancer cell lines. **Cancer Cell International**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2012.

TREBOLAZABALA, J.; MAGUREGUI, M.; MORILLAS, H.; DIEGO, A.; MADARIAGA, J. M. Portable Raman spectroscopy for an in-situ monitoring the ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 180, p. 138-143, 2017.

UENOJO, M.; JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Carotenoides: Propriedades, aplicações e biotransformação para a formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

UPPALA, P. T.; DISSMORE, T.; LAU, B. H.; ANDACHT, T.; RAJARAM, S. Selective inhibition of cell proliferation by lycopene in MCF- 7 breast cancer cells in vitro: A proteomic analysis. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 4, p. 595-601, 2013.

VALDUGA, E.; TATSCH, PIHETRA O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VARGAS-MURGA, L.; ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z.; OLMEDILLA-ALONSO, B. Fruits and vegetables in the Brazilian Household Budget Survey (2008–2009): carotenoid content and assessment of individual carotenoid intake. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 50, p. 88-96, 2016.

VASCONCELOS, A. G. **Avaliação da atividade anti-inflamatória de frações de licopeno da goiaba (*Psidium guajava* L.)**. Parnaíba – PI, 2015, p. 69. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí – Piauí.

- VASCONCELOS, A. G.; AMORIM, A. G. N.; SANTOS, R. C.; SOUZA, J. M. T.; SOUZA, L. K. M.; ARAÚJO, T. S. L.; NICOLAU, L. A. D.; CARVALHO, L. L.; AQUINO, P. E. A.; MARTINS, C. S.; ROPKE, C. D.; SOARES, P. M. G.; KUCKELHAUS, S. A. S.; MEDEIROS, J. R.; LEITE, J. R. S. A. Lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays anti-inflammatory and antioxidant profile by reducing suggestive hallmarks of acute inflammatory response in mice. **Food Research International**, p. 1-10, 2017.
- VÉRAS, L. M.; CUNHA, V. R.; LIMA, F. C.; GUIMARÃES, M. A.; VIEIRA, M. M.; CAMPELO, Y. D.; SAKAI, V. Y.; LIMA, D. F.; CARVALHO JR, P. S.; ELLENA, J. A.; SILVA, P. R. P.; VASCONCELOS, L. C.; GODEJOHANN, M.; PETRILLI, H. M.; CONSTANTINO, V. R. L.; MASCARENHAS, Y. P.; LEITE, J. R. S. A. Industrial scale isolation, structural and spectroscopic characterization of epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* stapf leaves: a promising Alkaloid against Schistosomiasis. **PloS One**, v. 8, n. 6, 2013.
- VIDAL, A. M.; DIAS, D. O.; MARTINS, E. S. M.; OLIVEIRA, R. S.; NASCIMENTO, R. M. S.; CORREIA, M. G. S. A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 1, n.15, p. 43-52, 2012.
- WATANABE, T.; ROZANE, D. E.; NATALE, W.; FURLAN, C. M. Avaliação da influência de substâncias fenólicas e carotenoides na anomalia do epicarpo da goiaba, “anelamento”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 008-013, 2011.
- YALVAC, M. E.; RAMAZANOGLU, M.; GUMRU, O. Z.; SAHIN, F., PALOTÁS, A.; RIZVANOVA, A. A. Comparison and optimisation of transfection of human dental follicle cells, a novel source of stem cells, with different chemical methods and electro-poration. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 7, p. 1272-1277, 2009.
- YANG, Y. J.; QI, S. N.; SHI, R. Y.; YAO, J.; WANG, L. S.; YUAN, H. Q.; JING, Y. X. Induction of apoptotic DNA fragmentation mediated by mitochondrial pathway with caspase-3-dependent BID cleavage in human gastric cancer cells by a new nitroxyl spin-labeled derivative of podophyllotoxin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 131-138, 2017.
- YAPING, Z.; SUPING, Q.; WENLI, Y.; ZHENG, X.; HONG, S.; SIDE, Y.; DAPU, W. Antioxidant activity of lycopene extracted from tomato paste towards trichloromethyl peroxy radical CCl₃O₂. **Food Chemistry**, v. 77, p. 209-212, 2002.
- YESILYURT, V.; HALFON, B.; OZTURK, M.; TOPCU, G. Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*. **Food Chemistry**, v. 108, p. 31-39, 2008.
- YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 220-27, 2001.
- ZEPKA, A. P. S. **Emissão de isopreno por plantações de eucalipto e sua influência na formação de ozônio troposférico**. São José dos Campos – SP, 2011, p. 235. Tese (Doutorado em Geofísica Espacial/ Ciências Atmosféricas) – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – São Paulo.

