UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS" CÂMPUS DE ARARAQUARA

FRANCIELE GARCIA BAVELONI

Avaliação da atividade citotóxica e genotóxica de extratos brutos de metabólitos secundários de fungos endofíticos isolados da *Eugenia jambolana* em células de hepatocarcinoma murino (Hepa-1c1c7)

Araraquara, SP

2013

FRANCIELE GARCIA BAVELONI

Avaliação da atividade citotóxica e genotóxica de extratos brutos de metabólitos secundários de fungos endofíticos isolados da *Eugenia jambolana* em células de hepatocarcinoma murino (Hepa-1c1c7)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia- Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Christiane Pienna Soares

Araraquara, SP

2013

Dedico este trabalho à minha estimada Tia Aparecida, aos meus pais, minha irmã, a todos meus amigos, por toda força e apoio que sempre me deram em momentos importantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter suprido todas as minhas necessidades não me deixando faltar nada

À minha estimada Bisavó Teresa que mesmo estando pouco tempo comigo, foi um dos maiores exemplos de virtude e amor

À minha estimada Tia Aparecida Trevisan muito amada e querida. Um dos meus maiores exemplos de perseverança diante das dificuldades

Aos meus pais Luis e Zelinda, por me amarem sob qualquer condição, sempre me apoiando, educando e dando toda sabedoria para poder seguir em frente e concluir meus objetivos baseado na humildade

À minha irmã Maria Fernanda por ser minha companheira e amiga em todos os momentos da minha vida. Dando-me força, motivação, amor e alegria

Aos meus avós paternos Bira e Ivete por me amarem e me apoiarem em todos os momentos da minha vida

A Tia Odila pelo carinho e apoio

A minha amiga Ariane por ter estado presente me apoiando em todas as minhas dificuldades e nunca ter me abandonado nos momentos em que mais precisei. Com certeza estes meus anos universitários não seriam a mesma coisa sem você!!!!

Aos amigos de laboratório Felipe e Juliana pelo apoio que me deram neste período que estagiei no laboratório.

À professora Christiane Pienna Soares pela oportunidade em estagiar neste laboratório em que cresci profissionalmente

A todos os integrantes do laboratório por terem contribuído para a realização deste trabalho

À Melissa, grande pessoa que conheci na faculdade selando uma grande amizade pelo resto da vida

Às grandes amigas Glaucia, Débora e Kelly pelos momentos maravilhosos, por todo carinho, apoio nos momentos de dificuldade passados juntos nestes anos em Araraquara. Com certeza, não seria a mesma coisas sem vocês!

“Não confunda derrotas com fracasso, nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

O Brasil apresenta regiões com grande diversidade geográfica proporcionando o desenvolvimento de diferentes espécies vegetais, favorecendo a busca por bioativos com fins terapêuticos. Nos últimos anos, fungos endofíticos vêm sendo considerados fontes importantes de produtos naturais, demonstrando atividades biológicas de interesses terapêuticos. Pesquisas apontam que extratos brutos oriundos de fungos endofíticos da *Eugenia jambolana* demonstram atividades antineoplásicas e antimicrobianas. No presente estudo verificou-se a atividade citotóxica e genotóxica de extratos brutos provenientes do metabolismo secundários dos fungos endofíticos isolados de partes da planta da *Eugenia jambolana*, como caule (Ej- c), folhas (Ej-f), fruto verde (Ej-fv) e fruto maduro (Ej-fm) por meio de experimentos *in vitro*, utilizando células de hepatocarcinoma murino selvagem (Hepa-1c1c7). Para avaliar a citotoxicidade dos extratos brutos foi realizado o teste do MTT, podendo ser observados diferentes perfis citotóxicos de acordo com a parte da planta e o tempo de exposição de 24 e 48 horas. No tempo de exposição de 24 horas as amostras de Ej-fv(1) e Ej-fv(3) apresentaram CI_{50} de 65,57 µg/ml e 85,75 µg/ml, respectivamente. Já para amostra Ej-fm(1) houve CI_{50}= 46,53 µg/ml . Nas análises que correspondem o tempo de exposição de 48 horas os extratos brutos do caule Ej-c (Ej-c(3) e Ej-c(5)) apresentaram CI_{50} nas concentrações de 84,65 µg/ml e 95,35 µg/ml, respectivamente. O composto Ej-c(1) também foi observado uma menor citotoxicidade na concentração de 100,0 µg/ml. A atividade citotóxica também foi observada nas amostras da folha Ej-f (Ej-f(1), Ej-f(2), Ej-f(3)) atingindo o CI_{50} nas concentrações de 95,54 µg/ml, 90,8, µg/ml e 26,91 µg/ml, respectivamente. O composto Ej-f(3) também apresentou atividade citotóxica de menor na concentração de 33,3 µg/ml. As amostras do fruto verde Ej-fv(1), Ej-fv(2), Ej-fv(3), Ej-fv(4) e Ej-fv(5) foram observadas CI_{50} nas concentrações de 61,18 µg/ml, 79,47 µg/ml, 76,9 µg/ml, 95,98 µg/ml e 88,21 µg/ml, respectivamente. O composto do Ej-fm(1) apresentou o CI_{50}= 66,14 µg/ml. Para o ensaio de genotoxicidade foi realizado o ensaio do cometa no tempo de exposição por 6 horas da amostra Ej-fv(1) em células Hepa-1c1c7, sendo observado dano significativo no DNA das células em estudo nas concentrações de 12,5 µg/ml e 50,0 µg/ml. Desta forma os fungos endofíticos isolados da planta *Eugenia jambolana* conferem potencial citotóxico e genotóxico para as células de hepatocarcinoma murino.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência de carcinoma hepatocelular (CHC) em diferentes partes do mundo. Regiões de alta incidência - taxas ajustadas para a idade superiores a 15 casos por 100.000 habitantes; regiões de incidência intermédia - taxas ajustadas à idade entre 5 e 15 casos por 100.000

Figura 2. As alterações patológicas do fígado de rato Wistar

Figura 3. Morfologia da árvore, folhas e frutos da *Eugenia jambolana*

Figura 4. Morfologia dos fungos endofíticos isolados da *Eugenia jambolana*

Figura 5. Esquema do cultivo em pequena escala dos extratos brutos obtidos dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos

Figura 6. Níveis de dano no DNA após exposição por peróxido de hidrogênio através do ensaio do cometa

Figura 7. Ensaio de citotoxicidade (MTT). Extratos brutos de fungos endofíticos da *Eugenia jambolana* isolados do caule (EJ-c). Tratamento de 24 horas.

Figura 8. Ensaio de citotoxicidade (MTT). Extratos brutos de fungos endofíticos da *Eugenia jambolana* isolados do caule *(*Ej-c). Tratamento de 48 horas.

Figura 9. Ensaio de citotoxicidade (MTT). Extratos brutos de fungos endofíticos da *Eugenia jambolana* isolados da folha (Ej-f). Tratamento de 24 horas

.

Figura 10. Ensaio de citotoxicidade (MTT). Extratos brutos de fungos endofíticos da *Eugenia jambolana* isolados da folha (Ej-f). Tratamento de 48 horas.

Figura 11. Ensaio de citotoxicidade (MTT). Extrato bruto de fungos endofíticos da *Eugenia jambolana* isolado do fruto maduro (Ej-fm1) e extratos brutos da *Eugenia jambolana* isolados do fruto verde (Ej-fv). Tratamento de 24 horas

Figura 12. Ensaio de citotoxicidade (MTT). Extrato bruto de fungos endofíticos da *Eugenia jambolana* isolado do fruto maduro (Ej-fm1) e extratos da *Eugenia jambolana* isolados do fruto verde (Ej-fv).Tratamento de 48 horas.

Figura 13. Genotoxicidade da Ej-fv(1) representada pela % de DNA na cauda em linhagem celular Hepa-1c1c7 tratadas com 12,5 µg/ml, 25,0 µg/ml e 50,0 µg/ml por 6 horas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-MEM – Meio Alfa Modification of Eagle Medium

ANOVA – análise de variância

APC – adenomatous polyposis coli

ATCC – American Type Culture Collection

ATV – associação de tripsina e versene

CCDC – cromatografia em camada delgada comparativa

CLAE-DAD – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo

CC I– colangiocarcinoma intra-hepático

CHC – carcinoma hepatocelular

CN – controle negativo

CP – controle positivo

CV– controle de veículo

CI_{50} – concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular

EDTA – Ácido Etilenodiaminatetracético

Ej-c (Ej-c(1), Ej-c(3) e Ej-c(5)) – extrato bruto de metabólitos secundários isolado do caule da planta *Eugenia jambolana* da família *Myrtaceae*

Ej-f (Ej-f(1), Ej-f(2) e Ej-f(3)) – extrato bruto de metabólitos secundários isolados da folha da planta *Eugenia jambolana* da família *Myrtaceae*

Ej-fm1– extrato bruto de metabólitos secundários isolados do fruto maduro da planta *Eugenia jambolana* da família *Myrtaceae*

Ej-fv (Ej-fv(1), Ej-fv(2), Ej-fv(3), Ej-fv(4) e Ej-fv(5)) – extrato bruto de metabólitos secundários isolados do fruto verde da planta *Eugenia jambolana* da família *Myrtaceae*

EP – erro padrão

K-RAS – Gene homólogo de sarcoma viral de rato Kirsten

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- brometo de difeniltetrazólio

NuBBE– Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – solução salina tamponada com fosfato

p53 – proteína p53

q.s.p. – quantidade suficiente para

RMN de H – Ressonância Magnética Nuclear de H

SFB – soro fetal bovino

VHB – vírus da hepatite B

VHC – vírus da hepatite C

ÍNDICE REMISSIVO

1. INTRODUÇÃO 14
1.1- Carcinoma Hepatocelular (CHC) 15
1.2- Fungos Endofíticos 19
1.3- E*ugenia jambolana* 20
2. OBJETIVOS 22
2.1- Objetivos gerais 23
2.2- Objetivos Específicos 23
3. Materiais e Métodos 24
3.1- Procedimentos Fitoquímicos: Obtenção, Isolamento, Purificação e Cultivo dos fungos endofíticos a partir da *E. jambolana* 25
3.2- Cultivo em pequena escala dos fungos endofíticos isolados da Eugenia jambolana. 28
3.3- Cultura de células – HEPATOCARCINOMA MURINO HEPA 1C1C7 29
3.4- Tratamento das linhagens celulares 29
3.5- Citotoxicidade com MTT 30
3.6- Ensaio de Genotoxicidade – Ensaio do Cometa 31
3.7- Análises ESTATÍSTICAS 33
4. RESULTADOS 34
4.1- Ensaio de citotoxicidade- MTT 35
4.2- Avaliação da Genotoxicidade - ENSAIO DO COMETA 43
5. DISCUSSÃO 45
6. CONCLUSÕES 49
7. REFERÊNCIAS 51

1. INTRODUÇÃO

1.1- CARCINOMA HEPATOCELULAR (CHC)

Em 2008, estima-se que 7,6 milhões de pessoas ao redor do mundo morrem de câncer. Deste número mais de 70% acometem pessoas de países menos desenvolvidos e com baixa renda (OMS, 2008).

A etiologia do câncer pode ser através das causas ambientais (fatores exógenos) como o tabagismo, hábitos alimentares, medicamentos, radiação solar ou por hábitos sexuais e fatores endógenos relacionados com mutações e alterações do DNA são determinantes na formação no carcinoma celular (INCA 2013; MONTESANO e HALL, 2001). De todos os casos 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais, da intensidade e duração da exposição das células aos agentes causadores de câncer (GREENWALD et al. 1995; ALBERTS et al., 1999; PEZZUTO et al., 2005).

Esta enfermidade abrange mais de 100 doenças que têm em comum o conjunto de manifestações patológicas que se caracterizam pelo acúmulo de mutações genéticas, descaracterizando a sua função original (INCA, 2013). Desta forma é desencadeado perda de controle da proliferação celular, capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de sofrer metástases para tecidos distantes, características estas do tumor maligno (MONTESANO e HALL, 2001).

A partir de dados consolidados sobre mortalidade por câncer no Brasil em 1999, o carcinoma hepatocelular (CHC) e vias biliares ocupava a sétima posição, sendo responsável por 4.682 óbitos. Acometendo uma frequência três vezes maior em homens do que em mulheres (INCA, 2013). Em localidades do mundo como o sudeste da Ásia, Japão e África do Sul apresentam uma alta incidência desta doença (Figura 1). (FELDMAN; FRIEDMAN; BRANDT, 2007).

