

Valdelúcia Maria Alves de Souza Grinevicius

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATOS DE
Piper nigrum Linnaeus cultivar Bragantina
(PIPERACEAE)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa.

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Grinevicius, Valdelúcia Maria Alves de Souza

Atividade antitumoral de extratos de *Piper nigrum*

Linnaeus cultivar Bragantina (PIPERACEAE) / Valdelúcia Maria Alves de Souza Grinevicius ; orientadora, Rozangela Curi Pedrosa - Florianópolis, SC, 2016.

204 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Bioquímica.

Inclui referências


1. Bioquímica. 2. *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina. 3. extração supercrítica. 4. atividade citotóxica e antitumoral. 5. Etnofarmacologia. I. Pedrosa, Rozangela Curi. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

"Atividade antitumoral de extratos de *Piper nigrum* Linnaeus cultivar Bragantina
(PIPERACEAE)"

Por

Valdelúcia Maria Alves de Souza Grinevicius

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca
Examinadora (032/PPGBQA/2016) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica -
UFSC.


Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:


Dr(a) Rozângela Curi Pedrosa (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)


Dr(a) Alceu Zanotto Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr(a) Sandra Regina Salvador Ferreira (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr(a) Eduardo Antonio Ferreira (Universidade de Brasília)


Dr(a) Karina Bettega Felipe (Universidade Federal do Paraná)

Florianópolis, 21 de Novembro de 2016.

Dedico este trabalho ao estimado “Doc” Dr. Onofre Berton, PhD em fitopatologia pela *Cornell University* que me inspirou a seguir adiante nesta empreitada. Dedico também ao amigo Prof. Dr. Alexandre D’ Agostini Zottis pelo exemplo de perseverança e por suas importantes contribuições nesta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Pai e Criador, por construir este universo complexo onde habitamos e, principalmente, por nos propiciar as ferramentas necessárias para desvendarmos pequenas partes das vias bioquímicas. Pura *emunah!*

Ao meu esposo Sérgio, ao nosso filho Alexei e nora Caroline e a seus pais Lise e Onofre Berton por acreditarem em mim. Agradeço por sempre me apoiarem, ofereço-lhes minha sincera gratidão. “*The LORD bless you and keep you; the LORD make his face shine upon you and be gracious to you; the LORD turn his face toward you and give you peace*” (*Numbers 6:24-26*).

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Rozangela Curi Pedrosa por me ter conduzido com firmeza durante a realização desta pesquisa com a paciência e força necessárias para manter meus pés em rocha sólida e confiável. Minha profunda gratidão à esta estimada orientadora “*Rosh!*”! Esta é a natureza de minha *Rosh!* Ser líder é uma tarefa muito especial e, a meu ver, sua liderança tem bases na doutrina muito interessante que o Messias nos deixou e que está clara nas palavras de Yeshayahu HaNavi. “*The Spirit of the Lord GOD {is} upon me; because the LORD hath anointed me to preach good tidings unto the meek; he hath sent me to bind up the brokenhearted, to proclaim liberty to the captives, and the opening of the prison to {them that are} bound*” (*Isaiah 61:1*).

Aos Professores da banca por terem contribuído no aprimoramento do texto desta tese e pelas sugestões apresentadas.

À Prof^a. Dr^a. Sandra R. S. Ferreira por ter nos oferecido a oportunidade de dar continuidade à pesquisa com a *Piper nigrum* que foi objeto de estudo durante seu doutoramento; agradecendo também à Dr^a. Kátia S. Andrade responsável pela extração supercrítica dos frutos de *P. nigrum* no LATESC-CTC-UFSC.

À Dr^a. Maria Helena Rossi do Instituto Biológico de São Paulo pela extração etanólica e pelo depósito da exsicata de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina no herbário do Município de São Paulo.

Agradecimentos ao Prof. Dr. Claus Tröger Pich pela orientação sobre os ensaios com DNA plasmidial; à Prof^a. Dr^a. Elenara Senna pelo uso de equipamentos para purificação dos compostos utilizados nas determinações fitoquímicas; ao Prof. Dr. Gustavo A. Mick, Prof. Dr. Alexandre D’ Agostini Zottis e à pós-doutoranda Lizandra C. Bretanha pelas análises por CG-EM; os Prof. Dr. Hernan F. Terenzi e Prof. Dr. Mário Steindel por suas contribuições valiosas durante a avaliação do trabalhos apresentados na SBBq e no SIC-SEPEX na UFSC e ao Prof.

Dr. Edmundo C. Grisard por ter disponibilizado os equipamentos no Laboratório de Protozoologia.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica da UFSC e, em especial, à Prof^a. Dr^a. Tânia M. F. Günther e Prof^o. Dr^a. Ariane Zalmoner pela supervisão nos estágios de docência e infinita paciência em explicar os pontos mais difíceis de Bioquímica com tanta clareza e amor à profissão.

Ao servidor Sr. João Francisco Correia, químico do grupo de pesquisa do Labioex e Mestre em Química de Produtos Naturais pela UFSC, que otimizou os processos de purificação das piperamidas além de elucidar pontos chave de química associados aos mecanismos celulares em nossos estudos. Agradeço por sua dedicação e esforço que resultou em contribuições fundamentais para a publicação dos resultados obtidos.

Ao Prof. Dr. Wylson Zancanella Quarteza do Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Montanha por ter fornecido as amostras de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina) utilizadas nesta pesquisa e ao Dr. Oriel Filgueira de Lemos da Embrapa Pará por fornecer valiosas informações sobre esta cultivar.

Para minha amiga Luciana Krüger e sua filha Alícia por todas as lindas mensagens que sempre me incentivaram a manter a confiança no valor da amizade sincera. Vocês são flores na minha jornada.

Meus queridos Rafaela Andregetti e Daniel Tonial Tomaz vocês são motivo de muita alegria para mim. Acredito que Deus continuará abençoando vocês em abundância. Sabem que são meus filhos de coração! Rafa, eu ficarei eternamente agradecida por seu carinho e por toda ajuda nas infundáveis planilhas; nas discussões referentes aos conceitos de Farmacologia, Farmacognosia e Bioquímica; na preparação dos extratos e no tratamento dos animais. Nossas madrugadas são testemunhas de todo trabalho desenvolvido! *“Rejoice in the Lord always. I will say it again: Rejoice! Let your gentleness be evident to all. The Lord is near. Do not be anxious about anything, but in everything, by prayer and petition, with thanksgiving, present your requests to God. And the peace of God, which transcends all understanding, will guard your hearts and your minds in Christ Jesus” (Philipensis 4:4-7).*

Para os *brothers in arms* os doutorandos Jean C. Benassi e Raquel G. Eckert por estarem me incentivando a manter plena confiança em Deus. *“My defence is of God, which saveth the upright in heart” (Psalms 7:10).*

Para as amigas Josiane Hilbig; Elinete Eliete de Lima e Mariana Dalagnol exemplos de coragem e determinação que sempre me apoiaram em momentos difíceis nesta jornada. Com a ajuda de vocês tenho força e

boa coragem para enfrentar os desafios. *"Do not fear, nor be dismayed. Be strong and of good courage"* (Joshua 10:25).

Para os amigos do grupo de pesquisa do Labioex Nadia S.R.S. Mota, Fabiana Ourique; Luiza e Allisson Castro; Eduardo B. Parisotto; Mirelle S. Farias; Rodrigo C. Zeferino; Gabriela M. Almeida e Tâmila Siminski. Todos sempre dispostos a auxiliarem na bancada e nas discussões sobre bioquímica. Agradeço a Deus por ter colocado vocês no meu caminho, queridos amigos! *"God is our refuge and strength, a very present help in trouble"* (Psalm 46:1).

Para Prof^a. Dr^a. Celeide Pereira da UFTPr por palavras de incentivo constantes que me ajudaram a manter a confiança em Deus. *"And we know that in all things, God works for the good of those who love Him, who have been called according to His purpose"* (Romans 8:28).

Para Mariana Piva, Marjorie Marin, Carina Sardá, Morgana Zirbel, Guilherme Zirbel, Pedro H. Peroni, Laura Otto, Eduarda Rohling e Cynthia de Padua. Prezados ICs no Labioex! Sucesso para todos vocês.

Às minhas amigas Andreia Carvalho Vieira, Damiana da Silva Ferreira dos Santos, Roseli Alves Costa, Cleusa Célia da Silva, Juliana Hartwig e Viviane de Souza pelo apoio incondicional nas horas difíceis, pelos cafés, pelo abraço forte e pelas palavras certas que só as amigas sabem dizer.

Para a equipe do LAMEB-UFSC (Chirle; Emily; Demétrio; Vanessa; Bibiana; Camille e Denis) e para a bióloga Elis Rosa do CEBIME-UFSC por todo suporte técnico fundamental na aquisição de dados nos equipamentos, além de inúmeras vezes em que nos forneceram instruções, treinamento e materiais suplementares que foram vitais para a continuidade dos trabalhos.

Aos servidores da Secretaria Integrada da Pós-Graduação do CCB, especialmente para Rebeca; Thais; Maria Eduarda; Kleyton e Rodrigo que sempre foram prestativos nos auxiliando com gentileza e boa vontade.

À CAPES pela bolsa doutorado e ao CNPq pela bolsa IC PIBIT concedidas para a condução desta pesquisa.

*“I will say of the Lord, He is my refuge, and my
fortress: my God, in him will I trust”*
Psalms, Tehilim, 91:2

RESUMO

A relevância etnofarmacológica de *Piper nigrum* L. (Piperaceae) (pimenta preta) se revela nas preparações herbais da medicina tradicional usadas para tratamento inflamação, febre, asma e câncer. No Brasil, o conhecimento tradicional quilombola atribui à pimenta preta efeitos benéficos sobre a saúde incluindo redução de inflamação. Nesta pesquisa buscou-se validar tal uso tradicional através de estudos fitoquímicos e bioquímicos realizados após tratamentos com extrato etanólico (ET) e supercríticos (ESC) produzidos com pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina). Estes extratos foram considerados como melhor tecnologia disponível para extrair metabólitos secundários. O extrato etanólico (ET) foi obtido por maceração (72 h) com rendimento de $6,40 \pm 0,03$ %. Os extratos supercríticos foram produzidos com dióxido de carbono supercrítico mantido na pressão de 150 bar (ESC150); de 200 bar (ESC200 ou ESC200+EtOH com etanol como cossolvente; 7,5 %) ou de 300 bar (ESC300). Cromatografia de camada delgada revelou piperina, pepirilina e retrofractamida C nos extratos. Após a purificação das bandas foram confirmados fragmentos de massa destas alcaloides (Espectrometria de massas por eletronebulização). Análise por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou que o extrato ESC200 teve maior conteúdo de piperina ($60,3 \pm 0,1$ %) comparativamente ao ET ($32,12 \pm 0,11$ %). Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massa revelou em ESC200 a presença de sesquiterpenos majoritários β -cariofileno, α -humuleno e β -copaeno. Enquanto que ET apresentou principalmente β -cariofileno, α -copaeno e β -bisaboleno. Todos extratos foram ativos *in vitro* contra células de tumor de mama (MCF-7; 24 ou 72 h), mas ESC200 foi mais citotóxico (1 - 1000 $\mu\text{g/ml}$; CE_{50} = $14,4 \pm 3,3$ $\mu\text{g/ml}$; 72 h), inibindo de maneira dose-dependente a proliferação clonogênica (MCF-7) após tratamento com ESC200 (20 ou 40 $\mu\text{g/ml}$; 24 h) causando maior diminuição da área das colônias. Houve considerável aumento na geração intracelular de EROS após tratamento com o extrato ET. Observou-se intercalação e danos oxidativos ao CT DNA causados por compostos presentes nos extratos. ESC200 (20 $\mu\text{g/ml}$) causou mais danos oxidativos comparativamente ao ET ($p < 0,001$). O extrato ET (1000 e 2000 $\mu\text{g/ml}$) causou quebras duplas no DNA plasmidial. Na primeira parte do estudo realizado *in vivo* os camundongos (Balb/c; machos; $n=12$) foram inoculados com células do carcinoma ascítico de Ehrlic (TAE) e tratados por via i.p. com ET (100 mg/kg/dia; 9 dias). Este tratamento causou inibição do crescimento tumoral (60 %) com aumento de sobrevida (76 %) associados ao aumento

de morte por apoptose destas células. ET (100 mg/kg/dia) determinou maior expressão de proteínas pró-apoptose Bax e p53 com diminuição da expressão de proteína anti-apoptose Bcl-xL. ET (100 mg/kg/dia) causou parada do ciclo celular em G1 das células de TAE devida à diminuição da expressão de ciclina A nestas células. Adicionalmente, o tratamento com ET (100 mg/kg/dia) estabeleceu condições pró-oxidantes nas células de TAE com maior atividade da catalase, da superóxido dismutase e da glutatona redutase; com depleção de GSH e elevação dos níveis de peroxidação de lipídios e carbonilação proteica. Tal efeito antitumoral observado com o extrato ET (100 mg/kg/dia) sugere ser parcialmente decorrente do aumento da geração de EROs e condições pró-oxidantes citotóxicas estabelecidas nas células tumorais. Enquanto que na segunda etapa (Parte II) de estudos realizados *in vivo* os camundongos Balb/c (machos, n=16) foram tratados via i.p. com ET e ESC200 (10 ou 20 mg/kg/dia; 9 dias). Os melhores resultados foram obtidos com 10 mg/kg/dia para ESC (200 bar) com inibição no crescimento tumoral (76 %) e aumento da sobrevida (67 %) comparativamente aos tratamentos com ET (42 % de inibição tumoral e 56 % de sobrevida). Nos tratamentos com ET observou-se parada do ciclo das células de TAE na fase G1 enquanto houve parada do ciclo na fase G2/M para as células de TAE coletadas dos animais tratados com ESC (200 bar). Houve aumento de apoptose das células de TAE que foi significativamente maior nas células de TAE dos animais tratados com ESC (200 bar). Assim, a extração supercrítica realizada para produzir o extrato ESC (200 bar; 40 °C, 240 min) pode ser considerada como a tecnologia mais apropriada para a obtenção de piperina, alcaloides e terpenóides. Ademais, o sinergismo entre estes compostos provavelmente promoveu as atividades antiproliferativa e antitumoral observadas *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: “*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina”. Citotoxicidade. MCF-7. Apoptose. Antitumoral. Extração supercrítica. Etnofarmacologia.

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance of *Piper nigrum* L. (Piperaceae) could be revealed through herbal formulations used to inflammation, fever, asthma and cancer. Brazilian quilombola traditional knowledge links black pepper with health recovery and inflammation reduction. The aim of the current work was to validate such traditional uses through phytochemical and biochemical studies after treatments done with ethanolic extract (ET) and supercritical extracts (SFE). Extracts were produced with black pepper (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina). Both were the best available technology to extract secondary metabolites. ET (ethanolic maceration; 72 h) had highest yield (6.40 ± 0.03 %). Supercritical carbon dioxide delivered at same temperature (40 °C) and at increased pressure allowed to produce extracts at 150 bar (SFE150); at 200 bar (SFE200 or SFE200+EtOH done with ethanol as co-enhancer; 7.5 %) and 300 bar (SFE300). Thin layer chromatography (TLC) showed piperine, piperidine and retrofractamide C in the extracts. Further purification of TLC bands allowed confirming alkaloid key mass spectra fragments (Electro Spray Ionization Mass Spectrometry). HPLC analysis showed SFE200 higher content of piperine (60.3 ± 0.1 %) comparatively to ET (32.12 ± 0.11 %). SFE200 GC/MS analysis showed sesquiterpenes β -caryophyllene, α -humulene and β -copaene. While ET had β -caryophyllene and germacrene D. All extracts were cytotoxic against breast cancer cells (MCF-7; 24 or 72 h), but SFE200 was more cytotoxic ($1 - 1000$ $\mu\text{g/ml}$; $\text{EC}_{50} = 14.4 \pm 3.3$; 72 h), and inhibited dose-dependently MCF-7 cells clonogenic proliferation with area reduction (SFE200; 20 or 40 $\mu\text{g/ml}$, 24 h) ($p < 0.001$). All treatments enhanced considerably intracellular ROS generation. Extracts compounds were capable to intercalate and cause CT DNA oxidative damage. SFE200 mainly at 20 $\mu\text{g/ml}$ caused significant CT DNA oxidative damage comparatively to ET ($p < 0.001$). Treatment (24 h) with higher ET concentrations (1000 and 2000 $\mu\text{g/ml}$) caused plasmid DNA fragmentation with double strand breaks. First part of this thesis (Part I) showed *in vivo* studies done with Balb mice (male, $n=12$) bearing Ehrlich ascites carcinoma cells (EAC) treated intraperitoneally with ET (100 mg/kg/day; 9 days). ET induced inhibition of tumor growth (60 %) and improved mice survival (76 %). Also increased apoptotic EAC cells correlated with increased expression of Bax and p53 and decreased of anti-apoptotic Bcl-xL. Additionally, ET (100 mg/kg/day) caused EAC cells cycle arrest at G1 with reduction in S related to decreased expression cyclin A. EAC cells oxidative stress status was increased by treatment (ET, 100 mg/kg/day) augmenting the activity

of catalase, superoxide dismutase and glutathione reductase, followed by GSH depletion and increased levels of lipoperoxidation and protein carbonylation. These findings suggests ET (100 mg/kg/day) antitumor activity could be partially due to increased ROS generation and cytotoxic pro-oxidant conditions in tumor cells. Comparative *in vivo* studies done at Part II showed mice (Balb/c; male; n=16) treated intraperitoneally with ET or SFE (200 bar) at 10 or 20 mg/kg/day (9 days). Mice treatment with ET or ESC 200 bar (10 mg/kg/day) caused EAC cells growth inhibition (40 and 76 %, respectively) and increased mice survivor time by 56 e 67 %, respectively. EAC cells cycle was arrested at G1 for treatment with ET and at G2/M for ESC (200 bar). Both treatments increased EAC cells death through apoptosis but ESC (200 bar) was more significant ($p<0.001$). ESC (200 bar; 40 °C; 240 min) was the best available technology to the extraction of alkaloids and terpenoids. Moreover, synergism between extracted phytochemicals probably promoted antiproliferative and antitumor activities observed *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: “*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina”. Cytotoxicity. MCF-7. Apoptosis. Antitumor. Supercritical extraction. Ethnopharmacology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Proteína p53 interagindo com a dupla fita de DNA através dos resíduos de arginina (R 248) e de lisina (K 120) na presença de um átomo de zinco (Zn)	35
Figura 2 - Sinalização para apoptose associada com danos ao DNA nuclear e ativação da proteína p53 induzidos pelo estresse oxidativo...	36
Figura 3 - Regulação da p53 pela MDM2.....	37
Figura 4 - Efeitos do estresse oxidativo e de danos ao DNA sobre o complexo p53-MDM2.....	38
Figura 5 - Fases do ciclo celular com as ciclinas e CDKs envolvidas .	39
Figura 6 - Vias de sinalização associadas com apoptose, necrose e autofagia.....	41
Figura 7 - Vias de sinalização celular associadas com morte por apoptose.....	43
Figura 8 - Danos moderados (A) ou severos (B) ao DNA associados à via intrínseca e que podem levar à morte celular por apoptose ou por necrose, respectivamente.....	44
Figura 9 - Papel das proteínas Bax (induz a apoptose) e Bcl-xL (inibe a apoptose) na permeabilização da membrana externa da mitocôndria e na formação do complexo VDAC, ANT e CyPD que constitui o poro MPT o qual favorece as trocas ADP/AT	46
Figura 10 - Micrografias eletrônicas de transmissão de alterações morfológicas associadas à morte celular por apoptose de células MCF-7 antes (A) e após tratamento com indutores de apoptose (B; C)	48
Figura 11 - Morfologia de células de carcinoma de Ehrlich por microscopia eletrônica de transmissão (A) e microscopia de fluorescência (B)	49
Figura 12 - A liberação do citocromo c leva à apoptose e a ruptura da membrana externa mitocondrial, com depleção de ATP e o inchaço irreversível causando morte celular por necrose	50
Figura 13 - Sistema antioxidante de remoção de EROs	53
Figura 14 - Compartimentos subcelulares envolvidos no sistema antioxidante de remoção de EROs	54
Figura 15 - Intercalação do quimioterápico doxorubicina entre as bases da molécula de DNA	56
Figura 16 - Ciclo redox do grupo quinona (núcleo quinóide) do quimioterápico doxorubicina onde são gerados os radicais superóxido e hidroxil	57
Figura 17 - Frutos de <i>Piper nigrum</i> L. (Piperaceae)	61

Figura 18 - Estrutura molecular e propriedades de alcanidas encontradas em frutos de <i>Piper nigrum</i> L.....	65
Figura 19 - Estrutura molecular de propriedades de sesquiterpenos cíclicos	68
Figura 20 - Curvas de viabilidade celular após tratamentos por 24 e 72 h	89
Figura 21 - Inibição da proliferação clonogênica após 24 h de tratamento com o extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina.....	90
Figura 22 - Indução da geração de EROs em células MCF-7 após 24 h de tratamento com extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina.....	91
Figura 23 - Efeito de intercalação ao CT DNA por compostos do extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina.....	92
Figura 24 - Danos oxidativos ao CT DNA causados pelo extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina.....	94
Figura 25 - Efeito de fragmentação do DNA plasmidial causado pelo extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina.....	96
Figura 26 - Atividade antitumoral do extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina após tratamento de Balb/c inoculados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich (TAE)	98
Figura 27 - Efeitos sobre o ciclo de células de TAE coletadas de camundongos Balb/c tratados com extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina.....	100
Figura 28 - Efeitos sobre a expressão de ciclina A em células de TAE coletadas de camundongos Balb/c tratados com extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina	101
Figura 29 - Tipo de morte induzido em células de TAE coletadas de camundongos Balb/c tratados com extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina.....	102
Figura 30 - Expressão de proteínas envolvidas no controle do tipo de morte induzido em células de TAE coletadas de camundongos Balb/c tratados com extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina	103
Figura 31 - Marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes de células de TAE inoculadas em camundongos Balb/c tratados com o extrato de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina	107
Figura 32 - Resumo gráfico dos eventos bioquímicos associados ao tratamento com extrato de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina que causaram a elevação do estresse oxidativo em células tumorais.....	109

Figura 33 - Determinações por espectrofotometria UV-vis confirmando a presença de piperina e retrofractamida C nos extratos de pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina).....	123
Figura 34 - Cromatogramas representativos e resultados de análise efetuada por CLAE do conteúdo de piperina em extratos de pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina).....	126
Figura 35 - Fragmentogramas representativos de determinações em espectrômetro de ionização por eletronebulização (<i>ESI-IT-MS/MS</i>) de alcaloides piperina e retrofractamida C nos extratos ET; ESC 200; ESC300 e ESC200+EtOH obtidos de pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina).....	135
Figura 36 - Citotoxicidade dos extratos de pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina) sobre células MCF-7 após tratamento por 24 e 72 horas	138
Figura 37 - Efeito antiproliferativo sobre células MCF-7 decorrentes do tratamento (24 h) com cada extrato de pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina).....	142
Figura 38 - Tipo de morte induzido em células MCF-7 por tratamento (24 h) com extratos produzidos com pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina).....	144
Figura 39 - Efeitos dos extratos de pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina) sobre o CT DNA	146
Figura 40 - Efeitos oxidativos dos extratos de pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina) sobre o CT DNA.....	148
Figura 41 - Efeitos dos extratos de pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina) sobre o CT DNA	149
Figura 42 - Atividade antitumoral observada em camundongos Balb/c (inoculados com carcinoma ascítico de Ehrlich) e tratados com cada extrato de pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina)	150
Figura 43 - Sobrevida de camundongos Balb/c (inoculados com carcinoma ascítico de Ehrlich) e tratados com cada extrato de pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina).....	152
Figura 44 - Efeito dos extratos de pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina) sobre as fases do ciclo celular no tumor ascítico de Ehrlich em camundongos Balb/c tratados durante 9 dias.....	154
Figura 45 - Efeito dos extratos de pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina) sobre o tipo de morte celular induzido nas células de TAE de camundongos Balb/c tratados	156
Figura 46 - Resumo gráfico dos eventos associados com atividade antiproliferativa e antitumoral de extrato supercrítico produzido com pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina).....	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conteúdo de piperamidas determinado por CLAE e dados espectrais obtidos de piperamidas isoladas do extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina	87
Tabela 2 - Citotoxicidade (CE ₅₀) do extrato etanólico sobre linhagens tumorais.....	89
Tabela 3 - Condições de extração, rendimento e características fitoquímicas do extrato etanólico (ET) e dos extratos supercríticos ESC200; ESC300 e ESC200+EtOH produzidos com pimenta preta preparada com frutos de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina.....	121
Tabela 4 - Cromatogramas representativos de análise efetuada por CG-EM dos extratos de pimenta preta preparada com pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina).....	128
Tabela 5 - Áreas relativas obtidas por análise de CG/EM para os compostos presentes no extrato produzido por maceração em etanol (ET) empregando pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina)	129
Tabela 6 - Áreas relativas obtidas por análise de CG/EM para os compostos presentes no extrato supercrítico obtido a 200 bar (ESC200) empregando pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina)	130
Tabela 7 - Resultados obtidos através de CG/EM para o extrato supercrítico obtido a 300 bar (ESC300) empregando pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina).....	131
Tabela 8 - Áreas relativas em análise de CG/EM para os compostos presentes no extrato supercrítico ESC200+EtOH obtido a 200 bar com cossolvente etanol (7,5 %; v/v) produzido com pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina).....	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAT	<i>Best Available Technology</i>
BE	Brometo de etídio
CAT	Catalase, enzima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDKs	Cinases dependentes de ciclinas
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCFH-DA	Diacetato de diclorofluoresceína
DMEM	Meio Eagle Dulbecco modificado (<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido, surfactante
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESC	Extração supercrítica
ESI-IT-MS/MS	Espectrometria de massas sequencial com espectrômetro de ionização por eletronebulização com interface do tipo armadilha de íons
ET	Extrato etanólico
GPX	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
HBSS	Solução salina tampão de Hank (<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)
HT-29	Linhagem de células de tumor colorretal humano
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MCF-7	Linhagem de células de tumor de mama humana
MTT	Sal de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-brometo de tetrazólio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo de fosfato

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo de fosfato reduzido
pBSK II	Plasmídeo Bluescript SK II
PBS	Salina tamponada fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PRXD	Peroxirredoxina
SDS-PAGE	Poliacrilamida dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TAE	Carcinoma ou tumor ascítico de Ehrlich
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBE	Tampão Tris-Borato com EDTA
TBS	Tampão Tris-NaCl (<i>Tris Buffered Saline</i>)
TCA	Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 OBJETIVOS	31
1.1.1 Objetivo geral	31
1.1.2 Objetivos específicos	31
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
2.1 CÂNCER.....	33
2.2 ASPECTOS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS AO CÂNCER .	33
2.2.1 Bases Moleculares do câncer	33
2.2.2 Ciclinas e CDKs envolvidas no controle do ciclo celular	38
2.2.3 Morte celular	40
2.2.3.1. Morte celular por apoptose.....	41
2.2.3.2. Morte celular por necrose.....	50
2.2.4 Estresse oxidativo e sistema de defesas antioxidantes	51
2.2.5 Quimioterápicos e tratamento de câncer	54
2.3 ATIVIDADE ANTITUMORAL DE PLANTAS MEDICINAIS ...	57
2.3.1 Estudos etnofarmacológicos	57
2.3.2 Usos etnomedicinais de Piperaceas e de <i>Piper nigrum</i>	58
2.3.3 <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina.....	60
2.3.4 Composição fitoquímica de <i>Piper nigrum</i>	62
2.3.4.1. Presença de piperina, piperilina, piperlonguminina, pelitorina e retrofractamida em <i>Piper nigrum</i>	62
2.3.4.2. Terpenóides	67
2.4 OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MATRIZES VEGETAIS COMPLEXAS EMPREGANDO MÉTODO CONVENCIONAL E FLUIDO SUPERCRÍTICO.....	69
3 PARTE I: ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Piper nigrum</i> E SUA CORRELAÇÃO COM A INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	73
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS	73
3.1.1 Reagentes e anticorpos.....	73
3.1.2 Amostra de frutos de <i>Piper nigrum</i> , obtenção de pimenta preta, preparação do extrato e análises fitoquímicas.....	74
3.1.3 Ensaios <i>in vitro</i> com linhagens tumorais	75
3.1.3.1 Cultura celular.....	75
3.1.3.2 Citotoxicidade e ensaio de proliferação celular.....	75
3.1.3.3 Níveis intracelulares de EROs.....	77
3.1.4 Intercalação e danos oxidativos ao CT DNA e fragmentação do DNA plasmidial	78
3.1.5 Ensaios realizados com camundongos Balb/c	81

3.1.5.1 Inibição do crescimento <i>in vivo</i> do carcinoma ascítico de Ehrlich.....	81
3.1.5.2 Efeitos sobre ciclo celular de carcinoma ascítico de Ehrlich	82
3.1.5.3 Tipo de morte celular induzida em carcinoma ascítico de Ehrlich.....	82
3.1.5.4 Imunodeteção	83
3.1.5.5 Biomarcadores de defesas antioxidantes e danos oxidativos no carcinoma ascítico de Ehrlich	84
3.1.6 Análise estatística	86
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
3.2.1 Identificação de piperamidas no extrato etanólico.....	86
3.2.2 Citotoxicidade, atividade antiproliferativa e geração intracelular de espécies EROs induzidas <i>in vitro</i> pelo extrato etanólico de <i>P. nigrum</i> L. cultivar Bragantina.....	88
3.2.3 Efeitos do extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina sobre o CT DNA e sobre o DNA plasmidial	92
3.2.4 Atividade antitumoral <i>in vivo</i> do extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina	97
3.2.5 Avaliação dos efeitos do extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina sobre a modulação do ciclo celular.....	99
3.2.6 Determinação do tipo de morte induzido pelo extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina	101
3.2.7 Avaliação dos efeitos do extrato etanólico de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina sobre o estresse oxidativo e defesas antioxidantes.....	105
3.3 CONCLUSÕES	109
4 PARTE II: ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATOS CONVENCIONAL E SUPERCRÍTICOS DE FRUTOS DE <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina.	111
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	111
4.1.1 Reagentes e meio de cultivo	111
4.1.2 Amostra de frutos de <i>Piper nigrum</i>, obtenção de pimenta preta, preparação dos extratos e análises fitoquímicas.....	111
4.1.2.1 Coleta dos frutos e preparo da pimenta preta.....	111
4.1.2.2 Obtenção do extrato etanólico e dos extratos supercríticos	112
4.1.2.3 Determinações por Cromatografia de Camada Delgada	113
4.1.2.4 Determinações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	114
4.1.2.5 Determinações por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)	114

4.1.2.6 Análises por espectrometria de massas sequencial (<i>ESI-IT-MS/MS</i>).....	115
4.1.3 Cultura celular.....	116
4.1.4 Citotoxicidade, inibição da proliferação celular e tipo de morte induzida pelos extratos obtidos de <i>Piper nigrum</i> L. cultivar Bragantina	116
4.1.5 Avaliação da capacidade de compostos presentes nos extratos interagirem por intercalação e causarem danos oxidativos ao DNA	117
4.1.6 Ensaios realizados com camundongos Balb/c	119
4.1.6.1 Inibição do crescimento <i>in vivo</i> do carcinoma ascítico de Ehrlich.....	119
4.1.6.2 Efeitos sobre ciclo celular de carcinoma ascítico de Ehrlich ..	119
4.1.6.3 Tipo de morte celular induzida em carcinoma ascítico de Ehrlich.....	120
4.1.7 Análise estatística	120
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
4.2.1 Análises fitoquímicas dos extratos	120
4.2.3 Efeito citotóxico dos extratos de <i>Piper nigrum</i>	137
4.2.4 Ensaios de interação <i>in vitro</i> dos extratos com o CT DNA ...	145
4.2.5 Atividade antitumoral <i>in vivo</i>	149
4.2.5.1 Inibição do crescimento tumoral e sobrevida.....	149
4.2.5.2 Efeito dos extratos ET e ESC sobre o ciclo celular.....	153
4.2.5.3 Tipo de morte celular induzida pelos extratos ET e ESC.....	155
4.4 CONCLUSÃO	159
5 CONCLUSÃO DA TESE	161
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	165
6.1 PERSPECTIVAS	165
REFERÊNCIAS	167
ANEXOS	201
ANEXO A - Artigo publicado	203
ANEXO B - Comprovante de submissão de artigo	204

1 INTRODUÇÃO

O câncer continua sendo a causa de um imenso número de mortes no mundo inteiro, ainda que significativos progressos tenham sido alcançados na medicina tanto no diagnóstico precoce quanto no desenvolvimento de novos fármacos empregados no tratamento.

O câncer ao nível celular pode ser caracterizado por mutações estruturais no DNA capazes de levar a perda do controle sobre o ciclo celular e inibição dos processos de morte celular (WOLF; RAMIREZ, 2001; MATTSON; KROEMER, 2003). Em geral o câncer pode ser relacionado à ação de oncogenes (AUDIC; HARTLEY, 2004). Adicionalmente, hábitos sociais ou culturais do indivíduo como o tabagismo e o alcoolismo podem ser considerados como fatores de risco para alguns tipos de câncer (PELUCCHI et al., 2006).

A teoria clássica para o desenvolvimento de neoplasias se apoia na ocorrência de mutações no DNA de uma célula fundadora que, no caso dos carcinomas, deve ser do tipo epitelial (SOTO; SONNENSCHN, 2004; 2011).

O câncer de mama, independentemente do tipo, deve ser considerado como um problema de saúde global, pois atinge e mata mulheres de todas as classes (COUGHLIN; EWKUEME, 2009). Assim, é importante incentivar as iniciativas visando o diagnóstico precoce e também alternativas terapêuticas que promovam a redução do número de mortes devidas a este tipo de câncer (COUGHLIN; EWKUEME, 2009). Em especial são procuradas formas de terapia complementar e alternativa incluindo o uso de formulações contendo partes de diferentes plantas (formulações herbais) que promovam melhor qualidade de vida aos pacientes com câncer de mama (MA et al., 2011).

Assim, existem em alguns países incentivos ao paciente com câncer para que este adote práticas de medicina alternativa e complementar baseadas no uso de plantas medicinais, entre outras formas terapêuticas (ROCKWELL; LIU; HIGGINS, 2005). De acordo com relatos de Vardy et al. (2013), a terapia herbal foi empregada por pacientes em estágios iniciais de câncer de mama sem causarem interações adversas. Ainda, de acordo com Buck et al. (2011), pacientes com câncer de mama desenvolvido no período pós-menopausa e que fizeram uso de dieta rica em sementes contendo lignanas e fibras, apresentaram maior sobrevida pós quimioterapia.

Neste contexto *Piper nigrum* tem sido empregada em formulações herbais na medicina tradicional chinesa (WANG et al., 2014; XIN; QI; HAN, 2009); indiana (KURIAN, 2012) e tailandesa (CHAVEERACH et

al., 2006; ATJANASUPPAT et al., 2009) como agente coadjuvante no tratamento do câncer e inflamações. Estas atividades foram atribuídas à presença de vários compostos secundários bioativos como as lignanas, principalmente em frutos verdes (PARMAR et al., 1997; CHAHAL et al., 2011) e, especialmente, se destaca a piperina encontrada na porção não volátil (óleo-resina) de frutos de *Piper nigrum* (SEMLER; GROSS, 1988). A piperina apresentou atividade anti-inflamatória (MUJUMDAR et al., 1990) e antitumoral (LIU et al., 2010; MAJDALAWIEH; CARR, 2010).

Compostos extraídos de espécies do gênero *Piper* tornaram-se fonte alternativa de moléculas com atividade antitumoral como o safrol isolado de *Piper hispidinervum* C. DC (ESTRELA et al., 2006; SILVA; OLIVEIRA, 2000), que foi utilizado para a síntese de naftoquinonas visando desenvolver novos compostos para tratamento do câncer (COSTA, 2000).

Para aumentar o entendimento dos processos envolvidos na atividade antitumoral direta e/ou indireta de extratos de plantas empregadas em preparações herbais são necessárias investigações adicionais sobre os efeitos e mecanismos de ação dos extratos empregando modelos *in vitro* em linhagens tumorais e estudos *in vivo* com modelos animais de carcinoma.

Na grande maioria das publicações científicas são descritos os efeitos de extratos principalmente das folhas e madeira (incluindo a casca do caule) das plantas. Estes extratos são obtidos empregando métodos convencionais tais como maceração em solvente orgânico, hidrodestilação, extração com água fria ou fervente, por exemplo. Porém, para o presente estudo, os extratos foram obtidos de pimenta preta preparada com frutos verdes de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina por extração etanólica (ET) e por extração supercrítica (ESC) com dióxido de carbono em estado supercrítico que, dentro de condições específicas, permite a extração de compostos majoritários nos óleos essenciais ou em óleo-resinas presentes em distintas partes das plantas (BEZERRA et al., 2006; PENEDO, 2007).

O processo de extração com fluidos supercríticos apresenta inúmeras vantagens entre as quais se destaca a remoção seletiva de frações voláteis e não voláteis, a ausência do solvente nos produtos resultantes da extração, a extração de compostos sensíveis ao calor devido às baixas temperaturas envolvidas; além do fato do solvente supercrítico (dióxido de carbono) ser considerado como não tóxico (FERREIRA et al., 1999).

Desta forma, a presente tese se encontra dividida em duas partes. A Parte I teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* para fornecer embasamento científico enquanto que a Parte II teve como principal objetivo efetuar a avaliação da atividade antitumoral *in vitro* de extratos convencional (etanólico) e supercríticos que foram confirmadas através de ensaios realizados *in vivo*. Estes extratos foram produzidos empregando-se pimenta preta, preparada com frutos verdes de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina. Trata-se de uma pesquisa inédita com esta cultivar.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* e *in vivo* o potencial antitumoral de diferentes extratos obtidos de frutos de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina) investigando alguns possíveis mecanismos de ação.

1.1.2 Objetivos específicos

Com relação aos extratos (etanólico e supercríticos) obtidos a partir de frutos de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina), buscou-se atingir os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Investigar a presença de compostos bioativos nos extratos com destaque para piperamidas e terpenoides;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos extratos sobre linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7) e de câncer colorretal (HT-29);
- ✓ Avaliar *in vitro* o potencial antiproliferativo após o tratamento de células MCF-7 com os extratos;
- ✓ Avaliar *in vitro* o potencial de geração intracelular de espécies reativas de oxigênio após o tratamento de células MCF-7 com os extratos;
- ✓ Investigar *in vitro* o mecanismo de ação citotóxico e/ou antiproliferativo avaliando os efeitos sobre o ciclo celular

e o tipo de morte de células MCF-7 induzidos após tratamento com os extratos;

- ✓ Avaliar *in vitro* a intercalação dos extratos com o CT DNA e a capacidade dos compostos presentes nos extratos causarem danos oxidativos à esta macromolécula; investigando também a capacidade destes compostos causarem fragmentação no DNA plasmidial;
- ✓ Avaliar *in vivo* a atividade antitumoral dos extratos sobre as células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) implantado em camundongos Balb/c;
- ✓ Avaliar *in vivo* alterações no ciclo celular e o tipo de morte celular induzido em células de TAE implantadas em camundongos Balb/c, que tenham sido induzidos após tratamentos com os extratos;
- ✓ Avaliar *in vivo* a expressão de proteínas envolvidas na morte e na progressão do ciclo celular de células de TAE implantadas em camundongos Balb/c, que tenham sido induzidas após tratamento com o extrato etanólico;
- ✓ Avaliar *in vivo* alterações nos níveis de marcadores de estresse oxidativo e indicadores de defesas antioxidantes de células de TAE implantadas em camundongos Balb/c, que forem induzidas pelo tratamento com o extrato etanólico investigando alguns mecanismos de ação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer – INCA (2011) do ponto de vista clínico, câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se formando metástases em outras regiões do corpo.

No mundo ainda existem países com elevadas taxas de mortalidade associadas aos diferentes tipos de câncer e, infelizmente, isto ainda ocorre no Brasil (*World Health Organization - WHO, 2014; International Agency for Research on Cancer - IARC, 2016*). Entre estes, o câncer de mama é o principal tipo de neoplasia que ocorre em mulheres tanto nos países em desenvolvimento quanto nas nações mais ricas, representando 25 % de todos os tipos de câncer diagnosticados em mulheres e com taxa de incidência elevada na Europa Ocidental (96 casos a cada 100 mil habitantes) embora menores taxas sejam registradas na África Central e na Ásia Oriental (27 casos a cada 100 mil) (*IARC, 2016*).