ZHANG, P.; LI, Z.; LU, J.; GUO, J.; FANG, F. Effects of stepwise nitrogen depletion on carotenoid content, fluorescence parameters and the cellular stoichiometry of *Chlorella vulgaris*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 181, p. 30-38, 2017.

ZHOU, X.; HUANG, W.; KONG, W.; YE, H.; DONG, Y.; CASA, R. Assessment of leaf carotenoids content with a new carotenoid index: Development and validation on experimental and model data. **International Journal of Applied Earth observation and Geoinformation**, v. 57, p. 24-35, 2017.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Vencendo o câncer

Esta estória é de uma paciente que já teve câncer no olho uma vez e duas vezes câncer de mama e graças a sua fé e sua perseverança venceu o câncer todas as vezes.

Nádia Aparecida Silva Tavares, 50 anos, residente e domiciliar em Brasília – DF. Em agosto de 2010 foi detectada com câncer no olho esquerdo e fez a cirurgia dia 13/09/2010, este não foi tão agressivo; foi retirado cirurgicamente todos os nódulos e não foi realizado nenhum tratamento coadjuvante (quimioterapia e radioterapia).

Em março de 2012 foi detectada com câncer de mama (seio direito), dia 22/05/2012 foi realizado a retirada parcial da mama (quadrantectomia), dia 18/06/2012 foi iniciado a quimioterapia (8 ciclos sendo 4 ciclos de Adriblastina +Ciclofosfamida e 4 ciclos de Taxotere), um ciclo a cada 21 dias, cada ciclo com duração de 4 horas. Logo após as quimioterapias foi realizado 33 sessões de radioterapia, 5 sessões por semana com duração de 3 minutos e 45 segundos, dividido no ângulo frontal e lateral. Continuou fazendo uso de hormônio terapia de dezembro de 2012 até a descoberta do terceiro câncer.

Em dezembro de 2015 foi detectado outro câncer de mama (no mesmo seio direito), foi realizado a cirurgia de mastectomia e reconstrução com retalho miocutâneo no dia 01/03/2017. Dia 24/03/17 iniciou a primeira dose de Taxotere + Fauldcarbo, quimioterapia dupla com duração de 8 horas a cada 21 dias (6 ciclos duplos) e 28 sessões de radioterapia, 5 sessões por semana com duração de 3 minutos e 45segundos. Atualmente não fazendo mais uso de hormônio terapia por ter sido um câncer de mama do tipo triplo negativo.

Tive a oportunidade de compartilhar de perto da sua luta contra este último câncer, quando estava realizando os ensaios contra células tumorais de câncer de mama em Brasília. Isso me incentivou mais ainda, saber que de alguma forma nós acadêmicos podemos contribuir com a ciência na busca de substâncias que tenham papel tão importante como para o tratamento de câncer de mama, buscando melhores resultados e menor toxicidade; sei que a trajetória é grande, mas temos que dar o primeiro passo.

Tenho imenso orgulho de ser cunhada dessa paciente vencedora, que diante de muitas batalhas e dificuldades não deixou se abater por esta doença que hoje aflige muitas mulheres tanto no Brasil como no mundo.

2012 - Em tratamento**2016 - Em tratamento****2017 - Pós tratamento**

“Amo meus cabelos mas tenho orgulho da minha carequinha e de todo o aprendizado que tenho adquirido depois dela.

O câncer pode até assustar, mas definitivamente não é uma sentença de morte!”