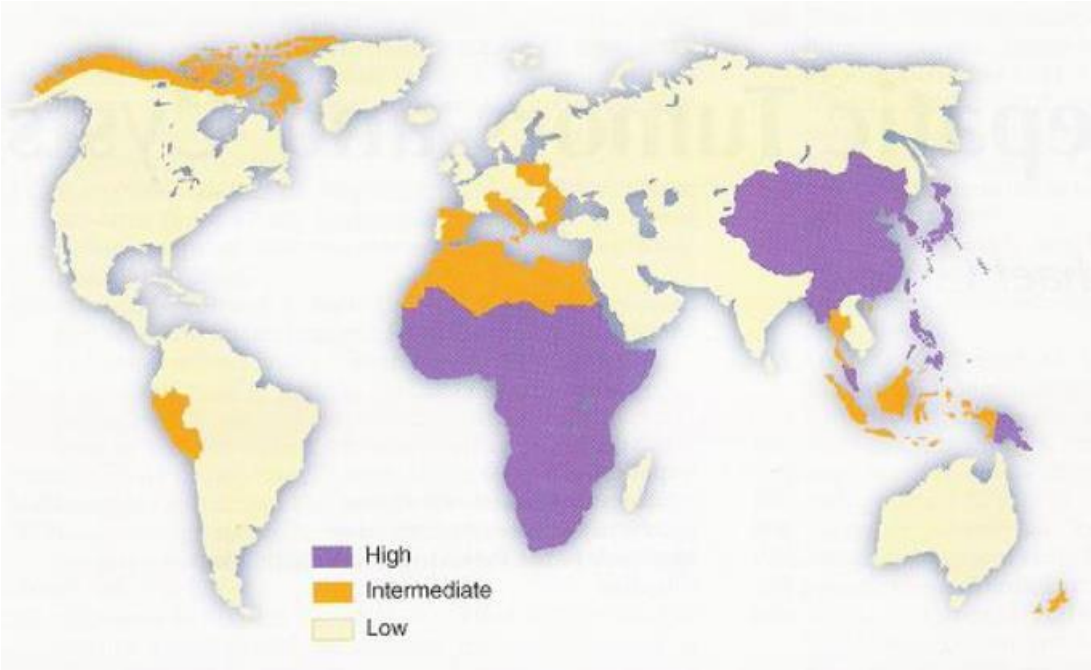


Figura 1. Incidência de carcinoma hepatocelular (CHC) em diferentes partes do mundo. Regiões de alta incidência - taxas ajustadas para a idade superiores a 15 casos por 100.000 habitantes; regiões de incidência intermédia - taxas ajustadas à idade entre 5 e 15 casos por 100.000 (FELDMAN; FRIEDMAN; BRANDT, 2007).

O câncer hepático divide-se em duas categorias: primário, tendo sua origem no próprio órgão, e secundário ou metastático com origem a partir de outros cânceres como, por exemplo, do colorretal com metástase no fígado. Os tipos de câncer que acometem o fígado são: Carcinoma hepatocelular (CHC), colangiocarcinoma intra-hepático (CCI), angiossarcoma hepático e o hepatoblastoma (INCA, 2013).

Fatores de risco para o carcinoma hepatocelular são divididos em maior e menor. Compreendem os fatores de risco maior, infeções crônicas por vírus das hepatites B e C, cirrose, exposição pela toxina aflatoxina B1. Já fatores envolvendo uso de anticoncepcionais orais, tabagismo, excesso de ferro por pessoas descendentes de negros, doença de Wilson, hemocromatose hereditária, deficiência de α1-antitripsina, tirosinémia hereditária tipo I, doença de armazenamento do glicogénio tipo I e II, hipercitrulinémia, telangiectasia-ataxia, obstrução membranosa da veia cava inferior são ditos como riscos menores. (FELDMAN; FRIEDMAN; BRANDT, 2007).

Dados demonstram que mais de 80% dos casos de carcinoma hepatocelular estão associados à cirrose. O risco de desenvolvimento da doença depende da etiologia da

cirrose, das características demográficas dos indivíduos acometidos pela doença e por último, infecções virais pelas hepatites (VHB e VHC) (VELOSA, 2001; BENVEGNÙ, GIOS, BOCCATO 2004; FATTOVICH, PANTALENA, ZAGNI; 2002). Em localidades, como China e África, a cirrose é em sua maior totalidade atribuída à infecção crônica pelo VHB, enquanto que outras regiões, a cirrose é causada pela infecção crônica pelo VHC, abuso de bebidas alcoólicas ou ambas. A cirrose promove o desenvolvimento tumoral agindo como um potente promotor tumoral (FELDMAN; FRIEDMAN; BRANDT, 2007).

A hepatocarcinogênese é um processo lento que tem origem em inflamação e na regeneração hepática proporcionando condições favoráveis para a ocorrência das alterações genéticas e epigenéticas levando à proliferação celular (VELOSA, 2011, EL-SERAG, 2007). Inicialmente ocorrem mutações em genes supressores de tumor e vias de genes de reparo do DNA, tais como, APC, K-ras e p53, que controlam a atividade da proliferação de células e morte. Além das alterações de mecanismos genéticos, a promoção do câncer pode ocorrer por intermédio de mecanismos epigenéticos. Estas alterações podem ocorrer como parte do desenvolvimento normal, mas também pode ocorrer como resultado da idade ou da exposição a fatores de risco, potencialmente resultando na carcinogênese em tecidos sadios. (SOREIDE, 2009).

Segundo estudos de LIU, et al. 2012, macroscopicamente, o tumor hepático de ratos da raça Wistar apresentou-se, coberto de nódulos cinzentos em vários tamanhos, petéquias e presença de necrose. No microscópio, as células estão dispostas em cordão sólido, infiltração dentro do tecido hepático circundante, vários graus de degeneração gordurosa, hemorragia e necrose são observados. Tecidos peritumorais mostraram edemas, eosinofilia e degeneração gordurosa, focos de proliferação das células de fígado, hiperplasia atípica e nódulos de hiperplasia (Figura 2).

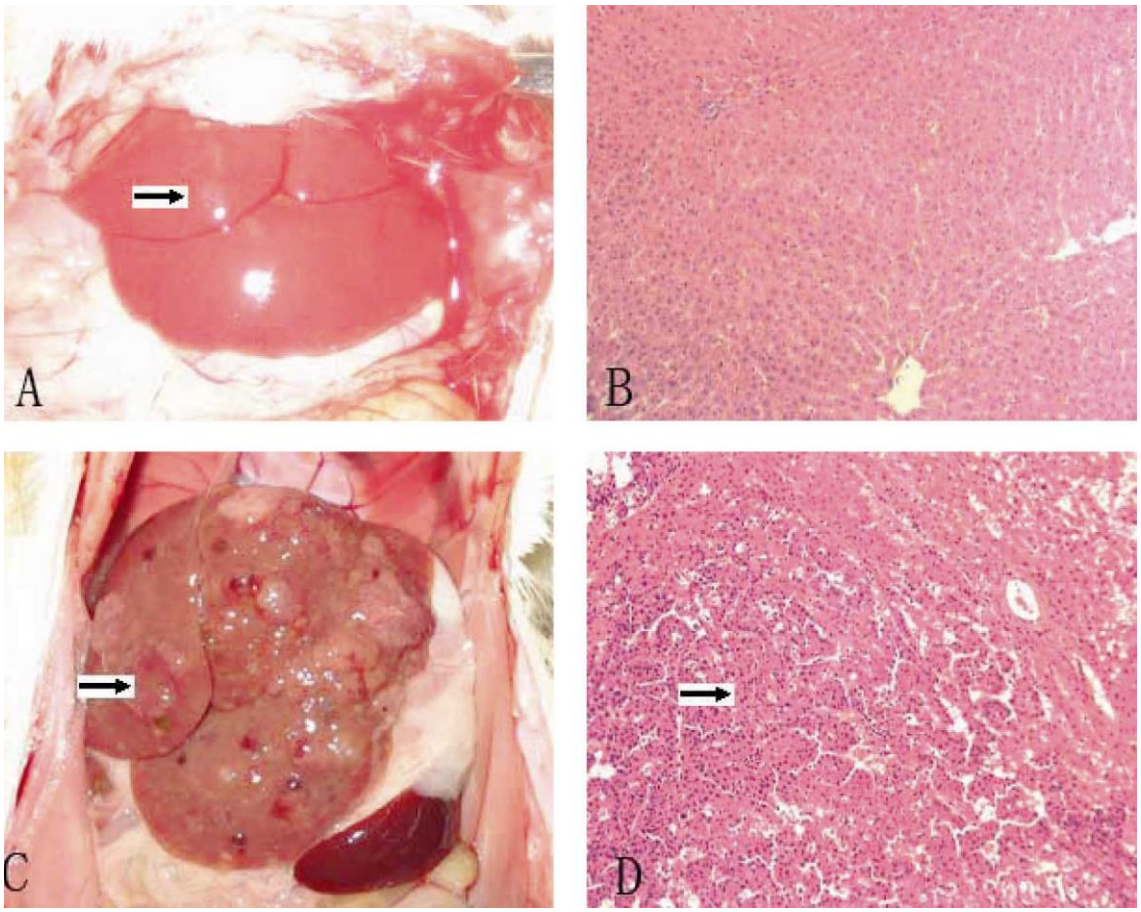


Figura 2. As alterações patológicas do fígado de rato Wistar. (A) Morfologia do fígado sadio em ratos do grupo controle: Foram observadas neste fígado superfície lisas e textura uniforme (setas demonstram o fígado normal), (B) Tecido hepático sadio do grupo controle corado com hematoxilia-eosina. Sob o microscópio, as células apresentaram-se com limites distintos dispostos radialmente para a veia central, apresentando forma poligonal com uma grande basofilia na carioteca dentro do citoplasma eosinofílico,(C) No período carcinogênese hepática, o fígado estava coberto por nódulos cinzentos em vários tamanhos, pontos hemorrágicos e necrose também foram vistos na seção (setas demonstrando o câncer de fígado), (D) Sob o microscópio, o fígado apresentava todos os sinais de câncer de célula hepática: células dispostas em cordão sólido, infiltrado no tecido hepático circundante, e vários graus de degeneração gordurosa, também foram detectados regiões hemorrágicas e necrose. Os tecidos peritumorais mostraram edema, eosinofília e degeneração gordurosa, focos de proliferação das células do fígado, nódulos hiperplásicos e hiperplasia atípica (setas demonstrando o câncer de fígado) (LIU, et al. 2012).

1.2- FUNGOS ENDOFÍTICOS

O Brasil possui cerca de 20% da biodiversidade mundial, principalmente, na floresta Amazônica (CALIXTO, 2003). Para o desenvolvimento de novos fármacos os produtos naturais tem uma alta significância. Especificamente no caso de doenças infecciosas e do câncer, estima-se que mais de 75 e 60%, respectivamente, dos fármacos atualmente empregados, são derivados de fontes naturais (NEWMAN, et al., 2003; CRAGG; NEWMAN, 2005). No geral, estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, onde 25% foram extraídos de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2003). Das 300 mil espécies de plantas existentes, cada uma são hospedeira de pelo menos um microrganismos endofítico e raras destas espécies vegetais têm sido estudadas em relação a sua biologia endofítica (STROBEL et al., 2004; ESPOSITO, AZEVEDO, 2010).

Microrganismos endofíticos foram descritos pela primeira vez em 1866, por De Bary, como organismos que vivem dentro de tecidos das plantas, sendo diferenciados dos epifíticos que vivem na superfície (ESPOSITO, AZEVEDO 2010). Os fungos endofíticos são um grupo diversificado de ascomicetos definidos por sua ocorrência assintomática dentro dos tecidos vegetais (JALGAONWALA et al., 2011; ARNOLD, 2007). A relação das plantas hospedeiras com microrganismos endofíticos confere uma associação mutualística, em que os endofíticos recebem nutrientes e proteção e por sua vez, a planta hospedeira recebe benefícios como maior resistência em ambientes adversos bióticos (insetos, herbívoros, nematoides parasitas e microrganismos fitopatogênicos) ou abióticos (pH, temperatura, estresse híbrido, ventos fortes, salinidade entre outros fatores) (ESPOSITO, AZEVEDO 2010; KHARWAR et al., 2011; ARAUJO et al., 2010; OWNLEY, GWINN 2010).