Recentemente o INCA publicou as estimativas de novos casos para os principais tipos de câncer considerando o biênio de 2016/2017. Para este ano estimou-se o número de novos casos de câncer de mama feminina para todos os estados brasileiros num montante de 57,96 por 100 mil habitantes (INCA, 2016a). Assim, o câncer de mama tem causado a morte de muitas mulheres no Brasil e no mundo inteiro, mesmo com melhoria de acesso às novas formas de diagnóstico precoce e de tratamento (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

2.2 ASPECTOS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS AO CÂNCER

2.2.1 Bases Moleculares do câncer

Do ponto de vista bioquímico, o câncer é considerado uma doença celular caracterizada por um descontrole do ciclo celular, que resulta numa perda progressiva dos processos de diferenciação, proliferação e morte, culminando em uma divisão celular descontrolada e no surgimento de tumores (ALBERTS et al., 2008).

De acordo com a literatura as células tumorais apresentam um conjunto de alterações em sua fisiologia e bioquímica que propiciam condições de sinalização adequadas à manutenção de proliferação celular constante, com resistência à morte celular programada (apoptose) e

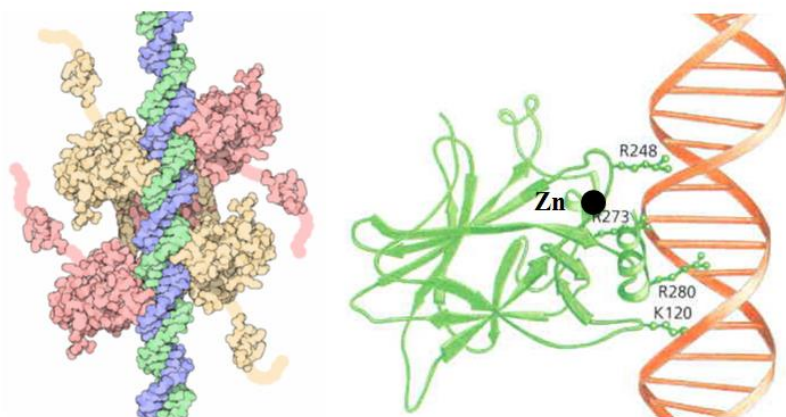
insensibilidade a substâncias supressoras de crescimento; além disto, tais alterações induzem fatores angiogênicos fazendo com que as mesmas sejam capazes de ativar a transição epitelial-mesenquimal para promover a invasão através da formação de micrometástases em tecidos saudáveis (HANAHAN; WEINBERG, 2000; 2011).

Algumas mutações no DNA podem originar células com comportamento distinto daquele que normalmente ocorre em células saudáveis, ou seja, ao invés de atuarem de maneira colaborativa as células mutantes passam a competir com as células normais. Quando uma célula mutante passa a se reproduzir descontroladamente ocorre a formação de uma população clonal de células tumorais. Estas apresentam uma vantagem seletiva que lhes permite crescerem, multiplicarem-se e dividirem-se de maneira mais vigorosa que se dá às custas das células vizinhas. Tal comportamento pode resultar no comprometimento da homeostase tecidual e na destruição de todo o conjunto em decorrência do crescimento de uma neoplasia (ALBERTS et al., 2008).

Mutações no DNA causam a ativação da p53. Esta fosfoproteína nuclear de 53 kDa apresenta uma estrutura composta por quatro cadeias proteicas idênticas unidas por um domínio tetramérico. Neste tetrâmero pode ser encontrado um domínio de ligação com o DNA que pode sofrer fosforilação no resíduo de serina 392 (S392) ativando a função de ligação específica à esta macromolécula (SAKAGUCHI et al., 1997; *NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION-NCBI*, 2016). Assim, quando a p53 liga-se às sequências específicas do DNA passa a atuar verificando a integridade do DNA e pode promover a parada do ciclo celular durante esta checagem caso sejam detectados danos causados por estresse oxidativo, por exemplo (ALBERTS et al., 2008).

O reconhecimento do DNA pela molécula da proteína p53 ocorre através dos resíduos de arginina 248 (R248) e de lisina 120 (K120) que se inserem nas fendas menor e maior do DNA numa interação dependente da presença de átomos de zinco (VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000; ALBERTS et al., 2008) (Figura 1).

Figura 1 - Proteína p53 interagindo com a dupla fita de DNA através dos resíduos de arginina (R 248) e de lisina (K 120) na presença de um átomo de zinco (Zn)



(Fonte: adaptado de ALBERTS et al., 2008; GOODSSELL, 2002)

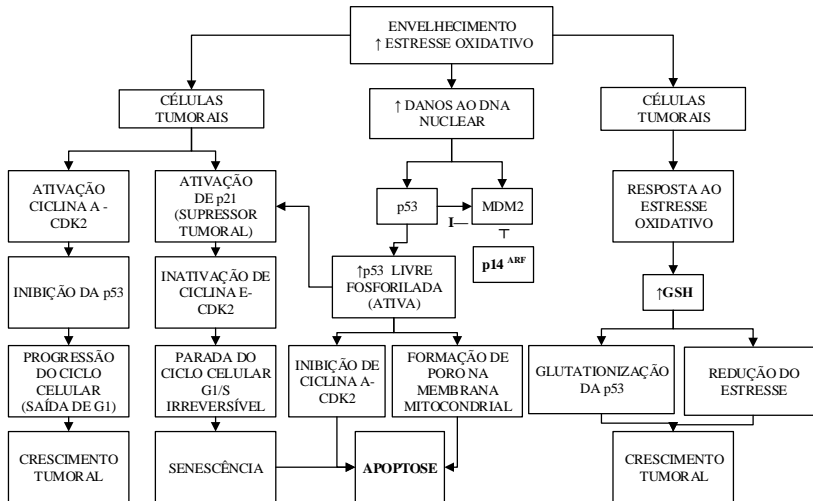
A perda do controle sobre o ciclo celular e falhas na indução de processos de morte celular observados no câncer podem ser decorrentes das mutações na estrutura linear do DNA herdadas ou de mutações adquiridas ao longo da vida por ação direta ou indireta de substâncias químicas com potencial mutagênico ou, ainda, de mutações associadas ao envelhecimento (WOLF; RAMIREZ, 2001; MATTSON; KROEMER, 2003).

Há décadas já se reconhece que o envelhecimento é um processo no qual danos às macromoléculas (DNA e proteínas) podem ser mediados por espécies reativas do oxigênio (EROs) (HARMAN, 1956). Miquel et al. (1983) refinaram o entendimento sobre estes processos de envelhecimento considerando que as mitocôndrias são a fonte e o principal alvo de radicais livres. Adicionalmente, danos oxidativos ao DNA mitocondrial (mtDNA) podem propiciar alterações profundas no metabolismo das mitocôndrias que resultem em alterações no ciclo celular podendo ocasionar morte celular (LEVINE; OREN, 2009; DAKUBO, 2010).

É importante mencionar ainda que na presença de danos ao DNA ocorre a ativação da proteína p53 e, concomitantemente, observa-se o papel exercido pelo sistema antioxidante celular em especial por moléculas do tripeptídeo glutatona reduzida (GSH) que passam a atuar

promovendo a glutationalização de moléculas de p53 inibindo a atividade pró-apoptótica das mesmas (VELU et al., 2007) (Figura 2).

Figura 2 - Sinalização para apoptose associada com danos ao DNA nuclear e ativação da proteína p53 induzidos pelo estresse oxidativo



(Fonte: adaptado de VELU et al., 2007; HAN et al., 2008; VASEVA; MOLL, 2009)

Em células tumorais foi verificada que a ocorrência de glutationalização dos resíduos de cisteína 124, 141 e 182 da p53 causou a inibição da ligação da p53 ao DNA determinando a sobrevivência e progressão tumoral (VELU et al., 2007; VASEVA; MOLL, 2009) (Figura 2). Por outro lado, quando os níveis de GSH estão depletados em função do estresse oxidativo elevado, o efeito inibidor da GSH sobre a atividade pró-apoptótica da p53 se reduz e a célula poderá entrar em apoptose (VELU et al., 2007).

Além disto, a proteína p53 pode agir como um fator de transcrição do DNA nuclear que atua modulando a expressão de genes que promovem a apoptose ou ainda de genes que possam ser responsáveis por manter as células presas entre as fases G1/S, ou seja, em um ponto de checagem da integridade do DNA (RONINSON, 2003; DIMRI, 2005).

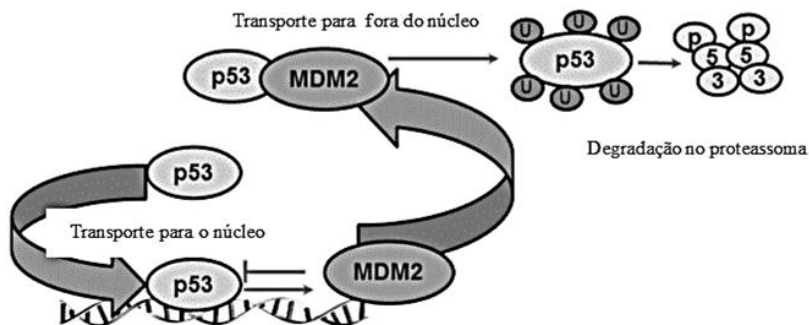
Se forem detectados danos ao DNA e estes forem corrigidos por proteínas de reparo do DNA, haverá o avanço no ciclo de maneira a completar a divisão celular (LEVINE; OREN, 2009) (Figura 2). No

entanto, quando os danos ao DNA forem irreparáveis poderá ser desencadeada a morte celular programada (apoptose) (LEVINE; OREN, 2009) (Figura 2).

Por outro lado, sabe-se que a senescência celular pode ser determinada pela inativação da proteína MDM2 sob a ação da proteína supressora tumoral p14^{ARF} (ZHANG; XIONG; YARBROUGH, 1998). Isto pode levar a um aumento da p53 livre que determina uma parada no ciclo celular seguida de alterações específicas de senescência no fenótipo celular (RONINSON, 2003) (Figura 2).

Outro mecanismo de perda de função da p53 que ocorre no câncer de mama também está associado com a deleção do gene p14^{ARF}. O gene supressor tumoral p14^{ARF} ao se ligar à MDM2 inibe a ação da proteína MDM2 que controla a degradação da p53 (Figura 2) (VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000). Assim, com a perda do p14^{ARF} a MDM2 passa a exercer maior controle ao se ligar à p53 inativando esta ao formar o dímero p53-MDM2 que, uma vez fora do núcleo, leva à ubiquitinação dos resíduos de lisina da p53 o que determina a degradação proteossomal da p53 (CHENG et al., 2011; NAG et al., 2013) (Figura 3).

Figura 3 - Regulação da p53 pela MDM2

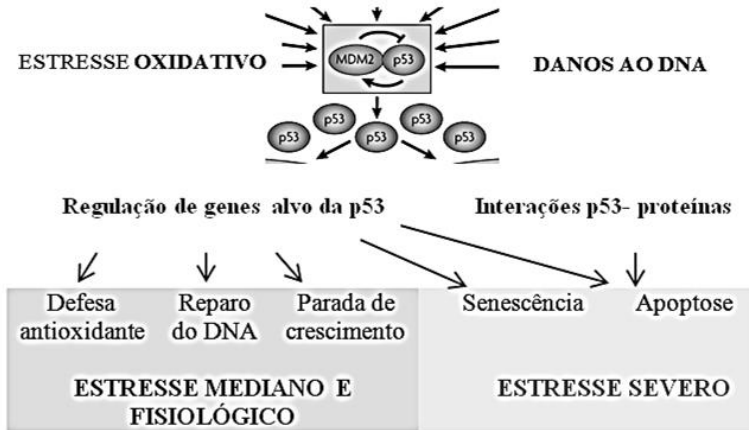


(Fonte: NAG et al., 2013)

A p53 também exerce papel na sinalização de estresse celular fisiológico quando ocorre a fosforilação do terminal N da p53 propiciando a quebra da ligação entre a MDM2 e a p53 levando à liberação e estabilização da p53 (KAMIJO et al., 1998) (Figura 2). Uma vez livre e ativa a p53 pode atuar regulando os genes associados às defesas antioxidantes e ao reparo de danos ao DNA ou interagir com outras proteínas (Figuras 3 e 4) (LEVINE; OREN, 2009; CHENG et al., 2011).

Em condições de estresse mais severo a p53 ativará processos como senescência celular e apoptose (LEVINE; OREN, 2009).

Figura 4 - Efeitos do estresse oxidativo e de danos ao DNA sobre o complexo p53-MDM2



(Fonte: adaptado de LEVINE; OREN, 2009)

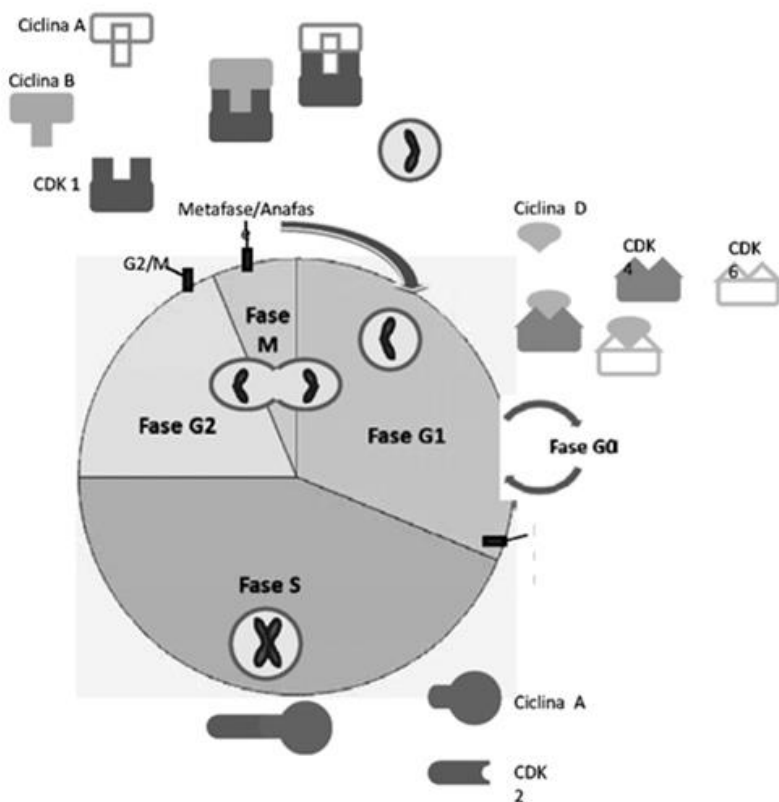
2.2.2 Ciclinas e CDKs envolvidas no controle do ciclo celular

O controle da progressão do ciclo celular ocorre pela ação de complexos proteicos onde as ciclinas exercem papel fundamental. De fato, nas células tumorais e nas normais ocorre a formação do complexo ciclina A-CDK2 onde a ciclina A regula a atividade catalítica de CDK2, uma cinase dependente de ciclina (*Cyclin Dependent Kinase* - CDK). O complexo ciclina A-CDK2 ativado atua se ligando na p53 promovendo a fosforilação do resíduo de serina 315 no terminal C desta proteína inibindo a sua atividade (LUCIANI et al., 2000). Esta sequência de eventos leva à evasão de apoptose e garante a continuidade do ciclo celular ao promover a saída da fase G1 *in vivo* (LUCIANI et al., 2000) (Figura 5).

Por esta razão, entre as estratégias para reduzir o crescimento tumoral pode ser considerada a modulação da atividade de proteínas que atuam no controle do ciclo celular. Esta atividade encontra-se bem documentada especialmente para as ciclinas A, B, D e E, assim como para as cinases dependentes de ciclinas (*Cyclin Dependent Kinases* - CDKs) em todas as fases do ciclo celular. Desta forma, em células normais a

continuidade ou a parada do ciclo celular também dependem da expressão das ciclinas que são reguladoras das CDKs. Assim, a progressão da fase G2 para a mitose depende de CDK2 - Ciclina A enquanto que a p53 mantém as células em G1 quando ocorrem danos ao DNA (WARD, 2002) (Figura 5).

Figura 5 - Fases do ciclo celular com as ciclinas e CDKs envolvidas



(Fonte: adaptado de ÁLVAREZ ALDANA et al., 2012)

A atividade das CDKs depende da associação com ciclinas que apresentam caráter regulatório propiciando a ativação destas que, por outro lado, são desativadas por defosforilação em seus resíduos de pares treonina/tirosina. Isto pode ocorrer quando proteínas inibitórias se ligam

às cinases, entre estas proteínas destacam-se a p21 e a p16 que atuam durante a fase G1 (SHERR, 1996; LAVIN; GUEVEN, 2006).

Na fase G1 (gap 1 ou ponto de controle da integridade do DNA) a ciclina E forma um heterodímero com a CDK2 que atua na modulação de genes associados com a proliferação celular. Quando a proteína p21 se liga e inibe o complexo ciclina E-CDK2 previne a fosforilação necessária para a passagem para a fase S (LAVIN; GUEVEN, 2006).

Nas células em fase S (fase de síntese de DNA) a ciclina A forma um complexo com a CDK2 necessário para a condução da célula para a fase G2 (gap 2 ou ponto de controle da integridade do DNA) (AUDIC et al., 2004). Por fim, na fase M que corresponde à mitose as ciclinas B1 e B2 formam complexos com cdc2 (LAI et al., 2012).

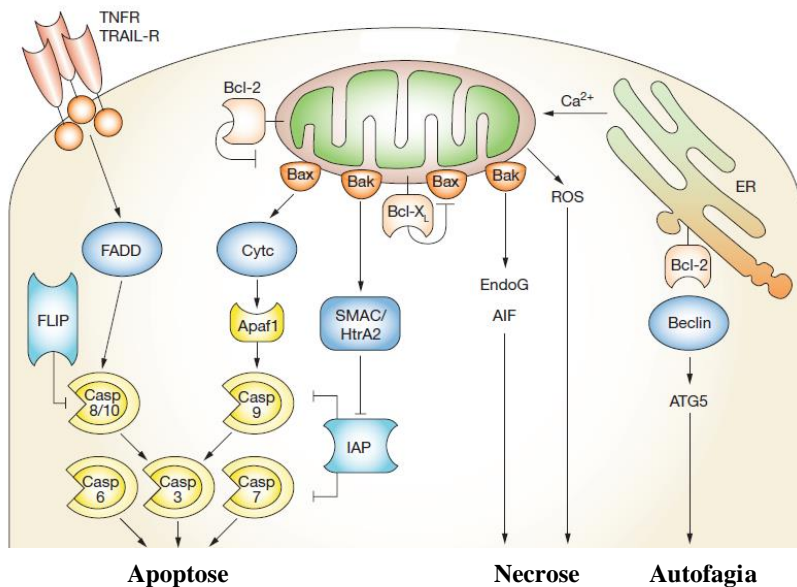
Portanto, as fases do ciclo celular dependem da função regulatória do complexo CDK/ciclina. Assim, menores níveis de CDK2 mantêm as células presas na fase G1 (Figura 5), o que eventualmente levará as células à morte por apoptose (GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2010) (Figura 2). Por outro lado, no caso de células tumorais que apresentarem maior ativação do complexo ciclina A-CDK2 haverá progressão do ciclo celular, entrada na fase S e mitose (BERTHET; KALDIS, 2007).

2.2.3 Morte celular

Em geral pode-se considerar que o tipo de morte e as alterações morfológicas associadas podem variar de acordo com o tipo celular; metabolismo e nível energético; tipo de estímulo citotóxico e a via de sinalização para morte celular que depende também das cascatas bioquímicas ou vias de sinalização no microambiente celular (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; HAIL JR. et al., 2006).

A morte por apoptose ou por necrose são alguns dos tipos de morte celular por auto-eliminação que apresentam características citológicas e bioquímicas próprias (CASTEDO et al., 2004; DIMRI, 2005). É importante notar que a ausência de controle destes processos pode resultar na formação de tumores (RICCI; ZONG, 2006) (Figura 6).

Figura 6 - Vias de sinalização associadas com apoptose, necrose e autofagia



Nota: AIF, fator indutor de apoptose; ATG5, proteína autofágica 5; Casp, caspase; Cytc, citocromo c; EndoG, endonuclease G; ER, retículo endoplasmático; ROS, espécies reativas de oxigênio; TNFR, receptor de fator de necrose tumoral; TRAIL-R, *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor*. (Fonte: REED, 2006)

2.2.3.1. Morte celular por apoptose

Em termos bioquímicos a apoptose ou morte celular programada pode ser regulada através da ativação de fatores pró-apoptóticos mediados por proteínas sinalizadoras bem como por proteínas efetoras. Este tipo de morte celular tem sido considerado como um processo regulado e dependente do estado energético celular, onde as células vizinhas atuam realizando a fagocitose dos remanescentes celulares, ou seja, trata-se de um processo limpo (ALBERTS et al., 2008). Além disto, este processo também é fundamental como um dos mecanismos regulatórios existentes no desenvolvimento embrionário bem como durante o crescimento para a manutenção do equilíbrio necessário para a homeostase dos tecidos (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; KONG et al., 2013).

Assim, em condições fisiológicas a apoptose favorece a manutenção do equilíbrio entre o número de células que entram em divisão e o número de células em processo de morte, habilitando o corpo a eliminar as células danificadas e senescentes (VAUX; STRASSER; 1996; KONG et al., 2013).

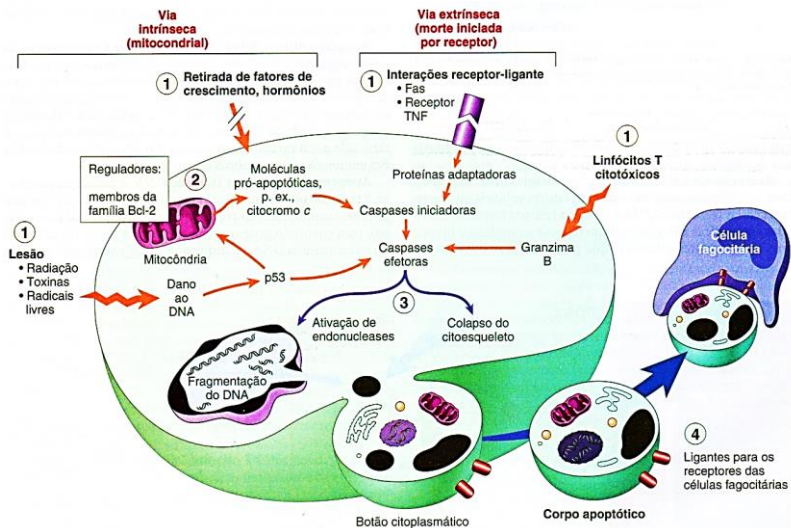
Por outro lado, em condições patológicas a finalização da vida de células por apoptose pode ocorrer devido à ativação de vias sinalizadoras associadas aos danos às macromoléculas (VELU et al., 2007).

A apoptose é um tipo de morte celular que pode ocorrer através de duas vias principais uma denominada como via extrínseca e outra denominada como intrínseca. Nestas vias ocorre a ativação de uma série de enzimas caspases que atuam como proteases clivando o seu substrato na região após um resíduo de aspartato (Asp). Algumas caspases são cruciais no processo de iniciação da apoptose (caspases inicializadoras) e são denominadas como caspases 2, 8, 9 e 10; outras são importantes na execução da apoptose (caspases efetoras) como as caspases 3, 6 e 7; além destas enzimas atuarem em processos de diferenciação celular e na resposta adaptativa ao estresse (GALLUZZI et al., 2008) (Figura 6).

A via extrínseca ocorre através de via de sinalização iniciada por proteínas da família de receptores de morte, entre os quais se destaca o receptor de fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor receptor* ou TNFR), situado na superfície externa da membrana celular (Figura 6).

A ativação da via intrínseca pode ocorrer após um estímulo capaz de causar estresse na célula. Neste caso, a resposta celular ao estresse se dá por intermédio de via de sinalização que se inicia com a liberação do citocromo c (GREEN, 2000; FULDA; GALLUZZI; KROEMER, 2010). Tal liberação é determinada quando ocorre a perda do potencial da membrana externa das mitocôndrias levando a permeabilização da mesma (ADAMS; CORY, 2002; YU; ZHANG, 2005) (Figura 7).

Figura 7 - Vias de sinalização celular associadas com morte por apoptose

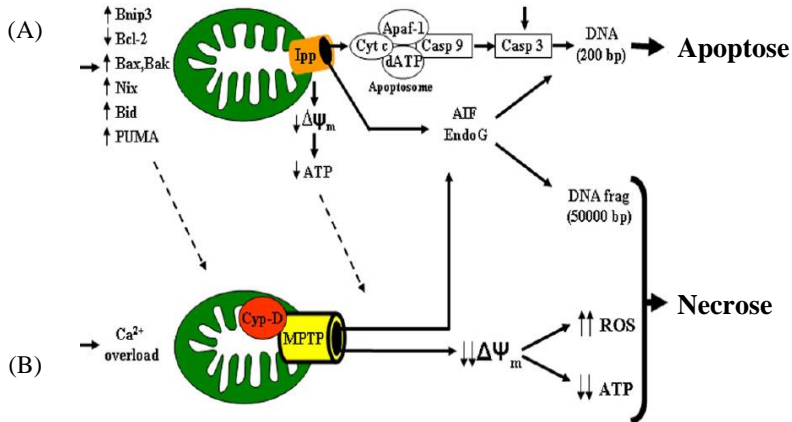


(Fonte: ROBBINS; COTRAN; MITCHELL, 2006)

Na Figura 7 os números correspondem às etapas envolvidas na sinalização para morte celular por apoptose. O número (1) corresponde ao início da sinalização por diferentes vias que incluem danos ao DNA associados aos radicais livres, sinalizados pela p53 que determina a liberação de moléculas pró-apoptóticas. O número (2) corresponde à resposta celular através da via intrínseca (liberação do citocromo c de mitocôndrias). A cascata de sinalização leva à ativação das caspases iniciadoras e de caspases efetoras e, finalmente, à ativação de endonucleases que atuam fragmentando o DNA genômico em qualquer lugar da fita. Além destas caspases causarem alterações drásticas no citoesqueleto representadas no número (3). Estes eventos culminam na formação de corpos apoptóticos representados no número (4) (ROBBINS; COTRAN; MITCHELL, 2006).

Assim, no estresse oxidativo moderado ou acentuado haverá inibição da cadeia respiratória das mitocôndrias danificadas culminando em morte celular por apoptose ou por necrose relacionadas com disfunção energética mitocondrial que pode também estar associada com elevadas concentrações de cálcio (MATTSON; KROEMER, 2003; GONZÁLEZ et al., 2011) (Figura 8).

Figura 8 - Danos moderados (A) ou severos (B) ao DNA associados à via intrínseca e que podem levar à morte celular por apoptose ou por necrose, respectivamente



Nota: AIF, fator indutor de apoptose; Apaf-1, *apoptosis protease-activating factor*; Atg, genes relacionados com autofagia; ATP, adenosina trifosfato; Casp, caspase; Cyp-D, ciclofilina D; Cyp-c, Citocromo c; dATP, desoxiadenosina trifosfato; DNA frag, fragmentos de DNA; Endo G, endonuclease-G; Ipp, poro permeável a íons; MPTP, poro de transição de membrana mitocondrial; PUMA, modulador de apoptose regulado por p53 (*p53 up-regulated modulator of apoptosis*); ROS, espécies reativas do oxigênio; $\Delta\Psi_m$, potencial de membrana mitocondrial interna.

(Fonte: adaptado de GONZÁLEZ et al., 2011)

Estratégias para o tratamento de câncer podem ser baseadas na indução de apoptose por mecanismos que dependem da ação de proteínas envolvidas na permeação da membrana externa das mitocôndrias tais como membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (Bak e Bax) (LINDSTEN et al., 2000).

Quando ativada, a proteína Bax se encontra ancorada na membrana externa das mitocôndrias e pode interagir com a proteína Bid. Esta interação leva à oligomerização da Bax e conseqüente abertura de poros por onde as moléculas do citocromo c podem ser liberadas para o citoplasma celular (Figura 9, passo 1). Isto não ocorre no caso de células

tumorais onde a proteína inibidora de apoptose Bcl-2 se liga à Bax impedindo sua oligomerização (Figura 9, passo 2), deslocando a proteína Bid que se desliga da Bax; uma vez ligada à Bcl-2 o conjunto se liga a outra Bax ancorada na membrana externa mitocondrial evitando que ocorra a permeabilização da membrana mitocondrial impedindo a liberação do citocromo c e ativação da via intrínseca (GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2010; LANT; STOREY, 2010).

Por outro lado, quando as proteínas pró-apoptóticas p53 e Bax estão superexpressas elas atuam impedindo que células tumorais escapem da morte programada, pois ocorre a permeabilização da membrana mitocondrial determinando a morte celular por apoptose. Desta forma, elas controlam o desenvolvimento de neoplasias (MATTSON; KROEMER, 2003). Quando houver superexpressão de Bax a sinalização para a morte celular será acelerada (LAI et al., 2012).

Além disto, a ação combinada dos membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (Bak e Bax) representa um ponto de controle da continuidade do ciclo celular considerado essencial para o desenvolvimento normal dos tecidos, pois estas proteínas atuam eliminando o excesso de células que representa um passo necessário para a manutenção da homeostase tecidual (LINDSTEN et al., 2000).

Além dos membros da família Bcl-2 a permeabilização da membrana externa mitocondrial pode ser controlada pela formação do poro de transição (*MPT - Mitochondrial Permeability Transition*). Este é constituído por um complexo proteico formado pela VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) que atua como canal aniônico dependente de voltagem; pela proteína ANT (*Adenina Nucleotide Translocase*) na membrana interna (atua no transporte de ATP) e pela proteína da matriz mitocondrial a ciclofilina D ou CyPD (*Cyclophilin D*) (GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2010) (Figura 9, passo 3).

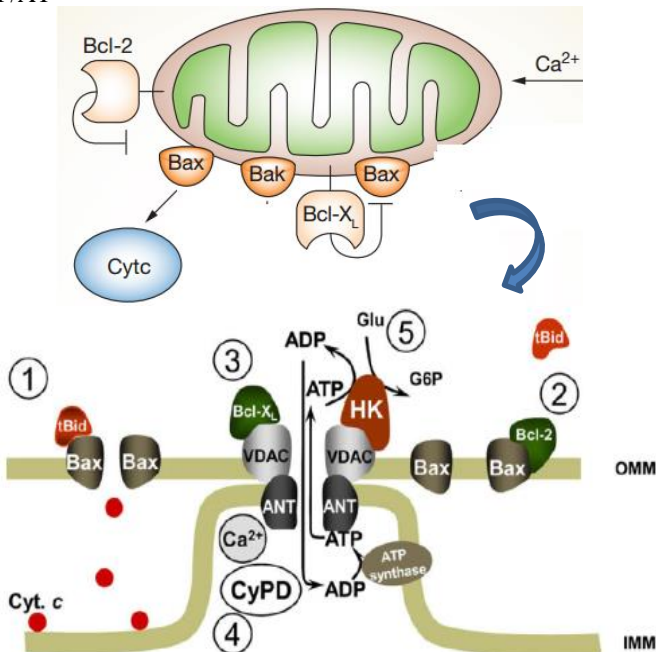
Elevadas concentrações de EROs induzem a formação de ligações cruzadas entre cisteínas (Cys160 e Cys257) da proteína ANT existente na membrana interna mitocondrial (Figura 9, passo 3), o que resulta em alterações conformacionais nesta proteína permitindo a entrada e, conseqüentemente, o aumento de cálcio no espaço intermembranas das cristas mitocondriais (COSTANTINI et al., 2000; WANG; YI, 2008).

O aumento de cálcio nas mitocôndrias promove a formação do complexo ciclofilina D – ANT (CyPD-ANT) (Figura 9, passo 3) que induz a abertura do poro MPT na membrana mitocondrial permitindo a liberação de moléculas de até 1,5 kDa, como o citocromo c que determina a morte por apoptose (HALESTRAP; CLARKE; JAVADOV, 2004). A homeostase do cálcio também depende de variações na razão entre as

concentrações de ATP, de ADP e fosfato inorgânico {[ATP]/[ADP][Pi]} no citosol e na razão entre NADH/NAD⁺ nas mitocôndrias (LEHNINGER; VERCESI; BABABUNMI, 1978).

Através deste poro MPT ocorrem as trocas de ADP/ATP (Figura 9, passo 4) o que permite às células tumorais utilizarem ATP intramitocondrial para realizar a fosforilação da glicose e manter a alta taxa de glicólise (Figura 9, passo 5) (GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2010). Assim, a proteína Bcl-xL inibidora da apoptose atua sobre o MPT quando se liga à proteína VDAC mantendo o complexo na configuração que permite a troca de ADP/ATP (GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2010).

Figura 9 - Papel das proteínas Bax (induz a apoptose) e Bcl-xL (inibe a apoptose) na permeabilização da membrana externa da mitocôndria e na formação do complexo VDAC, ANT e CyPD que constitui o poro MPT o qual favorece as trocas ADP/AT



Nota: VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) (canal aniônico dependente de voltagem dependente); ANT (Adenina Nucleotídeo Translocase); OMM (Outer Mitochondrial Membrane) (Membrana mitocondrial externa); IMM (Inner Mitochondrial Membrane) (Membrana mitocondrial interna); CyPD (ciclofilina D); Cyt c (citocromo c); Bid (proteína ligante da Bax).

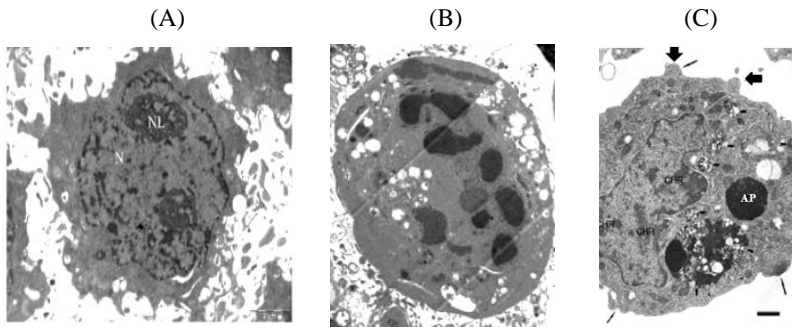
(Fonte: modificado de REED, 2006; MOTYL et al., 2006; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2010)

Em termos de alterações na morfologia celular que ocorrem em células em processo de apoptose podem ser destacadas as formações de pseudópodes; redução do volume celular (*cell shrinkage*); condensação da cromatina; fragmentação do núcleo; formação de *blebbings* na membrana plasmática intacta; relocação da cromatina para a superfície dos *blebbs*; fragmentação do núcleo e formação de corpos apoptóticos (vacúolos contendo porções do citoplasma e organelas) (LANE; ALLAN; WOODMAN, 2005; GALLUZZI et al., 2007; KONG et al., 2013) (Figura 10).

Estudo realizado *in vitro* com células MCF-7 foram observadas alterações na morfologia associadas à morte por apoptose (MOTYL et al., 2006). As células antes do tratamento apresentaram projeções alongadas na membrana e núcleo evidente com cromatina descondensada (Figura 10 A). O tratamento destas células com indutores de apoptose levou à retração ou encolhimento celular resultando na forma arredondada, causou condensação de cromatina e determinou o aumento de número de vacúolos no citoplasma (Figura 10 B) (KONG et al., 2013). Na Figura 10 C, representativa de células tratadas e em processo de apoptose, o tratamento levou à formação de *blebbings* na membrana plasmática e à formação de corpos apoptóticos que foram observados através de microscopia eletrônica de transmissão (AKTER et al., 2012; MOTYL et al., 2006).

Adicionalmente, outro modelo empregado em estudos de atividade antitumoral se refere ao tumor ou carcinoma ascítico de Ehrlich (TAE). Este carcinoma é uma neoplasia (adenocarcinoma mamário murino) derivada de células epiteliais de glândula mamária de camundongos, tendo sido descrita no início do século 20 pelo cientista Paul Ehrlich que observou o desenvolvimento da forma sólida quando implantado por via subcutânea, enquanto que quando inoculado intraperitonealmente se desenvolve na forma ascítica (EHRlich, 1906). Isto ocorreu quando células de TAE foram injetadas na cavidade intraperitoneal de camundongos por Loewenthal e Jahn (1932), que observaram células tumorais, hemácias e algumas células do sistema imune do animal envoltas em um líquido ascítico que nutre as células.

Figura 10 - Micrografias eletrônicas de transmissão de alterações morfológicas associadas à morte celular por apoptose de células MCF-7 antes (A) e após tratamento com indutores de apoptose (B; C)



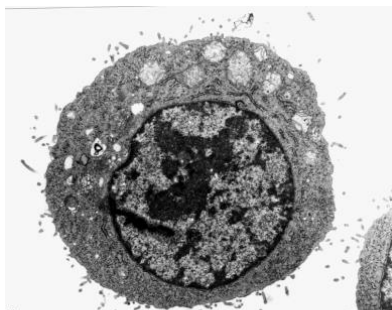
Nota: núcleo (N), nucléolo (NL) (aumento 10.000x) (KONG et al., 2013); corpos apoptóticos (AP); cromatina condensada (CHR) (setas cinza), a barra equivale a 1 μ m.

Fonte: (MOTYL et al., 2006; KONG et al., 2013)

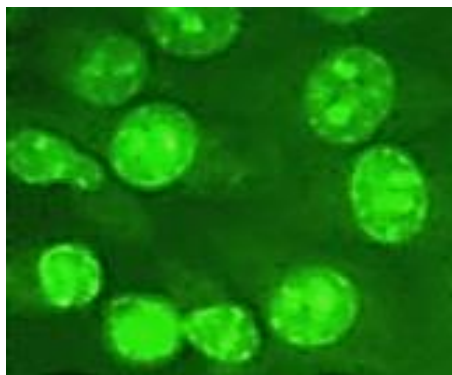
Observando a estrutura das células de TAE quando mantidas em condições fisiológicas verifica-se que estas apresentam forma arredondada contendo um núcleo bem delimitado, alguns vacúolos no citoplasma e com parte da cromatina descondensada (MOFFATT et al., 2000) (Figura 11 A). Estas células apresentam pontos no interior do núcleo onde a cromatina encontra-se condensada e que apresentam maior fluorescência (verde claro) quando se utiliza marcação com o corante laranja acridina. Este corante catiônico e intercalante do DNA é capaz de atravessar as membranas celulares intactas e, por esta razão, pode ser utilizado em estudos com o DNA; assim as células viáveis aparecem em verde claro devido à emissão deste corante no comprimento de onda de 525 nm (verde) (GABRIEL et al., 2012) (Figura 11 B).

Figura 11 - Morfologia de células de carcinoma de Ehrlich por microscopia eletrônica de transmissão (A) e microscopia de fluorescência (B)

(A)



(B)



Nota: (A) aumento 15.700x; (B) aumento 400x.

Fonte: (MOFFATT et al., 2000; GABRIEL et al., 2012)

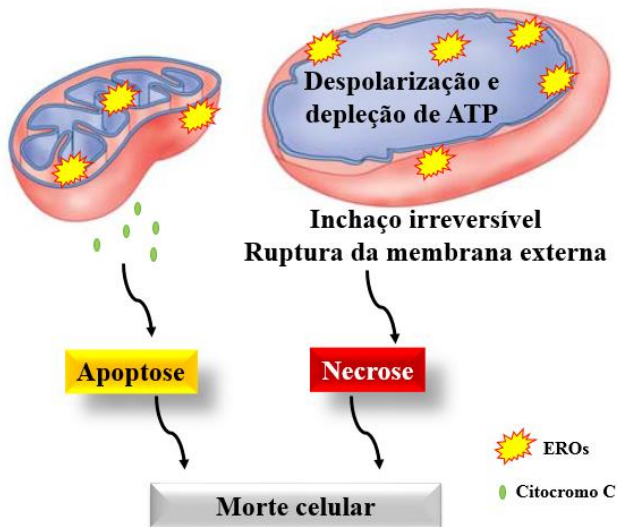
Adicionalmente, o corante laranja acridina permite observar algumas alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas associadas ao processo de apoptose induzido por tratamentos que causam modificações nas condições do pH de compartimentos intracelulares (lisossomos e endossomos) (MCGAHON et al., 1995).

2.2.3.2. Morte celular por necrose

A morte celular por necrose em geral ocorre como consequência de lesões associadas com processos infecciosos, inflamação e isquemia (OKADA; MAK, 2004). De fato, a morte por necrose frequentemente causa inflamação local (ROZENKRANZ; WINK, 2008).

Eguchi; Shimizu e Tsujimoto (1997) demonstraram que a morte celular por necrose está relacionada diretamente com depleção acentuada dos níveis intracelulares de ATP e perda do potencial de membrana nas mitocôndrias. Neste sentido, tem sido observado que ao serem submetidas a um estresse oxidativo acentuado ocorre nas células uma perda significativa do potencial de membrana das mitocôndrias que poderá resultar em despolarização e depleção de ATP, inchaço irreversível e morte celular por apoptose ou por necrose (YEN; KLIONSKY, 2008). Em condições de estresse oxidativo extremo haverá a depleção de ATP, com ruptura da membrana externa mitocondrial determinando a morte por necrose (Figura 12) (YEN; KLIONSKY, 2008; ZAHDFARD et al., 2015).