Nádia Aparecida Silva Tavares

APÊNDICE 2 – Atividades desenvolvidas durante a Pós-graduação

1. Atividades desenvolvidas

Durante o período de realização do doutoramento junto ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO (2014-Atual), outras atividades acadêmico-científicas foram realizadas, como a publicação em co-autoria de 2 (dois) artigos científicos em periódico internacional indexado relacionado a espécie *Psidium guajava*. O envolvimento em outras atividades de pesquisa e parcerias do grupo BIOTEC/UFPI originaram mais 6 (seis) artigos. Durante o período da pós-graduação foram apresentados 10 (dez) trabalhos em eventos científicos, distribuídos entre eventos regionais, nacionais e internacionais, listados a seguir.

1.1 Artigos publicado em periódico indexado relacionado a espécie *Psidium guajava*

- 1.1.1. VASCONCELOS, A. G.; AMORIM, A. G.N.; **SANTOS, R. C.**; SOUZA, J. M. T.; SOUZA, L. K. M.; ARAÚJO, T. S. L.; NICOLAU, L. A. D.; CARVALHO, L. L.; AQUINO, P. E. A.; MARTINS, C. S.; ROPKE, C. D.; SOARES, P. M. G.; KUCKELHAUS, S. A. S.; MEDEIROS, JAND-VENES, R.; LEITE, J. R. S. A. Lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays anti-inflammatory and antioxidant profile by reducing suggestive hallmarks of acute inflammatory response in mice. **Food Research International**, 2017.
- 1.1.2. AMORIM, A. G. N.; SOUZA, J. M. T.; **SANTOS, R. C.**; GULLÓN, B.; OLIVEIRA, A.; SANTOS, L. F. A. VIRGINO, A. L. E.; MAFUD, A. C.; PETRILLI, H. M.; MASCARENHAS, Y. P.; DELERUE-MATOS, C.; PINTADO, M. E.; LEITE, J. R. S. A. HPLC-DAD, ESI - MS/MS and NMR of lycopene isolated from *P. guajava* L. and its biotechnological applications. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2017.

1.2. Artigos publicados em parcerias

- 1.2.1. ARAÚJO, K. M.; LIMA, A.; SILVA, J. N.; RODRIGUES, L.; AMORIM, A. G. N.; QUELEMES, P. V.; **SANTOS, R. C.**; ROCHA, J. A.; ANDRADES, E. O.; LEITE, J. R. S. A.; MANCINI-FILHO, J.; TRINDADE, R. A. Identification of Phenolic Compounds and Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Euphorbia Tirucalli* L. **Antioxidants**, v.3, p.159 - 175, 2014.
- 1.2.2. CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; **SANTOS, R. C.**; PAZ NETO, A. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**. v.113, p.3697 - 3701, 2014.
- 1.2.3. QUELEMES, P. V.; PERFEITO, M. L.G.; GIMARÃES, M. A.; **SANTOS, R. C.**; LIMA, D. F.; NASCIMENTO, C. SILVA, M. N. P.; SOARES, M. J. S.; ROPKE, C. D.; EATON, P. MORAES, J.; LEITE, J. R. S. A. Effect of neem (*Azadiracta indica* A. Juss) leaf extract on resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation and *Schistosoma mansoni* worms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 287 - 294, 2015.
- 1.2.4. **SANTOS, R. C.**; AMORIM, A. G. N.; THOMASI, S. S.; FIGUEIREDO, F. C.; CARNEIRO, C. S.; SILVA, P. R. P.; NETO, W. R. V.; FERREIRA, A. G.; JÚNIOR, J. R. S.; LEITE, J. R. S. A. Development of na electrolytic method to obtain antioxidant for biodiesel from cashew nut shell liquid. **Revista Fuell**, v. 144, p. 415 - 422, 2015.
- 1.2.5. CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; WOLSCHICK, D.; ANDRADE, I. M.; **SANTOS, R. C.**; SANTOS, F. J. S.; VERAS, L. M. C.; COSTA-JÚNIOR, L. M. In vitro effects of *Pilocarpus microphyllus* extracts and pilocarpine hydrochloride on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p.248 - 253, 2016.