Estudos apontam que os fungos endofíticos são capazes de produzir um grande número de importantes metabólitos secundários bioativos (ALY et al., 2011; ALY et al., 2010; GREVE et al., 2010; JALGAONWALA et al., 2011). O fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (STIERLE et al., 1993) isolado a partir de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), é capaz de produzir o complexo diterpenóide Taxol, utilizado no combate de vários tipos de câncer (STIERLE et al., 1993). Outros fungos

isolados de plantas do gênero *Taxus* L. também têm a capacidade de produzir taxol (PEIXOTO NETO et al., 2004).

Microrganismos endófitos representam uma imensa e sustentável fonte de recursos de novos produtos naturais (KUSARI, SPITELLER, 2011)

1.3- EUGENIA JAMBOLANA

Pesquisas realizadas por CHAPLA 2012 foram isolados, purificados, doze fungos endofíticos oriundos de diferentes partes da planta (caule, folha e fruto) *Eugenia jambolana* da família *Myrtaceae*. Em que foram identificados dois fungos endofíticos *Saccharicola sp* e *Botryosphaeria parva*.

Eugenia jambolana (Figura 3) popularmente conhecida como jambolão tem sua etiologia na Indonésia, China e Antilhas, podendo também ser cultivado em vários outros países. No Brasil esta planta é cultivada em quase todo o território nacional, sendo encontrada nas planícies litorâneas, serras e planaltos. Desta forma, pode-se dizer que esta planta desenvolve-se em vários tipos de solos (GOMES, 1983). Os frutos da *Eugenia jambolana* são consumidos in natura, considerados como iguaria (BALIGA et al., 2011). Amplamente utilizada na medicina popular brasileira como antidiabética, hipoglicêmica, anti-inflamatória e antioxidante (VASI et al., 2009, SANTOS, et al., 2012).

Os estudos realizados até o momento com diferentes partes da planta do jambolão indicam que este possui diversos benefícios à saúde.

Extratos do fruto do jambolão apresentaram alta atividade antioxidante devido à presença de vitamina C, ácido gálico, taninos, antocianinas (BANERJEE, DASGUPTA 2005) petunidina-3-glicosídeo e a malvidina-3-glicosídeo (VEIGAS et al., 2007). Antocianinas além de propriedades antioxidantes tem ação hipoglicemiante (REYNERTSON et al., 2008). Cascas do caule da *Eugenia jambolana* também colaboram para o controle do diabetes (MATOS, 2002). Outras propriedades terapêuticas encontradas são anti-inflamatória e anticarcinogênica *(MURUGANANDAN et al., 2001).*

O óleo essencial das folhas do jambolão apresentam componentes fitoquímicos como pinocarveol, *α*-terpeneol, mirtenol, eucarvone, murolol, α-mirtenal, cineole, acetona geranil, *α*-cadinol e pinocarvone (BALIGA et al., 2011). Extratos das folhas da

Eugenia jambolana, provavelmente, devido à presença de taninos hidrolizáveis e flavonóides (BRITO et al., 2007; LIMA et al., 2007) como a miricetina e seus glicosídeos (KUSKOSKI et al., 2000; TIMBOLA et al., 2002, apresentam ação antiviral e anticarcinogênica (ONG e KHOO, 2000), anti-inflamatória (BRAGA et al., 2007; LIMA et al., 2007), antibacteriana (OLIVEIRA et al., 2007) e antialérgica (BRITO et al., 2007).



Figura 3. Morfologia externa da árvore, folhas e frutos da *Eugenia jambolana*. Fonte: Vanessa Mara Chapla.

2. OBJETIVOS

2.1- OBJETIVOS GERAIS

- O presente estudo tem por objetivo avaliar a atividade citotóxica e genotóxica de extratos brutos sintetizadas por fungos endofíticos isolados da planta *Eugenia jambolana*, por meio de experimentos *in vitro*, utilizando células de Hepatocarcinoma celular murino (Hepa-1c1c7).

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade e determinar a concentração inibitória de 50 % das células (CI_{50}), dos extratos brutos por fungos endofíticos oriundos de diferentes partes da planta (caule, folha e fruto) da *Eugenia jambolana* na linhagem celular de hepatocarcinoma murino (Hepa-1c1c7).

- Caracterizar o potencial genotóxico das frações brutas do fruto verde (Ej-fv(1)) em diferentes concentrações, utilizando o ensaio do cometa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- PROCEDIMENTOS FITOQUÍMICOS: OBTENÇÃO, ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CULTIVO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS A PARTIR DA *E. JAMBOLANA*

O processo de obtenção, isolamento, purificação e cultivo do fungo endofítico, foi realizado nas dependências do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), sob supervisão do Profª. Drª. Angela Regina Araujo.

A partir das pesquisas realizadas por Vanessa Mara Chapla, 2010, a obtenção de partes da planta como folhas, caules, frutos verdes e maduros saudáveis de *E. jambolana* foram coletadas na cidade de Araraquara-SP.

Após, partes da planta como folhas e caules jovens e saudáveis foram selecionados para o isolamento dos endófitos seguindo o procedimento de assepsia na superfície do material lavada com água corrente e sabão neutro, e esterilizada por imersão em uma solução de NaClO 1% (1 minuto), etanol aquoso 70% (1 minuto), seguida de uma dupla lavagem em água estéril (5 minutos) e posterior secagem (MAIER et al.,1997). A seguir, pedaços de folha e caule foram seccionadas assepticamente (3 a 4 de 0,5 cm) e inoculadas em placas de Petri contendo BDA (Batata Dextrose e Agar), ao qual foi adicionado, após esterilização em autoclave, antibiótico sulfato de gentamicina (100 $\mu g/mL^{-1}$) para evitar o crescimento de bactérias. O crescimento dos fungos foi monitorado até cada cultura atingir 0,5 a 1 cm de comprimento, e submetidas a sucessivas repicagens até obtenção das linhagens puras.

O isolamento dos fungos endofíticos, nos frutos verdes e maduros, foi realizado seguindo o mesmo procedimento para o isolamento dos endófitos presentes nas folhas e caule, apenas o tempo de esterilização foi alterado, devido à mudança do material vegetal. No processo de esterilização, as imersões em solução de NaClO 1%, etanol aquoso 70% e dupla lavagem em água estéril foram realizadas em 3 min, 5 min, e 5 min, respectivamente. A seguir, pedaços dos frutos foram seccionadas assepticamente (3 a 4 de 0,5 cm) e inoculadas em placas de Petri contendo BDA, ao qual foi adicionado, após esterilização em autoclave, antibiótico sulfato de gentamicina (100 μg

mL^{-1}). O crescimento dos fungos foi monitorado até cada cultura atingir 0,5-1,0 cm de comprimento, e submetidas a sucessivas repicagens até obtenção das linhagens puras.

A avaliação da pureza das linhagens foi realizada pela aparência uniforme das placas e pela utilização de microscópio. Foram obtidas sete linhagens puras, codificadas como Ej-c(1), Ej-c(3), Ej-c(4), Ej-c(5), Ej-f(1), Ej-f(2), Ej-f(3) (Ej= *Eugenia jambolana*; c=caule; f=folha), Ej-fm(1), Ej-fv(1), Ej-fv(2), Ej-fv(3), Ej-fv(4), Ej-f(5) (Ej= *Eugenia jambolana*, fm= frutos maduros, fv= frutos verdes) (Figura 5) sendo posteriormente preservados em "slants", contendo água estéril (método Castelani) e depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica, IQ-UNESP.

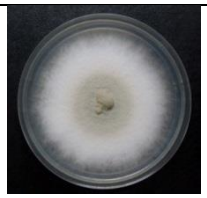
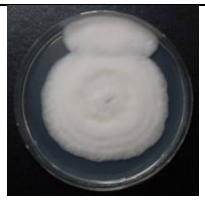
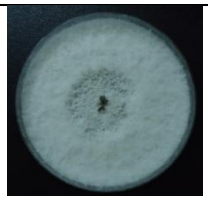
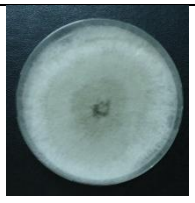
Caule		**Folha**	
Ej-c(1)		Ej-f(1)	
Ej-c(3)		Ej-f(2)	
Ej-c(4)		Ej-f(3)	
Ej-c(5)			
Fruto		Fruto	
Ej-fm(1)		Ej-fv(3)	
Ej-fv(1)		Ej-fv(4)	
Ej-fv(2)		Ej-fv(5)	

Figura 4. Fungos endofíticos isolados da *Eugenia jambolana*. Fonte: Vanessa Mara Chapla.

3.2- CULTIVO EM PEQUENA ESCALA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA EUGENIA JAMBOLANA.

Os fungos endofíticos isolados do caule, folha e frutos foram repicados para placas de Petri contendo BDA e incubado por 7, 7 e 6 dias, respectivamente. A seguir cada fungo foi inoculado em 2 frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 200 mL de meio de cultivo Czapek, os quais foram mantidos sobre a bancada a 25^{o}C por 28 dias, com agitações manuais uma vez por dia. Após esse período o caldo foi separado do micélio por filtração, o filtrado foi submetido a uma partição líquido/líquido com AcOEt (3 x 200 mL) e concentrado, fornecendo o extrato bruto de cada fungo.

Os extratos brutos foram submetidos a uma avaliação química, por CCDC (cromatografia em camada delgada comparativa) utilizando placas de sílica e eluição de Hex:AcOEt (3:7 v/v), CLAE-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo) e Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H (RMN de ^{1}H) (Figura 6).

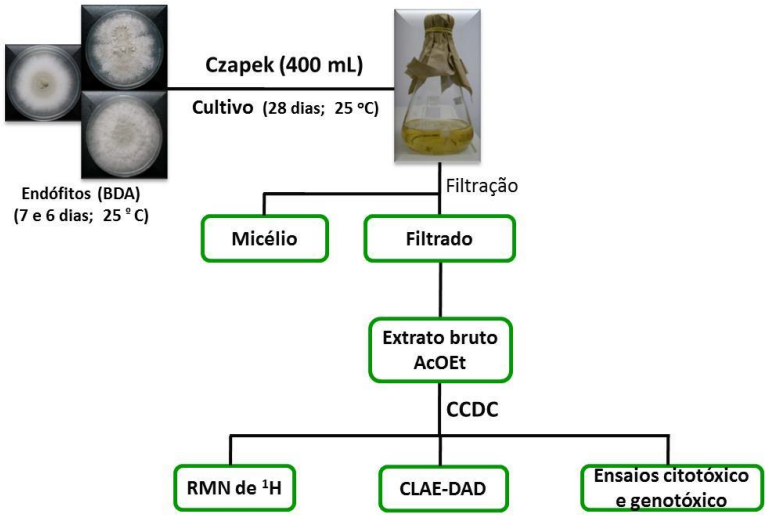


Figura 5. Esquema do cultivo em pequena escala dos extratos brutos obtidos dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos. Fonte: Vanessa Mara Chapla.

3.3- CULTURA DE CÉLULAS – HEPATOCARCINOMA MURINO HEPA 1C1C7.

O potencial efeito citotóxico, genotóxico das substâncias produzidas pelos fungos endofíticos isolados da *Eugenia jambolana* foram avaliados na linhagem de carcinoma hepatomurino 1c1c7.

Células de hepatocarcinoma murino (Hepa-1c1c7) (ATCC n. CRL-2026) foram cedidas pela o Prof. John M. Pezzutodo College of Pharmacy, University of Hawai'i at Hilo e cultivadas em meio α-MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

As células foram cultivadas em frascos de cultura, mantidas a 5% de CO_2 e temperatura de 37ºC até que a monocamada celular estivesse confluente. Posteriormente, as células foram lavadas com 5 mL de solução de Hanks (0,4 g de KCl, 0,06 g de KH_2PO_4, 0,04 g de Na_2HPO_4, 0,35 g de $NaHCO_3$, 1 g de glicose, H_2O q.s.p. 1000 mL) e tripsinizadas acrescentando-se 1 mL de ATV (Associação de Tripsina (0,2 %) e Versene (0,02 %) – Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, Brasil). Após o desprendimento da monocamada de células, estas foram homogeneizadas com volumes variados do meio acrescido de 10 % de soro fetal bovino. A suspensão celular obtida em um frasco foi transferida para outros frascos, de modo a obter 10^5 células/frasco. Esse procedimento foi repetido até que houvesse quantidade de células suficientes para os experimentos.