Figura 12 - A liberação do citocromo c leva à apoptose e a ruptura da membrana externa mitocondrial, com depleção de ATP e o inchaço irreversível causando morte celular por necrose



(Fonte: modificado de YEN; KLIONSKY, 2008)

As alterações morfológicas típicas de células em processo de morte por necrose envolvem o inchaço celular e desintegração tanto da membrana plasmática quanto da membrana nuclear (SUCHA et al., 2013). Estes processos podem resultar na ruptura e extravasamento do conteúdo do citoplasma para o exterior celular estes eventos são características típicas da morte por necrose (SPIERINGS et al., 2005) (Figura 12).

2.2.4 Estresse oxidativo e sistema de defesas antioxidantes

O estresse oxidativo é caracterizado por uma série de eventos que ocorrem no ambiente celular. Estresse oxidativo pode ser entendido como sendo um distúrbio no balanço pró-oxidante/antioxidante em favor do primeiro, levando a danos celulares potenciais (SIES, 1991; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Quando a elevação de espécies reativas de oxigênio (EROs) for muito pronunciada o estresse oxidativo gerado pode causar danos excessivos às macromoléculas, células e tecidos (MARTÍN-CORDERO et al., 2012). EROs são geradas continuamente através do metabolismo intracelular do oxigênio em organismos aeróbicos mediante estímulos externos. Estas espécies se tratam de pequenas moléculas ou íons formados pela redução incompleta do oxigênio e entre estas espécies reativas do oxigênio estão os radicais livres como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroperóxil (HO_2^{\cdot}), o radical hidroxil (HO^{\cdot}), o radical peróxil (HO_2^{\cdot}) e o radical alcóxil (RO^{\cdot}); além de espécies não radicalares que também são agentes oxidantes tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ozônio (O_3), os hidroperóxidos orgânicos (LOOH) e a forma eletricamente excitada denominada como oxigênio singlete (1O_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; DICKINSON; CHANG, 2011). Já os radicais livres são considerados como qualquer espécie química de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, que seja altamente reativa e capaz de atuar sobre biomoléculas (HALLIWELL, 1987; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Cabe destacar que os danos oxidativos às macromoléculas podem ser ocasionados de maneira mais seletiva principalmente por espécies oxidantes como o radical superóxido ($O^{\cdot-}$) e o óxido nítrico (NO^{\cdot}) ou de maneira mais indiscriminada como no caso do radical hidroxil (HO^{\cdot}) (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; HALLIWELL, 2013).

Halliwell e Whiteman (2004) consideraram que danos oxidativos ocorrem por ataque direto das espécies reativas sobre as biomoléculas durante o estresse oxidativo. Como consequência, este estresse pode

determinar uma resposta adaptativa celular ou do organismo como um todo que efetua uma regulação através do sistema de defesa antioxidante. Adicionalmente, no estresse oxidativo podem ocorrer danos a lipídios, ao DNA, às proteínas e carboidratos levando a alterações bioquímicas que incluem a ativação de proteases e modificações dos níveis de íons (Ca^{+2}) que determinam a morte celular por apoptose ou necrose nos casos em que as células não forem capazes de reverter os danos.

Para o combate ao estresse oxidativo as células apresentam as defesas antioxidantes que visam estabelecer o balanço redox e evitar a ocorrência de danos às macromoléculas (HALLIWELL; GUTERIDGE; 1999). Uma linguagem mais atual refere-se ao sistema de defesas antioxidantes celulares como sendo uma rede de equilíbrio redox ou rede antioxidante celular que é composta por sistemas que dependem de componentes conectados através de substratos e produtos (BUETTNER; WAGNER; RODGERS, 2013).

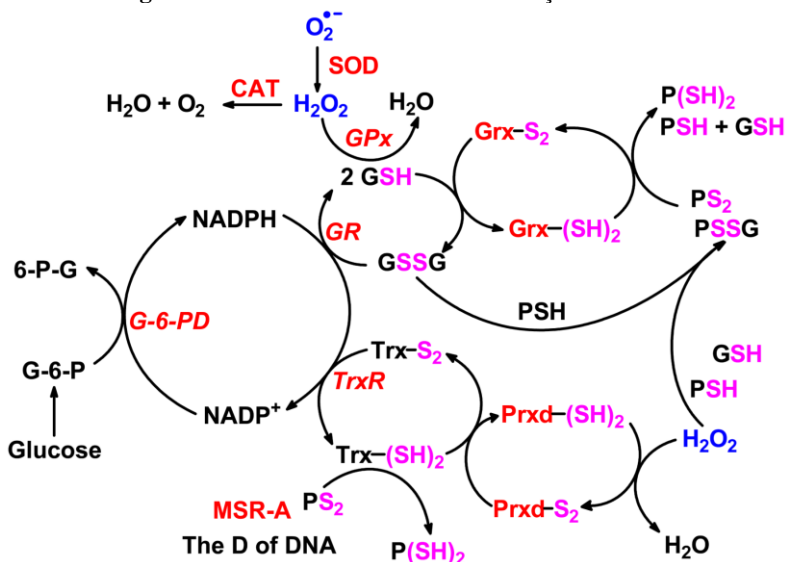
As reações que ocorrem dentro da rede antioxidante celular ou rede redox devem resultar na manutenção do adequado funcionamento tanto das células quanto do organismo. Dentro desta rede destaca-se a atividade do sistema de enzimas antioxidantes que atuam na remoção do ânion superóxido e de peróxidos (*superoxide-eroxide removal system* - SPR), ainda que os peróxidos sejam necessários à sinalização celular a concentração destes pode atingir níveis potencialmente danosos para as células normais (BUETTNER; WAGNER; RODGERS, 2013).

O sistema de remoção de superóxido-peróxido é constituído por várias enzimas como catalase (CAT); superóxido dismutase (SOD); glutationa redutase (GR); glutationa peroxidase (GPx); tiorredoxina (Trx) e peroxirredoxinas (Prxd) que estão presentes em diferentes organelas celulares e também na matriz extracelular (BUETTNER; WAGNER; RODGERS, 2013).

Os integrantes do sistema de regulação redox encontram-se representados na Figura 13. Trata-se de sistema formado por compostos enzimáticos e não enzimáticos (BUETTNER; WAGNER; RODGERS, 2013). A enzima envolvida no sistema de remoção de ânion superóxido é a superóxido dismutase (SOD). Este sistema apresenta três pontos ou nódulos (*node*) fortemente conectados e que atuam na remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BUETTNER; WAGNER; RODGERS, 2013). Na Figura 13 está representado o primeiro nódulo ou ponto de junção (*node*) constituído pela enzima catalase (CAT). O segundo ponto de junção é representado pelas enzimas glutationa redutase (GR) (atua regenerando GSH na presença de NADP^+ / NADPH e de GSSG) e glutationa peroxidase (GPx) que atua na presença do tiol glutationa

(GSH) para a remoção de peróxido de hidrogênio e formação de água (BUETTNER; WAGNER; RODGERS, 2013). O terceiro ponto de junção é representado pelo trio formado pelas enzimas tioredoxina redutase/tiorredoxina/peroxiredoxina que também estão envolvidas no sistema de remoção de peróxido de hidrogênio onde se destaca a enzima tioredoxina redutase (TrxR), as proteínas tioredoxina (Trx) e peroxiredoxina (Prxd) que atuam como antioxidantes na redução de peróxido de hidrogênio formando oxigênio e água (BUETTNER; WAGNER; RODGERS, 2013).

Figura 13 - Sistema antioxidante de remoção de EROs



Nota: catalase (CAT); glutatona dissulfeto (GSSG); glutatona reduzida (GSH); glutatona redutase (GR); glutatona peroxidase (GPx); ligação dissulfeto de proteína (PS₂); peroxiredoxina (Prxd); proteína reduzida (PSH); superóxido dismutase (SOD); tioredoxina redutase (TrxR); tioredoxina-(S-S) (Trx-S₂); tioredoxina-(SH)₂ (Trx-(SH)₂).

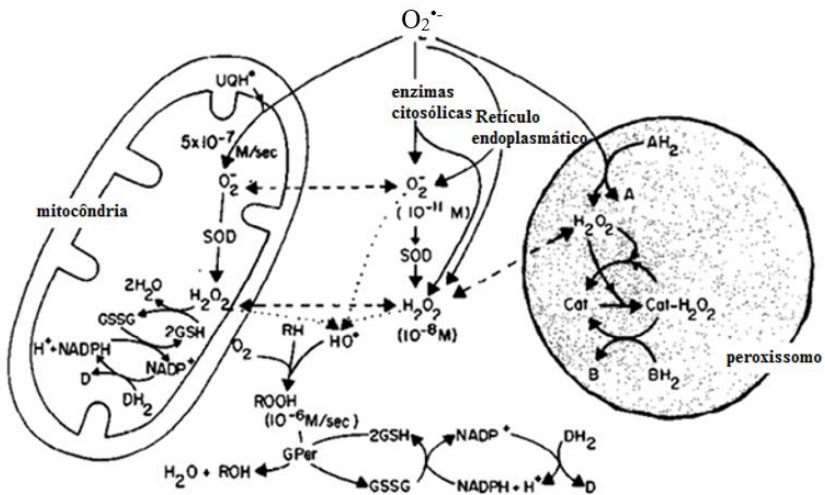
(Fonte: BUETTNER; WAGNER; RODGERS, 2013)

Assim, a geração de EROs no metabolismo celular é controlada por um complexo sistema de defesa antioxidante do qual participam compostos com atividade antioxidante de origem endógena como as enzimas com atividade antioxidante como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutatona redutase (GR), a glutatona peroxidase (GPx), a tioredoxina (Trx) e peroxirredoxinas (Prxd) e os tióis de alto

(albumina) ou de baixo peso molecular (glutathiona ou GSH) e formam uma complexa rede bioquímica onde atuam na remoção de peróxido de hidrogênio e neutralização das EROs. Além disto, as células também utilizam antioxidantes exógenos como as vitaminas C e E e os polifenóis (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; BUETTNER; WAGNER; RODGERS, 2013) (Figura 14).

Na Figura 14 os valores expressam a concentração e taxas de formação de metabólitos do oxigênio a partir do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), do radical hidroxil (HO^{\cdot}) e de alquil hidroperóxido (ROOH); B e BH_2 são doadores de hidrogênio com especificidade apropriada para catalase, como o etanol no interior de peroxissomos (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979).

Figura 14 - Compartimentos subcelulares envolvidos no sistema antioxidante de remoção de EROs



Nota: Catalase, cat; doadores de hidrogênio, A e AH_2 ; B e BH_2 ; D e DH_2 ; glutatona peroxidase, GPx; radical ubiquinona, UQH; sistema redutor NADP não especificado, DH e D; superóxido dismutase, SOD.

(Fonte: CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979)

2.2.5 Quimioterápicos e tratamento de câncer

A quimioterapia deve ser entendida como um método que utiliza compostos químicos, os quimioterápicos, no tratamento de doenças

causadas por agentes biológicos. Porém, ao ser aplicada no tratamento de câncer, a quimioterapia deve ser chamada de quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia antitumoral (INCA, 2016b).

A quimioterapia realizada com apenas um agente antineoplásico mostrou ser de menor eficácia, uma vez que a administração conjunta de fármacos permite atingir populações celulares em diferentes fases do ciclo celular, propicia condições para ação sinérgica dos compostos e promove maior resposta por dose administrada (INCA, 2016b).

Embora o objetivo primário da quimioterapia seja promover a morte das células tumorais enquanto as células normais devem permanecer preservadas observa-se comumente a ocorrência de lesões de maneira indiscriminada (ALMEIDA et al., 2005). Isto ocorre devido ao fato da maior parte dos agentes quimioterápicos existentes apresentarem baixa especificidade, levando também à destruição de tecidos saudáveis (TAM, 2013).

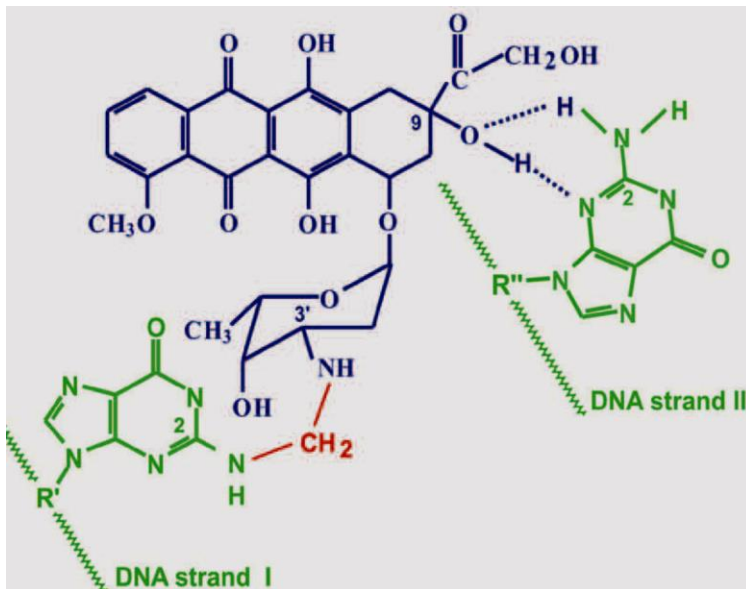
No tratamento de carcinomas de mama os agentes antineoplásicos clinicamente usados são ciclofosfamida, mitomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, podofilotoxinas (etoposida e teniposida), vimblastina, vincristina, metotrexato e taxol, este último em casos avançados (ALMEIDA et al., 2005).

Determinados quimioterápicos interagem por intercalação com o DNA, sendo que entre estes se destaca a doxorrubicina (NEIDLE, 1979; ALMEIDA et al., 2005). Trata-se de um antibiótico antracíclico não seletivo que foi isolado de culturas de *Streptomyces peucetius* var. *taesus* com reconhecida atividade antitumoral mas que apresenta graves efeitos adversos (HILMER et al., 2004; TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013).

A doxorrubicina tem sido empregada no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o de mama e seu modo de ação está baseado na intercalação com o DNA. Esta intercalação leva ao dano à estrutura desta macromolécula, causando inibição da atividade da topoisomerase com consequente parada no processo de replicação além de causar disfunção mitocondrial reduzindo a atividade dos complexos I e IV (HILMER et al., 2004; TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013).

A estrutura molecular da doxorrubicina sugere que sua porção planar tetracíclica (anéis fundidos) pode se inserir e intercalar entre dois pares de bases adjacentes na molécula de DNA e, ao mesmo tempo, o grupo amino do aminoaçúcar (*sugar amino group*) deste quimioterápico se posiciona no sulco menor da molécula de DNA onde interage com as bases adjacentes ao sítio de intercalação (Figura 15) (PALCHAUDHURI; HERGENROTHER, 2007; ALBERTS et al., 2008).

Figura 15 - Intercalação do quimioterápico doxorubicina entre as bases da molécula de DNA

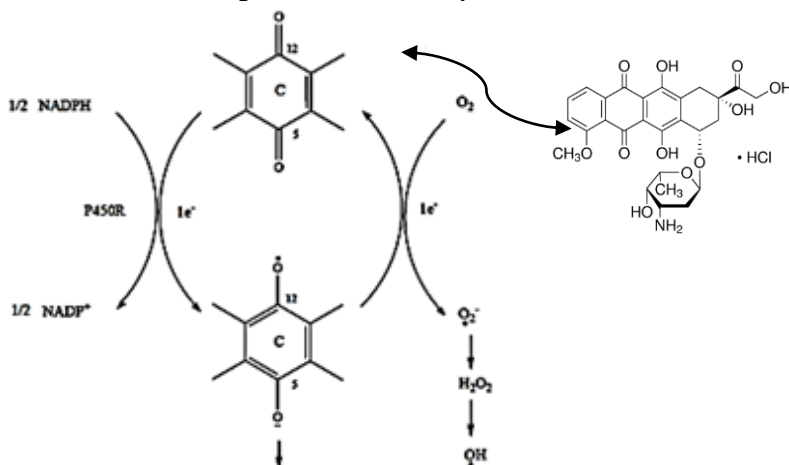


Nota: intercalação da molécula de doxorubicina (em azul) entre as bases das fitas do DNA (em verde).

(Fonte: ALBERTS et al., 2008)

Por fim, deve-se ressaltar que este fármaco apresenta baixa especificidade causando elevada citotoxicidade para células cardíacas e renais. Esta toxicidade pode ser atribuída à geração de radicais livres superóxido e hidroxil durante o ciclo redox do grupo quinona da doxorubicina. Por outro lado, estes radicais livres são capazes de causar danos às macromoléculas suficientes para induzir morte celular por apoptose ou necrose das células tumorais (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013; TAM, 2013) (Figura 16).

Figura 16 - Ciclo redox do grupo quinona (núcleo quinóide) do quimioterápico doxorubicina onde são gerados os radicais superóxido e hidroxil



Danos às macromoléculas (DNA e proteínas)

(Fonte: adaptado de TAM, 2013; Fonte da imagem: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure1/038/mfcd00077757.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00077757-large.png)

2.3 ATIVIDADE ANTITUMORAL DE PLANTAS MEDICINAIS

2.3.1 Estudos etnofarmacológicos

Compostos derivados de plantas têm sido empregados no tratamento de diferentes tipos de câncer, inclusive câncer de mama. A busca destes compostos secundários se dá notadamente através de estudos etnobotânicos realizados em comunidades tradicionais tanto no Brasil (TULER; SILVA, 2014), quanto em comunidades de várias etnias situadas em outros países (NEELIMA et al., 2011; ZAVALITA, 2012).

Entre os compostos isolados de plantas que estão sendo utilizados no tratamento de neoplasias destacam-se os alcalóides vimblastina e vincristina isolados de *Catharantus roseus* (Apocinaceae) e o diterpeno paclitaxel (taxol) isolado de *Taxus brevifolia* Nuttall (Taxaceae) (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Neste sentido, as pesquisas conduzidas no Laboratório de Bioquímica Experimental - LABIOEX forneceram informações importantes para a validação de usos populares previamente descritos sob

o enfoque etnobotânico. Ressaltando que a maior contribuição destas pesquisas se refere aos aspectos bioquímicos estudados que forneceram evidências bioquímicas e moleculares que podem ser utilizadas para comprovar e promover a validação do uso popular.

Com este intuito foram publicados trabalhos onde compostos provenientes de extratos vegetais apresentaram efetiva atividade antitumoral observada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os estudos *in vitro* foram realizados com a linhagem de câncer de mama (MCF-7) ou em células do carcinoma ascítico de Ehrlich isoladas (PARISOTTO et al., 2012).

Por outro lado, nos estudos *in vivo* foram empregados camundongos Balb/c inoculados com o carcinoma ascítico de Ehrlich que foram tratados por via intraperitoneal com os extratos vegetais obtidos por solventes convencionais ou por extração com dióxido de carbono supercrítico (KVICINSKI et al., 2011; BISCARO et al., 2013; FELIPE et al., 2014). Nestes estudos foi possível comprovar a atividade antitumoral com destaque aos tratamentos com extratos supercríticos de *Bidens pilosa* (Asteraceae) contendo flavonoides e poliacetilenos (KVICINSKI et al., 2011) e de extrato supercrítico de *Cordia verbenacea* (Boraginaceae) contendo sesquiterpenos (PARISOTTO et al., 2012). Além de ter sido observada tal atividade em frações de extratos de *Casearea sylvestris* (Salicaceae) contendo diterpeno cloredânico (FELIPE et al., 2014); e no extrato aquoso de látex de *Croton celtidifolius* (Euphorbiaceae) rico em flavonóis (BISCARO et al., 2013).

2.3.2 Usos etnomedicinais de Piperaceas e de *Piper nigrum*

Dentre as Piperaceas a maior biodiversidade de espécies do gênero *Piper* ocorre na região tropical das Américas (700 sp.) seguida da região sul da Ásia (300 sp.) Este gênero também tem ocorrência na África (JARAMILLO; MANOS, 2001).

Inicialmente faz-se necessário ressaltar a importância do uso tradicional de Piperaceas contendo compostos com propriedades antimicrobianas, cicatrizantes, anti-inflamatórias e antitumorais (MORALES, 1996; RASKIN et al., 2002). Na Índia, Tailândia, China e Vietnã a espécie *Piper nigrum* tem sido utilizada por apresentar atividade anti-inflamatória (KURIAN, 2012) e antitumoral (CHAVEERACH et al., 2006; WANG et al., 2014). Frutos de *Piper nigrum* também são utilizados em países africanos para tratamento de infecções de origem bacteriana (NOUMEDEM et al., 2013).

A tradição etnomedicinal de afrodescendentes brasileiros em comunidades quilombolas revela de maneira clara a importância de *Piper nigrum*, tanto no seu uso como planta medicinal quanto com relação ao seu uso no preparo de alimentos (ALBUQUERQUE et al., 2007; LIPORACCI, 2014). Crepaldi e Peixoto (2010) realizaram um levantamento etnobotânico em comunidade quilombola onde foi mencionado o uso de espécies do gênero *Piper*. Estas autoras relataram que os quilombolas empregam *Piper anisum* (João-barandi) e *Piper umbellatum* (caapeba/pariparoba) como plantas medicinais e *Piper nigrum* é empregada apenas na preparação de alimentos. Pereira et al. (2007) mencionam o uso de folhas e frutos de *Piper nigrum* que são utilizados por comunidades quilombolas para o tratamento de inflamações na garganta e problemas respiratórios. *Piper nigrum* foi citada entre as plantas utilizadas como tônicos, ou seja, que fortalecem as defesas naturais do organismo. Assim, este conhecimento tem sido mantido entre moradores de comunidade quilombola no nordeste brasileiro (BARBOZA DA SILVA et al., 2012).

A inflamação crônica e o câncer apresentam relação estreita entre si (WILLIAMS; MANN; DUBOIS, 1999; COUSSENS; WERB, 2002) uma vez que a inflamação tem sido considerada como evento chave no desenvolvimento do câncer (SETHI et al., 2012; ELINAV et al., 2013). De fato, a neutralização de processos inflamatórios foi considerada como uma estratégia para o tratamento de câncer decorrente de inflamação crônica (COUSSENS; ZITVOGEL; PALUCKA, 2013). Uma patente registrada demonstrou que frutos de *Piper nigrum* tem sido utilizados na medicinal tradicional na China para o tratamento de câncer (XIN; QI; HAN, 2009). Como alguns dos usos tradicionais do gênero *Piper* incluem o tratamento destas patologias, tais usos podem ser validados através da comprovação do efeito em conjunto decorrente da presença de compostos bioativos nos extratos de frutos de *Piper nigrum*, ou seja, através do sinergismo entre os compostos secundários presentes nos extratos vegetais (BIAVATTI, 2009).

Por fim, aspectos referentes ao clima, solo, condições de cultivo, altitude e tipo de cultivar interferem no perfil fitoquímico do óleo essencial extraído de pimenta preta da *Piper nigrum* (SRUTHI et al., 2013).

2.3.3 *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina

Entre as pimentas cultivadas no Brasil destaca-se a pimenta preta ou pimenta-do-reino (*Piper nigrum* Linnaeus) (Piperaceae) importada para o Brasil desde o período colonial onde era conhecida como pimenta da Índia. Esta foi trazida por imigrantes europeus e africanos (livres e escravos) para o Brasil colônia (VELLOSO, 1798). Portanto, esta espécie exótica foi introduzida na farmacopeia nativa da América do Sul, ou seja, passou a ser utilizada para o preparo de medicamentos (BENNETT; PRANCE, 2000).

Atualmente, a produção de *P. nigrum* coloca o Brasil entre os principais produtores mundiais. Na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2004) vários pesquisadores brasileiros trabalharam intensivamente para desenvolver o cultivar denominado como Bragantina cujas mudas-matrizes vieram da Estação Experimental de Panniyur no Estado de Kerala na Índia e foram introduzidas no Brasil na década de 1980. Para tanto, foram utilizadas técnicas de biotecnologia e de biologia molecular para desenvolver cultivares com perfil bioquímico, em termos de metabólitos secundários, que as tornaram mais resistentes às doenças e pragas, com maior eficiência na captação de nutrientes, maior capacidade de adaptação às alterações ambientais e com maior produtividade (KRISHNAMURTHY et al., 2010; LEMOS et al., 2011). Na atualidade os maiores cultivos comerciais do cultivar Bragantina estão no Pará, na Bahia e Espírito Santo (LEMOS et al., 2011).

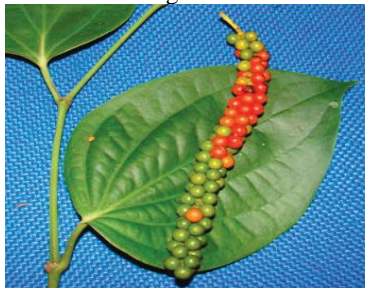
Plantas do cultivar Bragantina apresentam folhas largas e cordiformes, espigas longas com comprimento médio de 14 cm, flores hermafroditas e frutos tipo baga o que garante maior produtividade em termos de espigas comparativamente às demais cultivares que são produzidas no Brasil (LEMOS et al., 2011) (Figura 17 A).

Os frutos podem ser preparados e comercializados através de diferentes formas. Os frutos podem ser comercializados quando verdes e frescos ou verdes mantidos em conserva. Podem ser comercializados frutos maduros (frutos vermelhos); frutos secos que foram processados termicamente através de secagem ao sol ou em estufa como no caso de pimenta preta e frutos maduros processados com tratamento químico (pimenta branca) (Figura 17 B). Os frutos verdes possuem parênquima constituído por células alongadas onde se encontra uma grande quantidade de células contendo óleos (KADAM et al.; 2013) (Figura 17 C). Existe acúmulo de piperina nos tecidos tanto na pimenta preta (corte do fruto, Figura 17 D), quanto na pimenta verde (corte do fruto, Figura 17 E) que foi detectado através de espectrometria Raman e os resultados

foram apresentados em forma de mapas de intensidade onde os tons de rosa e vermelho correspondem a uma maior quantidade desta piperamida (SCHULZ et al., 2005).

Figura 17 - Frutos de *Piper nigrum* L. (Piperaceae)

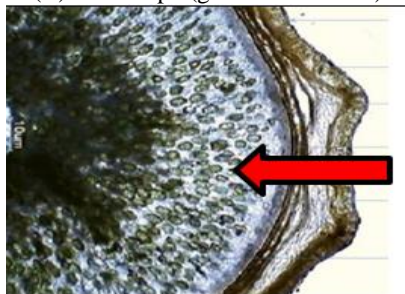
(A) Folha e espiga de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina



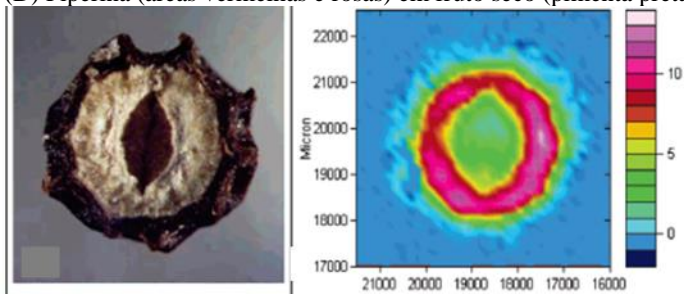
(B) Formas comercializadas



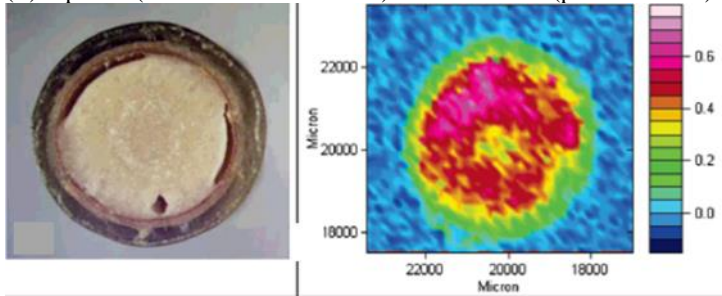
(C) Endocarpo (glândulas de óleo)



(D) Piperina (áreas vermelhas e rosas) em fruto seco (pimenta preta)



(E) Piperina (áreas vermelhas e rosas) em fruto verde (pimenta verde)



(Fontes das imagens: (A) (LEMOS et al., 2011); (B) (http://gernot-katzers-spice-pages.com/engl/Pipe_nig.html#pepper-types); (C) (KADAM et al., 2013); (D e E) (SCHULZ et al., 2005).

2.3.4 Composição fitoquímica de *Piper nigrum*

Os compostos secundários são considerados como parte das defesas químicas das plantas contra a herbivoria e contra fitopatógenos. As vias metabólicas e as enzimas associadas com a sua biossíntese têm sido utilizadas para demonstrar as relações filogenéticas entre famílias, gêneros e espécies vegetais (CASPI et al., 2014).

Com relação à composição fitoquímica de *Piper nigrum* já foram publicados vários artigos. Entre os compostos secundários presentes nesta espécie encontram-se compostos fenólicos (PARMAR et al., 1998; NAHAK; SAHU, 2011); fenilpropanoides (YOSHIDA, 2013) e sesquiterpenos, estes últimos no óleo volátil (PICAUD et al., 2006); as lignanas, principalmente em frutos verdes (PARMAR et al., 1997; CHAHAL et al., 2011); os carotenóides nos frutos (VARIYAR; BANDYOPADHYAY, 1990), além de ácidos graxos na camada de revestimento de frutos (cutícula) onde os poliésteres de ácidos graxos compõem a cutina que forma a cutícula (FICH; SEGERSON; ROSE, 2016); e alcaloides além de piperina (SINGH et al., 2011; SINGH; YADAV; TADIGOPPULA, 2014).

2.3.4.1. Presença de piperina, piperilina, piperlonguminina, pelitorina e retrofractamida em *Piper nigrum*

Na literatura existem algumas diferenças na nomenclatura adotada para alguns dos compostos secundários presentes em *Piper nigrum*. O principal composto secundário encontrado nos frutos desta espécie é a

piperina (KHAJURIA et al., 2013). A piperina foi classificada como alcaloide (KHAJURIA; THUSU; ZUTSHI, 2002; SUNILA; KUTTAN, 2004; SAMYKUTTY et al., 2013; ZARAI et al., 2013); como amida insaturada (SCOTT et al., 2005); também foi denominada como amida alcaloide (WANG et al., 2014) e como piperamida (KOTTE; DUBEY; MURALI, 2014). Nesta tese optou-se por utilizar o termo piperamida para piperina e para piperilina.

A análise de frutos, folhas e raízes de *P. nigrum* empregando espectrometria de massas revelou a presença de piperina em todas estas partes, enquanto que piperilina e piperlonguminina foram encontradas apenas nos frutos e a pelitorina foi encontrada nos frutos e nas raízes desta espécie (CHANDRA et al., 2014).

Sem sombra de dúvidas a piperamida mais estudada é a piperina. Esta apresenta inúmeras atividades biológicas entre as quais se destacam as atividades anti-inflamatória (SUNILA; KUTTAN, 2004) e antitumoral (LAI et al., 2012; WANG et al., 2014). Relatos mencionam que esta piperamida pode potencializar a atividade antitumoral de outros compostos (MEGHWAL; GOSWAMI, 2013) por aumentar sua biodisponibilidade através de diferentes mecanismos bioquímicos (KAKARALA et al., 2010).

A piperina deve ser considerada como uma molécula anfifílica que apresenta alguma solubilidade em água (SAHU et al., 2012), graças a uma porção mais polar da molécula que corresponde ao grupo amina (Figura 18 A) e, ao mesmo tempo, sua porção apolar pode formar complexos com fármacos mais apolares facilitando o transporte e a absorção destes (MEGHWAL; GOSWAMI, 2013). Estudos sugerem que a porção apolar da piperina pode atuar modulando a dinâmica de fosfolipídios e proteínas de membrana o que pode resultar em alterações na fluidez e permeabilidade da membrana celular e na conformação e atividade de enzimas associadas à membrana (KHAJURIA; THUSU; ZUTSHI, 2002). De fato, intercalação da piperina em bicamada lipídica de lipossomos afetou a viscosidade destas membranas (RAAY et al., 1999).

Além da piperina, entre os compostos secundários encontrados em *Piper nigrum* se destacam a piperilina, piperlonguminina e pelitorina, que apresentam estrutura molecular que pode ser dividida em três componentes que incluem uma porção benzodioxol que também pode ser denominada como anel metilendioxifenil, este se liga a uma cadeia com duplas ligações conjugadas (região apolar) e existe na outra extremidade da cadeia insaturada um anel piperidina ligado à esta através de um grupo carbonila no caso da piperina (Figura 18 A), enquanto que na molécula de piperilina o anel é pirrolidina (Figura 18 B).

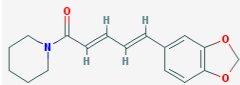
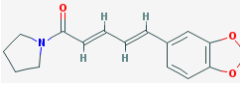
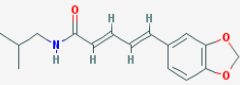
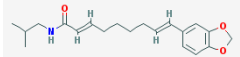
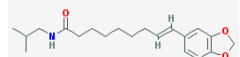
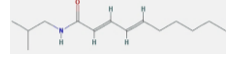
No caso das isobutilamidas piperlonguminina (Figura 18 C), retrofactamida C (Figura 18 D), dehidroretrofactamida C (Figura 18 E) e pelitorina (Figura 18 F) existe uma porção isobutilamida ligada a esta cadeia insaturada. Na outra extremidade desta cadeia, exceto na pelitorina, existe uma porção benzodioxol (anel metilendioxifenil) (SCOTT et al., 2008).

Alguns destes compostos constam na enciclopédia digital *Chemical Entities of Biological Interest* (ChEBI) (<http://www.ebi.ac.uk/chebi/>). Eles também possuem denominação junto à IUPAC (*The International Union of Pure and Applied Chemistry*), um número de registro junto ao *Chemical Abstract Service* (CAS) da Sociedade Americana de Química e um número de registro na base de dados PubChem (CID) da NCBI - *National Center for Biotechnology Information* que fornece informações detalhadas sobre estes compostos (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/#collection=compounds>). Um resumo destes dados consta na Figura 18 (A, B, C, D, E, F).

A molécula de pelitorina apresenta ligada à sua cadeia insaturada uma cadeia alifática contendo 5 carbonos conferindo caráter mais apolar à esta molécula (Figura 18 F) (EE et al., 2010; CHANDRA et al., 2014).

A presença de duplas ligações nos grupos dienamidas conjugadas nas moléculas de piperina, piperilina, piperlonguminina e pelitorina pode ser associada com maior reatividade (LEE et al., 2008). Realmente, esta reatividade foi associada com a instabilidade na molécula de pelitorina relacionada com a presença do cromóforo diamida conjugada contendo insaturações (-C=C-C=C-CONH-) (MIYAKADO; NAKAYAMA; OHNO, 1989).

Figura 18 - Estrutura molecular e propriedades de alcamidas encontradas em frutos de *Piper nigrum* L.

<p>(A) Piperina C₁₇H₁₉NO₃</p> 	<p>(B) Piperilina C₁₆H₁₇NO₃</p> 	<p>(C) Piperlonguminina C₁₆H₁₉NO₃</p> 
<p>Pubchem CID 638024 IUPAC (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-piperidin-1-il penta-2,4-dien-1-ona (1-5-(1,3)-benzodioxol-5-yl)-1-oxo-2,4-pentadienil)piperidina</p>	<p>Pubchem CID 636537 IUPAC (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-pirrolidin-1-il penta-2,4-dien-1-ona</p>	<p>Pubchem CID 5320621 IUPAC (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-(2-metilpropil)penta-2,4-dienamida</p>
<p>(D) Retrofractamida C C₂₀H₂₇NO₃</p> 	<p>(E) Dehidroretrofractamida C C₂₀H₂₉NO₃</p> 	<p>(F) Pelitorina C₁₄H₂₅NO</p> 
<p>Pubchem CID 5255091 IUPAC (2E,8E)-9-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-(2-metilpropil)nona-2,8-dienamida</p>	<p>Pubchem CID 16122394 IUPAC 1-[(E), 9-(3,4-metillenedioxifenil)-8-nonenoil] isobutil amida</p>	<p>Pubchem CID 5318516 IUPAC (2E,4E)-N-(2-metilpropil)deca-2,4-dienamida</p>

(Fonte: EE et al., 2010; KOTTE; DUBEY; MURALI, 2014; CHANDRA et al., 2014.)

Fontes das imagens:

- (A) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/638024>;
 (B) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/636537>;
 (C) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5320621>;
 (D) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5255091>;
 (E) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16122394>;
 (F) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5318516>

Em estudos de interação entre o DNA e moléculas contendo a porção benzodioxol correspondente ao anel metilenedioxifenil foi observada intercalação parcial deste anel entre os pares de bases do DNA

(TAN et al., 2005). Este anel está presente em algumas das alcanidas/piperamidas que ocorrem na espécie *Piper nigrum*.

Yaffe et al. (2013) confirmaram que a piperina participou da geração de EROs (principalmente de radical hidroxil, via reação de Fenton) na promoção de apoptose de células HRT-18 (tumor retal humano). Estes autores confirmaram o envolvimento de EROs após o pré-tratamento com um antioxidante (N-acetilcisteína) constatando que o pré-tratamento reduziu o efeito antitumoral, pois a N-acetilcisteína sequestrou as EROs e promoveu a síntese intracelular do tiol glutationa (GSH) (SKRZYDLEWSKA; FARBISZEWSKI, 1999).

A piperilina (Figura 18 B) pode ser denominada como *piperilyn* (KOTTE; DUBEY; MURALI, 2014) ou como *trichostachine* e foi inicialmente isolada de folhas de *Piper trichostachyon* (SINGH; DHAR; ATAL, 1969). Esta piperamida pode ser encontrada em frutos de *Piper nigrum*, *Piper chaba* e *Piper longum*; espécies normalmente empregadas no preparo de formulações herbais para tratamento de câncer por apresentarem compostos bioativos com propriedades antitumorais (CHAVEERACH et al., 2006; ATJANASUPPAT et al., 2009; SINGH; YADAV; TADIGOPPULA, 2014). Em estudo realizado por Ee et al. (2010), estes autores constataram que a pelitorina, isolada das raízes de *P. nigrum*, apresentou potente atividade antitumoral *in vitro* após 3 dias de tratamento, causando citotoxicidade para células MCF-7 ($CE_{50} = 1,8 \mu\text{g/ml}$).

Lee et al. (2008) efetuaram a extração etanólica de sementes de *Piper longum* e *Piper nigrum*. Estes autores encontraram retrofractamida C (Figura 18 D) em *P. longum* enquanto que em *P. nigrum* encontraram piperoleína; piperchabamida e pelitorina (Figura 18 F). Estes autores relatam que a retrofractamida C e pelitorina apresentaram atividade inibitória sobre o complexo de interação entre as proteínas envolvidas na adesão celular. Estas proteínas ocorrem na membrana de células do sistema imune que estão envolvidas na progressão de processos inflamatórios (LEE et al., 2008).

A retrofractamida A foi encontrada entre as amidas isoladas de extrato etanólico obtido de frutos de *Piper nigrum*. Este extrato foi solubilizado com metanol e, a partir deste, obteve-se a fração solubilizada em hexano/éter na qual foi identificada a retrofractamida A (KIUCHI et al., 1988). Enquanto que a isobutilamida dehidroretrofractamida C (Figura 18 E), um derivado de retrofractamida C, foi encontrada em extrato metanólico obtido de frutos de *Piper nigrum* (RHO et al., 2007); e retrofractamida C de extrato hidroalcoólico (JIN; QIAN; DU, 2013).

2.3.4.2. Terpenóides

Os terpenóides formam os óleos voláteis, ou seja, são compostos secundários sintetizados pelos vegetais para distintas funções que envolvem desde o crescimento e desenvolvimento até a proteção contra patógenos e estressores ambientais. Os monoterpenos e os sesquiterpenos são os terpenóides mais frequentes nos óleos voláteis (SIMÕES; SPITZER, 2003). Os terpenóides constituem uma classe de metabólitos secundários expressiva e muito estudada em *Piper nigrum* (PARMAR et al., 1997; FERREIRA et al., 1999; DANIEL, 2006).

Entre os terpenóides hidrocarbônicos podem ser destacados os monoterpenos que apresentam 10 átomos de carbono em sua estrutura molecular ($C_{10}H_{16}$) e os sesquiterpenos com 15 átomos de carbono ($C_{15}H_{24}$) (SINGH, 2007).

Entre os monoterpenos encontrados no óleo essencial de *P. nigrum* destaca-se o limoneno (PARMAR et al., 1997; FERREIRA et al., 1999). Com várias aplicações na indústria de alimentos, de cosméticos e farmacêutica, este composto é reconhecido como seguro (*Generally Recognized As Safe* - GRAS) (SUN, 2007).

Os efeitos dos hidrocarbonetos monocíclicos como limoneno sobre propriedades estruturais e funcionais de membranas estão intimamente relacionados com o acúmulo destes ocasionando mudanças na fluidez destas estruturas (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994).