- 1.2.6. CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; **SANTOS, R. C.**; PEREIRA, A. M. L.; FOGAÇA, F. H. S.; CANUTO, K. M.; BRITO, E. S.; CALVET, R. M. Composição química e eficácia do óleo essencial e do extrato etanólico de *Alpinia zerumbet* sobre *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p.1-7, 2016.

1.3. Trabalhos apresentados em eventos durante o período da Pós-Graduação

- 1.3.1. **SANTOS, R. C.**; AMORIM, A. G. N.; FIGUEIREDO, F. C.; ROSAS, W.; JÚNIOR, R.J.; QUARESMA, P.; LEITE, J.R.S.A. Produção de nanopartículas magnéticas estabilizadas com Líquido da Castanha do Caju. **V Encontro INCT Nanotecnologia – II Simpósio de Nanotecnologia do Noreste**, 2014.
- 1.3.2. SOUZA, J. M. T.; AMORIM, A. G. N.; **SANTOS, R. C.**; FARIAS, J. P.; MACEDO, W. B. S.; LEITE, J.R.S.A. Importância da ingestão de licopeno na prevenção e tratamento do câncer de próstata. **II Simpósio Latino-Americano de Bioecnologia do Nordeste**, 2014.
- 1.3.3. ANDRADES, E. O.; RODRIGUES, L. L.; ARAUJO, K. M.; **SANTOS, R. C.**; SILVA, J. N.; LIMA, A.; REIS, P. S. Determinação de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos da casca do fruto de *Sicana odorifera* (Vell.) Naudin. **II Simpósio Latino-Americano de Bioecnologia do Nordeste**, 2014.
- 1.3.4. **SANTOS, R. C.**; AMORIM, A. G. N.; VASCONCELOS, A. G.; SOUZA, J. M. T.; ROPKE, C. D.; LEITE, J.R.S.A. Prospecção tecnológica do licopeno obtido da goiaba vermelha. **III Simpósio Latino-Americano de Bioecnologia do Nordeste**, 2015.
- 1.3.5. VASCONCELOS, A. G.; AMORIM, A. G. N.; **SANTOS, R. C.**; SOUZA, J. M. T.; SOUZA, L. K. M.; ARAUJO, T. S. L.; NICOLAU, L. A. D.; ROPKE, C. D.; MEDEIROS, J. R.; LEITE, J.R.S.A. Atividade anti-inflamatória de extrato rico em licopeno e licopeno purificado de goiaba (*Psidium guajava* L.). **III Simpósio Latino-Americano de Bioecnologia do Nordeste**, 2015.

- 1.3.6. **SANTOS, R. C.**; AMORIM, A. G. N.; SOUZA, J. M. T.; ROPKE, C. D.; LONGO, J. P. F.; LEITE, J.R.S.A. Aplicações Biotecnológicas de licopeno extraído da goiaba vermelha. **III Simpósio Latino-Americano de Bioecnologia do Nordeste**, 2015.
- 1.3.7. VASCONCELOS, A. G.; AMORIM, A. G. N.; **SANTOS, R. C.**; SOUZA, J. M. T.; ROPKE, C. D.; KUCKELHAUS, S. A. S.; SILVA, F. R. P.; VASCONCELOS, D. F. P.; MEDEIROS, J. R.; LEITE, J.R.S.A. Análise histopatológica da atividade anti-inflamatória do licopeno obtido da goiaba (*Psidium guajava* L.) em modelo de edema de pata. **III Simpósio Latino-Americano de Bioecnologia do Nordeste**, 2015.
- 1.3.8. **SANTOS, R. C.**; OMBREDANE, A. S.; SOUZA, J. M. T.; VASCONCELOS, A. G.; PLÁCIDO, A.; AMORIM, A. G. N.; JOOANITTI, G. A.; LEITE, R. S. A. Evaluation of anticancer activity of lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) in human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. **Goiania Breast Cancer Symposium**, 2017.
- 1.3.9. RIBEIRO, A. M. B.; SOUSA, J. N.; **SANTOS, R. C.**; PORTELA, J. V. F.; BARRETO, H. M.; OLIVEIRA, A. P. Antimicrobial activity and modulation of the fluoroquinolone-resistance in *Staphylococcus aureus* by *Phyllanthus amarus* Schumach & Thonn. **III Encontro Estratégico de Ciências Farmacêuticas, III Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos e II Simpósio Internacional de Farmácia Clínica**, 2017.
- 1.3.10. **SANTOS, R. C.**; OMBREDANE, A. S.; SOUZA, J. M. T.; VASCONCELOS, A. G.; PLÁCIDO, A.; AMORIM, A. G. N.; LIMA, F. C. D. A.; ROPKE, C. D.; ALVES, M. M. M.; ARCANJO, D. D. R.; CARVALHO, F. A. A.; DELERUE-MATOS, C.; JOANITTI, G. A.; LEITE, J. R. S. A. Atividade anticâncer do extrato de goiaba rico em licopeno em células de adenocarcinoma mamário *in vitro*. **Encontro de Biotecnologia do Nordeste**, 2017.