3.4- TRATAMENTO DAS LINHAGENS CELULARES

Para todos os experimentos as células foram tratadas com diferentes concentrações (1,2 µg/mL; 3,7 µg/ml; 11,1 µg/ml; 33,3 µg/ml e 100,0 µg/ml) de extratos brutos obtidos de diferentes partes da planta *Eugenia jambolana*. Como controle positivo, foi utilizado o peróxido de hidrogênio 1 mM, diluído em meio de cultura sem soro fetal bovino para o ensaio de citotoxicidade (MTT). O ensaio para a avaliação da genotoxicidade, foi utilizado péroxido de hidrogênio na concentração de 1mM, diluído em meio de cultura sem soro fetal bovino por 10 minutos, como controle de veículo, o meio de cultura sem soro fetal bovino contendo até 1 % de DMSO (v/v). Todos os testes foram realizados com três experimentos independentes em três replicatas.

3.5- CITOTOXICIDADE COM MTT

O método de citotoxicidade empregado foi MTT, tendo como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzirem 3-(4,5-dimetil-2-thiazolil)-2,5-difenil-2*H*-brometo tetrazólio (MTT, Sigma®), formando cristais insolúveis de formazana de coloração violeta. Foi utilizada uma suspensão de 2,5 $\times 10^3$ células/poço das linhagens Hepa 1c1c7. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, e após 24 h de cultivo, as células foram tratadas com os extratos brutos de metabólitos de fungos endofíticos da *Eugenia jambolana*. As células foram tratadas por 24 e 48 horas, procurando avaliar o efeito concentração-resposta citotóxica.

Após o tratamento descrito no item, o meio de cultura foi removido e 5 mg/mL de MTT em PBS foram adicionados em cada poço, as células na microplaca foram incubadas a 37 ºC, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazana (3 h). Para a solubilização dos cristais de formazana, 100 μL de álcool isopropílico absoluto foi adicionado a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 540 nm, foi realizada em leitor de placas (Bio-TekPowerwave X, BioTekInstruments, Inc.,USA). A porcentagem de células vivas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por ZHANG et al. 2004:

$$\text{Células vivas (\%)} = \frac{\text{Absorvância do teste- Controle Branco}}{\text{Absorvância do controle veículo – Controle Branco}} \times 100$$

3.6- ENSAIO DE GENOTOXICIDADE – ENSAIO DO COMETA

Danos causados ao DNA por mutagênicos ambientais podem ser nocivos para diversos organismos, incluindo agentes humanos. O acúmulo de mutações está relacionado com o desenvolvimento da maioria dos tumores malignos e desordens degenerativas, o mesmo ocorre como aumento da idade e com as anomalias genéticas (CUZZOCREA et al., 2001; MIGLIORE et al.,2002). Desta maneira, ao avaliarmos extratos, frações e substâncias, cujo mecanismo de ação ainda é desconhecido, faz-se necessário avaliar o efeito genotóxico, buscando caracterizar tais mecanismos. Para elucidar esses mecanismos foi proposto para avaliação da genotoxicidade do extrato bruto de metabolismos secundário do fungo endofítico isolado do fruto verde da *Eugenia jambolana*, o ensaio do cometa, que pertence à classe de testes indicadores, pois é capaz de detectar danos de DNA que podem futuramente originar mutações. As vantagens deste teste incluem: sua aplicabilidade a vários tecidos e/ou tipos celulares; a grande sensibilidade em detectar pequenos níveis de danos no DNA; a necessidade de utilizar um pequeno número de células por amostra; sua fácil execução; o curto tempo necessário para completar um experimento e obter resultados; e o seu relativo baixo custo econômico (TICE et al., 2000).

Em sua forma mais simples, o ensaio do cometa se baseia na adição de células a uma lâmina recoberta por agarose. Em contato com a agarose, ocorre lise das células e membranas nucleares, e o DNA agora exposto é submetido a uma eletroforese alcalina. Por fim, o DNA é observado por microscopia de fluorescência após a coloração das células (FIGURA 4).

Resumidamente, o DNA migra porque contém quebras que podem sofrer arraste, e esses danos aumentam frente à exposição a agentes genotóxicos (MOLLER, 2005).

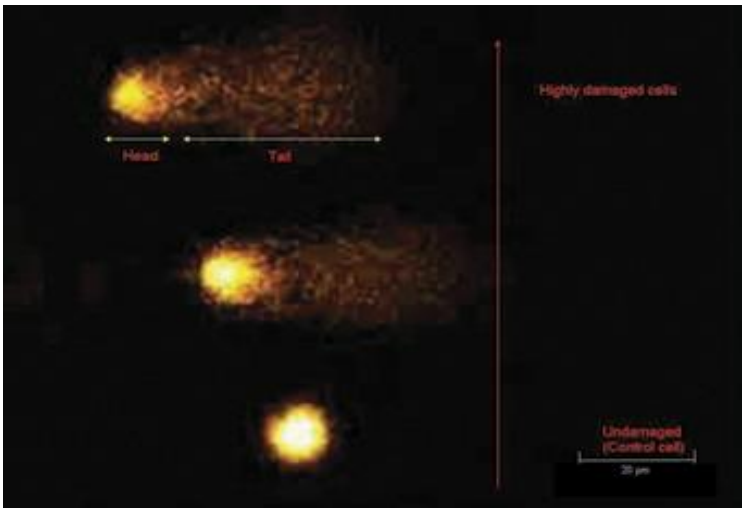


Figura 6. Níveis de dano no DNA após exposição por peróxido de hidrogênio em diversas concentrações, por meio do ensaio do cometa. Fonte: www.libyanjournalofmedicine.net/index.php, acessado em 02/10/2013

O ensaio do cometa foi realizado segundo protocolo estabelecido por Singh e colaboradores (1988). Primeiramente torna-se necessária a quantificação do ensaio o plaqueamento das células da linhagem Hepa 1c1c7 em uma concentração de 2 x 10^5 células/ml em placas de 24 poços (10^5céls/poço), para a avaliação da atividade genotóxica foram selecionadas concentrações não citotóxicas que foram determinadas pelo ensaio do MTT, as células passaram por tratamentos de 6 horas nas concentrações de 50,0 µg/ml; 25,0 µg/ml; 12,5 µg/ml de extrato bruto do fruto verde Ej-fv(1).

Posteriormente as células foram tripsinizadas da placa e ressuspendidas com agarose de baixo ponto de fusão e colocadas em lâminas limpas de microscopia óptica contendo uma fina camada de agarose ponto de fusão normal. Em seguida as lâminas preparadas foram lisadas com sal e detergente (NaCl 2,5 mM, EDTA 100 mM, Tris 10 mM) no mínimo por 3 horas e máximo 24 horas para a formação de nucleóides ligados à matriz nuclear e posteriormente aplica-se uma eletroforese alcalina (pH 13) nas condições de 25V, 280 mA por 20 minutos em uma solução de eletroforese que vai fornecer tal situação, esta solução é composta por Ácido Etilenodiaminatetracético (EDTA) e NaOH . Por fim, as lâminas são coradas com corante brometo de etídio na concentração de 0,8 mg/ml e são observadas ao microscópio de fluorescência para que sejam capturadas as imagens de 50 células por lâmina, totalizando 150 células por concentração, incluindo os controles positivo, negativo e veículo. Assim, as imagens

foram mensuradas por meio do software TRiTekComet Score™ v1.5, utilizando como parâmetro a medida da porcentagem de DNA na cauda, avaliando assim o grau de genotoxicidade do extrato bruto Ej-fv(1).

3.7- ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os resultados de citotoxicidade, no caso o MTT, a determinação da CI_{50} foram feitas linhas de tendências lineares e por meio das equações das retas obtidas, os valores foram definidos. Para comparação dos resultados foi aplicado o teste de análise de variância oneway (ANOVA) com pós teste de Tukey.

Para o ensaio do Cometa foi utilizada a comparação entre as concentrações por meio do teste não paramétrico de Kruskal Wallis com pós teste de Dunn's. As análises foram realizadas com software GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Para todos os testes estatísticos foi considerado o nível de $p<0,05$ (*$p<0,05$ **$p<0,01$ ***$p<0,001$).

4. *RESULTADOS*

4.1- ENSAIO DE CITOTOXICIDADE- MTT

A citotoxicidade dos extratos brutos obtidos dos fungos isolados de diferentes partes da planta (caule, folha e fruto) da *Eugenia jambolana* (Ej-c(1), Ej-c(3), Ej-c(5), Ej-f(1), Ej-f(2), Ej-f(3), Ej-fm(1), Ej-fv(1), Ej-fv(2), Ej-fv(3), Ej-fv(4) e Ej-fv(5)) foram avaliadas nas concentrações de 100 µg/ml, 33,3 µg/ml, 11,1 µg/ml, 3,7 µg/ml e 1,2 µg/ml (Figuras 7,8,9,10,11e 12) solubilizadas em meio de cultura na linhagem celular Hepa-1c1c7, em dois tempos de tratamento (24 e 48 h) para a determinação da CI_{50}, concentração capaz de reduzir em 50 % a viabilidade celular.

Foi possível observar diferentes perfis citotóxicos dos extratos brutos de acordo com o tempo de exposição das células Hepa-1c1c7 e da parte da planta *Eugenia jambolana* em que os fungos endofiticos foram coletados. No tratamento de 24 horas, os extratos brutos do caule Ej-c (Ej- c(1), Ej-c(3) e Ej c(5)) (Figura 7) não apresentaram atividade citotóxica. Já para o tempo de exposição de 48 horas houve CI_{50} nos extratos brutos de Ej-c(3) e Ej-c(5) nas concentrações de 84,65 µg/ml e 95,35 µg/ml, respectivamente (Figura 8). O composto Ej-c(1) também foi observado uma menor citotoxicidade na concentração de 100,0 µg/ml (Figura 8). Nas análises que correspondem o tempo de exposição de 48 horas os extratos brutos do caule Ej-c (Ej-c(1), Ej-c(3) e Ej c(5)) demostraram uma atividades citotóxica na maior concentração 100,0 µg/ml com uma viabilidade celular de 59,83%, 39,37% e 47,17% respectivamente (Figura 8). O composto Ej-c(5) também foi observado uma menor citotoxicidade com uma viabilidade de 72,9% na concentração de 33,3 µg/ml (Figura 8). As amostras da folha Ej-f (Ej-f (1), Ej-f(2), Ej-f(3)) (Figura 9) no tratamento de 24 horas, não foram citotóxicas em nenhuma das concentrações testadas. Para o tratamento de 48 horas, Ej-f(1), Ej-f(2) e Ej-f(3), apresentaram CI_{50} nas concentrações de 95,54 µg/ml, 90,8, µg/ml e 26,91 µg/ml, respectivamente (Figura 10). A atividade citotóxica também foi observada nas amostras da folha Ej-f (Ej-f (1), Ej-f(2), Ej-f(3)) em sua maior concentração de 100,0 µg/ml havendo viabilidade celular em 40,0%, 43,82% e 10,97%, respectivamente. O composto Ej-f(3) também apresentou uma viabilidade celular de 47% na concentração de 33,3 µg/ml (Figura 10). Os extratos brutos do fruto Ej-fv(1) e Ej-fv(3) (Figura 11), para o tempo de tratamento de 24 horas, foi observado citotoxicidade atingindo o CI_{50} nas concentrações de 65,57 µg/ml e 85,75 µg/ml, respectivamente (Figura 11). Já para amostra Ej-fm(1) houve CI_{50} na concentrações

46,53 µg/ml (Figura 11). Na análise dos resultados das amostras do fruto Ej-fv(1), Ej-fv(2) e Ej-fv(3) houve citotoxicidade nas concentração de 100,0 µg/ml, onde apresentaram viabilidade celular de 13,26%, 58,43% e 40,31%, respectivamente (Figura 11). Para amostra Ej-fm(1) houve citotoxicidade nas concentrações 100,0 µg/ml, 33,3 µg/ml e 11,1 µg/ml, onde representaram viabilidade celular de 36,5%, 22,97% e 36,63% respectivamente (Figura 11). Para o tratamento de 48 horas, as amostras do fruto verde Ej-fv(1), Ej-fv(2), Ej-fv(3), Ej-fv(4) e Ej-fv(5) foram observados CI_{50} nas concentrações de 61,18 µg/ml, 79,47 µg/ml, 76,9 µg/ml, 95,98 µg/ml e 88,21 µg/ml, respectivamente (Figura 12). O composto do Ej-fm(1) apresentou o CI_{50}= 66,14 µg/ml (Figura 12). As amostras do fruto Ej-fv(1), Ej-fv(2), Ej-fv(3), Ej-fv(4) e Ej-fv(5) foi observado atividade citotóxica das células na concentração de 100,0 µg/ml com viabilidade celular de 12,44%, 35,07%, 31,17%, 47,14% e 42,21%, respectivamente (Figura 12). O composto do Ej-fm(1) nas concentrações 100,0 µg/ml, 33,3 µg/ml e 11,1 µg/ml tiveram uma viabilidade celular de 27,5 %, 18,53% e 29,20% (Figura 12).