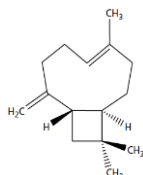
Os sesquiterpenos hidrocarbônicos apresentam estrutura cíclica com menor polaridade, tais como o β -cariofileno ($C_{15}H_{24}$) (Figura 19 A) e suas sinônimas trans-cariofileno ($C_{15}H_{24}$) (Figura 19 C); e isocariofileno ($C_{15}H_{24}$) (Figura 19 D), encontram-se listados como estereoisômeros nas bases de dados de química PubChem da NCBI (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/#collection=compounds>) e NIST Mass-Spectral Library (2016).

Por outro lado, os sesquiterpenos oxigenados denominados como óxido de β -cariofileno ($C_{15}H_{24}O$) (Figura 19 B) ou sua sinônima denominada como óxido de β -cariofileno ($C_{15}H_{24}O$) e o sesquiterpeno *allo*-aromadendreno ($C_{15}H_{24}O$) (Figura 19 E) também estão registrados nestas mesmas bases de dados.

O β -cariofileno apresentou atividade anti-inflamatória (GERTSCH et al., 2008) e, por esta razão, foi empregado no controle de endometriose (inflamação da mucosa uterina) induzida em modelo animal, sem causar efeitos prejudiciais às células reprodutivas dos animais tratados (ABBAS et al., 2013). Ressaltando que na endometriose ocorre crescimento anormal de células do endométrio.

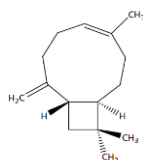
Figura 19 - Estrutura molecular de propriedades de sesquiterpenos cíclicos

(A)
β-Cariofileno ou
cariofileno
C₁₅H₂₄



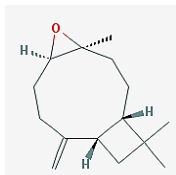
PubChem CID
5281515

(D)
Isocariofileno
C₁₅H₂₄



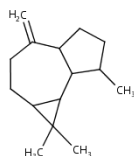
PubChem CID
5281522

(B)
Óxido de β-cariofileno ou
óxido de cariofileno
C₁₅H₂₄



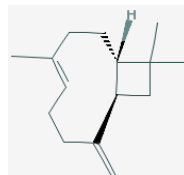
PubChem CID
6604672

(E)
Allo-aromadendreno
C₁₅H₂₄



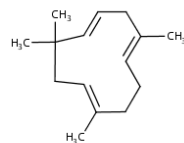
PubChem CID
42608158

(C)
Trans-cariofileno
C₁₅H₂₄



PubChem CID
5281515

(F)
α-Humuleno ou
α-Cariofileno
C₁₅H₂₄



PubChem CID
5281520

(Fonte das imagens: β-cariofileno e isocariofileno: LEGAULT; PICHETTE; 2007)

- (A) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281515>
 (B) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6604672>
 (C) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281515>
 (D) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isocaryophyllene>
 (E) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/42608158>
 (F) <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/sid/0006753986>

Entre as atividades atribuídas ao óxido de β-cariofileno (Figura 19 B) podemos destacar a imunomodulação e a atividade anti-inflamatória (GERTSCH et al., 2008). O óxido de β-cariofileno foi encontrado em maior concentração no óleo essencial obtido de frutos de *Piper nigrum* na forma de pimenta verde comparativamente ao obtido de pimenta preta (ORAV et al., 2004). Observou-se um aumento na concentração deste

sesquiterpeno em pimentas verdes e em pimentas pretas (ORAV et al., 2004).

Estudos realizados por distintos grupos de pesquisa relacionaram a atividade anti-inflamatória do trans-cariofileno (Figura 19 C) com a inibição do gene responsável pela síntese da enzima COX-2 (FERNANDES et al., 2007) ou com a inibição da atividade desta enzima (PARISOTTO et al., 2012).

Atividade citotóxica *in vitro* contra células de carcinoma hepatocelular de fígado humano (HepC2) foi atribuída ao sesquiterpeno aromadendreno isolado de coral marinho (*Sarcophyton glaucum*) (ALLIHAIBI et al., 2014). Enquanto o seu estereoisômero *allo*-aromadendreno (Figura 19 E) foi encontrado em extrato de espécies do gênero *Salvia* empregadas na medicina popular para tratamento de psoríase (SALIMPOUR; MAZOOJI; DARZIKOLAEI, 2011). A psoríase foi considerada como uma doença sistêmica caracterizada por processos inflamatórios e lesões principalmente na pele (REICH, 2012).

O sesquiterpeno cíclico α -Humuleno ou α -Cariofileno (C₁₅H₂₄) está representado entre os compostos da base de dados Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Humulene#section=Top>), onde foram apresentados aspectos físico-químicos deste composto (Figura 19 F).

Chaves et al. (2008) estudaram a farmacocinética e a distribuição de α -Humuleno em tecidos de camundongos. Estes autores consideraram este composto como o mais importante princípio ativo e um marcador do fitoterápico Acheflan[®]. Este é um fitoterápico à base de *Cordia verbenacea* (Familia Boraginaceae). O sesquiterpeno α -Humuleno pode ser encontrado no extrato etanólico desta planta que tem sido utilizada na medicina tradicional brasileira por apresentar baixa toxicidade e possuir atividade anti-inflamatória, bem como efeito analgésico e propriedades curativas após uso tópico (DE CARVALHO et al. 2004; SERTIE et al., 2005).

2.4 OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MATRIZES VEGETAIS COMPLEXAS EMPREGANDO MÉTODO CONVENCIONAL E FLUIDO SUPERCRÍTICO

Entre os métodos convencionais de extração de compostos bioativos de partes de plantas destacam-se a hidrodestilação e a maceração em solventes com distintas polaridades (SIMÕES; SPITZER, 2003).

As propriedades físico-químicas dos compostos bioativos presentes nos tecidos vegetais devem ser levadas em conta no momento da escolha do sistema extrator a ser empregado. Esta escolha deve visar uma maior seletividade associada com maior quantidade e qualidade do composto bioativo que se deseja extrair da matriz vegetal (MICHIELIN et al., 2005).

A grande maioria das publicações sobre usos etnofarmacológicos de plantas descrevem os efeitos de extratos vegetais obtidos empregando métodos convencionais como maceração em solvente orgânico (etanol, metanol, hexano, entre outros); extração por arraste de vapor ou extração através de hidrodestilação.

Porém, nestes processos existem pontos críticos que se referem ao grande tempo de processamento, o elevado consumo de solventes durante a extração e a deterioração de compostos, por exemplo. Além disto, nos processos utilizando solventes orgânicos pode ser difícil ou mesmo inviável sua remoção total. Assim, a eventual permanência de resíduos destes solventes no extrato poderá reduzir sua qualidade (MICHIELIN et al., 2005).

Como alternativa aos métodos convencionais a extração realizada com fluidos supercríticos pode ser empregada com sucesso para a extração de compostos orgânicos presentes em diferentes matrizes vegetais (SIMÕES; SPITZER, 2003).

De fato, a extração supercrítica empregando dióxido de carbono mantido em condições supercríticas (temperatura acima de 31°C; pressão acima de 72,8 bar) proporciona condições adequadas para solubilização de compostos mais apolares (óleos essenciais e óleo-resinas) presentes em distintas partes dos vegetais (FERREIRA, 1991; 1996; FERREIRA et al., 1999; CARRILHO; TAVARES; LANÇAS, 2001; FERREIRA; MEIRELES, 2002; BEZERRA et al., 2006).

Entre as vantagens do uso de dióxido de carbono supercrítico pode ser destacado o fato deste ser um solvente não tóxico que apresenta características em termos de segurança ambiental e, principalmente, possui maior seletividade na obtenção dos componentes voláteis e tratar-se de um solvente que pode ser totalmente removido do extrato final obtido (MICHIELIN et al., 2011).

Devido ao fato de possuir caráter mais apolar a extração com o dióxido de carbono mantido em condições supercríticas de temperatura e pressão promove a solubilização de compostos mais apolares, o que representa uma limitação para a extração dos compostos mais polares. Por outro lado, o poder de solvatação seletivo do fluido supercrítico permite fracionar os componentes de uma mistura complexa. Isto acontece porque

pequenas alterações na pressão ou na temperatura próximas ao ponto crítico podem modificar e aumentar significativamente a densidade e, como consequência, o poder solubilizante do fluido supercrítico, tornando-o mais seletivo (BLEICH; MÜLLER; WABMUS, 1993).

Os materiais dissolvidos no fluido supercrítico formam uma fase supercrítica homogênea contendo a mistura dos extratos com o solvente e, mediante a redução da pressão estes extratos podem ser recuperados devido à redução da densidade que permite a separação da mistura extratos/solventes (BLEICH; MÜLLER; WABMUS, 1993).

Outra vantagem da extração supercrítica se refere às temperaturas de trabalho que podem ser mais baixas, minimizando a deterioração dos componentes bioativos presentes nos extratos (MICHIELIN et al., 2011). Desta forma, a extração supercrítica favorece a redução de interferências sobre os compostos ativos garantindo suas propriedades (MICHIELIN et al., 2011).

Portanto, no desenvolvimento desta tese foi possível identificar alguns dos compostos secundários presentes nos extratos (etanólico ou supercríticos) obtidos a partir de frutos de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina). Como principal alvo de estudos buscou-se avaliar os efeitos e alguns mecanismos de ação decorrentes dos tratamentos realizados *in vitro*, de ensaios moleculares e de tratamentos realizados *in vivo* com os extratos (etanólico ou supercríticos). Assim, inicialmente foram realizados ensaios *in vitro* empregando linhagens tumorais (MCF-7 e HT-29) para avaliar a citotoxicidade e o potencial antiproliferativo do extrato etanólico. Foram realizados ensaios moleculares empregando DNA de timo de vitelo (CT DNA) exposto a cada um dos extratos (etanólico ou supercríticos) para avaliar a ocorrência de intercalação e de danos oxidativos à estas macromoléculas. Adicionalmente, avaliou-se o potencial do extrato etanólico de provocar fragmentação em DNA plasmidial. De maneira a corroborar os resultados observados *in vitro* efetuou-se a avaliação dos efeitos do tratamento sobre a inibição do crescimento tumoral e sobre o tempo de sobrevivência de camundongos Balb/c inoculados com o carcinoma ascítico de Ehrlich (TAE) e tratados por via intraperitoneal, durante 9 dias. Ao final dos tratamentos realizados *in vivo* com o extrato etanólico (100 mg/kg/dia) empregou-se o líquido ascítico contendo as células de TAE para a avaliação do tipo de morte induzido nestas células e verificar alterações em suas fases do ciclo celular. Em busca dos mecanismos de ação avaliou-se a expressão de proteínas associadas com a progressão do ciclo celular (Ciclina A) e de proteínas envolvidas com a indução de morte celular (Bax, p53) ou determinação dos níveis de marcadores bioquímicos de defesas

antioxidantes tais como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathiona redutase e avaliação da depleção dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), e de marcadores bioquímicos de danos oxidativos através da determinação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e de carbonilação proteica.

Na continuidade da pesquisa foram realizados estudos comparativos onde foram efetuados tratamentos com o extrato etanólico ou com os extratos supercríticos obtidos em condições de pressão distintas e na mesma temperatura. Nesta fase da pesquisa os extratos foram empregados em ensaios de citotoxicidade *in vitro* apenas com a linhagem MCF-7 que mostrou ser mais sensível no tratamento realizado por 24 h. Adicionalmente, avaliou-se o potencial antiproliferativo dos extratos (etanólico ou supercríticos) observando-se os efeitos sobre o número e o tamanho das colônias desta linhagem. Foi estudado também o tipo de morte celular induzido em células MCF-7 após o tratamento realizado *in vitro* com cada extrato (etanólico ou supercríticos). Por fim, foram realizados ensaios *in vivo* empregando tratamentos com o extrato etanólico ou com os extratos supercríticos em duas concentrações (10 ou 20 mg/kg/dia). Ao final dos tratamentos empregou-se a variação da circunferência abdominal para a avaliação da inibição do crescimento tumoral e observou-se o tempo da sobrevida dos camundongos Balb/c. Além disto, avaliou-se o tipo de morte induzido nas células de TAE presentes no líquido ascítico, bem como foram avaliadas alterações nas fases do ciclo celular decorrentes do tratamento dos animais com os extratos.

Esta tese foi dividida em Parte I e Parte II. A primeira parte abrangeu um estudo preliminar realizado apenas com o extrato etanólico (ET) no qual foram empregados ensaios *in vitro*, ensaios moleculares e ensaios *in vivo* de maneira a determinar a atividade antitumoral deste extrato. A segunda parte do estudo foi realizada de maneira comparativa empregando os extratos etanólico e supercríticos produzidos com frutos de pimenta preta *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina. Estes extratos foram empregados nos ensaios realizados *in vitro* e *in vivo*.

Na organização da tese foi apresentada uma breve introdução e revisão de literatura. Em seguida, na Parte I foi apresentada a metodologia empregada na obtenção do extrato etanólico, nas determinações fitoquímicas e nos ensaios realizados com este extrato. Nesta parte constam os resultados e a discussão dos mesmos. Na Parte II foi apresentado um estudo comparativo entre os extratos (etanólico e supercríticos), nesta parte constam a metodologia, os resultados obtidos e discussão dos mesmos.

3 PARTE I: ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATO ETANÓLICO DE *Piper nigrum* E SUA CORRELAÇÃO COM A INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO.

Esta parte constituiu um estudo preliminar realizado apenas com o extrato etanólico (ET) no qual foram empregados ensaios *in vitro*, ensaios moleculares e ensaios *in vivo* de maneira a determinar a atividade antitumoral deste extrato. Desta forma, o estudo buscou fornecer evidências que comprovem o uso tradicional de *Piper nigrum* em preparações herbais empregadas no tratamento de inflamação e câncer.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Reagentes e anticorpos

O meio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM), o soro fetal bovino (*fetal bovine serum*-FBS) e os antibióticos foram adquiridos da empresa Cultilab (Campinas, S. Paulo, Brasil) que fornece estes materiais produzidos pela Gibco (EUA). A albumina sérica bovina (*bovine serum albumin* - BSA), o sal de tetrazólio (MTT), a diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), o ácido ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB), o DNA de timo de vitelo (*calf thymus* DNA - CT DNA), a agarose, o brometo de etídio, o iodeto de propídio, o ácido tiobarbitúrico (*thiobarbituric acid* - TBA), o dimetilsulfóxido (DMSO) o coquetel inibidor de proteases produzidos pela Sigma-Aldrich e que foram adquiridos da empresa Sigma-Brasil (São Paulo, SP; Brasil). O coquetel inibidor de fosfatases foi adquirido da empresa Calbiochem (Merck Biosciences). Os anticorpos policlonais anti-*Rabbit* contra p53 e anti-ciclina A, e os anticorpos policlonais anti-*mouse* contra Bcl-xL e anti-Bax foram adquiridos de empresa brasileira representante comercial da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (EUA). O anticorpo monoclonal anti-*mouse* contra β -actin e o conjunto de detecção por quimioluminescência contendo anticorpos secundários acoplados à *horseradish peroxidase* (HRP) foram obtidos junto à representante brasileira da Millipore (EUA). Os demais reagentes inclusive os solventes empregados nas análises fitoquímicas foram todos de grau analítico.

3.1.2 Amostra de frutos de *Piper nigrum*, obtenção de pimenta preta, preparação do extrato e análises fitoquímicas

Espigas contendo frutos verdes de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina (Piperaceae), foram colhidas em dezembro 2011 em uma fazenda comercial situada no município de São Mateus (Espírito Santo, Brasil), nas coordenadas (18° 43' 37" de Latitude Sul; 40° 05' 51" de Longitude Oeste), em altitude de 26 m.

Para obter-se a pimenta preta, os frutos foram desidratados durante 8 h em um forno a gás aquecido a temperaturas variando entre 150 e 200 °C, na própria fazenda.

Um ramo de uma das plantas produtoras, de onde foram colhidos os frutos empregados no desenvolvimento desta pesquisa, foi identificado pelo botânico Ricardo J. Francischetti Garcia e uma exsicata contendo também as pimentas processadas (pimenta preta) foi depositada no Herbário Municipal de São Paulo (número 15422).

O extrato etanólico foi preparado pela Dra. Maria Helena Rossi no Laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais, do Instituto Biológico de São Paulo. Para tanto, os frutos secos de *Piper nigrum* (pimenta preta) foram moídos em triturador e mantidos em maceração etanólica (etanol 92,8°) durante 72 h, com renovação diária do solvente. O solvente foi removido empregando rotaevaporador sob pressão reduzida e mantido a 45 °C. O rendimento alcançado através desta extração com etanol foi de 64,0 mg por grama de material de partida constituído por pimenta preta preparada com frutos verdes de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina (432 g em 3 litros de etanol).

A presença de piperamidas foi confirmada através de cromatografia em camada delgada semi-preparativa (CCD) (silica gel 60 F254; Merck, Darmstadt, Alemanha) empregando como fase móvel n-hexano: acetato de etila (7:3; v/v) (WAGNER; BLADT, 1996).

Para a identificação das piperamidas presentes no extrato etanólico, as duas maiores bandas foram removidas da placa de CCD e dissolvidas em metanol absoluto (MeOH) efetuando-se as análises através de espectrofotometria UV-vis (Cirrus 80ST, FEMTO, São Paulo, Brasil). Além disto, as amostras das piperamidas isoladas por CCD e solubilizadas em metanol foram filtradas (0,22 µm; Millex; Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) e analisadas por espectrometria de massas sequencial de ionização por eletronebulização (*Electro Spray Ionization Mass Spectrometry - ESI-IT-MS*) com interface do tipo armadilha de íons (*ion trap - IT*) como analisador de espectros e mantido no modo positivo (QUIRANTES-PINÉ et al., 2009; KHAJURIA et al.,

2013; CHANDRA et al., 2014). Estas análises foram realizadas no espectrômetro Amazon X Ion Trap do Centro de Biologia Molecular e Estrutural (CEBIME) da UFSC, sob a coordenação do Prof. Hernán F. Terenzi.

As análises do conteúdo de piperamidas no extrato etanólico de *Piper nigrum* foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com cromatógrafo Shimadzu A10 equipado com coluna (C18, Phenomenex Luna 5 µL; 150 mm x 4,6 mm; tamanho de partícula 5 µm) recomendada para a separação de compostos hidrofóbicos. A coluna de extração foi mantida a 30 °C e empregando como fase móvel a mistura água: ácido acético: acetonitrila (1: 50: 50; v/v/v) em um fluxo de solvente de 1,5 ml/min, injetando um volume de amostra de 20 µl para o extrato etanólico conforme descrito anteriormente por Wood, Barrow e James (1988). Tanto o extrato quanto o padrão de piperina foram solubilizados em metanol absoluto grau analítico.

3.1.3 Ensaios *in vitro* com linhagens tumorais

3.1.3.1 Cultura celular

As linhagens celulares de carcinoma de mama humana (MCF-7) e carcinoma de cólon humano (HT-29) foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro, Brasil. As células foram mantidas em condições padrão a 37 °C em atmosfera controlada (5 % de CO₂ com 95 % umidade do ar). O meio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) foi suplementado com soro fetal bovino (10 %) e antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina, 100 µg/ml). Estas linhagens foram escolhidas para este estudo por serem carcinomas humanos, ou seja, linhagens tumorais derivadas de células epiteliais e representarem os tipos de câncer de maior prevalência e taxas de mortalidade em mulheres no Brasil e no mundo (WHO, 2014; IARC, 2016).

3.1.3.2 Citotoxicidade e ensaio de proliferação celular

O potencial citotóxico do extrato etanólico de *P. nigrum* contra as células MCF-7 e HT-29 foi avaliado através do ensaio do sal de tetrazólio (MTT assay) de acordo com Mosmann (1983). Cada tipo celular foi semeado na densidade de 10⁴ células/ml, acrescentando 200 µl do meio DMEM por poço, em placas de 96 poços. Após 24 h de cultivo, para garantir a aderência das células na placa, o meio foi removido e substituído por soluções do extrato etanólico preparadas em

concentrações crescentes (1 a 1000 µg/ml) empregando DMSO (0,1 %) e meio DMEM com soro e antibióticos. DMEM contendo DMSO (0,1 %) foi usado como controle negativo.

Após 24 h ou 72 h de tratamento, o meio foi removido, as células lavadas com PBS e foram mantidas em uma solução de MTT (100 µl/poço; 0,5 mg/ml) por 2 h nas condições padrão. Ao final deste tempo removeu-se esta solução e foi adicionado DMSO puro (100 µl). As placas foram mantidas por 10 minutos sob agitação. Por fim, efetuou-se a leitura das absorbâncias no comprimento de onda em 540 nm empregando leitor de microplacas (TECAN Infinity M200).

Com os valores de absorbância obtidos foi possível calcular o percentual de células viáveis de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{(\text{Absorbância}_{\text{amostra}}) \times 100}{\text{Absorbância}_{\text{controle negativo}}}$$

Após efetuar o cálculo da viabilidade celular dos tratamentos com as distintas concentrações do extrato etanólico, foram construídas curvas de viabilidade em função da concentração dos extratos. Então, foi possível calcular a concentração efetiva CE₅₀ por regressão linear a partir das curvas de viabilidade celular construídas para os dois tempos de tratamento (24 e 72 h). Foram realizados três experimentos independentes e cada concentração foi avaliada em triplicata.

Para avaliar o efeito antiproliferativo do extrato etanólico sobre células de tumor de mama (MCF-7) foram realizados ensaios de proliferação clonogênica (*clonogenic assay*). Nestes ensaios foram empregadas concentrações do extrato etanólico abaixo da concentração capaz de causar a morte de 50 % das células (concentração efetiva CE₅₀) (FRANKEN et al., 2006). Para tanto, as células MCF-7 foram mantidas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino e antibióticos e, após terem sido incubadas por 24 h em condições padrão, as células foram tripsinizadas durante 5 a 8 minutos e mantidas em incubadora, nas condições padrão. Em seguida, após neutralizar a tripsina com DMEM e centrifugar, o *pellet* celular foi ressuspenso em meio. Então, foi avaliada a viabilidade celular empregando um corante vital (azul de tripan) e efetuou-se a contagem de maneira a garantir o plaqueamento de 500 células/ml em placas de 6 poços. Após incubação por 24 h em condições padrão, o meio foi removido visando retirar as células não aderidas à placa. Um novo meio suplementado com soro fetal bovino e antibióticos (meio DMEM completo) foi adicionado contendo o extrato preparado na

concentração de 10 µg/ml. Após nova incubação por 24 h este meio de tratamento foi removido e foram efetuadas duas lavagens com salina tamponada de fosfato (PBS) aquecida a 37 °C.

Na continuidade do ensaio foi adicionado meio DMEM completo. As células foram mantidas neste meio para recuperação por um período de 20 dias, com renovação do meio a cada 3 dias. Ao término deste período o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS, fixadas e coradas com cristal violeta (0,2 %; m/v em água destilada). As placas foram fotografadas e as colônias formadas foram contadas determinando-se o potencial do extrato etanólico em inibir a proliferação celular clonogênica (PUCK; MARCUS, 1955). O controle negativo foi realizado com DMEM contendo DMSO (0,1 %). Foram realizados três ensaios independentes com cada concentração testada em triplicatas.

3.1.3.3 Níveis intracelulares de EROs

O conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi mensurado utilizando diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) conforme indicado por Glorieux et al. (2011). Resumidamente, células MCF-7 foram semeadas na densidade de $1,5 \times 10^4$ células/ml, adicionando-se 100 µl desta suspensão por poço em placas de 96 poços. Estas foram mantidas por 24 h em condições de incubação padrão. Em seguida o meio foi removido e foi adicionada a solução de DCFH-DA (10 µM; 100 µl) preparada em uma solução salina tampão de Hank (*Hank's Balanced Salt Solution* - HBSS) mantendo o conjunto sob incubação por 30 min, em condições padrão.

Após a remoção do meio contendo o excesso de DCFH-DA os poços foram lavados com HBSS (200 µl) e foram acrescentados 100 µl/poço da solução do extrato etanólico (10 µg/ml) preparada com o tampão HBSS. Após incubação em condições padrão por 24 h, os poços foram lavados com HBSS (200 µl) por duas vezes e foram acrescentados 100 µl de tampão HBSS em cada poço. Como controle negativo utilizou-se apenas meio de cultivo (DMEM com suplementos).

Alterações na intensidade de fluorescência de diclorofluoresceína foi mensurada em comprimentos de onda de excitação (485 nm) e de emissão (520 nm). Assim, as alterações nos níveis intracelulares de EROs (ΔF) foram determinadas através da equação abaixo (GLORIEUX et al., 2011):

$$\Delta F = \frac{(Ft - Fi)}{Fi}$$

Ft = leitura de fluorescência final de cada amostra nos comprimentos de onda de excitação (485 nm);

Fi = fluorescência inicial nos comprimentos de onda de emissão (520 nm).

Imediatamente após a leitura da fluorescência foi determinada a concentração de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para tanto, os poços foram esvaziados, em seguida aplicou-se 25 µl de água ultrapura em cada poço, para causar a lise celular sob agitação. Posteriormente, nos poços sem células foi construída uma curva de calibração de albumina sérica bovina (BSA) em concentrações crescentes (0,0; 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; 0,2 µg/ml). Então, em todos os poços foram adicionados 200 µl da solução de reagente Bradford (Bio-Rad, EUA) na concentração recomendada pelo fabricante (1 parte do reagente: 4 partes de água destilada; v/v). Após 10 min efetuou-se leitura da absorbância em 595 nm em leitor de microplacas (TECAN Infinity M200).

No cálculo relativo foi necessário descontar o efeito de autofluorescência das proteínas de cada poço. Assim, foram divididas as unidades de fluorescência mensuradas pelo conteúdo de proteína absoluto de cada poço que foi calculado por regressão linear. Ajustes foram feitos com relação à diluição das amostras (x30) e volume de água ultrapura utilizado em cada poço (x25).

3.1.4 Intercalação e danos oxidativos ao CT DNA e fragmentação do DNA plasmidial

Para determinar possíveis interações entre compostos presentes no extrato etanólico e o DNA de timo de vitelo (*calf thymus* DNA ou CT DNA), foi realizado o ensaio de intercalação empregando o agente intercalante brometo de etídio (BE). Este ensaio permitiu avaliar a fluorescência que o EB emite, de maneira independente do pH, quando se encontra intercalado entre as bases do DNA (MAITI; NANDI; CHOWDHURI, 1983; HOSSAIN; KUMAR, 2009). Porém, esta fluorescência diminui quando ocorre o deslocamento do BE devido à interação com outros compostos intercalantes ou com aqueles que se liguem na fenda menor do DNA alterando a configuração estrutural da macromolécula (KUBAŘ et al., 2006; TUMIR; STOJKOVIĆ; PİANTANIDA, 2014).

A titulação espectrofotométrica de determinado composto na presença de CT DNA pode ser utilizada para caracterizar a ligação deste composto com moléculas de DNA (DA SILVEIRA et al., 2011).

Ensaio preliminares para avaliar a interação entre o CT DNA e o BE foram realizados com concentrações crescentes de CT DNA (10; 20 e 40 μM) na presença de concentrações crescentes de BE (10; 20 e 40 μM), ambas soluções foram preparadas em tampão fosfato 50 mM contendo NaCl (0,1 %; pH 7,4) de maneira a obter-se uma curva de saturação, empregando placa multipoços perfazendo um volume final de 100 μl /poço (96 poços) (DA SILVEIRA et al., 2011). O NaCl foi empregado para evitar uma segunda fixação do brometo de etídio aos sítios do DNA.

O ponto de saturação foi obtido na mesma concentração de 10 μM para CT DNA e para BE. Esta concentração foi selecionada e empregada no ensaio de intercalação. Neste ensaio, em cada poço contendo o CT DNA foi primeiro acrescentado BE e somente então foram adicionadas as soluções do extrato etanólico (10; 15; 30; 45 $\mu\text{g/ml}$) perfazendo um volume final de 100 μl /poço; em seguida as placas foram mantidas ao abrigo da luz por 30 min (DA SILVEIRA et al., 2011).

Para ambos ensaios as variações na fluorescência foram obtidas nos comprimentos de onda de excitação (492 nm) e de emissão (620 nm) empregando leitor de placas (TECAN Infinity M200) (DA SILVEIRA et al., 2011). Estes ensaios foram realizados duas vezes em triplicatas para cada concentração.

Os danos oxidativos ao CT DNA foram avaliados através de método proposto por Jiang et al., (2007) e por Jun; Bochu; Liancai (2007). Inicialmente, o CT DNA (0,5 mM) foi preparado em 50 mM de tampão fosfato (pH 7,2) em microtubos (1,5 ml). Em seguida foi adicionada em cada tubo a solução do extrato etanólico preparada com o mesmo tampão de maneira a atingir a concentração final de 10 $\mu\text{g/ml}$ por poço. Após o término do tempo de incubação (24 h, a 37 °C) foi adicionada em cada tubo uma solução de 2-ácido tiobarbitúrico (1 %) preparada com NaOH (50 mM) e ácido acético glacial (1:1:1). Os microtubos foram mantidos em banho-maria por 10 min, na temperatura de 100 °C. Após resfriar em banho de gelo, as amostras foram transferidas para placas multipoços (96 poços) e a leitura da absorbância foi efetuada em 540 nm (TECAN Infinity M200). Como controle negativo empregou-se o tampão fosfato (50 mM; pH 7,2) e como controle positivo foram utilizados os oxidantes $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ (100 μM) e peróxido de hidrogênio (10 mM), ambos geradores de radicais livres (DA SILVEIRA et al., 2011). O Fe(EDTA)

promove danos ao DNA na presença de oxigênio livre para gerar espécies reativas de oxigênio (PICH, 2010).

O potencial de causar quebras na molécula de DNA plasmidial de dupla fita (plasmídeos circulares) foi avaliado empregando o plasmídeo Bluescript SK II (pBSK II) (Stratagene, EUA). Este plasmídeo derivado de pUC19, possui 2961 pares de bases apresentando gene de resistência bacteriana ao antibiótico ampicilina (<https://www.addgene.org/vector-database/1946/>).

Os plasmídeos pBSKII foram purificados de culturas de bactérias (*Echerichia coli*) empregando protocolo do fabricante (HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit; QIAGEN). Os plasmídeos pBSKII (5 µl) foram solubilizados em tampão HEPES (Ácido n-2-hidroxietilpiperazina-n'-2'-etanossulfônico) (20 nM) (pH 7,4) obtendo-se a concentração de 8,5 nM de plasmídeos equivalente a 25 µM em pares de bases (PICH, 2010), correspondente a 330 ng de plasmídeos. Em seguida o DNA plasmidial foi incubado em microtubos por 24 h com concentrações crescentes do extrato etanólico (10 µl; 0 - 2000 µg/ml) solubilizado em tampão HEPES. Os microtubos foram mantidos a 37 °C, ao abrigo da luz em estufa. Após o tempo de incubação em cada microtubo foram acrescentados 5 µl deste mesmo tampão contendo azul de bromofenol (0,01 %) para visualização das bandas. As amostras (20 µl/poço) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8 %) preparado com tampão Tris-borato - ácido etilenodiamino tetra-acético (TBE) (89 mM Tris Borato; 2 mM EDTA; pH 8,3) empregando voltagem constante (70 V), por 60 min. O gel de corrida foi previamente corado com brometo de etídio (2 µl; 100 µg/ml).

As bandas foram fotografadas sob luz ultravioleta em sistema de fotodocumentação (transiluminador UVP Image Systems) empregando o programa UVP Doc-ItLS versão 6.8.2 (California, EUA). Esta etapa de aquisição das imagens foi realizada no Laboratório de Protozoologia coordenado pelos Professores Dr. Edmundo Grisard e Dr. Mário Steindel.

As imagens digitalizadas foram analisadas empregando o programa ImageJ versão 1.47 (*National Institute of Health*, Bethesda, MD, EUA), comparando a intensidade das bandas correspondentes às formas do DNA superenovelado (FI); circular (quebra simples – FII) e forma linear (dupla quebra – FIII) (SREEDHARA; COWAN, 2001). A intensidade da forma FI foi corrigida por um fator de 1,47 devido à menor interação com o brometo de etídio causada pela conformação estrutural superenovelada (SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000). Assim, foi possível quantificar as formas adotadas pelo DNA plasmidial exposto ao extrato etanólico (SCARPELLINI et al., 2003).

3.1.5 Ensaios realizados com camundongos Balb/c

3.1.5.1 Inibição do crescimento *in vivo* do carcinoma ascítico de Ehrlich

Camundongos Balb/c machos foram submetidos a tratamento de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC PP00784). Preliminarmente os animais foram tratados por via intraperitoneal para determinar a maior dose tolerada do extrato etanólico, empregando as concentrações (10; 50; 100 e 150 mg/kg/dia) por 9 dias. Esta avaliação foi baseada na verificação de ocorrência de mortes, de ereção da pelagem, lentidão, inatividade e perda do apetite.

A concentração do extrato etanólico que apresentou o melhor resultado foi a de 100 mg/kg/dia em tratamento de 9 dias consecutivos. Esta foi a concentração escolhida para conduzir os tratamentos de animais. Machos Balb/c com 65 dias de vida e $22,0 \pm 0,5$ g de peso, foram inoculados no peritônio com células do carcinoma ou tumor ascítico de Ehrlich (5×10^6 células; 200 μ l).

O dia em que foi realizada a inoculação foi considerado como dia zero. Neste dia todos os animais foram pesados e a circunferência abdominal medida. Após 24 h, foram separados 3 grupos formados pelo mesmo número de animais (n=12).

Os animais do grupo controle negativo receberam salina preparada com 1 % do surfactante Tween 80 por via intraperitoneal (50 μ l); os animais do grupo tratado com o extrato etanólico receberam tratamento pela mesma via (50 μ l; 100 mg/kg/dia) e os animais do grupo controle positivo receberam o quimioterápico doxorubicina (50 μ l; 1,2 mg/kg/dia) pela mesma via e mesmo tempo de tratamento.

No décimo dia, realizou-se a medição da circunferência abdominal de 6 animais de cada grupo, foram coletadas amostras do líquido ascítico contendo as células para as determinações bioquímicas e, em seguida, os animais foram eutanasiados.

A inibição do crescimento do tumor foi determinada através da equação na qual considera-se a variação (Δ) da circunferência do abdome dos animais que foi mensurada no início do ensaio (dia zero) e 24 h depois dos animais terem recebido o último tratamento (dia 10) em relação à variação do grupo controle (FELIPE et al., 2014):

$$\text{Inibição (\%)} = \left[\frac{(\Delta \text{ circunferência do abdome}_{\text{tratatos}} \times 100)}{\Delta \text{ circunferência do abdome}_{\text{controle}}} \right] - 100$$

Seis animais de cada grupo foram mantidos vivos para determinar o tempo de sobrevivência, segundo a curva de sobrevivência de Kaplan e Meier usando o programa GraphPad Prism versão 6.0 (San Diego, EUA).

3.1.5.2 Efeitos sobre ciclo celular de carcinoma ascítico de Ehrlich

No décimo dia, foram coletadas células do carcinoma ascítico de Ehrlich no líquido ascítico formado na cavidade intraperitoneal dos grupos de tratamentos. A parada no ciclo celular das células do TAE coletadas dos animais tratados com o extrato ET foi avaliada utilizando uma solução de iodeto de propídio/RNase (Immunostep, Salamanca, Espanha) utilizando o protocolo proposto pelo fabricante. Para tanto, o líquido ascítico contendo as células foi coletado de cada camundongo. Em seguida efetuou-se a avaliação da viabilidade celular com azul de tripan. Então, o líquido ascítico contendo as células foi lavado em PBS (2x; 1000 rpm; 10 min) e ressuspensão neste tampão (250 μ l). Por fim, retirou-se uma alíquota desta suspensão celular contendo a densidade de 5×10^5 células/ml que foram fixadas em etanol (70 %; 200 μ l; -20 °C) e mantidas congeladas (-20 °C) por 12 h. Após o descongelamento, as células foram lavadas novamente e gentilmente ressuspensas em solução de iodeto de propídio/RNase (200 μ l; 75 μ M). Após incubação por 15 min em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as células foram avaliadas em citômetro de fluxo (BDFACS Canto II; BD Biosciences) (FACS *Flourescence-activated cell sorter*). Os dados coletados foram processados utilizando o programa Flowing versão 2.5.1 (Turku, Finlândia).

3.1.5.3 Tipo de morte celular induzida em carcinoma ascítico de Ehrlich

As células do carcinoma ascítico de Ehrlich do líquido ascítico inoculado na cavidade intraperitoneal dos grupos de tratamento foram coletadas no décimo dia. Em seguida, avaliou-se a viabilidade destas células com azul de tripan. Na continuidade, as células foram lavadas com PBS (2x; 1000 rpm; 10 min); ressuspensão o *pellet* em PBS (500 μ l). Então, preparou-se uma suspensão celular com densidade conhecida (5×10^6 células/ml) e um volume de 25 μ l foi transferido para um tubo de

fundo cônico. Por fim, estas células foram coradas com uma solução de brometo de etídio (5 μ l; 100 μ g/ml em água destilada) e com solução de laranja de acridina (5 μ l; 100 μ g/ml em água destilada). Aliquotas de cada amostra (5 μ l), foram visualizadas em microscópio de fluorescência para observar as alterações características de morte celular por apoptose ou por necrose. Para cada tratamento foram contadas 300 células, em triplicatas. Os resultados foram expressos como percentagem de células viáveis, apoptóticas ou necróticas (MCGAHON et al., 1995; GENG; ZENG; WANG, 2003).

3.1.5.4 Imunodeteção

Avaliou-se a expressão de proteínas relacionadas com a sobrevivência, proliferação celular, controle do ciclo celular e indução de apoptose; por imunoelctroforese do lisado completo de células tumorais (5×10^6 células/ml) retiradas de cada camundongo inoculado com o carcinoma de Ehrlich e tratado com os extratos por 9 dias. Resumidamente, as células foram lavadas com PBS e lisadas com tampão RIPA constituído por Tris-HCl (50 mM; pH 7,4); 150 mM NaCl; 1,0 % do surfactante NP40; 0,25 % do detergente desoxicolato de sódio e 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil. Este último deve ser utilizado para inibir as proteases que atuam nos resíduos de cisteína e serina. O tampão RIPA também foi suplementado com coquetel inibidor de fosfatases (3 %), para manter as enzimas fosforiladas.

As proteínas foram denaturadas empregando o tampão Laemmli contendo Tris-HCl (60 mM; pH 6,8); 2 % dodecil sulfato de sódio; 10 % glicerol; 5 % beta-mercaptoetanol e 0,01 % de azul de bromofenol (para evidenciar as bandas). Amostras de cada tratamento (20 μ l) foram aplicadas em cada poço e submetidas à eletroforese em gel de dodecil-sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulphate* - SDS) de poliacrilamida (SDS - PAGE), seguida de eletrotransferência para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF). As membranas foram bloqueadas com solução de leite em pó desnatado (4 g) em volume de tampão (80 ml) preparado com Tris-NaCl (60 mM) e 0,1 % Tween 20 (pH 7,6), para impedir ligações inespecíficas. As membranas foram mantidas sob leve agitação em agitador de placas multipoços (CIENTEC, modelo Kline CT 150). Após 1 hora, esta solução foi removida e foram realizadas 4 lavagens de 10 min com o mesmo tampão. Em seguida, as membranas foram incubadas por 2 h, sob leve agitação, com anticorpos primários anti-*Rabbit* contra p53 e contra ciclina A. As membranas foram lavadas com o mesmo tampão para remover os anticorpos não ligados. Em seguida, as membranas foram

incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 2 h, sob leve agitação.

Após remoção dos anticorpos não ligados, procedeu-se com a imunodeteção. Esta foi realizada usando um kit comercial de determinação de quimioluminescência. A β -actina foi usada como controle (LAEMMLI, 1970; DEJEANS et al., 2010). As imagens das bandas foram adquiridas empregando o sistema fotodocumentador ChemiDoc MP (Bio Rad) e as medições foram realizadas empregando o programa ImageJ versão 1.49 (*National Institute of Health*, Bethesda, MD, EUA). Os valores obtidos para as amostras dos tratamentos foram normalizados com os obtidos para β -actina.

A aquisição de imagens foi realizada através de equipamento fotodocumentador pertencente ao Laboratório Multiusuário de Estudos e Biologia, LAMEB, no CCB da UFSC.

3.1.5.5 Biomarcadores de defesas antioxidantes e danos oxidativos no carcinoma ascítico de Ehrlich

Nestas determinações foram empregadas amostras de líquido ascítico completo coletado da cavidade intraperitoneal dos animais inoculados com carcinoma ascítico de Ehrlich e tratados com o extrato por um período de 9 dias consecutivos. As amostras foram coletadas 24 h após o último tratamento.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada cineticamente através do método descrito por Aebi (1984). Esta determinação se baseia na reação de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) mediante a ação enzimática da catalase. A solução de peróxido a 30 % (10 mM) (200 μ l), preparada em tampão fosfato (50 mM; pH=7,0) foi adicionada com pipeta multicanal nos poços contendo as amostras (5 μ l). Imediatamente foram efetuadas as leituras para monitoramento das absorbâncias no comprimento onda de 240 nm por 5 minutos empregando a multileitora Spectramax (Paradigm; *Molecular Devices*, EUA) no Laboratório Multiusuário de Estudos e Biologia (LAMEB), no CCB da UFSC.