ANEXOS

ANEXO 1 – Comprovante do artigo publicado.

Food Research International 105 (2018) 184–196



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays cytotoxic effect against human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 via an apoptotic-like pathway



Raimunda C. dos Santos^a, Alicia S. Ombredane^b, Jéssica Maria T. Souza^a,
 Andreanne G. Vasconcelos^a, Alexandra Plácido^c, Adriany das G.N. Amorim^a,
 Eder Alves Barbosa^{d,e}, Filipe C.D.A. Lima^f, Cristina D. Ropke^g, Michel M.M. Alves^h,
 Daniel D.R. Arcanjo^h, Fernando A.A. Carvalho^h, Cristina Delerue-Matos^c, Graziella A. Joanitti^{b,i},
 José Roberto de S.A. Leite^{j,*}

^a Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, Biotec, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brazil

^b Laboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Biologia, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

^c REQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto, Porto, Portugal

^d Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas, LSAB, Instituto de Química, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

^e Laboratório de Espectrometria de Massa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil

^f Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo, Matão, SP, Brazil

^g Phytobios LTDA, Barueri, SP, São Paulo, Brazil

^h Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brazil

ⁱ Campus Ceilândia, Centro Metropolitano, Universidade de Brasília, Ceilândia, Brasília, DF, Brazil

^j Área de Morfologia, Faculdade de Medicina, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Carotenoid
 Antioxidant
 Breast cancer
 Cytotoxicity

ABSTRACT

This study investigated a lycopene-rich extract from red guava (LEG) for its chemical composition using spectrophotometry, mass spectrometry, attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), and computational studies. The cytotoxic activity of LEG and the underlying mechanism was studied in human breast adenocarcinoma cells (MCF-7), murine fibroblast cells (NIH-3 T3), BALB/c murine peritoneal macrophages, and sheep blood erythrocytes by evaluating the cell viability with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method and flow cytometry. Spectrophotometry analysis showed that LEG contained 20% of lycopene per extract dry weight. Experimental and theoretical ATR-FTIR suggests the presence of lycopene, whereas MS/MS spectra obtained after fragmentation of the molecular ion $[M]^+$ of 536.4364 show fragment ions at m/z 269.2259, 375.3034, 444.3788, and 467.3658, corroborating the presence of lycopene mostly related to all-trans configuration. Treatment with LEG (1600 to 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 and 72 h significantly affected the viability of MCF-7 cells (mean half maximal inhibitory concentration $[\text{IC}_{50}] = 29.85$ and 5.964 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) but not NIH-3 T3 cells ($\text{IC}_{50} = 1579$ and 911.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively). Furthermore LEG at concentrations from 800 to 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presented low cytotoxicity against BALB/c peritoneal macrophages ($\text{IC}_{50} \geq 800$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) and no hemolytic activity. LEG (400 and 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) caused reduction in the cell proliferation and induced cell cycle arrest, DNA fragmentation, modifications in the mitochondrial membrane potential, and morphologic changes related to granularity and size in MCF-7 cells; however, it failed to cause any significant damage to the cell membrane or display necrosis or traditional apoptosis. In conclusion, LEG was able to induce cytostatic and cytotoxic effects on breast cancer cells probably via induction of an apoptotic-like pathway.