A análise estatística foi realizada com o teste oneway ANOVA com pós-teste de Tukey (Tratados *vs CV*).

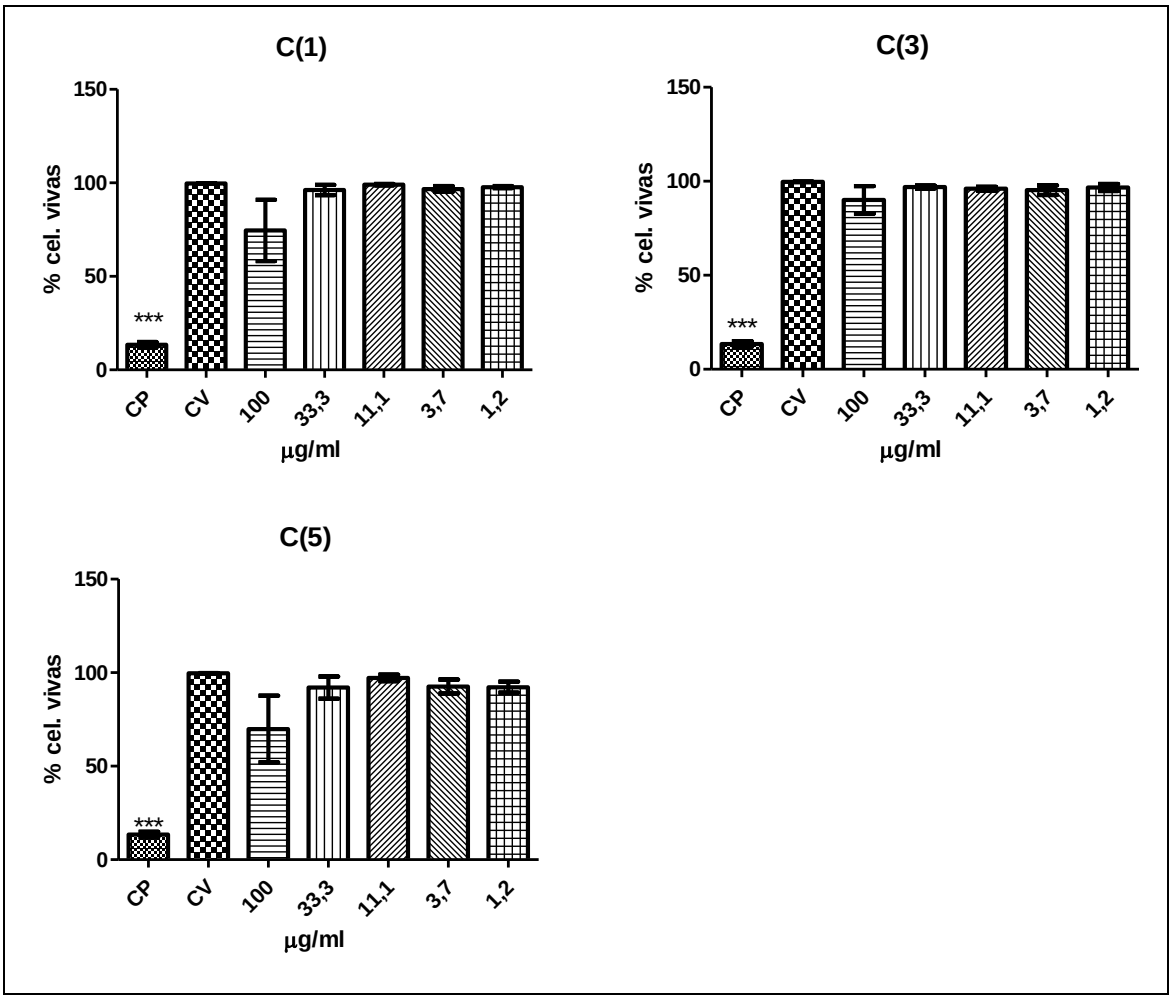


Figura 7. Ensaio de citotoxicidade (MTT). Extratos brutos de fungos endofíticos da *Eugenia jambolana* isolados do caule (EJ-c): Ej-c(1), Ej-c(3) e Ej-c(5) em linhagem celular de hepatocarcinoma murino (Hepa-1c1c7), no tratamento de 24 horas. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). CP (controle positivo, peróxido de hidrogênio a 1,0 mM) e CV (controle de veículo – DMSO 1%). *Oneway* ANOVA com pós-teste de Tukey (Tratados *vs CV*); *** $p < 0,001$.

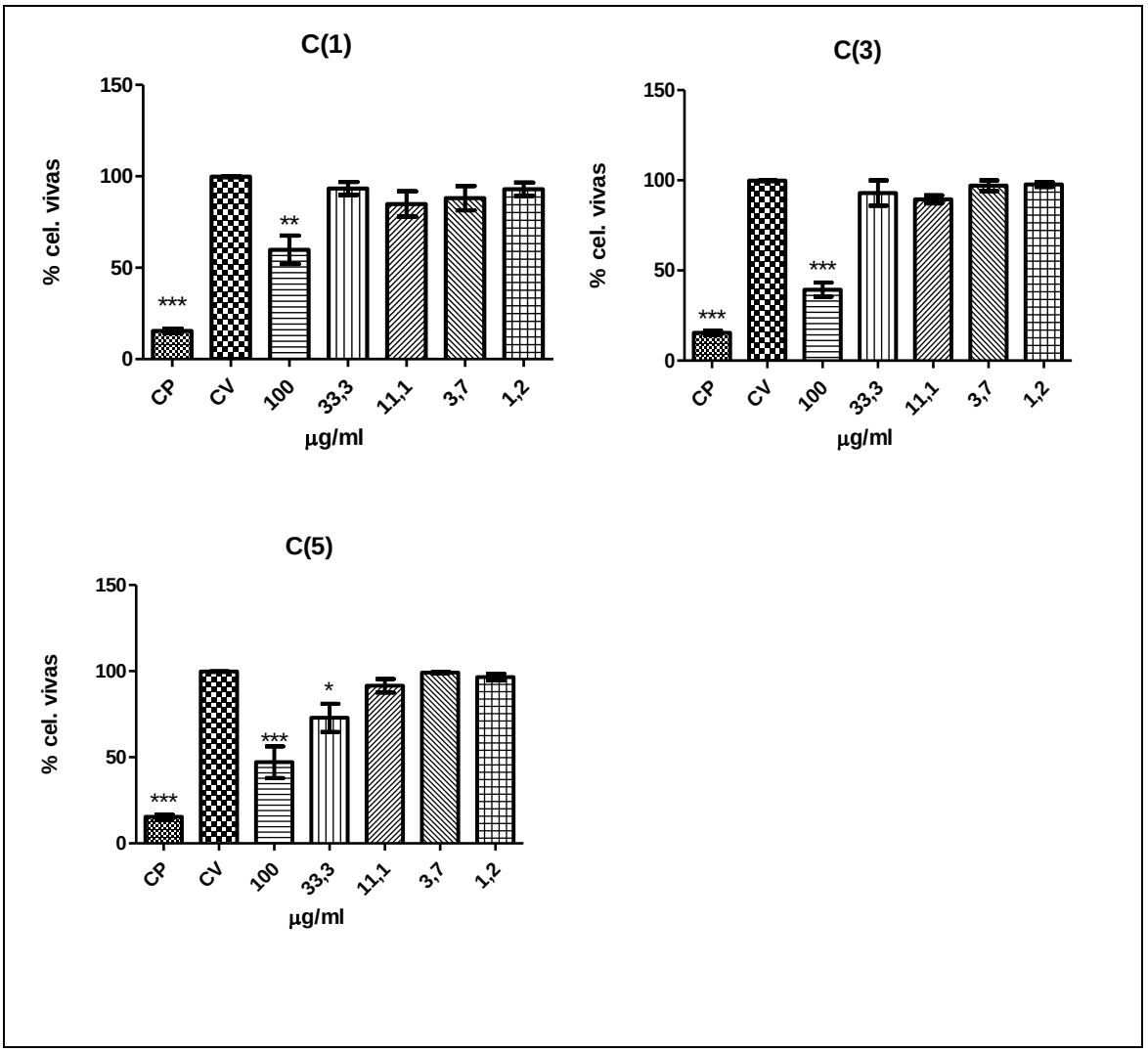


Figura 8. Ensaio de citotoxicidade (MTT). Extratos brutos de fungos endofíticos da *Eugenia jambolana* isolado do caule *(*Ej-c): Ej-c(1), Ej-c(3) e Ej-c(5) em linhagem celular de hepatocarcinoma murino (Hepa-1c1c7), no tratamento de 48 horas. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). CP (controle positivo, peróxido de hidrogênio 1,0 mM) e CV (controle de veículo – DMSO 1%). *Oneway* ANOVA com pós-teste de Tukey (Tratados *vs CV*).* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