Para o cálculo da atividade da CAT empregou-se o coeficiente e extinção molar do peróxido de hidrogênio, expressando os resultados em μ mol.min⁻¹ mg proteína⁻¹.

As determinações espectrofotométricas da atividade das enzimas (SOD e GR); do conteúdo de glutatona reduzida (GSH); dos níveis de peroxidação lipídica e de carbonilação de proteínas foram realizadas empregando leitor de microplacas (TECAN Infinity M200).

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi mensurada através do monitoramento da oxidação de adrenalina e formação do adrenocromo conforme descrito por Misra e Fridovich (1972). Foi construída uma curva com concentrações crescentes das amostras completando-se com tampão glicina (50 mM; pH 10,2) até atingir em cada poço o mesmo volume final (200 μ l). Inicialmente foram efetuadas leituras de absorvâncias no comprimento de onda de 480 nm por 10 minutos. Em seguida em cada poço foi acrescentada a solução de adrenalina (5 μ l; 60 mM; pH =2,0) utilizando micropipeta repetidora (dispensação seriada) (Multipette, *Eppendorf*, EUA). Imediatamente foram realizadas novas leituras de absorvâncias no mesmo comprimento de onda por 10 minutos. Nesta determinação como branco foi empregado o tampão glicina (50 mM; pH 10,2). A atividade da SOD foi calculada por regressão linear, com valores expressos em U SOD/mg de proteína.

A atividade da enzima glutatona redutase (GR) foi determinada através da medição da taxa de oxidação de NADPH em meio de reação (200 μ l) formado por tampão fosfato (0,1 M; pH = 7,0); ácido dietilenotriaminopentacético (5 mM; pH = 7,0); glutatona reduzida – GSSG (1,2 mM) e NADPH (2,1 mM). A diminuição da absorvância foi monitorada por espectrofotometria efetuando-se a leitura cinética durante 3 minutos em comprimento onda de 340 nm (CALBERG; MANNERVIK, 1985).

Para o cálculo da atividade da GR empregou-se o coeficiente de extinção molar do NADPH e os resultados foram expressos em μ mol. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ proteína $^{-1}$.

A peroxidação lipídica foi estimada através da medida da formação de malondialdeído (MDA) utilizando o método do ácido tiobarbitúrico (TBA) (BIRD; DRAPER, 1984).

Neste ensaio para as amostras mantidas em banho maria (100 °C; 15 min) cada molécula de MDA presente nas amostras pode formar aduto com duas moléculas de TBA preparado em tampão Tris-HCl (60 mM; pH 7,4). Trata-se de uma reação proporcional ao conteúdo de MDA na qual se forma um cromóforo de cor rosa mensurável no comprimento onda de 535 nm (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979; OSAWA; FELICIO; GONÇALVES, 2005).

O dano oxidativo às proteínas foi quantificado avaliando-se os níveis de proteína carbonilada (LEVINE et al., 1990). Processos oxidativos podem introduzir grupos carbonila (R-C=O) nos resíduos de aminoácidos de proteínas. Tais modificações podem ser detectadas usando-se o reagente 2,4 -dinitrofenilhidrazina (DNPH) (10 mM). O grupo amina (-NH₂) de cada molécula de DNPH reage com os grupos

carbonila presentes nas proteínas que sofreram oxidação, resultando na formação de dinitrofenilhidrazona que pode ser monitorada espectrofotometricamente no comprimento onda de 340 nm. A guanidina (6,0 M), um agente desnaturante de proteínas, foi empregada como branco. Para o cálculo dos níveis de carbonilação proteica foi empregado o coeficiente de extinção molar do DNPH e normalizados com a quantidade total de proteínas, determinadas pelo método de Lowry.

O conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) foi estimado através da reação de grupos tiois presentes nas amostras com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). Nesta reação forma-se o composto amarelo (tiolato) que é proporcional ao conteúdo de GSH e pode ser determinado por espectrofotometria no comprimento de onda de 412 nm (BEUTLER et al., 1963). Os resultados foram normalizados com o conteúdo protéico utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.1.6 Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste de Bonferroni, quando necessário. Nas comparações entre os valores de CE_{50} foi empregado o programa GraphPad Prism versão 6.0 (San Diego, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

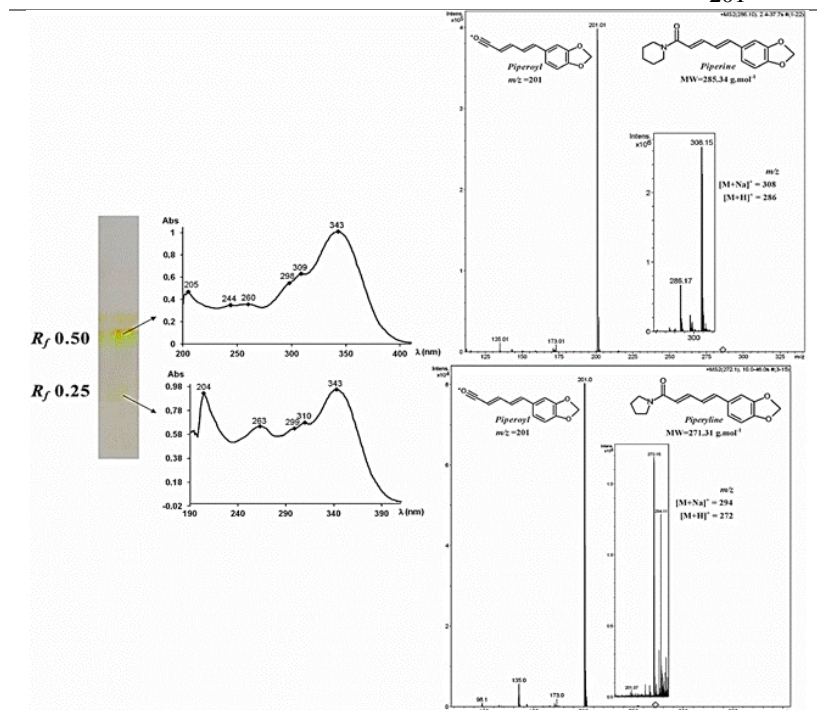
3.2.1 Identificação de piperamidas no extrato etanólico

A identificação de alguns dos constituintes dos extratos foi realizada empregando técnicas de separação cromatográficas. Apartir das maiores bandas obtidas em placas de CCD foi possível isolar e analisar as piperamidas por UV-Vis, por cromatografia (CLAE) e por espectrometria de massas (*ESI-IT-MS/MS*). Foram encontradas as piperamidas piperina ($36,0 \pm 0,2$ %) (cristais alongados e amarelos) e piperilina ($4,2 \pm 0,2$ %) (Tabela 1), em termos de massa e com base em análise realizada por CLAE e por CCD. Os valores para piperina foram cerca de 8 vezes maiores comparativamente aos relatos na literatura (DE PAULA et al., 2000; SCOTT et al., 2005). Estes valores maiores podem ser decorrentes do fato da cultivar Bragantina apresentar maior conteúdo de piperina em relação à cultivares de *P. nigrum* que foram estudadas por De Paula e colaboradores (2000) e por Scott e colaboradores (2005).

Na análise do espectro de *ESI-IT-MS/MS* da piperina foi observada a presença de íons de m/z 286 que correspondem à piperina protonada $[M+H]^+$ e de íons de m/z 308 que correspondem à molécula cationizada com sódio $[M+Na]^+$. Todos os dados espectrais foram consistentes com aqueles reportados para piperina e piperilina (KHAJURIA et al., 2013; CHANDRA et al., 2014) (Tabela 1).

Tabela 1 – Conteúdo de piperamidas determinado por CLAE e dados espectrais obtidos de piperamidas isoladas do extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina

Piperamida	CCD R_f	CLAE (%)	UV λ máx (nm)	<i>ESI-IT-MS/MS</i> m/z
Piperina	0,50	$36,0 \pm 0,2$	205, 244, 260, 298 <i>sh</i> 309, 343	$[M+Na]^+$ 308; $[M+H]^+$ 286; $[M-C_5H_{10}N]^+$ 201
Piperilina	0,25	$4,2 \pm 0,2$	204, 255, 263, 299 <i>sh</i> , 310, 343	$[M+Na]^+$ 294; $[M+H]^+$ 272; $[M-C_4H_8N]^+$ 201



Nota: Espectro UV-Vis (sh = ombro); e espectrometria de massas (ESI-IT-MS/MS, modo positivo). Os compostos foram isolados através de CCD semi-preparativa em sistema eluente hexano:acetato de etila (7:3; v/v). O fragmento $m/z = 201$ se refere à fração piperoil. Todas medições foram realizadas em solução metanólica. O conteúdo de piperilina foi calculado com base em CCD. (Fonte: o autor)

3.2.2 Citotoxicidade, atividade antiproliferativa e geração intracelular de espécies EROs induzidas *in vitro* pelo extrato etanólico de *P. nigrum* L. cultivar Bragantina

Os resultados obtidos por intermédio do ensaio MTT indicaram que o extrato etanólico de *Piper nigrum* cultivar Bragantina foi mais citotóxico para as células MCF-7 do que para as células HT-29 após 24 h de tratamento (Tabela 2). Para a linhagem MCF-7 o valor mais baixo de CE_{50} foi atingido após 24 h de tratamento. Assim, este tempo foi escolhido para a continuidade dos ensaios. Adicionalmente, o estudo dos efeitos de tratamentos realizados por 24 h foi realizado de maneira complementar os resultados obtidos nos ensaios moleculares realizados *in vitro* por 24 h com CT-DNA e DNA plasmidial. Em estudos de interação *in vitro* entre DNA e compostos podem ser empregados tempos de tratamento de 16 ou 24 h (TROMBONE et al., 2007; PICH, 2010; FARIAS et al., 2014).

As curvas de viabilidade celular após tratamento com o extrato (1-1000 $\mu\text{g/ml}$) por 24 e 72 h mostraram que o extrato causou citotoxicidade para ambos tipos celulares, evidenciado pelos valores de CE_{50} (Tabela 2; Figura 20).

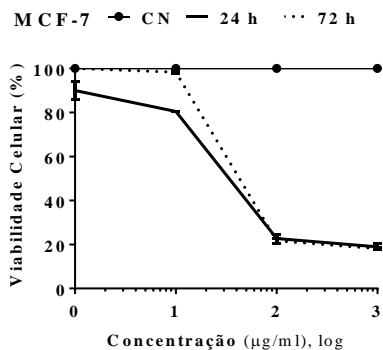
Cabe ressaltar que embora os menores valores de CE_{50} tenham sido obtidos no tratamentos realizado por 72 h para a linhagem HT-29, optou-se pelo estudo da linhagem MCF-7 em função de que entre mulheres o tumor de mama apresenta a maior taxa de mortalidade estimada em 16,8 % para o Brasil e de 14,7 % no mundo (WHO, 2014; IARC, 2016). Enquanto que o câncer colorretal apresenta taxa de mortalidade de 9,3 % no Brasil e apresenta taxa de mortalidade de 9,0 % no mundo (WHO, 2014; IARC, 2016), respectivamente.

Tabela 2 - Citotoxicidade (CE₅₀) do extrato etanólico sobre linhagens tumorais
CE₅₀
($\mu\text{g/ml}$)

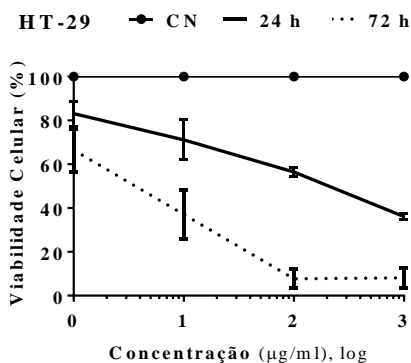
Tratamento (h)	Linhagens tumorais	
	MCF-7	HT-29
24	27,1 \pm 2,0	80,5 \pm 6,0
72	32,7 \pm 4,0	8,2 \pm 4,0

(Fonte: o autor)

Figura 20 - Curvas de viabilidade celular após tratamentos por 24 e 72 h
(A) MCF-7



(B) HT-29



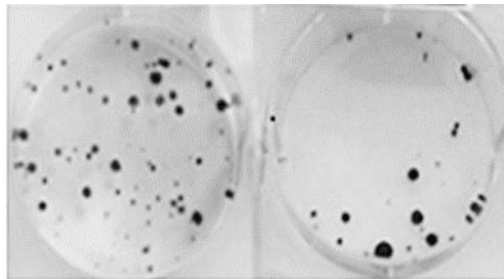
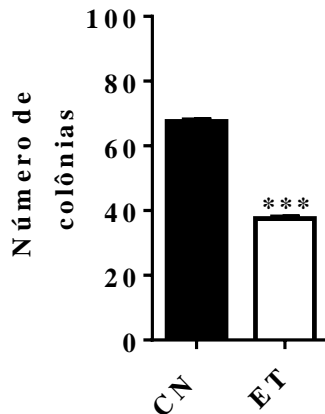
Nota: citotoxicidade observada *in vitro* do extrato etanólico (1-1000 $\mu\text{g/ml}$) de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina sobre as células MCF-7 (A) e HT-29 (B),

na densidade de 10^4 células/ml por poço. Experimentos realizados em triplicatas em três passagens consecutivas. Resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

(Fonte: o autor)

Com base nos resultados obtidos para 24 h de tratamento optou-se pelo uso de células MCF-7 no ensaio de formação de colônias (*clonogenic assay*) para a avaliação dos efeitos antiproliferativos do extrato. Este efeito está representado na Figura 21. Após tratamento com o extrato de *Piper nigrum* houve uma diminuição em cerca de 50 % da proliferação das células MCF-7 comparativamente ao controle.

Figura 21 - Inibição da proliferação clonogênica após 24 h de tratamento com o extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina



Nota: inibição da proliferação de células MCF-7 após tratamento com extrato etanólico (ET) de *Piper nigrum* na concentração de 10 μ g/ml, por 24 h e

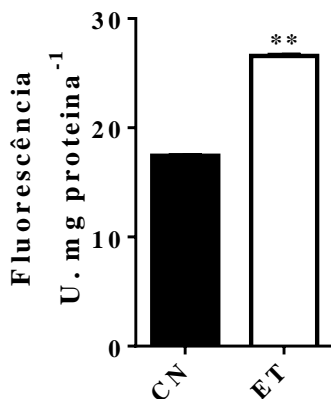
recuperação por 20 dias. Controle negativo (CN) tratado apenas com meio DMEM e DMSO (0,1%). Dados representam as médias de três experimentos independentes. Resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. *** denota diferença estatística comparativamente às células não tratadas do controle, quando $p < 0,001$.

(Fonte: o autor)

A Figura 22 mostra o aumento da geração intracelular de EROs (65,4 %) em células de MCF-7 tratadas com o extrato etanólico de *P. nigrum* L. cultivar Bragantina, comparativamente ao controle.

Provavelmente, devido à atividade pró-oxidante da piperina houve um aumento significativo das EROs intracelulares ($p < 0,01$) (Figura 22) e, principalmente, do radical hidroxil uma espécie altamente reativa produzida nas mitocôndrias de células tumorais tratadas com piperina (TAK et al., 2012; FOFARIA et al., 2014). Este resultado demonstrou que os efeitos citotóxico e/ou antiproliferativo aqui observados, foram decorrentes da formação de EROs nas células MCF-7 provavelmente devido à presença de piperina no extrato (YAFFE et al., 2013; 2015). A geração de EROs intracelulares na presença de piperina foi associada com a reação de Fenton (YAFFE et al, 2013).

Figura 22 - Indução da geração de EROs em células MCF-7 após 24 h de tratamento com extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina



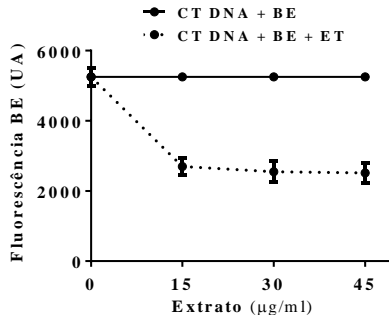
Nota: aumento de EROs intracelulares em células MCF-7 após tratamento com extrato etanólico (ET) de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina na concentração de

10 µg/ml, por 24 h. Controle negativo (CN) tratado com meio DMEM. Dados representam as médias de três experimentos independentes. Resultados foram expressos como média ± desvio padrão. ** denota diferença estatística comparativamente às células não tratadas do controle, quando $p < 0,01$. (Fonte: o autor)

3.2.3 Efeitos do extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina sobre o CT DNA e sobre o DNA plasmidial

Quando intercalado ao DNA o brometo de etídio (BE) emite fluorescência. Substâncias capazes de intercalarem no DNA podem competir com BE intercalado, deslocando o mesmo e, como consequência, causando a redução da fluorescência deste agente intercalante (HOSSAIN; KUMAR, 2009). Como apresentado na Figura 23, quando CT DNA (10 µM) foi exposto ao brometo de etídio e, em seguida incubados com o extrato, a fluorescência deste intercalante diminuiu. De fato, alcaloides aromáticos contendo porções planares e grupos ionizáveis (em função do pH) podem interagir com o CT DNA (HOSSAIN; KUMAR, 2009).

Figura 23 - Efeito de intercalação ao CT DNA por compostos do extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina



Nota: unidades arbitrárias (UA). A capacidade de intercalação dos compostos presentes no extrato etanólico foi avaliada através da variação da intensidade da fluorescência de brometo de etídio (BE) (10 µM) ligado ao DNA de timo de vitelo (CT DNA, 10 µM). Controle negativo (CT DNA+BE). Extrato etanólico (ET) de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicatas para cada concentração e os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. (Fonte: o autor)

Adicionalmente, moléculas intercalantes presentes no extrato ET podem ter deslocado o brometo de etídio que estava intercalado no CT DNA (RESCIFINA et al., 2014).

Na forma mais comum ou canônica de DNA de dupla fita (forma B) o esqueleto de cada fita desta macromolécula apresenta sequência alternada de grupos fosfodiéster e do açúcar desoxirribose ao qual encontra-se ligada uma base; por fim, ligações de hidrogênio existentes entre cada dupla de bases apolares unem as duas fitas do DNA (RESCIFINA et al., 2014).

Assim, a interação entre o DNA e uma molécula contendo um anel heterocíclico pode ser reforçada através de interações iônicas entre o átomo de oxigênio do grupo fosfodiéster do esqueleto do DNA e a carga positiva do átomo de nitrogênio no anel heterocíclico da molécula intercalante (NAKAMOTO; TSUBOI; STRAHAN, 2008). Assim, compostos contendo cargas positivas podem interagir com as cargas negativas (grupos fosfodiéster) no sulco menor do DNA que apresenta potencial eletrostático negativo (LEWIS et al., 2011).

Assim, pode ser considerado que parte do deslocamento do brometo de etídio intercalado ao CT DNA pode ser ocorrido em função de pequenas alterações na dupla hélice do CT DNA causadas por compostos ligantes de sulcos presentes no extrato etanólico de *Piper nigrum* cultivar Bragantina. Os compostos ligantes de sulco apresentam algumas características estruturais como forma curvada ou capacidade de adotar esta forma, a presença de grupos com cargas positivas e ligação preferencial em sequências do DNA ricas em AT (bases adenina e timina) (WILSON et al., 2008; LEWIS et al., 2011).

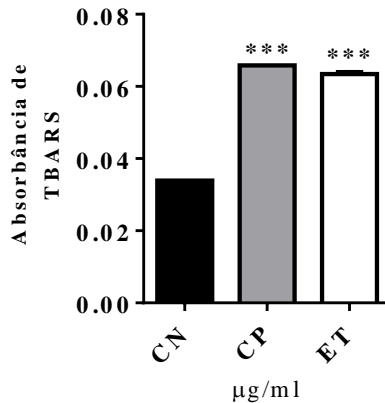
Entre os compostos presentes no extrato etanólico de *Piper nigrum* cultivar Bragantina, destaca-se a piperina. A molécula de piperina apresenta em sua estrutura um anel heterocíclico contendo um átomo de nitrogênio do grupo ionizável piperidina, que confere polaridade à esta molécula (CHITHRA et al., 2014).

Ademais, recentes estudos com piperina e DNA nos quais foram empregados ensaios *in vitro* e *in silico* foram demonstradas interações entre a piperamida e o CT DNA (HARIS et al., 2015; TAWANI et al., 2016). A piperina pode interagir com sequências ricas em AT presentes no sulco menor do CT DNA, o que foi confirmado através de determinações de propriedades físico-químicas do CT DNA tratado com esta piperamida (HARIS et al., 2015). Além disto, houve formação de ligações de hidrogênio entre piperina e região de DNA não canônico contendo sequência rica em guanina denominada como G-quadruplex DNA que ocorre em regiões do genoma humano (TAWANI et al., 2016).

O aumento da geração intracelular de EROs foi um efeito verificado em ensaios realizados expondo-se o CT DNA diretamente ao extrato vegetal (Figura 24). Os danos oxidativos foram evidenciados pelo aumento da absorbância (aumento de 1,8 vezes) causado pela formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em comparação ao grupo controle negativo (JUN; BOCHU; LIANCAI, 2007).

Dados da literatura demonstraram a contribuição da piperina na elevação intracelular de EROs que podem ser relacionados com a promoção de danos oxidativos ao DNA (FOFARIA et al.; 2014; YAFFE et al.; 2015).

Figura 24 - Danos oxidativos ao CT DNA causados pelo extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina



Nota: Absorbância das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS-MDA) derivadas de CT DNA (10 µg/ml) tratado com 10 µg/ml do extrato etanólico (ET) de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina. Controle negativo (CN) (CT DNA tratado com tampão fosfato). Controle positivo (CP) tratado com oxidantes $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}/\text{H}_2\text{O}_2$. Experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. *** denota diferença estatística em relação ao controle negativo, para $p < 0,001$.

(Fonte: o autor)

Quebras nas fitas do DNA comprometem a integridade da informação genética e, por esta razão, diminuem a viabilidade celular. Assim, avaliou-se a capacidade do extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina causar fragmentação no DNA plasmidial (Figura 25). O extrato ET causou dupla quebra, ou seja, houve quebra simultânea nas

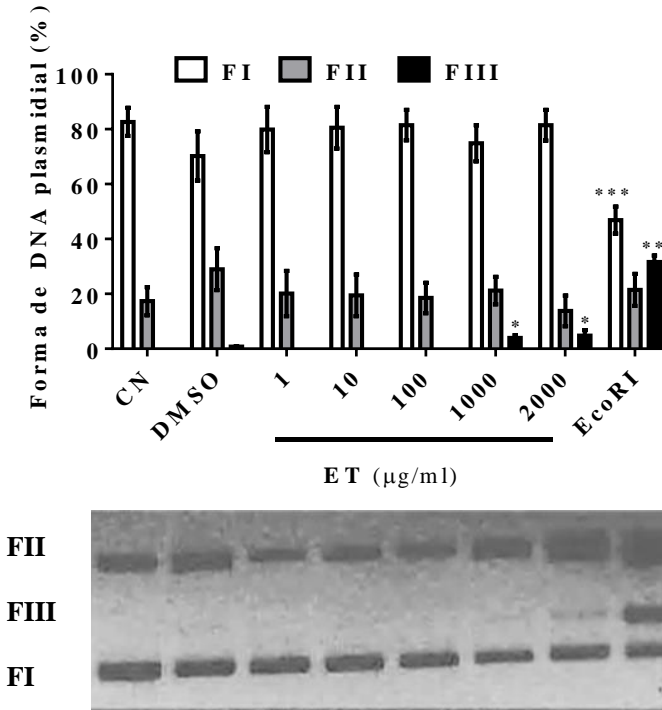
duas fitas do DNA, originando a forma linear aberta correspondente à FIII. Esta pode ser evidenciada pelo aparecimento de bandas correspondentes à forma FIII do DNA em proporções de 3,9 % e de 4,7 % obtidas nas maiores concentrações de 1000 e 2000 µg/ml, respectivamente.

Como controle positivo foi utilizada a enzima EcoRI, uma endonuclease de restrição que foi responsável por quebras simples em apenas uma das fitas do DNA que resultam em 21,5 % da forma circular aberta (FII); bem como por quebra nas duas fitas do DNA com 31,6 % da forma linear (FIII) (NELSON; COX, 2005; 2014).

O controle com DMSO (1,0 %; v/v) foi utilizado para avaliar se os mecanismos de ação sobre o DNA seriam hidrolíticos ou oxidativos pois o DMSO captura espécies reativas de oxigênio no meio reacional (SCARPELLINI et al., 2003), podendo sequestrar os radicais hidroxil (PICH, 2010). Assim, quando se utilizou apenas DMSO (1,0 %) na exposição do DNA plasmidial, foi possível observar quebras no DNA plasmidial causadas por hidrólise pois o DMSO propiciou o relaxamento em partes do DNA que se tornaram mais expostas favorecendo a ocorrência de quebras simples (JUANG; LIU, 1987) (Figura 25).

Deve ser ressaltado que a hidrólise de ligações fosfodiésteres é dificultada em função de cargas negativas dos grupos fosfodiéster (SREEDHARA; COWAN, 2001). Estas cargas inibem os compostos eletrófilos "ávidos por elétrons" altamente reativos que atacam os grupos nucleófilos "ricos em elétrons", existentes no esqueleto do DNA (SREEDHARA; COWAN, 2001).

Figura 25- Efeito de fragmentação do DNA plasmidial causado pelo extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina



Nota: fragmentação de DNA plasmidial induzida após exposição ao extrato etanólico (ET) de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina (1- 2000 µg/ml) por 24 h (37 °C). Controle negativo (CN) onde DNA plasmidial foi tratado apenas água ultrapura. Tratamento com dimetilsulfóxido (DMSO) (1,0 %). Linha EcoRI correspondente ao controle positivo (DNA tratado com enzima de restrição EcoRI solubilizada em água ultrapura). FI, forma superenovelada; FII, forma circular aberta resultante de uma quebra simples na fita; FIII, forma linear do plasmídeo resultante de quebra dupla nas fitas visualizadas no gel de agarose. Experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos em média ± desvio padrão da percentagem de forma do DNA plasmidial observada. *, **, *** denotam diferenças estatísticas em relação ao DNA não tratado com o extrato, para $p < 0,05$; $p < 0,01$ and $p < 0,001$; respectivamente.

(Fonte: o autor)

Todos os extratos foram solubilizados em DMSO (0,1 %; correspondente a 0,5 mM) em uma solução-mãe empregada para obter as

concentrações de tratamento. Deve ser destacado que os compostos presentes no extrato ET foram capazes de causar danos ao DNA plasmidial mesmo que tenha ocorrido alguma atividade sequestrante de radicais hidroxil pelo DMSO empregado na solubilização do extrato (PICH, 2010). Assim, pode-se supor que a atividade oxidativa observada após o tratamento com o extrato ET pode ter sido decorrente da formação de outros radicais livres ou outras EROs. Adicionalmente, no controle negativo com água ultrapura (MilliQ) foi possível observar poucas quebras simples no DNA plasmidial.

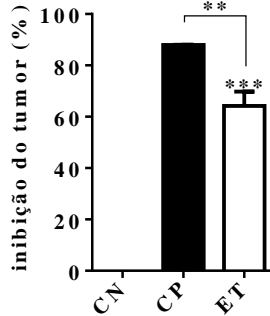
3.2.4 Atividade antitumoral *in vivo* do extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina

Foi observado que o extrato etanólico de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina) mostrou citotoxicidade *in vitro* para linhagens tumorais (MCF-7 e HT-29) além de inibir a proliferação de células MCF-7 possivelmente como decorrência da elevação de EROs intracelulares e de danos oxidativos ao DNA. Então, buscou-se verificar se este efeito antiproliferativo seria também observado em modelo *in vivo*. Assim, para avaliar o efeito antitumoral *in vivo*, os camundongos foram tratados por 9 dias consecutivos com o extrato na dose de 100 mg/kg/dia. Portanto, de acordo com os resultados apresentados na Figura 26 A o tratamento com extrato etanólico desta cultivar levou a uma inibição de mais de 60 % do crescimento tumoral. Enquanto que a doxorubicina, usada como tratamento controle positivo, causou mais do que 85 % de inibição do crescimento tumoral em relação ao controle negativo.

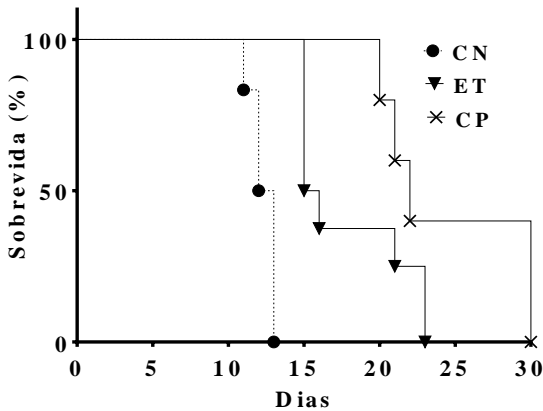
Na Figura 26 B encontra-se demonstrado que o tratamento com extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina aumentou o tempo de sobrevivência dos camundongos inoculados com o carcinoma ascítico de Ehrlich (TAE) em cerca de 76 %, enquanto que para os animais tratados com doxorubicina a sobrevivência foi maior.

Figura 26 - Atividade antitumoral do extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina após tratamento de Balb/c inoculados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich (TAE)

(A) Inibição tumoral



(B) Tempo de sobrevida



Nota: Machos (65 dias de vida; $22,0 \pm 0,5$ g de peso; $n=12$). Controle negativo (CN) (50 μ l; NaCl; 0,8 %; Tween 80; 1,0 %; 9 dias). Controle positivo (CP) tratado com doxorrubicina (50 μ l; 1,2 mg/kg/dia; 9 dias). Tratamento com o extrato etanólico (ET) (50 μ l; 100 mg/kg/dia; 9 dias). *** denota diferença estatística em relação ao controle negativo, para $p < 0,001$.

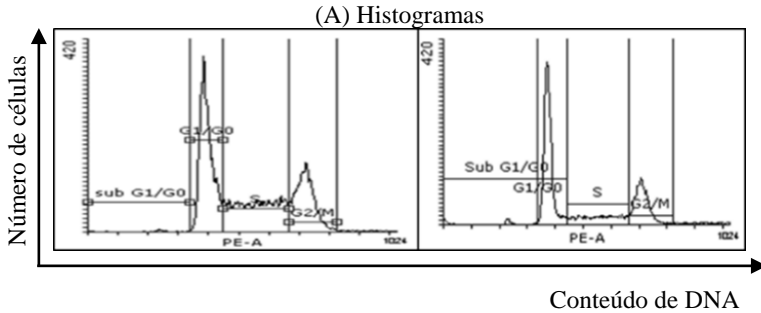
(Fonte: o autor)

3.2.5 Avaliação dos efeitos do extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina sobre a modulação do ciclo celular

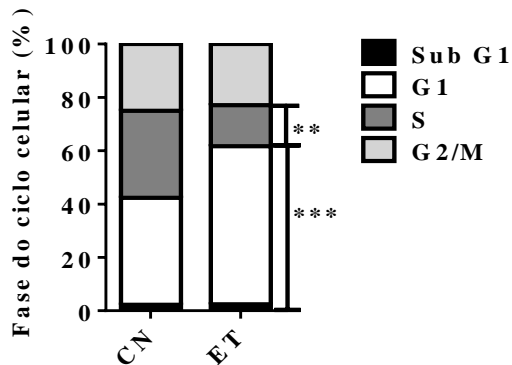
O ciclo celular pode ser modulado através da ativação da via de sinalização da p53 determinada por danos ao DNA. Pois a ativação da proteína p53, conhecida como guardião do DNA, pode causar a parada do ciclo celular no ponto de checagem G1/S (VERMEULEN et al., 2003; LAVIN; GUEVEN, 2006). Esta parada pode resultar em redução ou retardo na progressão do ciclo celular e pode induzir morte por apoptose (LAVIN, GUEVEN, 2006).

Desta forma, o próximo passo foi investigar os efeitos sobre o ciclo celular das células de TAE coletadas de animais submetidos ao tratamento com o extrato de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina. Estes resultados encontram-se na Figura 27 (A, B).

Figura 27 - Efeitos sobre o ciclo de células de TAE coletadas de camundongos Balb/c tratados com extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina



(B) Efeitos sobre as fases do ciclo celular



Nota: Machos (65 dias de vida; $22,0 \pm 0,5$ g de peso; $n=6$). Controle negativo (CN) (50 μ l; NaCl; 0,8 %; Tween 80; 1,0 %). Tratamento com o extrato etanólico (ET) (50 μ l; 100 mg/kg/dia; 9 dias). ** e *** denotam diferenças estatísticas em relação às células do controle negativo, para $p < 0,01$ and $p < 0,001$; respectivamente.

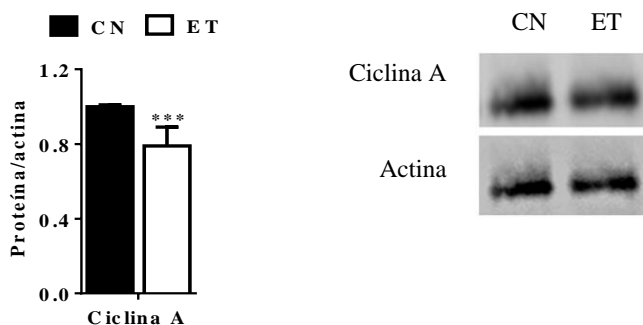
(Fonte: o autor)

Neste contexto, os dados apresentados na Figura 27 indicam que o tratamento realizado com o extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina aumentou o número de células em G1 (acima de 40 %) e, ao mesmo tempo, diminuiu o número de células na fase S (47 %). Além

disto, o tratamento levou à diminuição da expressão de ciclina A nas células de TAE (Figura 28). De acordo com a literatura a progressão do ciclo celular na fase G1 requer a ativação da ciclina A (LUCIANI et al., 2000).

Assim, os resultados apresentados sugerem que a parada em G1 (Figura 27) ocorreu devido à diminuição da expressão da ciclina A (Figura 28).

Figura 28 - Efeitos sobre a expressão de ciclina A em células de TAE coletadas de camundongos Balb/c tratados com extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina



Nota: Machos (65 dias de vida; $22,0 \pm 0,5$ g de peso; n=6). Controle negativo (CN) (50 μ l; NaCl; 0,8 %; Tween 80; 1,0 %). Tratamento com o extrato etanólico (ET) (50 μ l; 100 mg/kg/dia; 9 dias). *** denota diferença estatística em relação às células do controle negativo, para $p < 0,001$. (Fonte: o autor)

3.2.6 Determinação do tipo de morte induzido pelo extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina

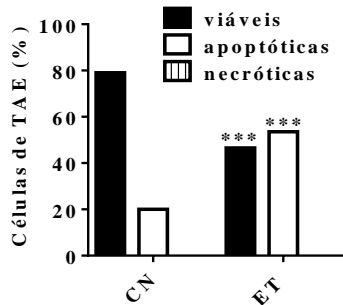
Na continuidade dos experimentos realizados *in vivo* e visando determinar os mecanismos relacionados ao efeito antitumoral observado foi avaliado o tipo de morte celular induzido nas células de TAE após tratamento com o extrato de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina.

Na Figura 29 encontram-se apresentados os resultados do tipo de morte avaliado através da coloração com laranja de acridina/brometo de etídio. Através deste ensaio, observou-se uma redução drástica do número de células viáveis com aumento de células em apoptose (2,5 vezes) após o tratamento com o extrato. Adicionalmente, foi possível

observar que o tipo de morte celular induzido foi apoptose. Houve um aumento de 30 % no número de células de TAE em apoptose no grupo de animais tratados com o extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina comparativamente às células dos animais do grupo controle, sem ter sido detectada morte celular por necrose.

Os dados obtidos mostraram que a apoptose induzida pelo tratamento com o extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina (Figura 29) pode ser relacionada com a parada do ciclo em G1/S (Figura 28). Estas evidências podem ser sustentadas por resultados que demonstraram que este tratamento causou ativação da p53 nas células de TAE (Figura 30).

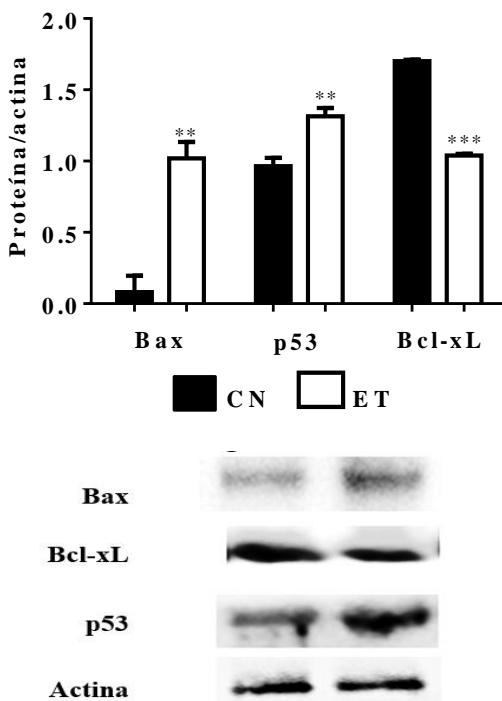
Figura 29 - Tipo de morte induzido em células de TAE coletadas de camundongos Balb/c tratados com extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina



Nota: Machos (65 dias de vida; $22,0 \pm 0,5$ g de peso; $n=6$). CN corresponde ao controle negativo (50 μ l; NaCl; 0,8 %; Tween 80; 1,0 %). Tratamento com o extrato etanólico (ET) (50 μ l; 100 mg/kg/dia; 9 dias). Solução de brometo de etídio (5 μ l; 100 μ g/ml) e de acrinidina laranja (5 μ l; 100 μ g/ml) (1:1; v/v). Suspensão celular na densidade de 5×10^6 células/ml. *** denota diferença estatística em relação ao controle negativo, para $p < 0,001$. (Fonte: o autor)

A Figura 30 revela que o tratamento com o extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina aumentou a expressão de Bax e de p53 e reduziu a expressão de Bcl-xL.

Figura 30 - Expressão de proteínas envolvidas no controle do tipo de morte induzido em células de TAE coletadas de camundongos Balb/c tratados com extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina



Nota: Machos (65 dias de vida; $22,0 \pm 0,5$ g de peso; $n=6$). Controle negativo (CN) (50 μ l; NaCl; 0,8 %; Tween 80; 1,0 %). Tratamento com o extrato etanólico (ET) (50 μ l; 100 mg/kg/dia; 9 dias). **, *** denotam diferenças estatísticas em relação às células do controle negativo, para $p < 0,01$ and $p < 0,001$; respectivamente.

(Fonte: o autor)

A apoptose que ocorre pela via mitocondrial depende do controle realizado por proteínas-chave como a Bcl-2 e Bax. As proteínas anti e pró-apoptóticas da família Bcl-2 que regulam a apoptose podem ser encontradas nas membranas das mitocôndrias (BROWN, 1997; ENO et al., 2012).

Cabe destacar que em condições fisiológicas a membrana interna mitocondrial apresenta permeabilidade à alguns metabólitos e íons (HALESTRAP; CLARKE; JAVADOV, 2004). Mas, em condições de

estresse oxidativo e aumento da concentração de cálcio pode ocorrer a abertura de um poro inespecífico na membrana mitocondrial, ou seja, o poro MTP que permite a passagem livre de moléculas de até 1,55 kDa (HALESTRAP; MCSTAY; CLARKE, 2002; HALESTRAP; CLARKE; JAVADOV, 2004). Como resultado desta abertura na membrana mitocondrial interna haverá inchaço da mitocôndria causando a expansão da matriz que promove o desdobramento das cristas da membrana interna da mitocôndria (HALESTRAP; CLARKE; JAVADOV, 2004). Devido ao inchaço a membrana externa mitocondrial eventualmente se rompe liberando as proteínas que estavam no espaço intramembranas como o citocromo c e outros fatores sinalizando para a morte por apoptose (HALESTRAP; CLARKE; JAVADOV, 2004).

Adicionalmente, as proteínas da família Bcl-2 também podem ser encontradas nas membranas do retículo endoplasmático atuando na modulação da homeostase de cálcio (LI et al., 2007; ENO et al., 2012).

Por outro lado, a inibição de Bcl-xL pode ser vista como uma estratégia de controle do início de apoptose desde que resíduos de aminoácidos nesta proteína podem interagir prevenindo a abertura na membrana mitocondrial e, desta forma, impedindo a liberação do citocromo c. Adicionalmente, a Bcl-xL pode competir com a Bax presente na membrana externa modulando a resposta associada com apoptose (BERTINI et al., 2012).

Uma vez verificado tipo de morte celular induzido pelo extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina em células do TAE, avaliou-se a expressão de p53 e de membros da família Bcl-2, a fim de verificar a ocorrência da ativação da via intrínseca, bem como correlacionar o processo de morte à possível indução de danos ao DNA, que normalmente culmina na ativação de p53 (CHENG et al., 2011).