Abbreviations: ROS, reactive oxygen species; MAPK, mitogen-activated protein kinase; LEG, lycopene-rich extract from red guava; ESI, electrospray ion; ATR-FTIR, Attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy; DFT, density functional theory; PI, propidium iodide; FSC, forward scatter; SSC, side scatter; IR, infrared; IC_{50} , mean half maximal inhibitory concentration

* Corresponding author at: Universidade de Brasília, UnB, Faculdade de Medicina, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910900 Brasília, DF, Brazil.

E-mail address: jrsaleite@pq.cnpq.br (J.R.d.S.A. Leite).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.045>

Received 21 May 2017; Received in revised form 16 October 2017; Accepted 26 October 2017

Available online 27 October 2017

0963-9969/ © 2017 Published by Elsevier Ltd.

ANEXO 2 – Artigos publicado em periódico indexado relacionados a *Psidium guajava*.

ARTICLE IN PRESS

FRIN-06573; No of Pages 10

Food Research International xxx (2017) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres




Lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays anti-inflammatory and antioxidant profile by reducing suggestive hallmarks of acute inflammatory response in mice

Andreanne G. Vasconcelos^a, Adriany das G.N. Amorim^a, Raimunda C. dos Santos^a, Jessica Maria T. Souza^a, Luan Kelves M. de Souza^b, Thiago de S.L. Araújo^b, Lucas Antonio D. Nicolau^c, Lucas de Lima Carvalho^c, Pedro Everson A. de Aquino^d, Conceição da Silva Martins^e, Cristina D. Ropke^f, Pedro Marcos G. Soares^c, Selma Aparecida S. Kuckelhaus^g, Jand-Venes R. Medeiros^b, José Roberto de S.A. Leite^{a,g,*}

^a Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia-BIOTEC, Universidade Federal do Piauí-UFPI, Campus Ministro Reis Velloso-CMRV, Parnaíba, PI, Brazil

^b Laboratório de Físio-Farmacologia Experimental-LAFFEX, Universidade Federal do Piauí-UFPI, Campus Ministro Reis Velloso-CMRV, Parnaíba, PI, Brazil

^c Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer-LAFICA, Universidade Federal do Ceará-UFC, Fortaleza, CE, Brazil

^d Laboratório de Neurofarmacologia, Universidade Federal do Ceará-UFC, Fortaleza, CE, Brazil

^e Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens-NEMPI, Universidade Federal do Ceará-UFC, Fortaleza, CE, Brazil

^f Phytobios Nordeste LTDA, Parnaíba, Piauí, Brazil

^g Área de Morfologia da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília-UnB, Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 October 2016

Received in revised form 4 January 2017

Accepted 20 January 2017

Available online xxxxx

Keywords:

Carotenoids

Natural antioxidant

Psidium guajava L. fruit

Inflammation

ABSTRACT

This study investigated the anti-inflammatory activity of the extract (LEG) and purified (LPG) lycopene from guava (*Psidium guajava* L.), as well as some mechanisms possibly involved in this effect. The anti-inflammatory activity was initially assessed using paw edema induced by Carrageenan, Dextran, Compound 48/80, Histamine and Prostaglandin E2 in Swiss mice. A peritonitis model was used to evaluate neutrophil migration, the activity of myeloperoxidase (MPO) and reduced glutathione (GSH) concentration; while the effect on the expression of iNOS, COX-2 and NF- κ B, was assessed by immunohistochemistry analysis. Results showed that oral and intraperitoneal administration of LEG and LPG inhibited inflammation caused by carrageenan. LPG (12.5 mg/kg p.o.) significantly inhibited the edema formation induced by different phlogistic agents and immunostaining for iNOS, COX-2 and NF- κ B. Leukocytes migration in paw tissue and peritoneal cavity was reduced, as well as MPO concentration, whereas GSH levels increased. Thus, lycopene-rich extract from red guava has beneficial effect on acute inflammation, offering protection against the consequences of oxidative stress by downregulating inflammatory mediators and inhibiting gene expression involved in inflammation.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Inflammation consists of an answer of the organism, triggered by different types of injuries on the tissues or for infectious agents. It is characterized by increasing vascular permeability, cellular migration and the release of cytokines and free radicals (Medzhitov, 2008; Nourshargh & Alon, 2014). Although inflammatory answer is considered a protective event, it represents an aggression to the organism, once it results in tissue damage, edema and pain (Medzhitov, 2008). Furthermore, pro-inflammatory mechanisms may contribute to the development of chronic diseases, such as diabetes, cancer, arthritis,

neurological diseases and psoriasis, that is why the control of the inflammatory process is desired (Lee et al., 2013; Pawelec, Goldeck, & Derhovanessian, 2014; Haworth & Buckley, 2015; Kim, Na, Myint, & Leonard, 2015; Grine, Dejager, Libert, & Vandenbroucke, 2015).

Many researches have focused on new bioactive molecules, natural products and functional foods as alternatives to the development of new anti-inflammatory agents (Moro et al., 2012; Pereira et al., 2012; Cavalcanti et al., 2013; Pérez et al., 2014). Some food compounds such as antioxidants, singly or in association, might influence the inflammatory process, reducing its harmful effects and the risk to develop diseases (Stoner & Wang, 2013; Lu & Yen, 2015; Nidhi, Sharavana, Ramaprasad, & Vallikannan, 2015).

Studies show that lycopene, or fractions rich in lycopene, has an important anti-inflammatory behaviour (Renju & Muraleedhara Kurup, 2013; Kim, Park, Kim, & Cho, 2014; Li, Deng, Liu, Loewen, & Tsao, 2014). Lycopene is a carotenoid composed by an acyclic chain with 11

* Corresponding author at: Área de Morfologia da Faculdade de Medicina (AM), Faculdade de Medicina (FM), Universidade de Brasília (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, Distrito Federal, DF 70910900, Brazil.
E-mail addresses: jrleite@gmail.com, jrleite@pq.cnpq.br (J.R.S.A. Leite).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.017>
0963-9969/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article as: Vasconcelos, A.G., et al., Lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays anti-inflammatory and antioxidant..., *Food Research International* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.017>

HPLC-DAD, ESI-MS/MS, and NMR of Lycopene Isolated From *P. guajava* L. and Its Biotechnological Applications

Adriany G. N. Amorim, Jessica M. T. Souza, Raimunda C. Santos, Beatriz Gullón, Ana Oliveira, Luiz F. A. Santos, Adamor L. E. Virgino, Ana C. Mafud, Helena M. Petrilli, Yvonne P. Mascarenhas, Cristina Delerue-Matos, Manuela E. Pintado, and José R. S. A. Leite*

Psidium guajava L. have been reported to be a rich source of antioxidant compounds. Its carotenoids have been highlighted by their high antioxidant capacity, which offers several benefits for human health. In this sense, lycopene isomers need to be identified. In this work, the comprehensive chemical characterization, by HPLC-DAD, MS/MS, and NMR, of lycopene isolated from *P. guajava* L., antioxidant and antimicrobial activity of lycopene extracts and isolated lycopene are evaluated. The FTIR results reported a structure with Z configuration, confirmed by UV-Vis, with $\lambda_{\max} = 448, 473, \text{ and } 505 \text{ nm}$ for 5-Z lycopene. Furthermore, MS/MS positive ionization shows one fragment $m/z 309 [M-227]^+$, relatively abundant for isolated lycopene. Experimental and Theoretical NMR studies revealed that guava may contain 5-Z lycopene because of the similarity found among the peaks. Lycopene extracts presented higher antioxidant activity than isolated lycopene, from both *P. guajava* L. and tomato, when measured by ABTS and ORAC ($r^2 = 0.9995$ and $r^2 = 0.9992$, respectively). In addition, lycopene extract shows antibacterial efficacy against *E. coli*, *S. aureus*, and *L. innocua*, presenting MBC values of 20 mg mL^{-1} . These results suggest that lycopene extract have potential applicability for food, cosmetics, and pharmaceutical industry.