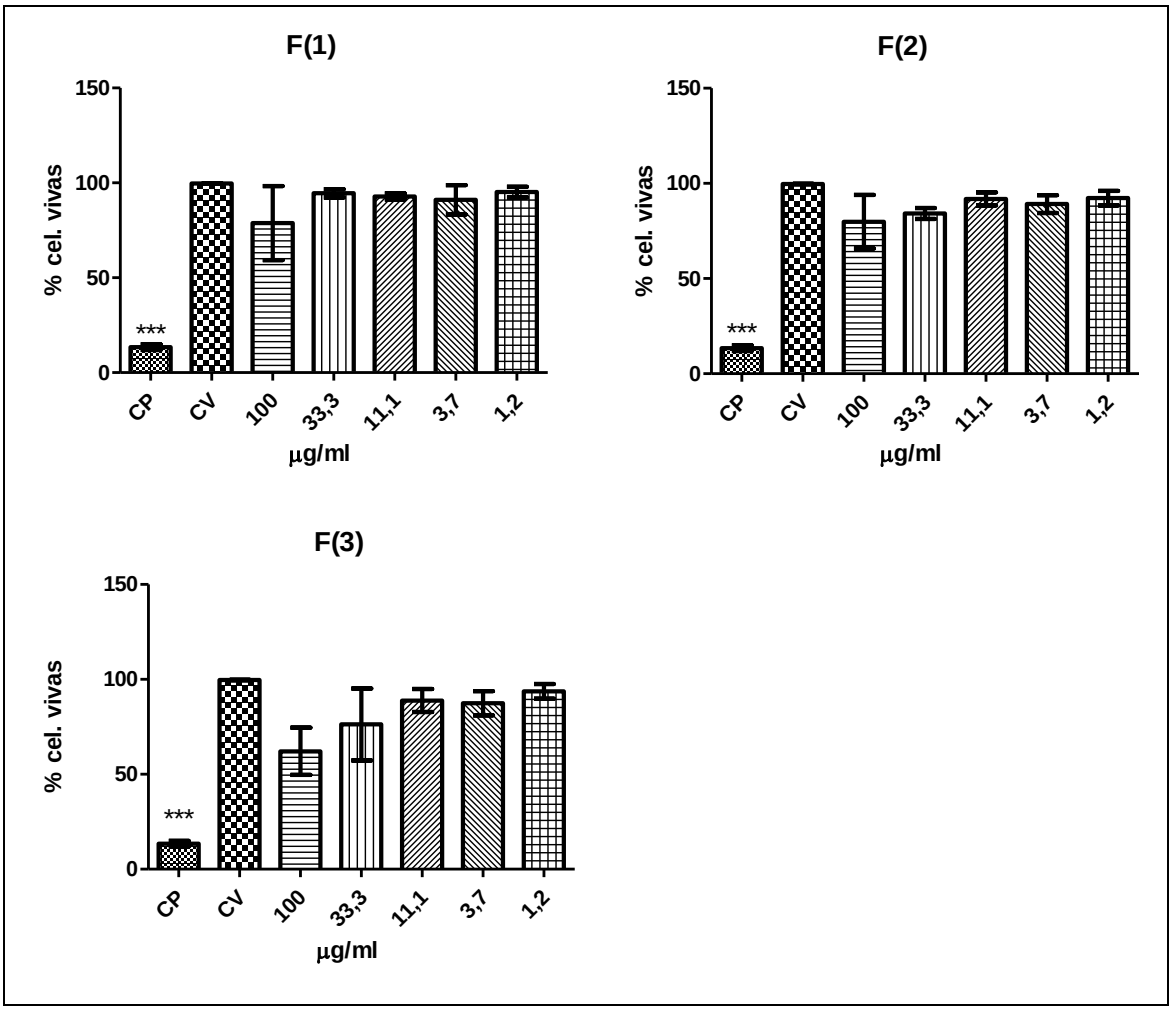


Figura 9. Ensaio de citotoxicidade (MTT). Extratos brutos de fungos endofíticos da *Eugenia jambolana* isolados da folha (Ej-f): Ej-f(1), Ej-f(2) e Ej-f(3) em linhagem celular de hepatocarcinoma murino (Hepa-1c1c7), no tratamento de 24 horas. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). CP (controle positivo, peróxido de hidrogênio 1,0 mM) e CV (controle de veículo – DMSO 1%). *Oneway* ANOVA com pós-teste de Tukey (Tratados *vs CV*). *** $p < 0{,}001$.

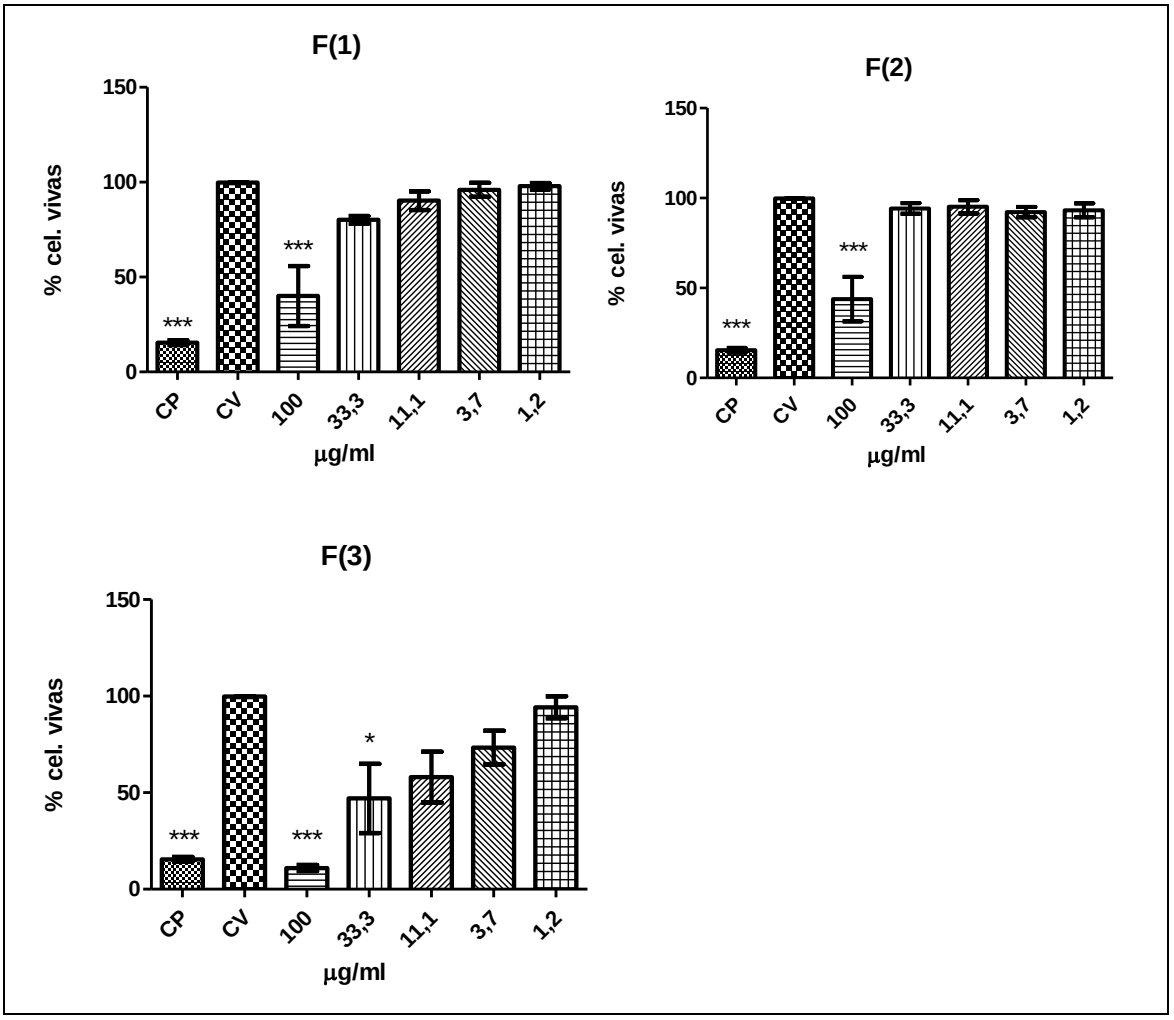


Figura 10. Ensaio de citotoxicidade (MTT). Extratos brutos de fungos endofíticos da *Eugenia jambolana* da folha (Ej-f): Ej-f(1), Ej-f(2) e Ej-f(3), respectivamente em linhagem celular de hepatocarcinoma murinho (Hepa-1c1c7), no tratamento de 48horas. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). CP (controle positivo, peróxido de hidrogênio 1,0 mM) e CV (controle de veículo – DMSO 1%). *Oneway* ANOVA com pós-teste de Tukey (Tratados *vs CV*). * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$.

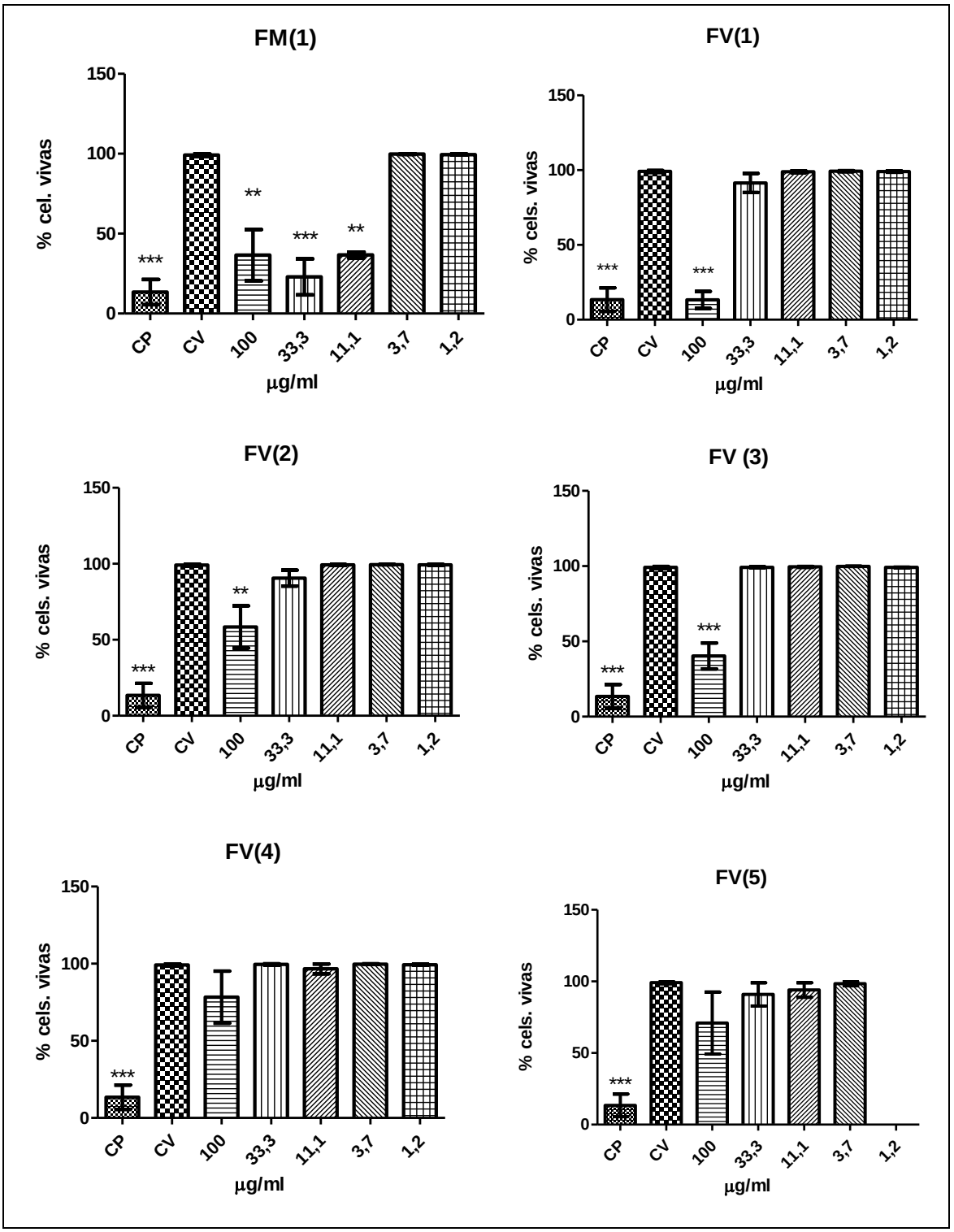


Figura 11. Ensaio de citotoxicidade (MTT). Extrato bruto de fungos endofíticos da *Eugenia jambolana* isolado do fruto maduro (Ej-fm1) e extratos bruto da *Eugenia jambolana* isolados do fruto verde (Ej-fv): Ej-fv(1), Ej-fv(2), Ej-fv(3,) Ej-fv(4) e Ej-fv(5) em linhagem celular de hepatocarcinoma murino (Hepa-1c1c7), no tratamento de 24 horas. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). CP (controle positivo, peróxido de hidrogênio 1,0 mM) e CV (controle de veículo – DMSO 1%). *Oneway* ANOVA com pós-teste de Tukey (Tratados *vs CV*). ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