Como mencionado anteriormente membros da família Bcl-2 estão envolvidos na ativação da via intrínseca mediante o controle da permeabilidade mitocondrial, onde membros pró-apoptóticos como Bak e Bax atuam na formação de poros na membrana mitocondrial que induzem alterações que podem culminar na morte celular por apoptose (REED, 2006; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2010).

Portanto, os resultados obtidos mediante o tratamento dos camundongos com o extrato etanólico de *P. nigrum* cultivar Bragantina sugerem que este foi capaz de induzir apoptose através da via de sinalização que envolveu a ativação de p53 e de Bax.

3.2.7 Avaliação dos efeitos do extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina sobre o estresse oxidativo e defesas antioxidantes

Os resultados apresentados na Figura 31 mostram que o estresse oxidativo em células de TAE, inicialmente observado *in vitro* em células MCF-7 e nos estudos com CT DNA, puderam ser confirmados nos estudos *in vivo*. Estes dados correspondem a biomarcadores de estresse oxidativo avaliados em amostras de líquido ascítico total contendo células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Os resultados foram apresentados nos gráficos correspondentes aos marcadores de peroxidação lipídica (Figura 31 A) e de carbonilação proteica (Figura 31 B). A peroxidação lipídica é um marcador de estresse oxidativo que se baseia na avaliação dos danos induzidos nos lipídios da membrana celular (ZHAO et al., 2014), enquanto a carbonilação de proteínas representa um marcador de modificações oxidativas em proteínas (NELSON; COX, 2005; 2014). Foi constatado um aumento significativo da peroxidação lipídica (Figura 31 A) e na carbonilação proteica (Figura 31 B) das células no líquido ascítico de camundongos tratados com o extrato (até 2 vezes e cerca de 10 vezes, respectivamente), comparativamente ao controle negativo, revelando um insulto oxidativo importante.

De maneira a promover uma melhor compreensão sobre as consequências do estresse oxidativo induzido pelo extrato etanólico de *Piper nigrum* no tecido tumoral tornou-se importante avaliar outros marcadores de defesas antioxidantes, tais como a concentração de GSH assim como a atividade de enzimas antioxidantes GR, SOD e CAT. Uma vez que a atividade e não a expressão destas enzimas foi avaliada, os resultados foram úteis contribuindo para a identificação de vias de sinalização para a detoxificação de EROs em distintos compartimentos das células tumorais.

A GSH deve ser entendida como molécula crítica na resposta celular de resistência tanto ao estresse agudo quanto ao estresse crônico. O grupo tiol (-SH) de GSH pode atuar como doador de elétrons reduzindo moléculas instáveis tais como as EROs. Ao doar um elétron, a molécula de GSH por si mesma torna-se reativa. Mas, rapidamente reage com outra GSH reativa formando glutatona dissulfeto (GSSH). GSH pode ser regenerada a partir de GSSH através da enzima GR que catalisa a redução de GSSH a GSH. De fato, GSH pode ser encontrada no meio extracelular enquanto a GSH e GR intracelulares encontram-se presentes principalmente no citosol e em compartimentos mitocondriais (MBEMBA et al., 1985). Confirmando o insulto oxidativo evidenciado

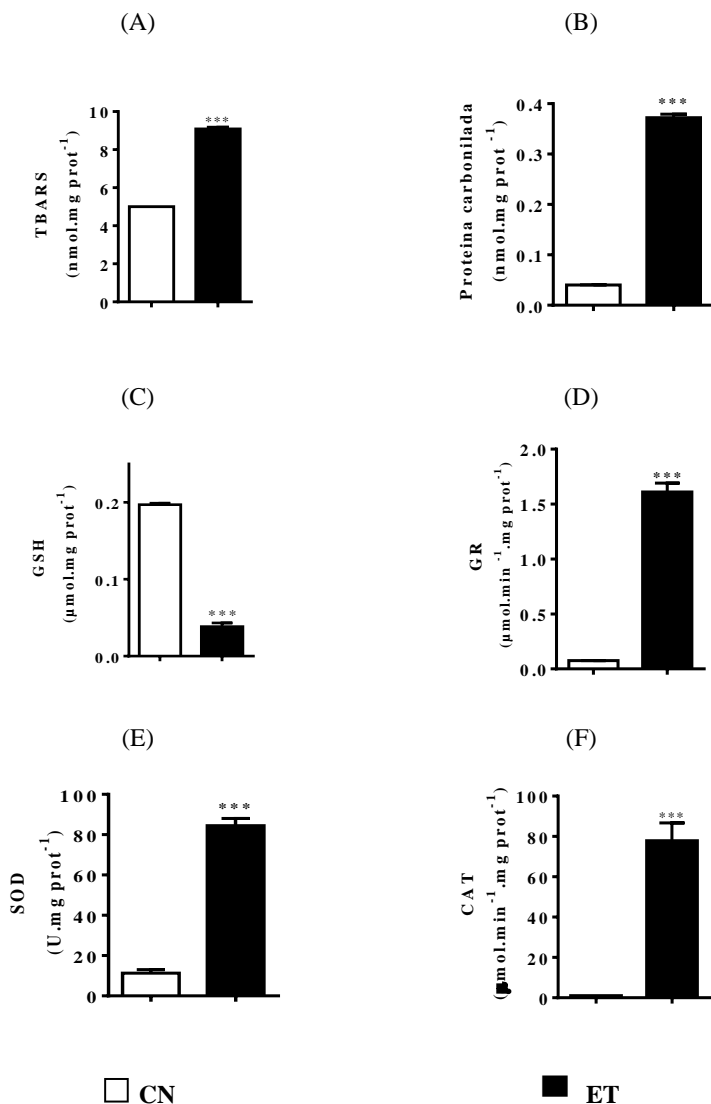
através de oxidação de lipídios e de proteínas e, provavelmente para compensar tal insulto, os resultados apresentados na Figura 31C revelam a depleção do conteúdo de GSH em cerca de 3 vezes comparativamente aos níveis apresentados pelo grupo controle negativo.

Cabe destacar que o efeito antitumoral foi relacionado com a depleção dos níveis de glutathiona (GSH) em células tumorais pelos autores Higuchi e Yamamoto (2002). Estes autores demonstraram que em decorrência de maior depleção dos níveis de glutathiona (GSH) houve indução de apoptose em células tumorais.

Adicionalmente, a depleção de GSH também pode ser correlacionada com a elevação da atividade da GR (aumento superior a 10 vezes) (Figura 31 D) no líquido ascítico coletado de camundongos tratados com o extrato etanólico, comparativamente aos animais do grupo controle negativo.

Da mesma forma, os resultados apresentados na Figura 31 E/F demonstraram um aumento na atividade da CAT em 37,5 vezes e aumento na atividade SOD em 7,6 vezes e, em reação com controle negativo. É importante considerar que em sua atividade enzimática a SOD atua dismutando o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 e O_2 (MISRA; FRIDOVICH, 1972) e, desta forma, atua continuamente formando H_2O_2 que prontamente sofre a ação da CAT (AEBI, 1984). Em mamíferos foram caracterizadas três formas de SOD altamente compartimentalizadas. A forma SOD1 pode ser encontrada quase exclusivamente nos espaços citoplasmáticos, enquanto a SOD2 tem como alvo as enzimas contendo manganês presentes nas mitocôndrias e a forma SOD3 apresenta um peptídeo sinalizador que direciona esta enzima para o ambiente extracelular (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002). Os resultados apresentados na Figura 31 E representam a atividade total da SOD presente nas amostras. Nos animais, a CAT encontra-se principalmente localizada no interior de peroxissomos no citoplasma (CHELIKANI et al., 2004).

Figura 31 - Marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes de células de TAE inoculadas em camundongos Balb/c tratados com o extrato de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina



Nota: CAT, catalase; GR, glutationa redutase; GSH, glutationa reduzida; SOD, superóxido dismutase; TBARS, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrio. Machos (65 dias de vida; 22,0 ± 0,5 g de peso; n=6). Controle negativo (CN) (50 μl; NaCl; 0,8%; Tween 80; 1,0 %). Tratamento com o extrato etanólico (ET) (50 μl; 100

mg/kg/dia). *** denota diferença estatística em relação às células do controle negativo, para $p < 0,001$.

(Fonte: o autor)

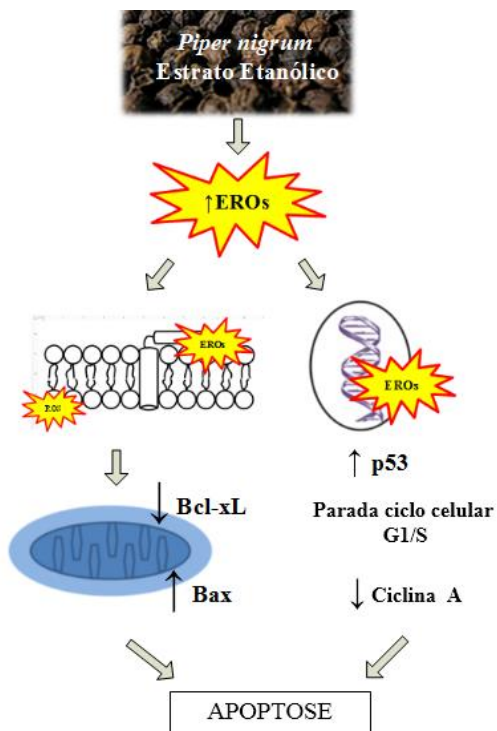
Todas estas três importantes enzimas antioxidantes apresentaram aumento da atividade enzimática de maneira a atenuar ou evitar a continuidade do estresse oxidativo promovido pelo tratamento com o extrato de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina (Figura 31 D/E/F). Quando a geração de EROs superou as defesas antioxidantes ocorreu a depleção do conteúdo de GSH (Figura 31 C). Mesmo com o aumento da atividade de GR (Figura 31 D) o conteúdo de GSH (Figura 31 C) provavelmente não foi renovado na quantidade que seria necessária. Como consequência, as EROs causaram peroxidação lipídica (Figura 31 A) e danos oxidativos às proteínas (Figura 31 B) elevando a produção de EROs e a atividade da SOD (Figura 31 E). Como mencionado anteriormente, houve diminuição do conteúdo de GSH (cerca de 60 %) (Figura 31 C) nas células tumorais dos camundongos tratados com o extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina. Como consequência destes menores níveis de GSH provavelmente houve a redução dos efeitos inibitórios da GSH sobre a atividade pró-apoptótica da p53 (via glutationização) o que resultou na indução de apoptose (VELU et al., 2007).

Ademais, o mecanismo envolvido na atividade antitumoral em condições pró-oxidantes, estabelecidas após o tratamento com o extrato etanólico de *Piper nigrum*, pode estar relacionado diretamente com danos oxidativos ao DNA observados *in vitro*. Fofaria et al. (2014) verificaram que piperina levou a indução de EROs que causaram danos ao DNA determinando parada no ciclo celular em G1 mediada por piperina seguida por apoptose de células de melanoma. Adicionalmente, foi demonstrado que houve um pronunciado decréscimo nas defesas antioxidantes das células tumorais que induziu o aumento da expressão da p53 e bloqueou o ciclo celular em G1/S através da redução de expressão de ciclina A deflagrando a morte por apoptose, através da ativação da via intrínseca.

Assim, com base em todos os resultados experimentais obtidos anteriormente foi possível elaborar a hipótese ilustrada da Figura 32 para possíveis mecanismos de ação do extrato etanólico da *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina. Nesta hipótese de trabalho o estresse oxidativo gerado nas células pode ser devido à sobrecarga de EROs nas células tumorais mantidas em condições pró-oxidantes propiciadas pelo tratamento com extrato etanólico desta cultivar. A sobrecarga de EROs

levou à danos oxidativos às membranas celulares e ao DNA resultando em morte por apoptose.

Figura 32 - Resumo gráfico dos eventos bioquímicos associados ao tratamento com extrato de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina que causaram a elevação do estresse oxidativo em células tumorais



(Fonte: o autor)

3.3 CONCLUSÕES

O extrato etanólico de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina foi citotóxico para as células MCF-7 resultando em morte e redução da proliferação deste tipo celular. Efeitos estes provavelmente relacionados com o aumento de EROs intracelulares. O extrato foi capaz de causar danos ao DNA por intercalação e clivagem oxidativa. Ele inibiu o crescimento tumoral em modelo *in vivo* por mecanismos que envolveram parada no ciclo celular e indução de apoptose. Além disto, o efeito

antitumoral *in vivo* também deve ser associado com a sobrecarga de EROs nas células tumorais mantidas em condições pró-oxidantes. Estas foram evidenciadas pela elevada atividade das enzimas antioxidantes CAT; SOD e GR, além do aumento da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas.

Estas constatações usando a maceração etanólica de frutos de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina) confirmam as alegações etnomedicinais referentes às propriedades curativas desta espécie, além de fornecer esclarecimentos sobre alguns dos mecanismos moleculares envolvidos.

Estes resultados foram condensados em um artigo que foi publicado na revista *Journal of Ethnopharmacology* (ANEXO A):

GRINEVICIUS, V.M.A.S.; KVIECINSKI, M.R.; SANTOS MOTA, N.S.; OURIQUE, F.; PORFIRIO WILL CASTRO, L.S.; ANDREGUETTI, R.R.; GOMES CORREIA, J.F.; FILHO, D.W.; PICH, C.T.; PEDROSA, R.C. *Piper nigrum* ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 189, p.139-147, 2016.

4 PARTE II: ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATOS CONVENCIONAL E SUPERCRÍTICOS DE FRUTOS DE *Piper nigrum* L. CULTIVAR BRAGANTINA.

Nesta etapa da pesquisa buscou-se avaliar comparativamente os extratos obtidos através de método convencional com maceração etanólica (ET) e os extratos supercríticos (ESC) obtidos com dióxido de carbono supercrítico mantido na mesma temperatura e tempo de extração e com diferentes pressões. Neste estudo buscou-se confirmar a extração supercrítica como melhor tecnologia disponível (*BAT - Best Available Technology*) para obtenção de extratos contendo compostos bioativos.

Desta forma, a parte I e a parte II desta tese podem ser consideradas como complementares. Pois, na parte I buscaram-se evidências comprobatórias das alegações tradicionais referentes às atividades anti-inflamatória e antitumoral da pimenta preta (*Piper nigrum*). Enquanto que na parte II buscou-se demonstrar que o uso de extração supercrítica pode representar uma alternativa mais eficiente para obter mais compostos bioativos.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Reagentes e meio de cultivo

O meio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM), o soro fetal bovino (*fetal bovine serum*-FBS), tampão fosfato salina (PBS) e os antibióticos foram adquiridos da empresa Gibco (USA). Os reagentes sal de tetrazolio (MTT), DNA de timo de vitelo (*calf thymus* DNA - CT DNA), agarose, brometo de etídio, iodeto de propídio e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (USA). Os demais reagentes inclusive os solventes empregados nas análises fitoquímicas foram todos de grau analítico.

4.1.2 Amostra de frutos de *Piper nigrum*, obtenção de pimenta preta, preparação dos extratos e análises fitoquímicas

4.1.2.1 Coleta dos frutos e preparo da pimenta preta

A coleta dos frutos e preparo da pimenta preta foram realizados de acordo com o descrito na Parte I, item 3.1.2. Assim, deve ser ressaltado

que nos experimentos descritos nesta parte da tese foram utilizados frutos de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina. Trata-se de um cultivar desenvolvido por uma empresa estatal EMBRAPA, genuinamente brasileira, que tem se destacado por relevantes contribuições para o desenvolvimento desta *commodity* buscando produzir frutos que estejam dentro de padrões de qualidade internacionalmente aceitos (LEMOS et al., 2011; INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2011; 2015).

4.1.2.2 Obtenção do extrato etanólico e dos extratos supercríticos

O extrato etanólico (ET) foi obtido conforme descrito previamente na Parte I desta tese, item 3.1.2. Os extratos supercríticos foram preparados pela Dra. Kátia S. Andrade no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, coordenado pela Profa. Dra. Sandra R. S. Ferreira. Deve ser ressaltado que a descrição contida nesta tese sobre os procedimentos empregados pela Dra. Kátia S. Andrade na obtenção dos extratos supercríticos visou apenas oferecer as informações necessárias para a reprodução dos processos de extração realizados. Maiores detalhes do processo podem ser obtidos na tese desta pesquisadora (ANDRADE, 2015).

No processo de extração que foi realizado por Andrade seguindo os procedimentos detalhados em sua tese de doutorado (ANDRADE, 2015) foi utilizado um sistema de extração supercrítica previamente descrito (ZETZL; BRUNNER; MEIRELES, 2003) e empregando condições de processo previamente padronizadas (MICHIELIN et al., 2005; ANDRADE et al., 2012; ANDRADE; FERREIRA, 2013; ANDRADE, 2015). Os extratos supercríticos foram produzidos utilizando pimenta preta previamente preparada com frutos verdes de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina. Os frutos na forma de pimenta preta foram moídos em triturador de facas, foram peneirados e imediatamente utilizados para as extrações (FERREIRA; MEIRELES; CABRAL, 1993; FERREIRA; MEIRELES, 2002).

Conforme mencionado anteriormente Andrade obteve os extratos supercríticos (ESC) mantendo o dióxido de carbono em condições supercríticas (scCO₂) (ANDRADE, 2015). As condições de extração em termos de temperatura (40 °C), de pressão (150; 200 ou 300 bar) e de tempo de extração (240 min) que foram utilizadas modificaram a densidade do solvente (dióxido de carbono) aumentando sua seletividade

(MICHIELIN et al., 2011). A coluna de extração foi mantida a 40 °C, em banho termostatizado (Microquímica-MQBTZ99-20, SC, Brazil), de acordo com Andrade (2015). O tempo das extrações foi de 240 minutos, tendo sido realizadas 3 extrações para cada tipo de extrato. O fluxo do solvente foi mantido em $8,00 \pm 2,0 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ usando dióxido de carbono com 99,9 % de pureza em diferentes condições de pressão (150, 200 e 300 bar) (1 atm= 1,01225 bar) (ANDRADE, 2015).

Adicionalmente, Andrade efetuou as extrações empregando o cossolvente com fluxo mantido em $8,00 \pm 2,0 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$. O cossolvente utilizado foi etanol a 7,5 % (v/v) (VETEC, S. Paulo) (ANDRADE, 2015). As extrações com este cossolvente foram realizadas para a pressão de 200 bar com base no fato do extrato ESC200 ter apresentado os melhores resultados em ensaios preliminares para avaliação de citotoxicidade *in vitro* empregando células de câncer de mama (MCF-7).

Estas condições promoveram um aumento na solubilização de componentes específicos dentro da fração não-polar da complexa matriz vegetal com conseqüente aumento do rendimento destes compostos (MICHIELIN et al., 2005; PERAKIS et al., 2005). O extrato ET apresentou o maior rendimento global ($6,4 \pm 0,03 \%$). Entre os extratos supercríticos o que foi obtido na pressão de 150 bar (ESC150) apresentou o menor rendimento ($1,5 \pm 0,40 \%$); o extrato supercrítico obtido a 200 bar (ESC200) apresentou um rendimento levemente superior ($2,7 \pm 0,40 \%$); assim como o extrato supercrítico obtido a 300 bar (ESC 300) ($2,3 \pm 0,02 \%$). Enquanto que o extrato supercrítico obtido a 200 bar com cossolvente (etanol; 7,5 %) (ESC200+EtOH) apresentou o maior rendimento ($4,3 \pm 0,01$) em relação aos demais extratos supercríticos (ANDRADE, 2015).

4.1.2.3 Determinações por Cromatografia de Camada Delgada

A presença de piperamidas em todos extratos (ET, ESC150, ESC200, ESC300 e ESC200+EtOH) obtidos de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina) foi confirmada através de cromatografia em camada delgada semi-preparativa (CCD) (WAGNER; BLADT, 1996), conforme descrito na Parte I, item 3.1.2.

As cromatografias analíticas em camada delgada foram conduzidas de maneira a separar, identificar e quantificar as piperamidas presentes nos extratos enquanto que as cromatografias preparativas foram empregadas para isolar quantidades de piperina e de retrofractamida C suficientes para a realização das caracterizações fitoquímicas. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica

Experimental-LABIOEX segundo protocolos estabelecidos pelo Químico e mestre em Fitoquímica Ms. João F. Correia servidor da UFSC neste laboratório, que otimizou os procedimentos de separação e de purificação de piperamidas dos extratos com base em literatura (WAGNER; BLADT, 1996).

4.1.2.4 Determinações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises do conteúdo de piperamidas nos extratos ET, ESC150, ESC200, ESC300 e ESC200+EtOH foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com cromatógrafo HPLC Agilent 1200, contendo detector UV-visível (comprimento de onda 340 nm) e equipado com coluna Luna C18 (150 mm x 4,6 mm; e tamanho de partícula 5 µm), mantida na temperatura 25 °C. Como fase móvel foi empregada a solução acetonitrila:água (ácido acético 1 %) (60:40), com fluxo de solvente de 1 ml/min e o volume fixo de injeção da amostra (2 µl), conforme descrito anteriormente por Wood, Barrow e James (1988). Tanto o extrato quanto o padrão de piperina foram solubilizados em metanol absoluto grau analítico. Estas análises foram realizadas pelo Prof. Dr. Luiz Kanis da UNISUL.

Nesta determinação foram pesados 10 mg de cada extrato que foram diluídos em 10 ml de metanol absoluto grau analítico e mantidos em agitação ultrassônica durante 15 minutos. Então, as amostras foram filtradas (0,45 µm; VertiPure™ NYLON Syringe Filters) e encaminhadas para as análises.

O cálculo da concentração de piperina foi realizado a partir da comparação da área das amostras com um padrão de piperina (0,1 mg/ml) solubilizado em metanol absoluto grau analítico. Os resultados foram apresentados em mg de piperina/g da amostra. As análises dos mesmos extratos empregados nos ensaios *in vitro* e *in vivo* foram realizadas em triplicata.

4.1.2.5 Determinações por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

A análise qualitativa dos extratos ET e ESC200, ESC300 e ESC200+EtOH foi efetuada em sistema de cromatografia gasosa (Agilent Technologies modelo 7820A) acoplado a espectrômetro de massas (Agilent Technologies modelo 5975 MSD). Os compostos foram separados em coluna capilar HP5 MS (25 m x 250 µm x 25 µm). Foi

empregado o modo de injeção Split com taxa 5:1 (5 ml/min), com o detector mantido em temperatura de 280 °C e pressão de 5 psi. O volume injetado da amostra de cada extrato foi de 1 µl. A temperatura do forno da coluna foi programada para iniciar em 50 °C, com taxa de incremento de 4 °C por minuto até atingir 260 °C, onde permaneceu por 10 min. O tempo total de análise foi de 62 min. Os dados de espectro de massa completo foram obtidos e coletados através do modo de varredura dentro de intervalo estabelecido (30 – 750 Da). Os compostos foram indentificados usando a biblioteca de espectros de massa Wiley 6.0 (Wiley, Nova York, NY, EUA).

Estas análises foram realizadas pela pós-doutoranda Lizandra C. Bretanha no LABEC - Laboratório de Eletroforese Capilar situado no Departamento de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas (CFM) da UFSC, sob a coordenação do Prof. Dr. Gustavo A. Micke.

4.1.2.6 Análises por espectrometria de massas sequencial (*ESI-IT-MS/MS*)

Para as análises por espectrometria de massas, as bandas de placa de cromatografia em camada delgada (CCD) localizada em $R_f = 0,50$ e $R_f = 0,30$ foram removidas e dissolvidas em metanol. Após centrifugação o sobrenatante foi coletado e submetido às análises através de espectrofotometria UV-vis (Cirrus 80ST, FEMTO, São Paulo, Brasil). Estas amostras das alcamidas isoladas do extrato ESC200 e solubilizadas em metanol absoluto foram filtradas (0,22 µm, Millex; Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) antes da realização dos estudos por espectrometria de massas sequencial com espectrômetro de ionização por eletronebulização (*Electro Spray Ionization Mass Spectrometry - ESI-IT-MS*) com interface do tipo armadilha de íons (*ion trap - IT*) como analisador de espectros que foi mantido no modo positivo (QUIRANTES-PINÉ et al., 2009; KHAJURIA et al., 2013; CHANDRA et al., 2014).

Estas análises foram realizadas no espectrômetro Amazon X Ion Trap do Centro de Biologia Molecular e Estrutural (CEBIME) da UFSC pela bióloga Elis Rosa servidora da UFSC neste centro, sob a coordenação do Prof. Dr. Hernán F. Terenzi. A interpretação dos fragmentos foi realizada com base em dados publicados na NIST e em artigos publicados.

4.1.3 Cultura celular

A cultura das células da linhagem celular de carcinoma de mama humana (MCF-7) foi realizada conforme descrito na Parte 1 desta tese, item 3.1.3.1.

4.1.4 Citotoxicidade, inibição da proliferação celular e tipo de morte induzida pelos extratos obtidos de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina

No ensaio de citotoxicidade foram adicionadas as soluções do extrato etanólico (ET) ou de extratos supercríticos obtidos a 150 bar (ESC150); a 200 bar (ESC200), a 300 bar (ESC300) e a 200 bar com adição de cossolvente (etanol a 7,5 %, v/v) (ESC200+EtOH) em concentrações logarítmicas crescentes (1, 10, 100 e 1000 µg/ml). Os tratamentos foram conduzidos por 24 e 72 h. Estes ensaios foram realizados segundo Mosmann (1983), conforme descrito na Parte I desta tese, item 3.1.3.2.

Os ensaios para a avaliação dos efeitos dos compostos presentes nos extratos sobre a proliferação celular clonogênica foram realizados com todos os extratos. Porém, apenas foram apresentados os resultados obtidos após os tratamentos com o extrato etanólico (ET) ou com o extrato supercrítico ESC200 em concentrações crescentes (10, 20 e 40 µg/ml) de acordo com Franken et al. (2006). Foram preparadas soluções primeiramente solubilizando os extratos em DMSO (0,1 %) e, então, adicionou-se meio DMEM completo para obterem-se as concentrações de trabalho. Ao final de 20 dias de incubação, as colônias foram lavadas com PBS e coradas com cristal violeta (0,2 %). Em seguida procedeu-se a aquisição das imagens em microscópio invertido com câmara digital acoplada (Zeiss Axio Vert 40 CFL). Na configuração e aquisição das imagens foi empregado o software Zen pro 2012 (Carl Zeiss, Alemanha). Para a medição da área das colônias foram empregadas as mesmas imagens digitais, utilizando-se a função de medição de área oval do software ImageJ versão 1.49 (*National Institute of Health*, Bethesda, MD, EUA), empregando uma escala calibrada (*analyse, set scale, distance in pixels* =16; *know distance* =1.0). Como referência foi necessário estabelecer um padrão a partir de uma área conhecida (7,1 mm²) que foi inserida em cada poço empregando bolômetro de desenho (diâmetro de 3,0 mm), antes da aquisição das imagens digitais.

Para a avaliação do tipo de morte celular induzida em MCF-7, estas foram plaqueadas (densidade de 5×10^6 células/poço) em placas com 96

poços. Então, foram mantidas por 24 h nas condições de incubação padrão para garantir a aderência. Em seguida, as células foram submetidas a tratamento com os extratos por 24 h, nas condições de incubação padrão. Os extratos foram solubilizados em DMSO (0,1 %) e em meio DMEM de maneira a atingir a concentração final em cada poço equivalentes à 10 ou 20 µg/ml. O controle negativo foi tratado apenas com DMSO (0,1 %) em meio DMEM.

Após a tripsinização, as células de cada tratamento foram submetidas à centrifugação (10 min, 1000 rpm). O sobrenadante foi descartado e as células MCF-7 foram ressuspensas em PBS (25 µl) na densidade de (5×10^6 células/ml), em tubos de fundo cônico. Em seguida, 5 µl da solução de brometo de etídio (100 µg/ml preparada em água destilada) e 5 µl da solução de acrinidina laranja (100 µg/ml preparada em água destilada) foram adicionadas a cada tubo. Por fim, uma alíquota (5 µl) de cada amostra foi observada sob microscópio de fluorescência para a quantificação do percentual de células viáveis, apoptóticas ou necróticas, foram contadas 300 células de cada amostra, em triplicatas (n=3). (GENG, ZENG, WANG, 2003).

4.1.5 Avaliação da capacidade de compostos presentes nos extratos interagirem por intercalação e causarem danos oxidativos ao DNA

Substâncias puras e compostos capazes de interagirem intercalando-se entre as bases do DNA podem competir com as moléculas de iodeto de propídio (IP). O IP em solução aquosa apresenta excitação máxima a 493 e emissão a 636 nm (THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2016). Quando o IP se liga intercalando entre as bases do DNA como consequência ocorre um aumento expressivo em sua fluorescência (20 a 30 vezes) e, ao mesmo tempo, a fluorescência de excitação máxima sofre deslocamento na emissão (535 nm) e no comprimento de onda de excitação (617 nm) (THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2016).

Ensaio preliminares para avaliar a interação entre o CT DNA e o iodeto de propídio foram efetuados através de uma curva de saturação. Esta curva foi construída com valores crescentes de iodeto de propídio (12,5; 25; 50; 75; 100 e 125 µM) empregando a mesma concentração de DNA (10 µM). A concentração de saturação foi obtida para iodeto de propídio (IP) a 25 µM. Assim, foram empregadas as concentrações de CT DNA (10 µM) e de IP (25 µM) na continuidade dos ensaios (DA SILVEIRA et al., 2011). As diluições foram realizadas com tampão fosfato 50 mM contendo 0,1 M de cloreto de sódio (NaCl) em pH 7,4. O

NaCl foi empregado para evitar uma segunda fixação do IP aos sítios do DNA (DA SILVEIRA et al., 2011).

Para a realização do ensaio de intercalação, em cada poço (placa 96 poços) foi adicionado CT DNA de maneira a atingir a concentração final de 10 μM , em seguida foi acrescentado IP (25 μM) e, somente então, foram adicionadas as soluções dos extratos (ET e ESC200) de maneira a serem obtidas as concentrações finais de 10, 20, 30, 40 $\mu\text{g/ml}$; perfazendo um volume final de 100 μl /poço; após manter as placas ao abrigo da luz por 30 min, leituras de variações da fluorescência do IP foram efetuadas empregando 535 nm (excitação) e 617 nm (emissão) (TECAN Infinity M200), segundo descrito anteriormente (DA SILVEIRA et al., 2011). Para o preparo destas soluções, cada extrato (0,01g) foi previamente solubilizado em DMSO (0,1 %; v/v) e adicionou-se o volume do tampão fosfato 50 mM contendo 0,1 M de cloreto de sódio (NaCl) em pH 7,4. Como controle negativo utilizou-se o CT DNA e IP nas mesmas concentrações obtidas com tampão fosfato 50 mM contendo 0,1 M de cloreto de sódio (NaCl) em pH 7,4. Como controle positivo utilizou-se solução tamponada de doxorubicina a 10; 20; 30 e 40 $\mu\text{g/ml}$. Foram realizados três ensaios distintos conduzidos empregando triplicatas para cada concentração dos extratos.

Para determinar a ocorrência de danos oxidativos ao CT DNA causados após exposição aos extratos, foi empregado o método proposto por Jiang et al. (2007) e por Jun; Bochu; Liancai (2007). Inicialmente, o CT DNA (0,5 mM) foi preparado em 50 mM de tampão fosfato (pH 7,2) em microtubos (1,5 ml). Em seguida foi adicionada em cada tubo a solução dos extratos (ET e ESC200) preparada com o mesmo tampão de maneira a atingir a concentração final de 10 e de 20 $\mu\text{g/ml}$ em cada poço. Após o término do tempo de incubação em banho maria (24 h, a 37 °C) adicionou-se em cada tubo uma solução de 2-ácido tiobarbitúrico (1,0 %) preparada com NaOH (50 mM) e ácido acético glacial (1:1:1). Os microtubos foram mantidos em banho-maria (100 °C) por 10 min, resfriados em banho de gelo e as amostras foram transferidas para placas multipoços (96 poços) e a leitura da absorbância foi efetuada em 540 nm (TECAN Infinity M200). Como o controle negativo empregou-se o tampão fosfato (50 mM; pH 7,2) e como controle positivo foram utilizados os oxidantes $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ (100 μM) e peróxido de hidrogênio (10 mM), ambos geradores de radicais livres (DA SILVEIRA et al., 2011). O $\text{Fe}(\text{EDTA})$ atua promovendo danos ao DNA na presença de oxigênio livre por gerar espécies reativas de oxigênio (PICH, 2010).

4.1.6 Ensaios realizados com camundongos Balb/c

4.1.6.1 Inibição do crescimento *in vivo* do carcinoma ascítico de Ehrlich

Para a avaliação da atividade antitumoral *in vivo* os ensaios foram conduzidos conforme descrito no item 3.1.5.1 da Parte I desta tese. Os animais (Balb/c; machos; $22,0 \pm 0,5$ g; 65 dias de vida; n=16) foram inoculados intraperitonealmente com células do carcinoma ou tumor ascítico de Ehrlich (TAE) (5×10^6 células/ 200 μ l). Após 24 h, os animais foram tratados por via intraperitoneal com o extrato etanólico (ET) ou com o extrato supercrítico ESC (produzido a 200 bar) de maneira comparativa. Para os ensaios *in vivo* utilizou-se Tween 80 (1,0 %; v/v) como controle negativo preparado com solução salina NaCl (0,8 %; v/v).

Realizou-se um estudo preliminar com o extrato ESC (produzido a 200 bar) para determinar a melhor dose empregando uma faixa de valores variando de 5,0; 8,0; 10,0 e 30 mg/kg (dados não apresentados). Os tratamentos realizados com o extrato a 30 mg/kg/dia causaram a morte dos animais. Além disto, os tratamentos realizados com o menor valor (5,0 mg/kg/dia) não apresentaram diferença em relação ao grupo controle negativo (dados não apresentados). Portanto, foram obtidos os melhores resultados nos tratamentos realizados com valores de 10 e 20 mg/kg/dia. Assim, estas doses foram escolhidas para a continuidade dos ensaios.

Adicionalmente, estes valores foram convertidos para a dose equivalente para humanos (HD) de acordo com Reagan-Shaw, Nihal e Ahmad (2007). Para tanto, foi aplicada a fórmula abaixo:

$$HD_{[mg/kg]} = \left[dose\ animal_{[mg/kg]} \times \frac{animal_{K_m}}{humano_{K_m}} \right]$$

Dados do órgão de controle (*Food and Drug Administration*) providenciaram os valores de Km (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2007). Assim, ao serem efetuados os cálculos foram encontrados os valores de dose equivalente para humanos (HD).

4.1.6.2 Efeitos sobre ciclo celular de carcinoma ascítico de Ehrlich

Para a determinação dos efeitos dos extratos sobre o ciclo celular do carcinoma de Ehrlich *in vivo* os ensaios foram conduzidos conforme descrito na Parte I desta tese, item 3.1.5.2.

4.1.6.3 Tipo de morte celular induzida em carcinoma ascítico de Ehrlich

Para a determinação dos efeitos dos extratos sobre o tipo de morte celular induzida nas células do carcinoma de Ehrlich *in vivo* os ensaios foram conduzidos conforme descrito na Parte I desta tese, item 3.1.5.3.

4.1.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram conduzidas conforme descrito na Parte I desta tese, item 3.1.6.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Análises fitoquímicas dos extratos

O extrato ET apresentou menor conteúdo de piperina determinado por CLAE ($32,12 \pm 0,11$ mg/g) (Tabela 3). Enquanto que as análises dos extratos supercríticos realizadas por CLAE mostraram que o maior conteúdo de piperina foi encontrado no extrato obtido a 200 bar (ESC200) ($60,35 \pm 0,14$ mg/g) que foi aproximadamente 1,9 vezes maior comparativamente ao extrato ET e em relação aos demais extratos (Tabela 3). O extrato supercrítico obtido a 150 bar apresentou o menor conteúdo de piperina ($33,98 \pm 0,40$ mg/g) e, por esta razão, não foi selecionado para as análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas (CG/EM). Por esta razão ESC150 também não foi empregado nos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Nas análises por CG/EM do extrato supercrítico realizado a 200 bar (ESC200) favoreceu a solubilização e extração de sesquiterpenos e apresentou a menor relação entre monoterpenos e sesquiterpenos (0,011), um indicativo da melhor qualidade deste extrato (SALZER; FURIA. 1977) (Tabela 3). Enquanto os extratos ET, ESC300 e ESC200+EtOH apresentaram respectivamente os valores 0,020; 0,363 e 0,021 para a relação entre monoterpenos/sesquiterpenos.

Orav et al. (2004) analisaram o óleo de *Piper nigrum* onde os monoterpenos (50-74 %) e sesquiterpenos (20-35 %) foram os principais constituintes do extrato obtido de pimenta preta submetida a secagem com ar seguida de extração e destilação simultâneas empregando como solvente o n-hexano.

Considerando os compostos extraídos e apresentados na Tabela 3, pode-se ressaltar que alguns dos sesquiterpenos já foram previamente associados com atividade antitumoral observada *in vitro* e *in vivo*, tais

como o β -cariofileno e α -humuleno (PARISOTTO et al., 2012); o α -humuleno isoladamente (LEGAULT; PICHETTE, 2007) e o germacreno D (BAGHERI; MANAP; SOLATI, 2014).

Tabela 3 - Condições de extração, rendimento e características fitoquímicas do extrato etanólico (ET) e dos extratos supercríticos ESC200; ESC300 e ESC200+EtOH produzidos com pimenta preta preparada com frutos de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina

EXTRATO (Condições de extração)	CLAE Conteúdo Piperina (mg/g extrato)	CG/EM Conteúdo Cario- fileno Área (%)	CG/EM Abundância relativa <u>monoterpenos</u> e <u>sesquiterpenos</u> (%)	Razão monoterpeno/ sesquiterpenos
ET (Maceração em EtOH 93 %; Remoção solvente em baixa pressão 45 °C)	32,12 ± 0,11	23,95	<u>Ciclopentano, 2- metil-1-metilen- 3-(1-metiletenil)</u> (0,71) β -Cariofileno (23,95) α -Copaeno (4,38) β -Bisabolene (3,7) δ -Cadineno (2,18) Germacreno D (0,6) α -Muuroлено (0,5)	0,020
ESC 150 (scCO ₂ 150 bar 40 °C)	33,98 ± 0,40	n.d.	n.d.	<u>n.d.</u>
ESC200 (scCO ₂ 200 bar 40 °C)	60,35 ± 0,14	20,06	<u>γ-Cis- sesquiciclogeraniol</u> (0,17) β -Cariofileno (23,95) β -Cadineno (5,45) β -Copaeno (4,72) α -Himachaleno (3,16) α -Humuleno (1,29) α -Muuroлено (0,32)	0,011

ESC300 (scCO ₂ 300 bar 40 °C)	43,86 ± 0,09	Não detectado	<u>Neo-cloveno</u> (1,88) Copaeno (5,18)	0,363
SFE200 + EtOH (scCO ₂ cossolvente Etanol 7,5 % 200 bar 40 °C)	49,24 ± 0,02	45,27	<u>D-Limoneno</u> (1,33) β-Cariofileno (45,27) α-Copaeno (8,98) β-Bisaboleno (6,09) Cubedol (1,46) Germacreno D (1,41)	0,021

Nota: n.d., não determinado.

(Fonte: o autor)

As condições de extração visaram garantir o maior contato entre o leite de extração formado pelo substrato sólido (pimenta preta seca e moída) e o fluido supercrítico aumentando a solubilidade e seletividade do processo (FERREIRA; MEIRELES, 2002). Buscando-se aumentar o rendimento na extração de piperina e de compostos mais polares foi escolhida a pressão de 200 bar com a adição de cossolvente etanol (7,5 %; v/v) para produzir uma série de extrações obtendo-se o extrato ESC200+EtOH. Desta forma, o aumento da solubilidade e da seletividade do solvente mantido no estado supercrítico propiciou uma maior taxa de transferência de massa (*mass transfer rate*) que resultou em um maior rendimento no caso do extrato supercrítico produzido a 200 bar e obtido com a adição de cossolvente (ESC200+ EtOH) ($4,3 \pm 0,01$ %) em relação ao extrato ESC200 ($2,7 \pm 0,40$ %) que foi produzido sem etanol e mantendo esta pressão do solvente (200 bar).

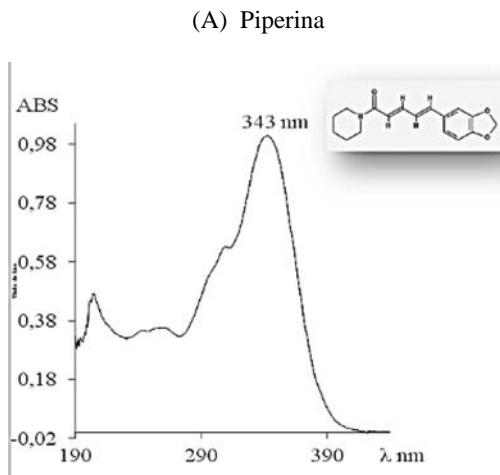
A polaridade do etanol pode aumentar a extração de compostos mais polares através da formação de pontes entre o dióxido de carbono supercrítico e os compostos presentes na matriz vegetal (REYES et al., 2016). De fato, ESC200+EtOH apresentou um rendimento 1,6 vezes maior comparativamente ao ESC200 que também foi preparado com 200 bar (Tabela 3). No entanto, a adição de etanol como cossolvente não elevou o conteúdo de piperina ou de compostos mais polares.