Practical Applications: Lycopene from *P. guajava* L. is characterized by HPLC-DAD, MS, NMR, FTIR, and X-Ray, presented antioxidant capacity by ORAC and antibacterial efficacy against food pathogens.

1. Introduction

Psidium guajava L. is a species that grows in tropical and subtropical regions. The fruit, guava, has originally come from Mexico and Central America, but it is also very common in Brazil. Guava contains a high level of antioxidant compounds, such as vitamin C and carotenoids, especially lycopene.^[1]

Lycopene is a natural carotenoid,^[2] which shows powerful antioxidant properties, even higher than β -carotene. It is usually found in red fruits as tomato and guava.^[3] This bioactive compound has attracted considerable attention in the last two decades due to its protective effects against several chronic diseases, particularly skin cancer,^[4,5] prostate cancer, lung cancer,^[6] cardiovascular diseases,^[5] and degenerative diseases.^[1]

Many studies have focused on the use of tomato as the main source of lycopene in the development of functional products.^[7] Although lycopene extracts from tomato are the most studied and used according to the literature, it is worth pointing out that

A. G. N. Amorim, J. M. T. Souza, R. C. Santos
Centre for Biodiversity Research and Biotechnology
Federal University of Piauí
São Sebastião Avenue, 2819, Reis Veloso, 64202-020,
Parnaíba, Piauí, Brazil

B. Gullón
Department of Chemical Engineering
Institute of Technology
University of Santiago de Compostela
15782, Santiago de Compostela, Spain

A. Oliveira, M. E. Pintado
Centre for Biotechnology and Fine Chemistry
Portuguese Catholic University
Arquiteto Lobão Vital Apartado Street, 2511, Asprela, Porto, Portugal

L. F. A. Santos
Bruker of Brasil Ltda
BBP Condominium
Barão de Mauá
Rod D. Pedro I, Km 87.5 (Northern runway), 12954-260, Atibaia,
São Paulo, Brazil

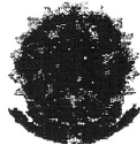
DOI: 10.1002/ejlt.201700330

A. L. E. Virgino, H. M. Petrilli
Physical Institute
University of São Paulo
Matão street, bystreet R, 187 Block C, room 102, University City,
05508090, São Paulo-SP, Brazil

A. C. Mafud, Y. P. Mascarenhas
São Carlos Physical Institute
University of São Paulo
13566-590, São Carlos, São Paulo, Brazil

C. Delerue-Matos
REQUIMTE
Superior Engineering Institute of Porto
Polytechnic Institute of Porto
Porto, Portugal

Prof. J. R. S. A. Leite
Morphology Area
Faculty of Medicine
University of Brasília (UnB)
University campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900,
Brasília-DF, Brazil
E-mail: jrleite@gmail.com; jrleite@pq.cnpq.br

ANEXO 3 – Carta de aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa da UFPI.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO COM ANIMAIS
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 32155734 – e-mail: ceeapi@ufpi.br

Teresina, 16 de maio de 2012.

Ao (A)

Prof (a): Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira e Francisco de Assis Oliveira
Departamento: UFPI/CCS/NPPM

Sr. (a) Pesquisador (a),

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado: **“Estudo químico-farmacológico de plantas medicinais do cerrado e da caatinga do nordeste brasileiro e de produtos sintéticos e seus derivados bioativos.”**, foi avaliado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais – CEEA/UFPI teve parecer **APROVADO sob o nº. 008/12**. Esclarecemos que o mesmo se encontra de acordo com os requisitos exigidos para apreciação de projetos de pesquisa.


Prof.^a Ivete L. de Mendonça,
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

Atenciosamente,