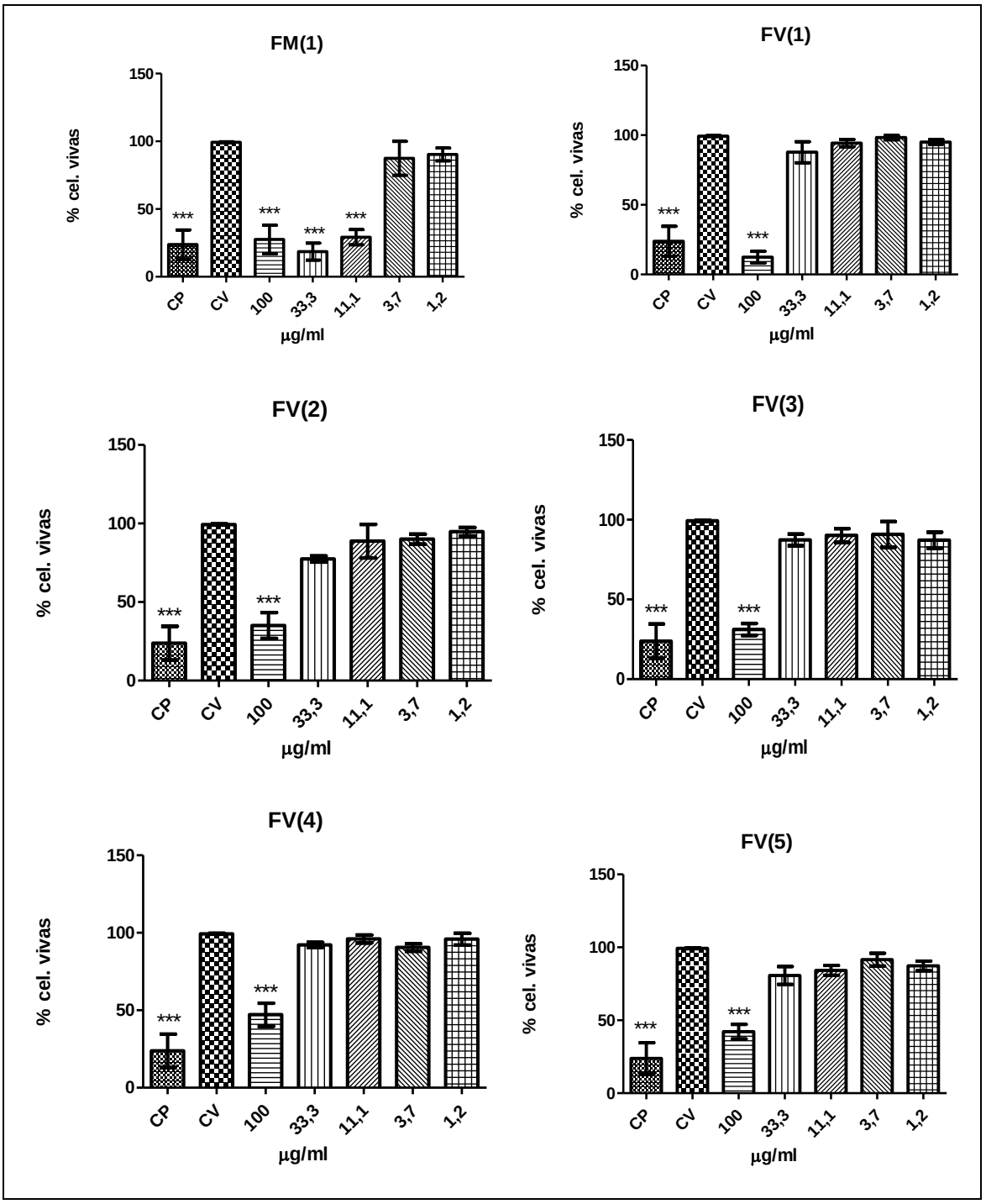


Figura 12. Ensaio de citotoxicidade (MTT). Extratos brutos de fungos endofíticos da *Eugenia jambolana* isolado do fruto maduro (Ej-fm1) e extratos da *Eugenia jambolana* isolados do fruto verde (Ej-fv): Ej-fv(1), Ej-fv(2), Ej-fv(3,) Ej-fv(4) e Ej-fv(5) em linhagem celular de hepatocarcinoma murino (Hepa-1c1c7), no tratamento de 48 horas. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). CP (controle positivo, peróxido de hidrogênio 1,0 mM) e CV (controle de veículo – DMSO 1%). *Oneway* ANOVA com pós-teste de Tukey (Tratados *vs CV*). *** $p < 0{,}001$.

4.2- AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE - ENSAIO DO COMETA

De acordo com o teste da redução do MTT, a amostra Ej-fm(1) apresentou citotoxicidade em diferentes concentrações que os demais extratos brutos, desta forma, Ej-fm(1) foi direcionado para outras pesquisas. Sendo assim, o composto escolhido para o ensaio do cometa foi Ej-fv(1), onde apresentou porcentagens de morte celular. Para a realização deste ensaio foram utilizadas concentrações não citotóxicas. Os resultados do ensaio do Cometa para avaliação de genotoxicidade, por meio da medida de fragmentação do DNA na cauda distante do nucleóide estão demonstrados na (Figura 13). Foi utilizado a linhagem celular Hepa 1c1c7 tratadas em diluição seriada de 12,5, 25,0 e 50,0 μM de extrato bruto de metabólitos secundários da parte do fruto verde da planta *Eugenia jambolana* Ej-fv(1) . Para a realização do experimento, as células foram tratadas por 6 horas. Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão (M±EP) da porcentagem de DNA na cauda. As análises estatísticas de variância foram feitas pelo teste Kruskal Wallis com pós-teste de Dunns (Tratados vs CV). Sendo a significância representada por * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$.

Para o tratamento por 6 horas, as concentrações testadas de Ej-fv(1) apresentaram concentração-resposta significante quando comparadas ao controle de veículo (DMSO 1%) , sendo que nas maiores concentrações 50,0 μM e 25,0 μM esta significância apresentou-se maior. Para a concentração de 50 μM a porcentagem de DNA fragmentado na cauda foi de 11,06%, já para a concentração de 25 μM a porcentagem foi de 7,58% (Figura 13).

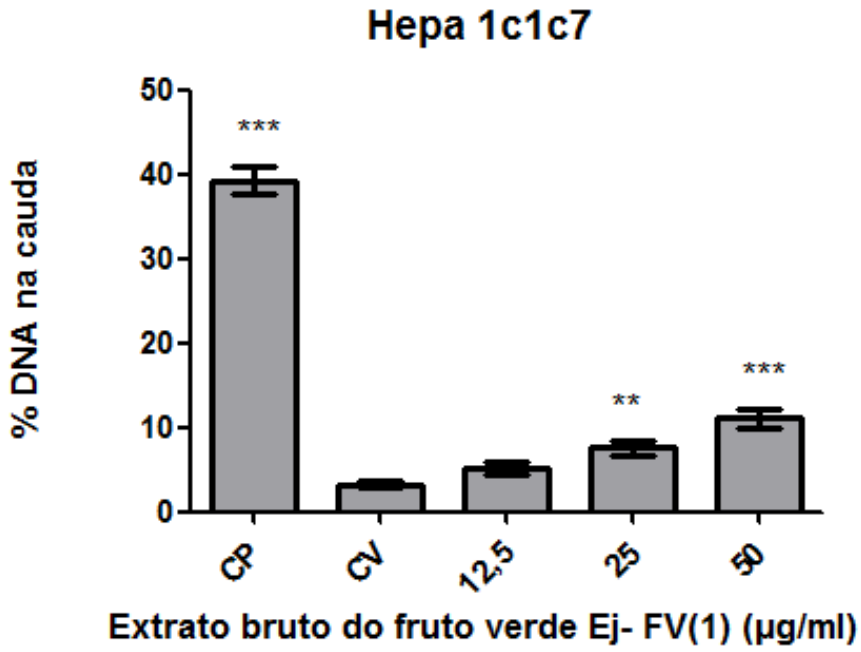


Figura 13. Genotoxicidade da Ej-fv(1) representada pela % de DNA na cauda em linhagem celular Hepa 1c1c7 tratadas com 12,5 µg/ml, 25,00 µg/ml e 50,0 µg/ml por 6 h. Resultados são expressos como a média da % de DNA na cauda de 150 células por concentração e controles e analisados por *Kruskal-Wallis test* com pós-teste de Dunn's (tratados *vs* CV). CP: 1mM de peróxido de hidrogênio por 10 minutos, CV: controle de veículo DMSO 1%, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

5. *DISCUSSÃO*

Na medicina popular muitos produtos naturais são utilizados para fins terapêuticos sendo utilizados como analgésicos, diuréticos, tranquilizantes, entre outros. A partir de espécies de plantas ou derivados de protótipos naturais foram obtidos drogas quimioterápicas (COSTA-LOTUFO et al., 2005).

Microrganismos endofíticos vêm sendo considerados fontes importantes de produtos naturais (KUSARI, SPITELLER 2011) devido aos metabólitos secundários que apresentam atividades biológicas de grande interesse terapêutico como potenciais de drogas antitumorais. (GUNATILAKA 2006). A descoberta do quimioterápico Taxol originário do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (STIERLE et al. 1993) foi isolado, inicialmente das cascas de árvores da família Taxus (*Taxus brevifolia*) (WANI et al., 1971).

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de rastreamento do National Cancer Institute dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

Estudos realizados por SOUWALAK PHONGPAICHIT, et al., 2007, demonstraram que os extratos brutos provinintes do metabolismo secundário de fungos endofíticos isolado da planta *Garcinia sp* apresentavam atividades biológicas como antifúngica, antibacteriana, antivirais e antitimorais. Através dos ensaios de citotoxicidade MTT (ensaio colorimétrico baseado na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolio em azul de formazana) e SRB (Ensaio de sulfarrodamina B) foram observados atividade citotóxica para a linhagem tumoral pulmonar (NCI-H187) e tumor epitelial oral (KB), respectivamente. Os valores de IC_{50} encontrados para NCI-H187 e KB foram 4,16–13,17 $\mu g\ mL^{-1}$ e 0,06–8,44$\mu g\ mL^{-1}$, respectivamente.

CHAPLA, 2012, relatou atividade biologica antitumoral com os extratos brutos de metabólitos secundários da planta *Eugenia jambolana* das amostras Ej-c(3) para as linhagens tumorais HCT-8 (cólon - humano), MDAMB-435 (mama - humano), SF-295

(glioblastoma - humano) e Ej-fm(1) HCT-116 (cólon - humano), OVCAR (carcinoma de ovário), SF-295 (glioblastoma - humano) através do método do MTT.

Dos resultados do estudo presente, pode-se observar que os extratos brutos oriundos dos fungos endofíticos das partes da planta da *Eugenia jambolana* induziram diferentes perfis citotóxicos de acordo com o tempo de exposição (24 e 48 horas) nas células Hepa- 1c1c7. Os extratos brutos do caule Ej-c e da folha Ej-f para o tempo de exposição de 24 horas não ocorreram citotoxicidade significativa em nenhuma das concentrações testadas. No tempo de exposição de 48 horas ocorreram citotoxicidade apenas nas maiores concentrações dos extratos brutos Ej-c e Ej-f testadas na linhagem Hepa-1c1c7. Em concentrações menores as porcentagens de morte celular foram baixas não havendo variação significativa. Para os extratos brutos do fruto Ej-fv e Ej-fm(1), o perfil citotóxico para o tratamento de 24 horas foi significativo para diferentes concentração da amostra Ej-fm(1) e para as amostras Ej-fv(1), Ej-fv(2) e Ej-fv(3), houve citotoxicidade apenas na maior concentração. No tempo de exposição de 48 horas as amostras dos extratos bruto Ej-fv tiveram citotoxidade apenas na maior concentração enquanto para Ej-fm(1) diferentes concentrações da amostra apresentaram efeito citotóxico significativo na linhagem Hepa-1c1c7, corroborando com os dados dos estudos de CHAPLA 2012 e SOUWALAK PHONGPAICHIT et al., 2007.

Para a avaliação dos níveis de dano no DNA, existem algumas técnicas disponíveis. A eletroforese de células isoladas (ensaio do cometa), por exemplo, de células epiteliais humanas, nos permite avaliar o índice de danos no DNA. É uma técnica simples, rápida e não requer altos investimentos com equipamentos analíticos. Os cometas podem ser classificados por imagem computacional em diversas categorias, com base no comprimento de migração e na proporção relativa de DNA na cauda, atribuindo-se características a cada classe de migração (COSTA et al., 2001).

O dano ao DNA, no ensaio do cometa pode ser induzido por drogas, radiações e substâncias inorgânicas. A exposição do DNA ao estresse oxidativo leva a mais de 20 diferentes tipos de dano (produzindo bases nitrogenadas oxidadas) (COSTA et al., 2001). O dano mais comum às purinas é a formação do produto oxidado 8-oxo-dG, o qual é usado para avaliação de ensaios ao DNA (BARZILAI & YAMAMOTO 2004).

Investigação de dano ao DNA em células HepG2 pelo ensaio do cometa tem sido usada como biomarcador sensível para avaliar os efeitos genotóxicos, além disso este ensaio é conveniente para estudar quantitativamente as relações concentração-resposta *in vitro* (UHL et l., 2003)

Componentes presentes nas folhas e frutos da *Eugenia jambolana,* como polifenóis e taninos podem estar relacionados com atividade genotóxica nas maiores concentrações, pois tais compostos apresentam-se tóxicos também em maiores concentrações (KASHIWADA et al., 1992).