O poder de solvatação seletivo do fluido supercrítico permite separar um componente específico de uma mistura de multicomponentes. Isto acontece porque pequenas alterações na pressão ou na temperatura próximas ao ponto crítico, podem modificar aumentando

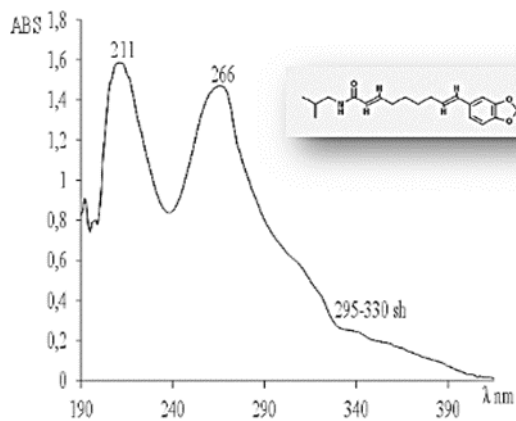
significativamente a densidade e, como consequência, o poder solubilizante do fluido supercrítico tornando-o mais seletivo (BLEICH; MÜLLER; WABMUS, 1993; MENDES; PESSOA; ULLER, 2002).

O comprimento de onda (λ_{\max}) para piperina (343 nm/ MeOH: 205, 244, 260, 298 sh, 309, 343) (Figura 33 A) e para retrofractamida C com UV λ_{\max} (266 nm/ MeOH: 211; 266) (Figura 33 B) foram obtidos de bandas dos extratos formadas em placas de cromatografia em camada delgada semi-preparativa ($R_f = 0,50$ e $R_f = 0,30$) foram removidas e solubilizadas com metanol para efetuar leituras de absorvância a UV (Figura 33 C).

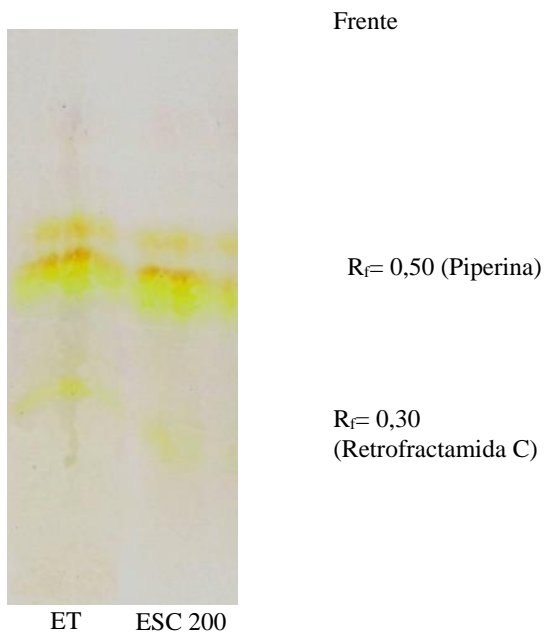
Figura 33 - Determinações por espectrofotometria UV-vis confirmando a presença de piperina e retrofractamida C nos extratos de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina)



(B) Retrofractamida C



(C) Imagem representativa de CCD



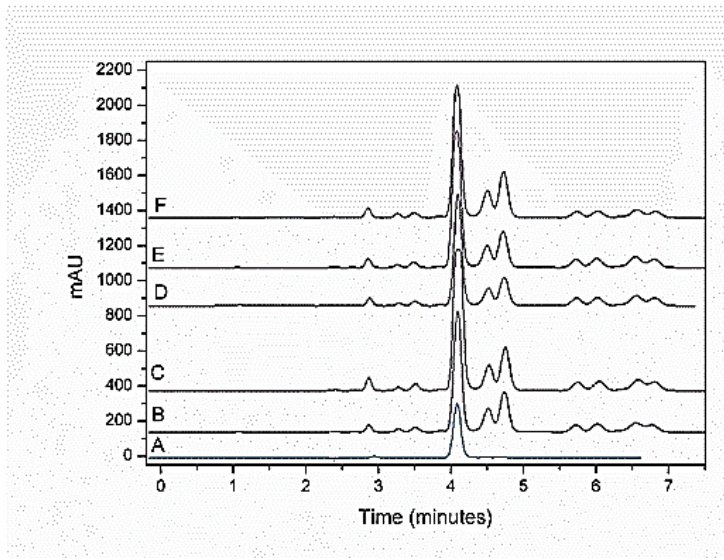
(Fonte: o autor)

As análises realizadas por CLAE com os extratos de pimenta preta preparada com frutos verdes de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina (ET; ESC200; ESC300 e ESC200+EtOH) encontram-se na Figura 34. A concentração relativa de piperina encontrada no extrato ET e nos extratos supercríticos foi consistente com aquelas reportadas na literatura (PARMAR et al., 1997; SCOTT et al., 2005).

Semler e Gross (1988) avaliaram por CLAE a distribuição de piperina em extrato etanólico obtido a partir de distintas partes de *Piper nigrum* e observaram que o conteúdo de piperina foi menor em folhas maduras (0,0007 mg/g de peso seco); em folhas jovens (0,0049 mg/g de peso seco); em raízes (0,32 mg/g de peso seco); em brotos jovens (0,070 mg/g de peso seco). Estes autores encontraram valores maiores de piperina nos frutos de *Piper nigrum* comercializados na forma de pimenta preta de melhor qualidade (42,0 e 17,3 mg/g de peso seco) e de menor qualidade (2,88 mg/g de peso seco) do que em frutos comercializados na forma de pimenta branca (2,25 mg/g de peso seco).

Os resultados das análises por CG/EM encontram-se nas Tabelas 4 até 8. Na Tabela 4 foram apresentados os cromatogramas dos extratos analisados, ou seja, o extrato convencional (ET) e os extratos supercríticos (ESC200; ESC300 e ESC200+EtOH). Na Tabela 5 referente ao ET; Tabela 6 referente ao ESC200; Tabela 7 referente ao ESC300 e na Tabela 8 referente ao ESC200+EtOH, foram apresentados os dados relativos ao número de picos; o tempo de retenção; a área relativa (%); o nome do composto identificado na biblioteca de dados NIST (identificação na biblioteca; *Library/ ID*); a referência e o seu número junto ao CAS para cada um dos extratos mencionados.

Figura 34 - Cromatogramas representativos e resultados de análise efetuada por CLAE do conteúdo de piperina em extratos de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina)



Piperina

Extrato	(%)	mg/g extract
ET	32,12 ± 0,11	321,22 ± 1,05
ESC150	33,98 ± 0,40	339,83 ± 3,97
ESC200	60,35 ± 0,14	603,50 ± 1,44
ESC300	49,24 ± 0,02	492,43 ± 0,18
ESC200+EtOH	43,86 ± 0,09	438,64 ± 0,87

Nota: piperina padrão (A); ET (B); ESC150 (C); ESC200 (D); ESC300 (E); ESC200+EtOH (F).

(Fonte: o autor)

Foi identificado um alcaloide no extrato ESC300 (Tabela 7). Este alcaloide pode ser considerado como um alcaloide tipo imidazólico por apresentar o grupo imidazol e ter sido denominado na NIST como *imidazole, 1-(1-dimethylamino pyrrolidine-2,5-dione-3-yl)-* CAS# 339302-34-0. Esta denominação pode ser traduzida como imidazol, 1-(1-dimetilamino pirrolidina-2,5-diona-3-il).

Alcaloides imidazólicos contendo grupos imidazol e pirrolidina podem apresentar atividade antitumoral. Estudo realizado *in vitro* e *in*

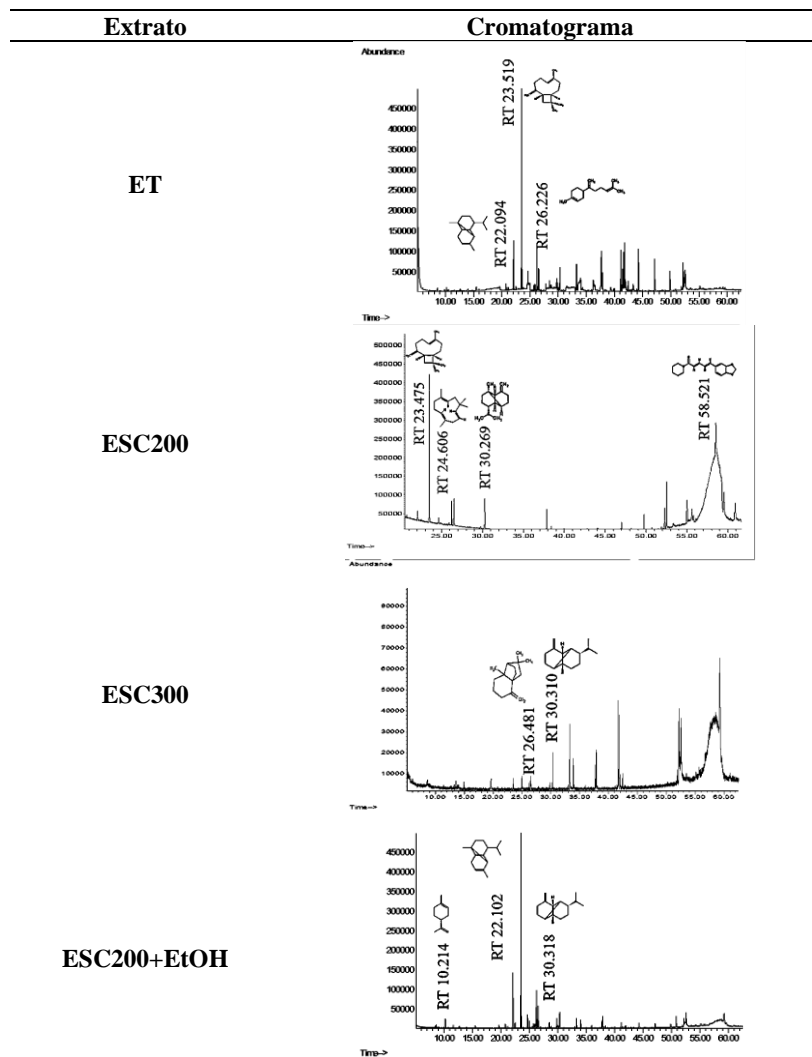
silico demonstrou que compostos imidazólicos de baixo peso molecular podem atuar como inibidores de receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR - *Platelet Derived Growth Factor Receptor*) que possui importante papel na angiogênese e no crescimento de tumores (HICKEN et al., 2014). Este receptor pode ser considerado como um alvo para o tratamento de tumores malignos (BOARD; JAYSON, 2005). Pois, a ativação destes receptores foi relatada para glioma e tumores gastrointestinais (WONG; MANGWANA, 2007; RAICA; CIMPEAN, 2010).

Por outro lado, estudo *in vitro* realizado por Wu (1965) mostrou que imidazol estimulou a glicólise aeróbica em células do tumor ascítico de Ehrlich.

Para o extrato ESC200+EtOH (Tabela 8) a adição do cossolvente (7,5 %) favoreceu a solubilização e praticamente duplicou o conteúdo de β -cariofileno (45,27 %) comparativamente ao percentual extraído por maceração convencional (23,95 %) (Tabela 5). Demonstrando que na pressão de 200 bar em temperatura constante (40 °C) ao ser adicionado etanol, que possui caráter mais polar, propiciou uma maior solubilidade e seletividade para este sesquiterpeno com caráter mais polar (FERREIRA, MEIRELES, 2002).

Assim, o aumento da extração de β -cariofileno poderia ser atribuído ao efeito combinado do solvente etanol (7,5 %) com a elevação da pressão. Pois, o aumento da pressão determina um aumento da densidade do solvente supercrítico (dióxido de carbono) e da capacidade de solubilização deste solvente (MICHIELIN et al., 2009). Assim, o aumento de pressão combinado com a adição de solvente orgânico aumentou a solubilização e extração deste composto comparativamente à extração etanólica que foi capaz de extrair cerca de 1,9 vezes menos β -cariofileno dos frutos de *P. nigrum* cultivar Bragantina.

Tabela 4 - Cromatogramas representativos de análise efetuada por CG-EM dos extratos de pimenta preta preparada com pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina)



(Fonte: o autor)

Por outro lado, no extrato convencional (ET) (Tabela 5) foram identificados através de CG-EM alguns sesquiterpenos como o β -cariofileno (23,95 %); copaeno (4,38 %); β -bisaboleno (3,7 %); germacreno - D (0,6 %) e α -muuroloeno (0,5 %).

Liu; Song e Hu (2007) observaram a presença de β -cariofileno (23,49 %) e D-limoneno (18,68 %) em óleo essencial obtido de frutos de *Piper nigrum* através de extração assistida por micro-ondas, em meio aquoso.

Tabela 5 - Áreas relativas obtidas por análise de CG/EM para os compostos presentes no extrato produzido por maceração em etanol (ET) empregando pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina)

Pico #	Tempo de Retenção	Area %	Identificação na Biblioteca	Ref #	CAS #
1	20,740	0,71	Ciclopentano, 2-metil-1-metileno-3-(1-metiletenil)-	15906	056710-83-9
2	22,094	4,38	Copaeno (α -Copaeno)	64252	003856-25-5
3	23,519	23,95	Cariofileno	64272	000087-44-5
4	25,884	0,75	Ciclohexano, 6-etenil-6-metil-1-(1-metiletil)-3-(1-metiletilideno)-, (S)-	64491	005951-67-7
5	25,955	0,51	α -Muuroloeno	64335	031983-22-9
6	26,226	3,70	β -Bisaboleno	64331	000495-61-4
7	26,481	0,60	1,6-Ciclododecadieno, 1-metil-5-metileno-8-(1-metiletil)-, [S-(E,E	64463	023986-74-5
8	26,544	2,18	δ -Cadineno (sinonímia Naftaleno, 1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-,(1S-cis)-)	64485	000483-76-1
9	27,810	0,87	1,3:2,4-O-Dibenzilideno-d-glicose	18780	1000127-05-6
10	28,479	0,72	N-Metiladrenalina, tri-TMS	21679	1000071-8 72-1

Nota: número do pico no cromatograma (Pico #). Número de referência na Biblioteca NIST (Ref #). Número do composto no *Chemical Abstract Service* (CAS#)

(Fonte: o autor)

Para Fagen, Kolen e Hussong (1955) a piperina poderia ser encontrada apenas na porção não volátil (óleo-resina) de *Piper nigrum* e, ainda assim, este composto secundário foi identificado no ESC200 e no ESC200+EtOH, através das análises de CG/EM que permitem observar predominantemente os compostos voláteis (Tabelas 6 e 8).

Tabela 6 - Áreas relativas obtidas por análise de CG/EM para os compostos presentes no extrato supercrítico obtido a 200 bar (ESC200) empregando pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina)

Pico #	Tempo de Retenção	Área %	Identificação na Biblioteca	Ref #	CAS #
1	23,475	20,06	Cariofileno	64272	000087-44-5
2	24,606	1,29	α -Humuleno	-	6753-98-6
3	25,642	0,17	Gama-cis-sesquiciclogeraniol 1-Metileno-2b-hidroximetil-3,3-dimetil-4b-(3-metilbut-2-enil)-ciclohexano	-	-
4	25,906	0,32	α -Muuroleno	64335	031983-22-9
5	26,186	3,16	α -Himachaleno	-	3853-83-6
6	26,499	5,45	(-)- β -Cadineno	-	523-47-7
7	30,269	4,72	β -Copaeno	-	18252-44-3
8	37,829	3,46	5-Isopropil-2,8-dimetil-9-oxatriciclo[4.4.0.0(2,8)]decan-7-ona	-	-
9	38,402	0,67	Ácido n-Hexadecanoico (ácido palmítico)	-	57-10-3
10	39,948	0,32	14-Heptadecenal	-	-
11	51,842	0,51	Benzo[b]ciclopenta[e]pirano-3-carboxaldeído, 1,2-dihidro-	-	-
12	52,285	3,36	Pirocatecol (1,2 benzenodiol)	-	120-80-9
13	58,521	55,07	Piperina	13195 2	000094-62-2

Nota: número do pico no cromatograma (Pico #). Número de referência na Biblioteca NIST (Ref #). Número do composto no *Chemical Abstract Service* (CAS#)

(Fonte: o autor)

Tabela 7 - Resultados obtidos através de CG/EM para o extrato supercrítico obtido a 300 bar (ESC300) empregando pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina)

Pico #	Tempo de Retenção	Area %	Identificação na Biblioteca	Ref #	CAS #
1	13,542	1,07	2H-Piran-2-ona, tetrahydro-4,4,6-trimetil-	19831	010603-06-2
2	14,952	1,18	Homoserina	9023	000498-19-1
3	23,519	1,46	Ácido 9, 12-octadecadienoico, metil éster (Ácido linoleico, metil éster)	136387	1000333-56-4
4	26,481	1,88	β -Neocloveno	64323	056684-96-9
5	30,310	5,18	α -Copaeno	64250	003856-25-5
6	37,667	3,04	Ácido hexadecanoico, metil éster (Ácido palmítico, metil éster)	119407	000112-39-0
7	37,866	6,24	Fenol, 2,6-dimetil-4-nitroso	24892	013331-93-6
8	38,105	0,19	Imidazol, 1-(1-dimetilaminpirrolidina-2,5-diona-3-il)-	68247	339302-34-0
9	41,648	11,59	Ácido 9,12-Octadecadienoico (Z,Z)-, metil éster (Ácido linoleico, metil éster)	139727	000112-63-0
10	41,815	11,43	Ácido 10-octadecadienoico, metil éster	141285	013481-95-3
11	41,999	2,07	3,5-Etanoquinolin-10-ona, decahidro-1,7-dimetil-,3R(3.alfa.,4a.beta.,5.alfa.,7.beta.,8a.beta.)	66972	021041-42-9
12	42,436	2,20	Ácido undecanoico, metil éster	61163	001731-86-8

Nota: número do pico no cromatograma (Pico #). Número de referência na Biblioteca NIST (Ref #). Número do composto no *Chemical Abstract Service* (CAS#)

(Fonte: o autor)

Tabela 8 - Áreas relativas em análise de CG/EM para os compostos presentes no extrato supercrítico ESC200+EtOH obtido a 200 bar com cossolvente etanol (7,5 %; v/v) produzido com pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina)

Pk#	Tempo Retenção	Area [%]	Identificação na Biblioteca	Ref#	CAS#
1	10,214	1,33	D-Limoneno	15682	005989-27-5
2	20,756	0,68	Biciclo[3.1.0] hexano, 6-isopropilideno-1-metil-	15884	024524-57-0
3	22,102	8,98	α -Copaeno	64283	1000360-33-0
4	22,500	1,41	1,6-Ciclododecadieno, 1-metil-5-metileno-8-(1-metiletil)-,[s-(E)]	64463	023986-74-5
5	23,535	45,2	Cariofileno	64272	000087-44-5
6	24,657	2,23	1,4,7, -Ciclundecatieno, 1,5,9,9-tetrametil-, Z,Z,Z-	64408	1000062-61-9
7	25,700	0,71	α -Guaieno	64292	003691-12-1
8	25,907	0,67	Naftaleno, decahidro-4a-metil-metileno-7-(1-metiletilideno), (4aR-trans)-	64497	000515-17-3
9	25,963	0,59	<i>Allo</i> -aromadendreno	64334	025246-27-9
10	26,242	6,09	β -bisaboleno	64331	000495-61-4
11	26,489	1,46	Cubedol	79374	1000374-15-9
12	26,552	3,53	Naftaleno, 1,2,4a,5,8,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)ro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)]-	64533	000523-47-7
13	28,487	1,03	Biciclo[2.2.1] heptano, 2,2-dimetil-3-metileno-,(1r)-	15904	005794-03-6
14	30,318	2,79	Copaeno (α -copaeno)	64250	003856-25-5
15	33,280	1,83	2,4-Diamino-5H-indeno[1,2-d] pirimidina	59352	095140-64-0

16	37,874	2,43	Hexadecanamida, N-(6-hidroxi-9H-purin-2-il)	20705	021047-87-0
17	50,820	2,49	Ácido ftálico, di (2-propilpentiléster)	20770	1000377-93-5
18	52,182	2,45	2-Amino-9-fluorenona	57255	003096-57-9
19	52,556	2,53	3,4-Metilenodioxo-N,N-dietilbenzilamina	66848	063673-96-1
20	59,228	2,88	Piperina	13195	000094-2-62-2

Nota: número do pico no cromatograma (Pico #). Número de referência na Biblioteca NIST (Ref #). Número do composto no *Chemical Abstract Service* (CAS#)

(Fonte: o autor)

Orav et al. (2004) observaram concentrações muito baixas de β -bisaboleno (0,2 a 0,3 %) em óleo essencial obtido de frutos de pimenta preta.

Deve ser ressaltado que os terpenóides podem ser metabólitos primários e secundários que apresentam funções de proteção contra estresse abiótico como temperaturas elevadas (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2006; DUDAREVA et al., 2006).

A análise de CG/EM revelou também a presença de *allo*-aromadendreno no extrato ESC200+EtOH obtido a 200 bar. Os sesquiterpenos aromadendreno e *allo*-aromadendreno foram encontrados no óleo essencial de outras piperáceas nativas da Amazônia (DA SILVA et al., 2014). *Allo*-aromadendreno isolado de organismo marinho (*Sarcophyton glaucum*) induziu apoptose em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e de câncer de próstata (PC-3) em estudo *in vitro* realizado por Al-Lihaibi et al. (2014). Adicionalmente, Francisco et al. (2001) identificaram *allo*-aromadendreno (um estereoisômero do aromadendreno) no óleo de mirtácea (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn) obtido por extração supercrítica em pressões variando de 80 até 250 bar. A maior área encontrada para este sesquiterpeno foi obtida na pressão de 200 bar.

Surpreendentemente, o terpeno D-limoneno foi encontrado apenas no extrato ESC200+EtOH em pequena quantidade (1,33 %), este valor está dentro dos relatados na literatura. O percentual de D-limoneno para frutos secos de *Piper nigrum* foi descrito como entre 2 e 4 % (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 1993). Enquanto que Liu; Song e Hu (2007) encontraram um conteúdo relativo de 18,68 % para D-limoneno empregando pré-tratamento por

hidrodestilação de frutos de *P. nigrum*. Estes autores efetuaram um pré-tratamento do óleo empregando aquecimento por micro-ondas e destilação à seco (*microwave heating and dry distillation*).

O rendimento dos extratos supercríticos para alguns componentes de óleos voláteis pode ser maior comparativamente à extração com solventes mais polares. Atti-Santos et al. (2005) observaram que empregando extração supercrítica (90 bar; 60 °C; 30 min) conseguiram extrair 2,8 % a mais de D-limoneno e 46 % a mais de β -bisaboleno comparativamente aos valores obtidos no processo de extração com solvente mais polar.

Devido à sua lipofilicidade o D-limoneno acumula-se no tecido adiposo e nas glândulas mamárias (CROWELL et al., 1992). Por esta razão, foi empregado em estudo clínico em paciente com tumor de mama. Este tratamento levou à estabilização no crescimento tumoral. Porém, após 11 meses de tratamento este foi interrompido pois foram detectadas metástases nos ossos, ou seja, o câncer invadiu outros tecidos (VIGUSHIN et al., 1998).

Outro possível mecanismo de ação que pode explicar a atividade antitumoral do limoneno foi atribuído ao fato deste composto inibir a isoprenilação de algumas proteínas e, desta forma, contribuir para a redução do crescimento tumoral pois algumas proteínas preniladas regulam o crescimento celular e/ou a transformação tumoral (CROWELL, 1999).

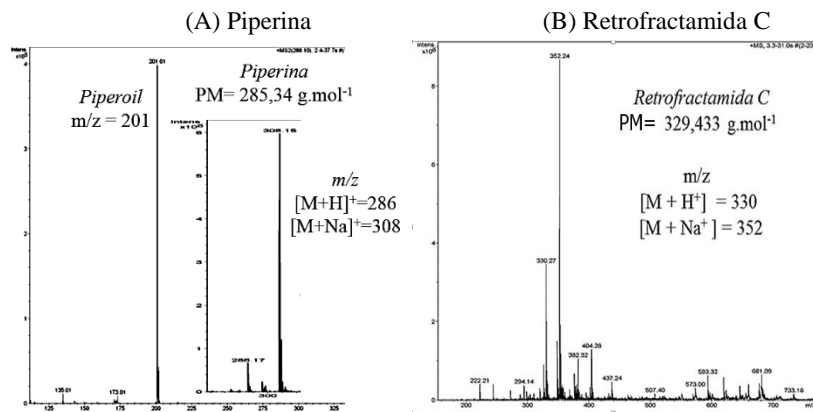
Nas análises por CG/EM do extrato ESC200 foi identificado pirocatecol (Tabela 6). Este composto pode atuar nas membranas na presença de metais (Cu^{2+} ; Fe^{3+}) onde o ciclo redox do catecol pode atuar como agente pró-oxidante promovendo a peroxidação de lipídios e causando danos às outras macromoléculas como DNA e proteínas (SCHWEIGERT; ZEHNDER; EGGEN, 2001). De fato, a geração de EROs intracelulares decorrente de oxidação enzimática de catecois que pode ocorrer também na presença de metais ou de oxigênio, formando-se ânion superóxido que poderá ser dismutado pela enzima SOD formando peróxido de hidrogênio e radical hidroxil, na presença de metais como cobre ou ferro (SCHWEIGERT; ZEHNDER; EGGEN, 2001).

Nas análises por CG/EM foi constatada a presença de piperina nos extratos ESC200 (Tabela 6) e no ESC200+EtOH (Tabela 8).

As análises realizadas por espectrometria de massas sequencial com espectrômetro de ionização por eletronebulização (*ESI-IT-MS/MS*) confirmaram a presença de piperina e de retrofractamida C nos extratos. Entre os fragmentogramas obtidos por *ESI-IT-MS/MS* operando no modo positivo foram identificados os fragmentos m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 308$ e

$[M+H]^+=286$ correspondentes à piperina (Figura 35 A), enquanto que os fragmentos m/z $[M + H]^+ = 330$ e $[M + Na^+] = 352$ confirmaram a presença de retrofractamida C (Figura 35 B).

Figura 35 - Fragmentogramas representativos de determinações em espectrômetro de ionização por eletronebulização (*ESI-IT-MS/MS*) de alcaloides piperina e retrofractamida C nos extratos ET; ESC 200; ESC300 e ESC200+EtOH obtidos de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina)



(Fonte: o autor)

Análises de CG/EM (Tabelas 4 a 8) possibilitaram a identificação de poucos monoterpenos e de alguns sesquiterpenos com maior conteúdo encontrados principalmente nos extratos ET e ESC200. As diferenças entre os componentes de óleos voláteis que tenham sido extraídos de plantas da mesma espécie podem ser decorrentes de resposta do vegetal às variações climáticas, sazonais e geográficas além de diferenças genéticas (LIU et al., 2010).

O sesquiterpenos tricíclicos copaeno ou α -copaeno (CAS# 3856-25-5) e β -copaeno (CAS: 18252-44-3) foram identificados nos extratos por CG-EM. A extração utilizando cossolvente (ESC200+EtOH) aumentou a extração do α -copaeno (8,98 %) (Tabela 8) em relação à extração com solvente etanólico convencional (ET) (4,38 %) (Tabela 5). Enquanto a extração realizada a 200 bar sem cossolvente foi obtida uma porcentagem um pouco maior de β -copaeno (4,72 %) (Tabela 6).

O extrato ESC300 (Tabela 7) apresentou D-limoneno (15,64 \pm 0,15 %); e os sesquiterpenos copaeno (3,84 \pm 0,17 %); β -bisaboleno (1,47 \pm 0,15 %); germacreno D (0,15 \pm 0,03 %) e β -cariofileno (25,38 \pm 0,62 %).

De fato, Ferreira, Meireles e Cabral (1993) empregando extração supercrítica (300 bar, 40 °C) de frutos de pimenta preta (*Piper nigrum* L.) constataram a presença de limoneno. Elevações na pressão do dióxido de carbono supercrítico determinam aumentos no poder de solvatação deste fluido supercrítico; como resultado do aumento de sua densidade que permite maior extração de determinados componentes bioativos (BAGHERI; MANAP; SOLATI, 2014).

Bagheri, Manap e Solati (2014) observaram que ao manterem dióxido de carbono sob condições de pressão (300 bar) e temperatura (40 °C) por um tempo de extração de 40 min, foi possível obter limoneno ($15,64 \pm 0,15$ %) e obter os sesquiterpenos β -cariofileno ($25,38 \pm 0,62$ %); copaeno ($3,84 \pm 0,17$ %); β -bisaboleno ($1,47 \pm 0,15$ %); germacreno D ($0,15 \pm 0,03$ %) a partir de sementes de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Kuching).

Por outro lado, através do índice de qualidade que mostra a relação monoterpenos/sesquiterpenos (SALZER; FURIA, 1977), ficou claro que os extratos com os menores valores também apresentaram a maiores capacidades de inibição do crescimento de células MCF-7 *in vitro* e de inibição do crescimento tumoral *in vivo* de células de TAE implantadas nos camundongos. Tal inibição elevou o tempo de sobrevivência após o término do tratamento dos animais que receberam o extrato supercrítico produzido a 200 bar (ESC; 10 mg/kg/dia), em relação ao controle tratado apenas com salina contendo Tween 80 (1 %).

De fato, em estudo realizado por Sruthi e colaboradores (2013) sobre o perfil do óleo essencial extraído de frutos secos de pimenta preta da *Piper nigrum* L. cultivar Panniyur-1 revelou diferenças entre os componentes do óleo essencial entre plantas desta variedade que são cultivadas em diferentes altitudes e expostas a climas semelhantes.

Sruthi et al. (2013) empregaram hidrodestilação para obterem o óleo essencial dos frutos de *P. nigrum* L. cultivar Panniyur-1 cultivadas em regiões de clima tropical úmido em altitude de 45 m ($11^{\circ}17'35,16''$ N; $75^{\circ}49'10,2''$ L) e em altitude de 10,7 m ($12^{\circ}12'5,97''$ N; $75^{\circ}9'48,51''$ L). Estes autores observaram em plantas cultivadas a 10 m de altitude um conteúdo de piperina (4,49 %) que foi 1,6 vezes maior comparativamente ao encontrado na maior altitude (2,76 %). Embora estes autores não tenham encontrado diferenças estatísticas no conteúdo de terpenos entre os óleos volatéis dos frutos secos de *Piper nigrum* cultivados nas duas altitudes. Na maior altitude (45 m) entre os terpenóides estes autores encontraram o D-limoneno (5,99 %) e os sesquiterpenos β -cariofileno (21,9 %); α -copaeno (5,51 %); β -bisaboleno (7,8 %); germacreno D (0,42 %) e α -muuroleno (0,12 %). Enquanto que para a menor altitude (10,7 m)

o óleo obtido dos frutos secos apresentou 15,13 % de D-limoneno; e os sesquiterpenos β -cariofileno (21,41 %); α -copaeno (4,75 %); β -bisaboleno (6,49 %) e α -muuroleno (0,17 %) (SRUTHI et al.; 2013).

Todos estes compostos também foram encontrados nos extratos supercríticos obtidos de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina com plantas cultivadas à 26 m de altitude e dentro de coordenadas geográficas referentes ao clima tropical úmido. Porém, a extração supercrítica aumentou a extração de piperina que foi maior no ESC200. Além disto, no extrato ESC200+EtOH a área relativa de β -cariofileno (45,27 %) foi a maior comparativamente aos demais extratos. Comparativamente aos valores obtidos por Sruthi e colaboradores (2013) para a cultivar Panniyur-1, foram percebidas algumas similaridades entre a composição fitoquímica destas duas cultivares de *P. nigrum*.

Adicionalmente, no extrato ET foi identificado um composto denominado como *naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl) 1S-cis* - (CAS# 483-76-1). Este nome foi utilizado como palavra de busca na base de dados FooDB que denominou este composto como (+) (10),4-Cadinadiene com o mesmo número (CAS# 483-76-1). Por sua vez, as sinonímias deste último composto foram denominadas como δ -cadinene ou *Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)(1S,8aR)* - (FOODB, 2015).

Liu; Song e Hu (2007) encontraram *cadina-1-4-diene* quando estudaram a composição do óleo essencial extraído por hidrodestilação de frutos de *Piper nigrum*. Para tanto, estes autores efetuaram um pré-tratamento do óleo antes das análises por CG/EM. Nestes pré-tratamentos foram empregadas as técnicas de microextração em fase-sólida por *headspace (solid-phase)* e de destilação por micro-ondas antes de injetar a amostra em CG-EM.

4.2.3 Efeito citotóxico dos extratos de *Piper nigrum*

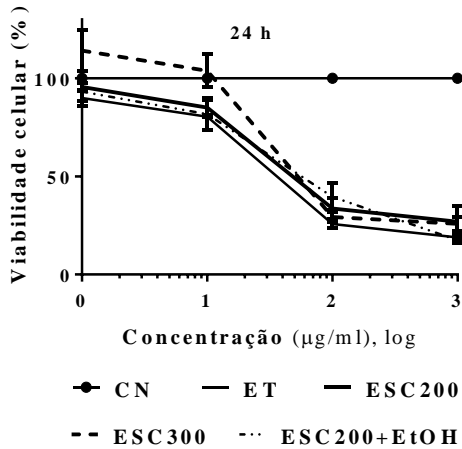
Avaliação da citotoxicidade dos extratos de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina demonstrou a maior toxicidade o extrato ESC200 (Figura 36). O tratamento com ESC200 por 24 h resultou no menor valor de concentração efetiva ($CE_{50} = 21,3 \pm 5,6 \mu\text{g/ml}$) comparativamente ao valor obtido para células tratadas com ET ($CE_{50} 29,4 \pm 3,6 \mu\text{g/ml}$) e tratadas com ESC300 ($CE_{50} = 27,8 \pm 7,1 \mu\text{g/ml}$). Enquanto o extrato ESC200+EtOH causou menor citotoxicidade para estas células ($CE_{50} = 47,7 \pm 3,4 \mu\text{g/ml}$) comparativamente aos demais tratamentos.

Figura 36 - Citotoxicidade dos extratos de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina) sobre células MCF-7 após tratamento por 24 e 72 horas

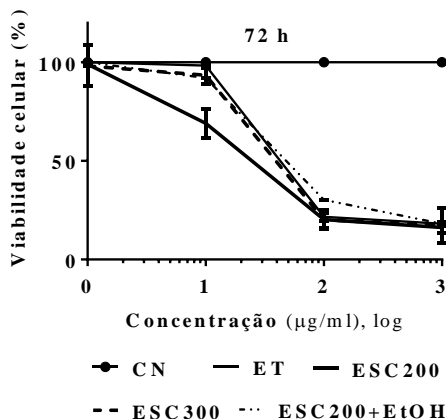
(A) Citotoxicidade em termos de CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)

Tratamento (h)	Extratos			
	ET	ESC200	ESC300	ESC200+EtOH
24	$29,4 \pm 3,6$	$21,3 \pm 5,6$	$27,8 \pm 7,1$	$47,7 \pm 3,4$
72	$32,7 \pm 7,0$	$14,4 \pm 3,3$	$30,5 \pm 7,7$	$34,9 \pm 3,7$

(B) Viabilidade celular (24 h)



(C) Viabilidade celular (72 h)



Nota: Densidade de 10^4 células/ml por poço. Concentrações dos extratos ($1 - 1000$ µg/ml; apresentadas na forma logarítmica). Concentração Efetiva Citotóxica (CE_{50}) (Ensaio MTT). Extrato etanólico (ET). Extratos supercríticos obtidos a 200 bar (ESC200), a 300 bar (ESC300) e a 200 bar com adição de cossolvente (etanol; 7,5 %) (ESC200+EtOH). Resultados decorrentes de três experimentos independentes.
(Fonte: o autor)

No extrato ESC300 foram encontrados alguns ácidos graxos insaturados, ou seja, o ácido 9, 12-octadecadienoico, metil éster (ácido linoleico, metil éster; insaturado) e o ácido 9,12-octadecadienoico (Z,Z), metil éster (ácido linoleico, metil éster; insaturado) (Tabela 7),

Deve ser lembrado que incorporação de ácidos graxos insaturados na membrana celular pode facilitar o processo de iniciação da cadeia de peroxidação lipídica devido à ação de radicais livres (LIMA; ABDALLA, 2001). O favorecimento da propagação de danos oxidativos pode ocorrer em ácidos graxos insaturados como o ácido linoleico, que possui duas duplas ligações. Pois, os ácidos graxos com mais de uma insaturação apresentam maior número de grupos metilênicos ($-CH_2-$) que são mais susceptíveis à oxidação (LIMA; ABDALLA, 2001).

Foi observado efeito inibidor *in vitro* do ácido linoleico sobre células MCF-7 (SHULTZ; CHEW; SEAMAN, 1992).

Assim, a presença do ácido linolênico no extrato ESC300 pode explicar a citotoxicidade observada em células MCF-7 tratadas com este extrato. No entanto, este efeito foi menor comparativamente ao ESC200,

especialmente após 72 h de tratamento. Neste caso, a presença do alcaloide imidazol, 1-(1-dimetilamino pirrolidina-2,5-diona-3-il) no ESC300 pode ter contribuído parcialmente na resistência das células MCF-7. Pois, estudo realizado *in vitro* com células do TAE mostrou que na presença de imidazol ocorreu um aumento da glicólise em condições aeróbicas (WU, 1965).

Adicionalmente, o aumento da CE_{50} observado nas células tratadas por 72 com ESC300 poderia ser devido ao fato de que foram encontrados no ESC300 os ácidos graxos saturados ácido palmítico, metil éster (3,04 %) e o ácido undecanoico, metil éster (2,20 %) (Tabela 7). Por outro lado, o ESC200 apresentou uma percentagem bem menor de ácido palmítico (0,67 %; Tabela 6) que não interferiu na CE_{50} deste extrato que apresentou o menor valor em relação aos demais tratamentos.

Entre os ácidos graxos saturados encontrados em frutos de *Piper nigrum* por Hossain et al. (2014) destacou-se o ácido palmítico com 12,24 %.

O desenvolvimento e a progressão do câncer tem sido com certa frequência associados ao aumento de lipogênese *de novo*, ou seja, aumento da síntese *de novo* de ácidos graxos saturados em células tumorais após captação de lipídios do meio (RYSMAN et al., 2010). Assim, por intermédio da lipogênese *de novo* podem ocorrer alterações nas propriedades das membranas tumorais que sejam favoráveis ao crescimento tumoral por determinarem a proteção destas células contra insultos endógenos ou exógenos (RYSMAN et al., 2010). De fato, o aumento de ácidos graxos saturados na membrana foi associado com maior resistência ao ataque de radicais livres (RYSMAN et al., 2010).

No entanto, após 72 de tratamento com o extrato ESC200, foi observada uma drástica redução no valor de CE_{50} ($14,4 \pm 3,3 \mu\text{g/ml}$) (Figura 36) quando comparado aos valores dos demais tratamentos. Isto pode ter ocorrido devido à reatividade da piperina que pode aumentar a geração de EROs intracelulares (LEE et al., 2008; FOFARIA et al., 2014).

Adicionalmente, a presença de duplas ligações nos grupos dienamidas conjugadas nas moléculas de piperina foi relacionada com sua maior reatividade em comparação com a molécula de retrofracamida C que possui apenas uma dupla ligação na cadeia lateral (LEE et al., 2008). Além disto, foi observado que a atividade de inibição da adesão celular foi maior para as piperamidas que apresentam maior número de duplas ligações conjugadas além de que a presença de grupo piperidina modulou positivamente elevando a atividade inibitória destes compostos comparativamente às pimeramidas que apresentaram o grupo isobutila (LEE et al., 2008).

Portanto, a presença simultânea de piperina, retrofractamida C e dos sesquiterpenos (β -cariofileno e α -humuleno) no extrato ESC (produzido a 200 bar) provavelmente contribuiu para aumentar a citotoxicidade observada devido ao sinergismo entre estes compostos (BIAVATTI, 2009). Além de que a piperina pode ter aumentado a biodisponibilidade de compostos com atividade antitumoral de maneira sinérgica (BIAVATTI, 2009; PFUND et al., 2015).

Neste sentido, estudo realizado por Legault e Pichette (2007) empregando etanol (0,5 %; v/v) como solvente de sesquiterpenos foi constatado sinergismo entre β -cariofileno com o paclitaxel (um diterpeno) e também o sinergismo com os sesquiterpenos α -humuleno e isocariofileno. Segundo estes autores, o β -cariofileno isoladamente não inibiu o crescimento da linhagem tumoral MCF-7 em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, a associação do quimioterápico paclitaxel (taxol) (0,025 μ g/ml) com o β -cariofileno (10 μ g/ml) demonstrou um efeito potencializador da atividade antitumoral do quimioterápico.