Pesquisas de AGUSTONI 2012, em células HepG2 apontam que em altas concentrações de extratos brutos de folhas e frutos da Eugenia jambolana apresentou grau de genotoxicidade significante.

Dessa maneira faz-se necessária a utilização do teste do cometa para avaliar a atividade genotóxica de Ej-fv(1), pois no presente estudo, esse composto demonstrou ser um agente genotóxico. Para o tempo de tratamento propostos, houve genotoxicidade para a linhagem Hepa 1c1c7, na exposição de Ej-fv(1) onde observou-se taxas significantes de dano no DNA, representada pela porcentagem de DNA na cauda da célula com 50,0 μM, 25,0 μM e 12,5 μM de Ej-fv(1) na linhagem tumoral Hepa 1c1c7, Corroborando com o estudo de AGUSTONI 2012.

6. CONCLUSÕES

1) Os extratos brutos de metabolismos oriundos de fungos endofíticos extraídos do caule, folha, fruto verde e fruto maduro da *Eugenia jambolana*, apresentaram citotoxicidade de acordo com o tempo de exposição da amostra, concentração e parte da planta nas linhagens de hepatocarcinoma celular murino (Hepa-1c1c7).

2) A avaliação de genotoxicidade pelo ensaio do Cometa, demonstrou que o tratamento com Ej-fv(1) ocasionou danos genotóxicos na linhagem de hepatocarcinoma celular murino (Hepa 1c1c7) no tempo de 6 horas de tratamento.

7. REFERÊNCIAS

AGUSTONI, D. **Avaliação da capacidade de quimioprevenção de Eugenia jambolana em linha de hepatocarcinoma celular (HepG2 Hepa-1c1c7).** 2012. 116f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

ALBERTS, D. S.; COLVIN, G. M.; CONNEY, A. H. Prevention of cancer in the next millennium: Report of the Chemoprevention Working Group to the American Association for Cancer Research.**Cancer Research**, v. 59, n. 19, p. 4743-4758, 1999.

ALY, H. A.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Appl Microbiol Biotechnol**., v. 90, p. 1829–1845, 2011.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; Kjer, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, p. 1–16, 2010.

ARAUJO, W.L.; LACAVA, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; SOBRAL, J. K.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. **Guia Prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba:CALO, 2010. 167p.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biol. Rev.**, v. 21, p. 51-66, 2007.

BALIGA, M. S.; BHAT, H.; BALIGA, B.R. V.; WILSON, R.; PALATTY, P. L. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. **Food Res. Inter.**, v. 44, p. 1776–1789, 2011.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; de, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chem.**, v. 90, p. 727-733, 2005.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. I. Review: DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair**, v.3(8-9), p.1109-1115, 2004.

BENVEGNÙ, L., GIOS, M., BOCCATO, S. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. **Gut**., v.53,p.744-749, 2004.BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. **The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts**. Biochemica**,** v. 4, p. 14-19, 1996.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. de O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J. Ethnopharmacology**, v. 111, p. 396-402, 2007.

BRITO, F. A.; LIMA, L. A.; RAMOS, M. F. S.; NAKAMURA, M. J.; MACHADO, S. C. C.; SIANI, A. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; SAMPAIO, A. L. F. Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Braz J. Med Biol. Res.**, v. 40, p. 105-115, 2007.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, v.55, n. 3, pp. 37-39, 2003.

CHAPLA, V. M. **Estudo químico e biológico dos fungos endofitícos isolados da espécie vegetal *Eugenia jambolana***. 2012. 52 f. Exame Geral de Qualificacão (Doutorado em Quimica). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D.J. Plants as source of anticancer agents. **J. Ethnopharmacol**., v.100, p.72-79, 2005.

COSTA-LOTUFO,L.V.et al**.** Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p.21-30, 2005.

COSTA, R.M.A.; LIMA, W.C.; VOGEL, C.I.G.; BERRA C.M.; LUCHE, D.D.; MEDINA-SILVA, R.; GALHARDO, R.S.; MENCK, C.F.M.; OLIVEIRA, V.R. DNA repair-related genes in sugarcane expressed sequence tags (ESTs). **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.131-140, 2001.

CUZZOCREA, S.; RILEY, P.D.; CAPUTI, P.A.; SALVEMINI, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, in xammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 135–159, 2001.

MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. **Mutation Res,** v. 512, p. 135–153, 2002.

El-SERAG H, RUDOLPH K. Hepatocellular Carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. **Gastroenterology**, v.132, n.7, p. 2557-2576, 2007

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: EDUCS 2010.

FALCOSKI, T.O.R.S**. Avaliação da capacidade quimiopreventiva das substâncias fenólicas isoladas de *Inga laurina* por abordagem genômica e proteômica em linhagens de hepatocarcinoma celular (HepG2 e Hepa 1c1c7).** 2013. 71f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

FATTOVICH, G., PANTALENA., M., ZAGNI, I. Effect of hepatitis B and C virus infections on the natural history of compensated cirrhosis: a cohort study of 297 patients. **Am J Gastroenterol.**, v.97, p.2886-2895, 2002.

FELDMAN, M.; FRIEDMAN, L., BRANDT, L. **"Sleisenger and Fordtran's** – gastrointestinal and liver disease". 8th ed, 2006. p.1885 – 1893.

GREENWALD, P.; KELLOFF, G.; BURCH-WHITMAN, C.; KRAMER, B. S. Chemoprevention. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 45, n. 1, p. 31-49, 1995.

GREVE, H.; MOHAMED, I. E.; PONTIUS, A.; KEHRAUS, S.; GROSS, H.; KONIG, G. M. Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. **Phytochem. Rev.**, v. 9, p. 537-545, 2010.

GOMES, R.P. **Fruticultura brasileira**. 9. ed. São Paulo: Nobel, 1983. 269. p.

GUNATILAKA, A. A. L. J. Natural Products from Plant-associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. **Nat.Prod**., v. 69, p. 509- 526, 2006.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativas e incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa. Acesso em: 02 out 2013.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAM, R. T. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **J. Microb. Biotechnol. Research**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.

KASHIWDA, Y., NONAKA, G., NISHIOKA, I., CHANG, J., LEE, K.. Tannins and related compouds as selective cytotoxic agents. **Journal of Natural Prodructs** v.55, p.1033-1043, 1992.

KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S. K.; STIERLE, A.; STIERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Nat. Prod. Rep.**, v. 28, p. 1208-1228. 2011.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Nat. Prod. Rep**., v. 28, p. 1203-1207, 2011.

KUSKOSKI, E. M.; MARQUES, P. T.; FETT, R. Estudo comparativo da estabilidade das antocianinas do baguaçu, jambolão e da uva. **Rev. Bras. Cor. Nat.**, v. 4, n. 1/2, p. 73-76, 2000.

LIMA, L. A.; SIANI, A. C.; BRITO, F. A.; SAMPAIO, A. L. F.; OLIVEIRA, M. G. M.; RIEHL, H. C. A. S. Correlation of anti-inflammatory activity with phenolic content in the leaves of *Syzygium cumini* (L.) skeels (Myrtaceae). **Quimica Nova**, v. 30, n. 4, p. 860-864, 2007.

LIU, H.; ZHANG, L.; CHEN, S.; WANG, Z.; HUANG, F. & WANG, D. The role and significance of Bcl-2 and Bax in the hepatic carcinoma. **Int. J. Morphol**., v.30, n.4,p.1466-1473, 2012.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais – guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. Fortaleza: Edições UFC, 2002. p. 344.

MURUGANANDAN, S.; SRINIVASAN, K.; CHANDRA, S.; TANDAN, S. K.; LAL, J.; raviprakash, V. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. **Fitoterapia**, v. 72, p. 369-375, 2001.

MAIER, W.; HAMMER, U.; DAMMANN, U.; SCHULZ, B.; STRACK, D. Acumulation os sesquiterpenoid cyclohexenone derivates induced by an arbuscular mycorrhizal fungus in members of the Poaceae. **Planta**, v. 202, p. 36-42, 1997.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). The global burden of disease: 2004 update. Genebra, Suíça: WHO Press, 2008. 116p.

MOLLER, P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. **Basic &Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96 Supl 1, p. 1-42, 2005.

MONTESANO, R.; HALL, J. Environmental causes of human cancers. **Europ. J. Cancer**,
v. 37,p.567-587, 2001.

OLIVEIRA, G. F.; FURTADO, N. A. J. C.;SILVA FILHO, A. A. S.; MARTINS, C. H. G.; Bastos, J. K.; Cunha, W. R.; Silva, M. L. A. Antimicrobial activity of *Syzigium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Braz. J. Microbiology**, v. 38, p. 381-384, 2007.

ONG, K. C.; KHOO, H. E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. **Life Sciences**, v. 67, p. 1695-1705, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). The global burden of disease: 2004

update. Genebra, Suíça: WHO Press, 2008,116p

OWNLEY, B. GWINN, K.; VEJA, F. E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **BioControl.,** v. 55, p. 113-128, 2010.

PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; CAETANO, L.C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín LatinoAmericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.3,p.67-9, 2004.

PEZZUTO, J. M.; KOSMEDER, J. W.; PARK, E. J. Chapter 1: Characterization of Natural Product Chemopreventive Agents. **Cancer Chemoprevention, Volume 2: Strategies for Cancer Chemoprevention**. v. 2, 2005.

PHONGPAICHIT, S. et al. Biological activities of extracts from endophyct fungi isolated from Garcinia plants. **FEMS Immunol Med Microbiol.,** v. 51, p. 517-525, 2007.

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B,; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chem.,** v. 109, p. 883-890, 2008.

ROMÃO. A.M.M. **Relação entre a alpha-fetoproteína, Doença Hepática Crónica e Carcinoma Hepatocelular, e o estudo imagiológico tumoral.** 2009.86f. Tese (Mestrado em Medicina). Faculdade de Ciências da Saúde-Universidade da Beira Interior, Corvihã, 2009.

SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E. S.; BRAGA, M. F. B. M.; GUEDES, G. M.M.; ROLÓN, M.; VEGA, C.; ARIAS, A. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. A.; COUTINHO, H. D. M. Cytotoxic, Trypanocidal, and Antifungal Activities of *Eugenia jambolana* L. **J. Med. Food**., v. 15, n. 1, p. 66–70, 2012.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARRE,J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.,** v.82, p.1107 – 1112, 1990.

SORBO, J. M**. Efeito antitumoral, genotóxico e mutagênico de nitensidina A em camundongos *nude* BALB/c com implante tumoral xenográfico de células imortalizadas com HPV-16 (SiHa).** 2011. 94f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

SOREIDE K, NEDREBO BS, KNAPP JC, GLOMSAKER TB, SOREIDE JA, KORNER H. Evolving molecular classification by genomic and proteomic biomarkers in colorectal cancer: potential implications for the surgical oncologist. **Surg Oncol**. 2009;18:31–50.

SOUZA, F. O. **Avaliação citotóxica, pró-apoptótica , genotóxica e mutagênica de nitensidina B em células tumorais cervicais humanas.** 2013. 80f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

STIERLE A, STROBEL G., STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Sci.** v. 260, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 257-268, 2004.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TIMBOLA, A. K.; SZPOGANICZ, B.; BRANCO, A.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G. A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 2, p. 174-176, 2002.

UHL, M., HELMA, C., KANASMULLER, E. Evaluatuin of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatome (HepG2) cells. Mutation Research, v. 468, p. 213-225, 2000.

VASI, S.; AUSTIN, A. Antioxidant potential of *Eugenia jambolana* Lam. Seeds. **J. Biol. Sci.**, v. 9, n. 8, p. 894-898, 2009.

VELOSA, J. Lesões precursoras de cancro do fígado. **Jornal Português de Gastrenterologia,** v.18, n.6, 2011.

VEIGAS, J. M.; NARAYA, M. S.; LAXMAN, P. M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. **Food Chem.,** v. 105, p. 619-627, 2007.

WANI, M.C., H.L. TAYLOR, M.E. WALL, P. COGGON and A.T. McPHAIL. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J. Am. Chem. Soc.,** v. 93, p. 2325-2327, 1971.

ZHANG, Y.; WU, L.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharmaceutica,** v. 25, p. 83-89, 2004.

Dados finais

Araraquara, 09 de janeiro de 2014

_____

Aluna

Franciele Garcia Baveloni

De acordo,

_____

Orientador

Profª Dra.Christiane Pienna Soares