A apoptose de células das glândulas mamárias tem sido estudada de maneira a fornecer mais informações sobre o papel deste tipo de morte na evolução do câncer de mama comparativamente aos tecidos normais. Neste sentido, Motyl et al. (2006) verificaram que a apoptose ocorre normalmente durante as fases de maturação das glândulas mamárias normais. Estes autores empregaram a linhagem tumoral de câncer de mama (MCF-7) para avaliar o efeito pró-apoptótico de camptotecina. A camptotecina é um alcaloide quinolínic que atua inibindo o reparo do DNA pelas topoisomerasas o que pode resultar em morte celular por apoptose (BARINAGA, 1998; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

Deve ser destacado que esta linhagem celular tem sido também empregada em estudos para a avaliação *in vitro* da atividade antitumoral de extratos de plantas e de suas frações, bem como de compostos sintéticos e fármacos de maneira isolada ou combinada (FELIPE et al., 2014; OURIQUE et al., 2015).

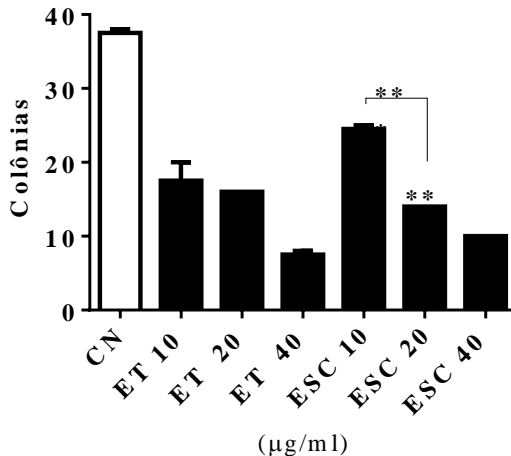
Legault e Pichette (2007) também verificaram que o isocariofileno (32 μ g/ml) isoladamente causou 69 % de citotoxicidade para MCF-7 enquanto que a associação nesta mesma concentração com o β -cariofileno (10 μ g/ml) elevou a citotoxicidade para 90 %.

Assim, com base nos resultados de citotoxicidade os extratos ET e ESC200 (produzido a 200 bar) foram selecionados para a continuidade dos ensaios *in vitro*. Para tanto, este extrato supercrítico (ESC200) recebeu nova denominação sendo identificado como ESC.

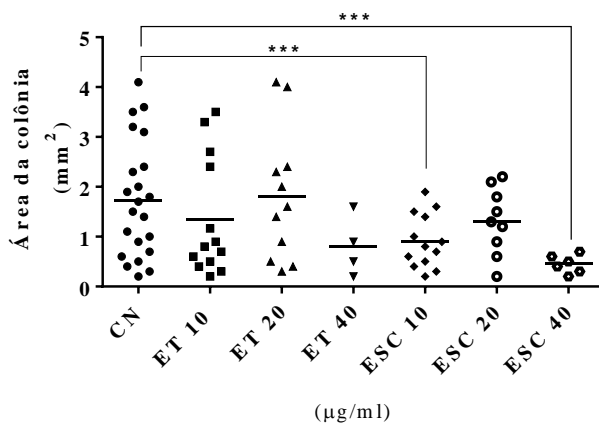
Considerando os valores de CE_{50} obtidos nos ensaios de citotoxicidade (Figura 36), foram realizados tratamentos com ET e com ESC nas concentrações de 10, 20 ou 40 $\mu\text{g/ml}$ que foram capazes de causar inibição na proliferação clonogênica de células MCF-7 de maneira dose-dependente conforme apresentado na Figura 37 A. Estes resultados mostram que embora tenham sido observados menores números de colônias nos tratamentos realizados com ET, quando se observa os resultados apresentados na Figura 37 B/C pode-se perceber que as áreas destas colônias foram maiores comparativamente às áreas das colônias tratadas com ESC. De fato, nas concentrações testadas para ambos os extratos houve efeito citotóxico que resultou na diminuição do diâmetro das colônias. Esta diminuição foi notada principalmente para ESC (produzido a 200 bar) nas concentrações de 10 $\mu\text{g/ml}$ e de 40 $\mu\text{g/ml}$, nas quais observou-se área média em torno de 1,0 mm^2 e em torno de 0,5 mm^2 , respectivamente; ambas apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle negativo ($p < 0,001$) (Figura 37 B). As colônias podem ser visualizadas na Figura 37 C.

Figura 37 - Efeito antiproliferativo sobre células MCF-7 decorrentes do tratamento (24 h) com cada extrato de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina)

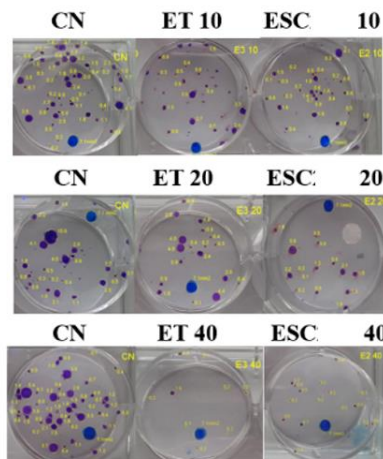
(A) Inibição da proliferação de clones



(B) Efeitos sobre o tamanho da área das colônias



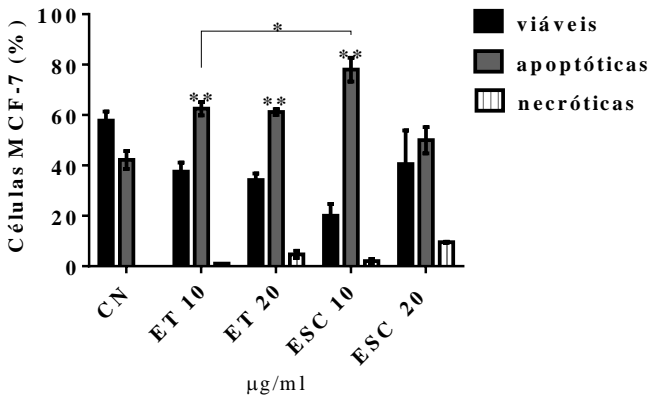
(C) Imagens representativas das áreas das colônias calculadas com programa ImageJ



Nota: Controle negativo (CN) (DMSO a 0,1 % em meio DMEM). Extratos (10; 20 ou 40 µg/ml). Extrato etanólico (ET). Extrato supercrítico produzido a 200 bar (ESC). Resultados de três experimentos independentes. Em (A) *** denota diferença significativa entre os tratamentos com ESC 10 e ESC 20; e de ESC 20 em relação ao CN, quando $p < 0,001$. Em (B) *** denota diferença significativa entre os tratamentos com ESC 10 e ESC 20, quando $p < 0,001$. (Fonte: o autor)

Adicionalmente, foram estudados os tipos de morte celular induzidos após os tratamentos de células MCF-7 com os extratos. Conforme apresentado na Figura 38 os tratamentos efetuados a 10 µg/ml com ET ou com ESC (produzido a 200 bar) determinaram aumentos do número de células em apoptose comparativamente ao CN ($p < 0,01$). Porém, os tratamentos com ESC (10 µg/ml) causaram um aumento mais significativo na morte por apoptose comparativamente aos tratamentos realizados com extrato ET (10 µg/ml) ($p < 0,05$). Todavia, nos tratamentos realizados na maior concentração (20 µg/ml) houve um aumento considerável no número de células em necrose. Necrose é um indicativo de elevada toxicidade (ROZENKRANZ; WINK, 2008). Assim, este resultado determinou a escolha da concentração capaz de induzir predominantemente apoptose para conduzir o próximo ensaio. Desta forma, ficou claro que o tratamento realizado com a menor concentração (10 µg/ml) do ESC produzido na pressão de 200 bar causou predominantemente apoptose nas células MCF-7.

Figura 38 - Tipo de morte induzido em células MCF-7 por tratamento (24 h) com extratos produzidos com pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina)



Nota: Controle negativo (CN) (meio DMEM; 0,1 % DMSO). Extrato etanólico (ET), extrato supercrítico 200 bar (ESC) (10 ou 20 µg/ml). Solução de brometo de etídio (5 µl; 100 µg/ml) e acrinidina laranja (5 µl; 100 µg/ml) (1:1; v/v). Suspensão celular na densidade de 5×10^6 células/ml. * e ** denotam diferenças significativas entre o ESC e ET, quando $p < 0,05$; e entre os extratos e o CN, quando $p < 0,01$.

(Fonte: o autor)

Deste modo, a extração supercrítica realizada a 200 bar (40 °C) com pimenta preta obtida de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina apresentou um potencial citotóxico e antiproliferativo importante. Todos os resultados obtidos *in vitro* sugerem que o conteúdo de piperina, β -cariofileno e α -humuleno poderiam estar associados com a toxicidade sobre MCF-7. Assim como, podem ter contribuído para a inibição da proliferação clonogênica e para a diminuição da área das colônias provavelmente devido à indução de apoptose. Possivelmente, deve ter ocorrido um efeito de sinergismo entre estes compostos.

No ensaio clonogênico as células apresentam homogeneidade pois devem ser plaqueadas apenas 500 células que são clones. Após serem expostos ao tratamento muitos clones morrem e os que sobrevivem apresentam maior semelhança entre si pois passam por uma seleção causada pelos compostos citotóxicos presentes nos extratos. Neste sentido, o ensaio clonogênico realizado com tratamento por apenas 24 h empregando células MCF-7 permite observar os efeitos sobre células que foram mantidas por um período de recuperação de vinte dias. Neste tempo de tratamento poucos clones conseguiram superar o estresse oxidativo causado pelos compostos presentes nos extratos. Assim, durante o período de recuperação os clones que sobreviveram puderam proliferar formando as colônias que foram visualizadas à olho nú.

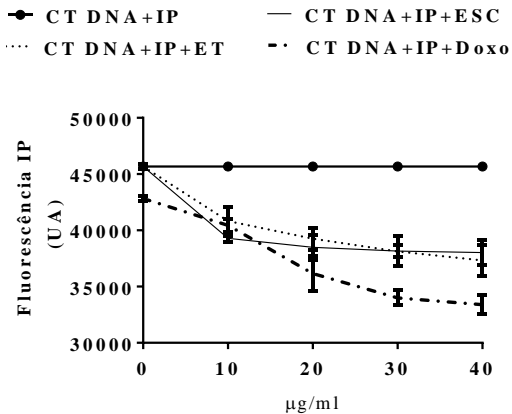
Seria possível considerar que os resultados deste ensaio poderiam simular uma determinada população contendo um pequeno aglomerado de células tumorais detectado em tecido saudável e que possa ser considerado similar ao que ocorre no caso de micrometástases. De acordo com Pantel et al. (1999), um pequeno aglomerado de células tumorais que possa ser detectado na medula óssea pode ser considerado como uma micrometástase. Sabe-se que a inibição da proliferação de micrometástases pode ser considerada uma excelente abordagem para o tratamento de câncer (HURST et al., 2016). Assim, estes resultados obtidos com o ESC podem apontar para um bom potencial como agente adjuvante no tratamento do câncer.

4.2.4 Ensaios de interação *in vitro* dos extratos com o CT DNA

Investigações sobre os mecanismos associados ao efeito citotóxico revelaram interações entre o CT DNA e os compostos presentes nos extratos obtidos de frutos verdes de *P. nigrum* L. cultivar Bragantina. Os resultados da exposição *in vitro* de CT DNA a diferentes concentrações dos extratos encontram-se representados na Figura 39.

O perfil de intercalação entre as moléculas de CT DNA e os extratos ou doxorrubicina (controle positivo) mostrou o deslocamento e a diminuição da fluorescência do IP, comparativamente ao controle negativo (Figura 39) de uma maneira dose dependente. Provavelmente, a redução da fluorescência do IP ocorreu após interações entre o CT DNA e os grupos ionizáveis de alcaloides aromáticos (HOSSAIN; KUMAR, 2009). Deve ser destacado que compostos intercaladores são moléculas que se inserem perpendicularmente na estrutura do DNA por ligações não-covalentes (MARTÍNEZ; CHACÓN-GARCÍA, 2005). Uma explicação adicional refere-se ao aumento da capacidade de intercalação de ligantes planares que depende do tipo de geometria de coordenação e do tipo de átomo doador do ligante (XU et al., 2003; ZHANG et al., 2005). De fato, foi observado que a piperina atuou aumentando a biodisponibilidade de compostos intercalantes ou ligantes nos sulcos do DNA (PFUND et al., 2015).

Figura 39 - Efeitos dos extratos de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina) sobre o CT DNA



Nota: CT DNA (10 µM); iodeto de propídio (IP) (25 µM). Extrato etanólico (ET) e extrato supercrítico a 200 bar (ESC) solubilizados em DMSO (0,1 %) e em tampão fosfato 50 mM contendo 0,1 M de cloreto de sódio, em pH 7,4. Concentrações dos extratos (10 a 40 µg/ml). Controle negativo (CT DNA+IP). Controle positivo (CT DNA+IP+doxo) (doxorrubicina; 10 a 40 µg/ml). Resultados obtidos de três experimentos independentes (30 min de tratamento, 37 °C).

(Fonte: o autor)

Moléculas de pirocatecol podem atuar formando adutos, ou seja, podem se ligar covalentemente com o DNA de maneira diretamente dependente dos níveis intracelulares de peróxido de hidrogênio (SCHWEIGERT; ZEHNDER; EGGEN, 2001). Isto deve ter ocorrido entre as moléculas de pirocatecol identificadas por CG/EM no ESC (200 bar) e o CT DNA tratado com este extrato. Assim, ao intercalarem com o CT DNA as moléculas de pirocatecol podem ter deslocado o iodeto de propídio que estava intercalado neste macromolécula (SCHWEIGERT; ZEHNDER; EGGEN, 2001).

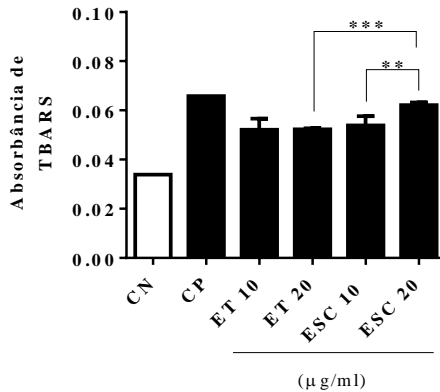
Adicionalmente, compostos intercalantes presentes nos extratos de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina podem ter deslocado o iodeto de propídio durante os ensaios realizados (RESCIFINA et al., 2014).

Além disto, alcaloides podem interagir com o DNA intercalando nesta molécula como no caso do alcaloide sanguinarina, e podem também interagir com as enzimas associadas com o DNA como a polimerase I e transcriptase reversa; podendo atuar sobre o RNA e proteínas dos ribossomos (WINK; SCHMELLER; LATZ-BRÜNING, 1998). De fato, piperina (0,3 mM) causou a inibição da síntese de proteínas *in vitro* (WINK; SCHMELLER; LATZ-BRÜNING, 1998). Outros estudos *in vitro* demonstraram que a síntese de proteínas ribossomais pode ser afetada quando ocorrerem interações entre alcaloides e ácidos nucleicos ribossomais (rRNA, tRNA e mRNA) e, adicionalmente, devido às interações com proteínas ribossomais (WINK; TWARDOWSKI, 1992).

Por outro lado, as propriedades apolares/lipofílicas da piperina podem modular a dinâmica de membranas aumentando a biodisponibilidade de compostos apolares que sejam capazes de intercalar entre as bases apolares do DNA (MEGHWAL; GOSWAMI, 2013) e, ao mesmo tempo, pode aumentar a biodisponibilidade de outros compostos que possam causar danos à esta macromolécula de maneira a induzir a morte das células tumorais (BADMAEV et al., 2000; PATIL et al. 2011). No entanto, maiores concentrações de piperina foram associadas com aumento na geração intracelular de EROS (MITTAL; GUPTA, 2000; TAK et al., 2012; YAFFE et al., 2013).

Danos oxidativos foram observados quando o CT DNA foi exposto por 24 h às soluções dos extratos ET e ESC produzido a 200 bar (Figura 40). Estes danos podem ser resultantes de ataques de radicais livres ao carbono 4 da desoxirribose do CT DNA observáveis após tratamento desta molécula com substâncias geradoras de radicais livres JUN; BOCHU; LIANCAI, 2007).

Figura 40 - Efeitos oxidativos dos extratos de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina) sobre o CT DNA

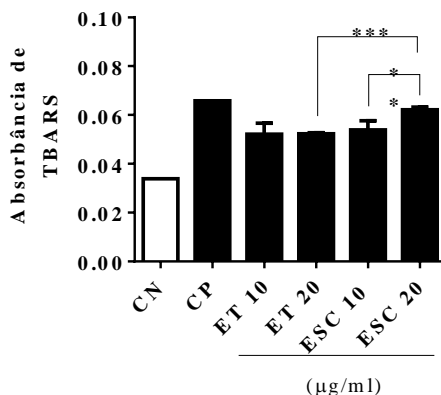


Nota: CT DNA (0,5 mM). Controle negativo (CN) (tampão fosfato; 50 mM; pH 7,2). Controle positivo (CP) formado por $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ (100 μM) e peróxido de hidrogênio (10 mM). Extrato etanólico (ET). Extrato supercrítico obtido a 200 bar (ESC) (10 ou 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Resultados obtidos de três experimentos independentes, com 24 h de tratamento a 37 °C. ** indica diferença significativa ($p < 0,01$) entre os tratamentos com extrato ESC. *** indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) de ESC em relação ao ET na mesma concentração (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). (Fonte: o autor)

Os dois extratos causaram danos oxidativos ao DNA (Figura 41). Porém, os danos causados pelo extrato ESC produzido a 200 bar na concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ foram significativamente maiores quando comparados aos obtidos com o extrato ET na mesma concentração ($p < 0,001$).

No extrato ESC foi encontrado o maior conteúdo de piperina ($60,35 \pm 0,14$) (Tabela 3). Este extrato causou danos oxidativos equivalentes a 82 % dos danos devidos à exposição do CT DNA aos oxidantes (CP) (Figura 41). Fofaria et al. (2014) associaram esta piperamida com a indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) que causaram danos oxidativos ao DNA de células de melanoma levando à parada no ciclo celular e morte por apoptose. Adicionalmente, o DMSO (0,1 %) que foi empregado para efetuar a solubilização dos extratos pode aumentar o relaxamento em partes o DNA (JUANG; LIU, 1987) e, desta forma, pode ter favorecido processos de quebras hidrolíticas no CT DNA (PICH, 2010).

Figura 41 - Efeitos dos extratos de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina) sobre o CT DNA



Nota: CT DNA (0,5 mM). Controle negativo (CN) (tampão fosfato; 50 mM; pH 7,2). Controle positivo (CP) formado por $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ (100 μM) e peróxido de hidrogênio (10 mM). Extrato etanólico (ET). Extrato supercrítico obtido a 200 bar (ESC) (10 ou 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Resultados obtidos de três experimentos independentes, com 24 h de tratamento a 37 °C. ** indica diferença significativa ($p < 0,01$) entre os tratamentos com extrato supercrítico a 200 bar (ESC). *** indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) de ESC em relação ao etanólico (ET) na mesma concentração (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

(Fonte: o autor)

4.2.5 Atividade antitumoral *in vivo*

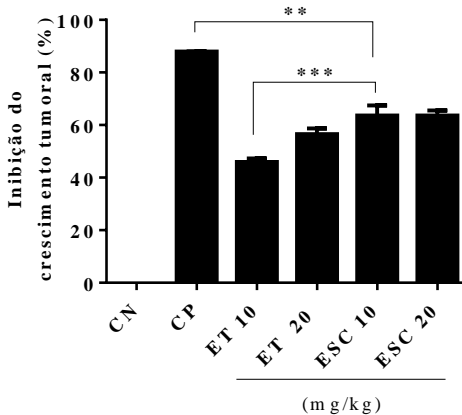
4.2.5.1 Inibição do crescimento tumoral e sobrevida

Buscando verificar se os resultados *in vitro* seriam reproduzidos *in vivo* foram realizados ensaios empregando camundongos Balb/c inoculados com TAE e tratados com os extratos de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina.

Para o valor correspondente aos extratos na menor dose (10 mg/kg/dia) foi obtido um valor de dose equivalente para humanos (HD) igual a 0,81 mg/kg/dia. Para a maior dose (20 mg/kg/dia) obteve-se o valor de HD igual a 1,62 mg/kg/dia.

A Figura 42 apresenta o percentual de inibição do crescimento tumoral. Os tratamentos realizados com ESC na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$) comparativamente aos tratamentos efetuados com ET na mesma concentração.

Figura 42 - Atividade antitumoral observada em camundongos Balb/c (inoculados com carcinoma ascítico de Ehrlich) e tratados com cada extrato de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina)



Nota: Machos (65 dias de vida; $22,0 \pm 0,5$ g; $n= 16$). Controle negativo (CN) (50 μ l; NaCl; 0,8 %; Tween 80; 1,0 %; 9 dias). Controle positivo (CP) (doxorrubina, 50 μ l; 1,2 mg/kg/dia; 9 dias). Extrato etanólico (ET). Extrato supercrítico obtido a 200 bar (ESC) (50 μ l; 10 ou 20 mg/kg/dia; 9 dias). ** e *** denotam diferenças significativas (para $p < 0,01$ e $p < 0,001$; respectivamente) entre o ESC e o ET. (Fonte: o autor)

O tratamento com o extrato supercrítico ESC a 10 mg/kg/dia, causou cerca de 76 % de inibição do crescimento tumoral aproximando-se do efeito inibitório atingido pelos tratamentos efetuados com doxorrubina enquanto o tratamento com ET houve 42 % de inibição do crescimento tumoral (Figura 42).

Também houve aumento de 67 % na sobrevida dos animais após tratamento com ESC (200 bar) (10 mg/kg/dia), com diferença estatística significativa ($p < 0,001$) comparativamente ao tratamento realizado com o extrato ET (56 %) na mesma concentração (Figura 43 A). Este cálculo foi realizado utilizando a função área sob a curva do programa GraphPad.

Observou-se que o grupo tratado com ESC na maior dose (20 mg/kg/dia) os animais morreram antes o que indica que aparentemente esta foi mais tóxica (Figura 43 B).

Desta forma, foi constatado que os tratamentos realizados com ESC a 10 mg/kg/dia foram mais efetivos em aumentar a sobrevida dos animais comparativamente ao grupo tratado com ET na mesma dose (Figura 43 A). Enquanto que nos tratamentos realizados com ESC a 20

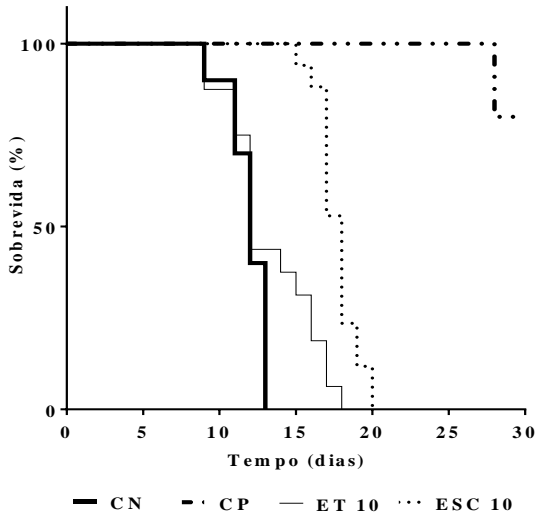
mg/kg/dia foi observado um aumento de sobrevida (51 %) um pouco maior em relação ao grupo de animais que receberam a mesma dose do extrato ET (36 %) e em relação ao controle negativo (Figura 43 B). Salientando-se que os camundongos dos grupos tratados com o extrato ET (10 ou 20 mg/kg/dia) apresentaram menor tempo de sobrevida, comparativamente ao ESC (10 mg/kg/dia).

Sunila e Kuttan (2004) observaram um aumento de 58,8 % no tempo de sobrevida de camundongos Swiss albino tratados com piperina (1,14 mg/animal) por 10 dias consecutivos e atribuíram a atividade antitumoral deste composto à sua atividade imunomoduladora.

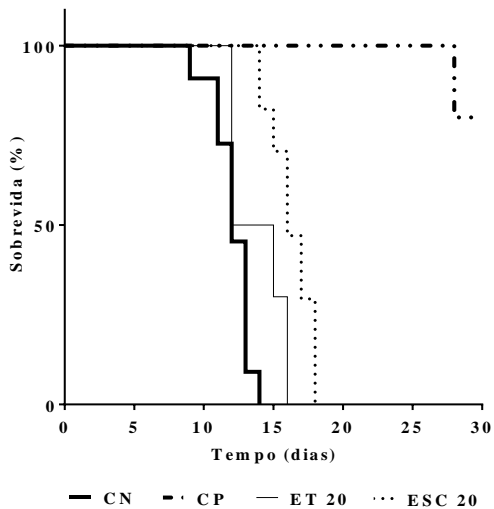
Com base no efeito antitumoral observado nos ensaios realizados *in vivo* com ESC (200 bar) pode-se considerar que este pode estar associado principalmente ao sinergismo entre a piperina, retrofractamida C e os sesquiterpenos β -cariofileno e α -humuleno; além de algum outro componente com atividade citotóxica/antiproliferativa presente no extrato que não tenha sido indentificado.

Figura 43 - Sobrevida de camundongos Balb/c (inoculados com carcinoma ascítico de Ehrlich) e tratados com cada extrato de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina)

(A) Sobrevida tratamento 10 mg/kg/dia



(B) Sobrevida tratamento 20 mg/kg/dia



Nota: Machos (65 dias de vida; $22,0 \pm 0,5$ g; n= 16). Controle negativo (CN) (50 μ l; NaCl; 0,8 %; Tween 80; 1,0 %; 9 dias). Controle positivo (CP) (doxorrubina, 50 μ l; 1,2 mg/kg/dia; 9 dias). Extrato etanólico (ET). Extrato supercrítico a 200 bar (ESC) (50 μ l; 10 ou 20 mg/kg/dia; 9 dias).
(Fonte: o autor)

4.2.5.2 Efeito dos extratos ET e ESC sobre o ciclo celular

Na busca dos mecanismos relacionados com a inibição do crescimento de TAE foram avaliados os efeitos sobre o ciclo celular e sobre o tipo de morte induzida nas células deste carcinoma colhidas de animais inoculados. Na Figura 44 A foram apresentados os histogramas que mostram as variações no conteúdo de DNA ao longo das fases do ciclo celular das células de TAE coletadas de animais tratados com os extratos de *P. nigrum* cultivar Bragantina e com o controle negativo.

Na Figura 44 B encontram-se as percentagens de células de TAE em cada fase do ciclo celular. Os resultados obtidos com os tratamentos realizados com o extrato ESC na dose de 10 mg/kg/dia mostraram um decréscimo significativo ($p < 0,01$) da fase S com parada de ciclo celular das células de TAE na fase G2/M, comparativamente aos animais tratados com ET na mesma dose. Em estudo *in vitro* Lai et al. (2012), demonstraram que após tratamento com piperina as células metastáticas 4T1 (células de carcinoma mamário de camundongos) apresentaram supressão do crescimento através de parada no ciclo celular em G2/M.

Compostos capazes de causar parada no ciclo celular inibindo a proliferação de células tumorais podem ter potencial aplicação como adjuvantes em tratamentos realizados com quimioterápicos (DICKSON; SCHWARTZ, 2009). Além disto, intervenções farmacológicas baseadas em extratos de plantas que possam aumentar a susceptibilidade de células tumorais à quimioterapia podem ter impacto substancial no tratamento de câncer (LIAO; APAYA; SHYUR, 2013).

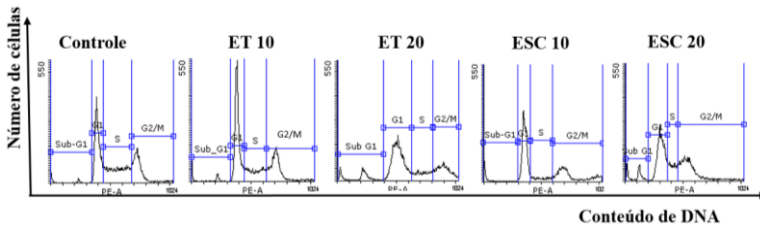
Ainda, a evidente redução da fase S induzida pelo tratamento dos animais com ESC administrados na concentração de 10 mg/kg/dia (Figura 44 B), sugere a ocorrência de danos ao DNA. Pois, quando o dano ao DNA ocorrer na fase S, a célula terá parada do ciclo na fase G2 para checar a integridade do DNA (ÁLVAREZ ALDANA et al., 2012). Quando são detectados danos irreparáveis neste ponto de controle a célula deverá entrar em processo de morte celular por apoptose (ALBERTS et al., 2008).

Para a continuidade deste estudo buscou-se avaliar o tipo de morte de células de TAE induzida após tratamento dos camundongos com cada

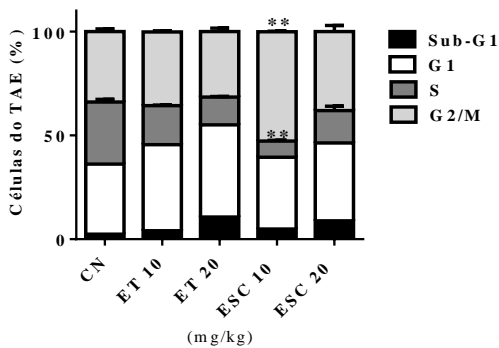
extrato (ET ou ESC) que foram produzidos com *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina.

Figura 44 - Efeito dos extratos de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina) sobre as fases do ciclo celular no tumor ascítico de Ehrlich em camundongos Balb/c tratados durante 9 dias

(A) Histogramas



(B) Efeitos sobre as fases do ciclo celular



Nota: Machos (65 dias de vida; $22,0 \pm 0,5$ g de peso; $n=6$). CN corresponde ao controle negativo (50 μ l; NaCl; 0,8 %; Tween 80; 1,0 %). Extratos (50 μ l; 10 ou 20 mg/kg/dia, 9 dias). Extrato etanólico (ET). Extrato supercrítico obtido a 200 bar (ESC). Solução de brometo de etídio (5 μ l; 100 μ g/ml) e de acridina laranja (5 μ l; 100 μ g/ml) (1:1; v/v) ** indica diferença significativa ($p<0,01$) entre ESC e CN.

(Fonte: o autor)

4.2.5.3 Tipo de morte celular induzida pelos extratos ET e ESC

Como visto anteriormente o extrato ESC (produzido a 200 bar) na concentração de 10 µg/ml causou citotoxicidade para células MCF-7 e inibiu a proliferação clonogênica destas células através da indução de apoptose. Adicionalmente, o extrato ESC também apresentou substâncias capazes de se intercalarem entre as bases do CT DNA e de causarem danos oxidativos à esta macromolécula, os quais podem ter contribuído para o efeito citotóxico e antiproliferativo observados *in vitro*. Este efeito foi confirmado *in vivo* através da inibição do crescimento das células de TAE implantadas em camundongos, aumentando o tempo de sobrevivência devido à parada no ciclo celular e indução de apoptose nestas células.

Na Figura 45 A encontram-se os resultados da investigação do tipo de morte induzida células de TAE após 9 dias de tratamento dos camundongos com o extrato etanólico (ET) ou com o extrato supercrítico produzido a 200 bar (ESC). Houve um aumento significativo ($p < 0,001$) de morte por apoptose em células de TAE coletadas de animais que receberam tratamento com ESC comparativamente às células dos animais que receberam ET. Enquanto na Figura 45 B encontram-se imagens representativas das células de TAE em processo de morte por apoptose ou necrose, além de células viáveis.

A extração supercrítica realizada a 200 bar (40 °C) por 240 min (ESC) mostrou ser um bom processo com maior eficiência na extração de compostos bioativos pois o dióxido de carbono supercrítico mantido a 200 bar providenciou as condições para melhorar a extração de piperina dos frutos verdes de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina.

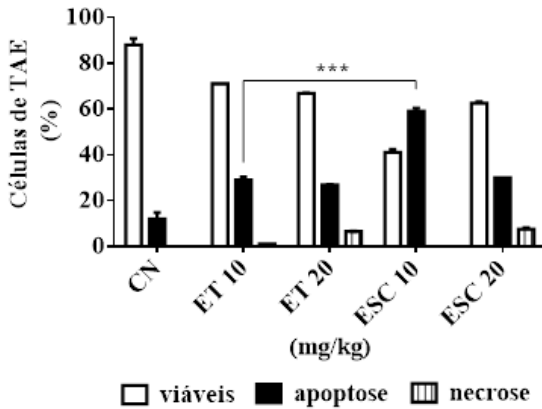
Porém, outros aspectos também devem ser considerados para demonstrar que a extração supercrítica apresenta vantagens em relação à maceração etanólica tradicional. Conforme destacado por Ferreira et al. (1999) e Ferreira e Meireles (2002) deve ser considerada a ocorrência de transferência de massa entre o soluto dissolvido (compostos secundários) na fase sólida (matriz da pimenta preta) e a fase do solvente (dióxido de carbono supercrítico). A transferência de massa depende da porosidade e tamanho de partícula da matriz vegetal; da densidade e difusividade dos compostos secundários presentes nesta matriz vegetal e da taxa de vazão, da densidade e da difusividade do solvente (dióxido de carbono supercrítico) (FERREIRA; MEIRELES, 2002).

No extrato ESC as condições supercríticas (200 bar, 40 °C) favoreceram a extração de compostos secundários bioativos em proporções determinadas em miligramas por grama de extrato (mg/g). Assim, para o ESC as proporções aproximadas dos compostos bioativos

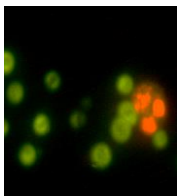
extraídos foram de 302 de piperina (603,50 mg/g); para 1 de retrofractamida C (2,0 mg/kg); para 100 de β -cariofileno (200,6 mg/g); para 6,5 de α -humuleno (12,9 mg/g); e para 168 de pirocatecol (336 mg/g). Estas proporções não foram verificadas no caso do extrato convencional (ET) que apresentou as proporções de 80 para piperina (321,22 mg/g); para 1 de retrofractamida C (4,0 mg/kg); e de 60 para o β -cariofileno (239,5 mg/g) sem a ocorrência de α -humuleno e pirocatecol neste extrato.

Figura 45 - Efeito dos extratos de pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina) sobre o tipo de morte celular induzido nas células de TAE de camundongos Balb/c tratados

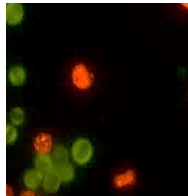
(A) Tipo de morte induzido



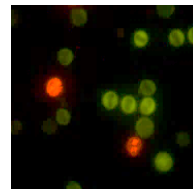
(B) Fluorescência BE /LA



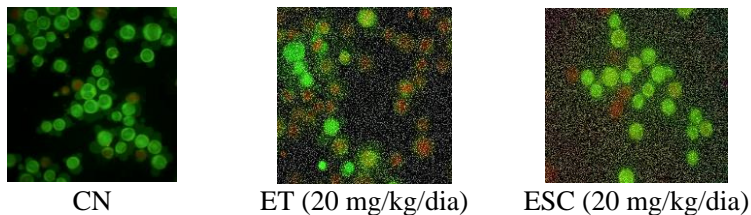
CN



ET (10 mg/kg/dia)



ESC (10 mg/kg/dia)



Nota: Machos (65 dias de vida; $22,0 \pm 0,5$ g; $n=6$). Controle negativo (CN) (50 μ l; NaCl; 0,8 %; Tween 80; 1,0 %). Extrato etanólico (ET). Extrato supercrítico obtido a 200 bar (ESC) (50 μ l; 10 ou 20 mg/kg/dia, 9 dias). *** indica diferença significativa ($p<0,001$) entre ESC e ET. Células viáveis (verdes), em apoptose (laranja) ou necrose (vermelhas) (aumento 40 x). (Fonte: do autor)

Salientando-se que estes compostos secundários foram associados com atividade anti-inflamatória e antitumoral conforme reportado para piperina (MUJUMDAR et al., 1990; SUNILA; KUTTAN, 2004). Enquanto a retrofractamida C apresentou atividade inibitória sobre proteínas importantes na progressão de processos inflamatórios (LEE et al., 2008), Já ao β -cariofileno foram atribuídas atividades de imunomodulação e anti-inflamatória (GERTSCH et al., 2008) bem como atividade antitumoral e inibidora da COX causada por sinergismo entre cariofileno e α -humuleno em extrato vegetal (PARISOTTO et al., 2012). Por fim, ao pirocatecol foi atribuída a citotoxicidade observada em células de leucemia humana (HL60) (KOLACHANA et al., 1993).

Assim, devido ao ESC (200 bar) apresentar o maior conteúdo de piperina que também foi encontrada nos demais extratos e, principalmente, devido ao fato do ESC (200 bar) ter apresentado maiores atividades (citotóxica, antiproliferativa e antitumoral) tanto *in vitro* quanto *in vivo* pode-se supor que piperina em conjunto a retrofractamida C, o β -cariofileno e o α -humuleno e o pirocatecol podem ter contribuído através de sinergismo para a melhor atividade antitumoral observada em relação aos demais tratamentos. Adicionalmente, seria oportuno considerar o envolvimento de outro(s) componente(s), ainda não identificado(s) neste extrato, que possua(m) atividades antiproliferativa e antitumoral que pode(m) ter contribuído nos resultados observados.

As condições de extração supercríticas aumentaram a extração de sesquiterpenos. Entre os sesquiterpenos identificados por CG-EM nos extratos (Tabelas 3 - 8) o β -cariofileno apresentou maior valor para ESC200+EtOH (45,27 %); enquanto que o extrato ET (23,95 %) e o

obtido para ESC200 (20,06 %) respectivamente foram 1,89 e 2,25 vezes menores, em relação ao extrato supercrítico produzido com adição de co-solvente.

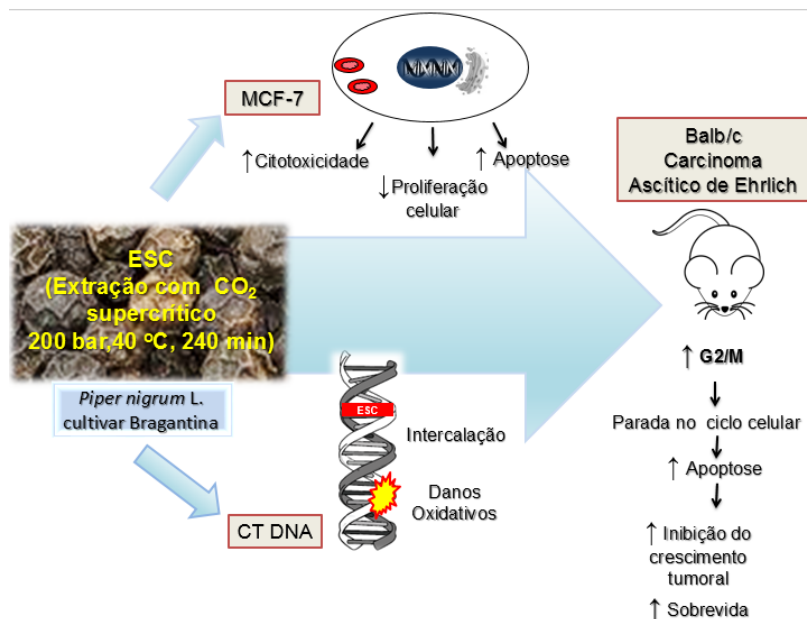
Parisotto et al. (2012) demonstraram que as soluções do extrato obtido em condições supercríticas contendo sesquiterpenos (trans-cariofileno e α -humuleno) promoveram redução do crescimento do TAE *in vivo*; além de apresentar atividade citotóxica *in vitro* contra células MCF-7 (IC₅₀= 154 μ g/ml) e contra células do tumor ascítico de Ehrlich (IC₅₀=133 μ g/ml). Adicionalmente, estes autores verificaram que o extrato levou à inibição da enzima ciclooxigenase (COX-2) em células MCF-7, destacando que, em geral, as células tumorais apresentam a expressão desta enzima muito ampliada. Ao aumentarem a expressão da COX-2 as células tumorais podem alterar as suas condições de aderência e interações com a matriz extracelular; podem regular a ação de fatores de crescimento e podem apresentar resistência à apoptose induzida após tratamento com extratos vegetais (PARISOTTO et al., 2012; SUBHASHINI; MAHIPAL; REDDANNA, 2005).

Poucos estudos têm sido realizados para demonstrar os efeitos aditivos ou de sinergismo existentes entre os metabólitos secundários presentes em espécies do gênero *Piper* especialmente de espécies que apresentam uma grande variedade de metabólitos secundários como *Piper nigrum* (SCOTT et al., 2002; DYER et al., 2003; DYER; RICHARDS; DODSON, 2004).

Ademais, os mecanismos envolvidos na atividade tumoral verificada *in vivo* e estabelecida após o tratamento com o extrato supercrítico (produzido a 200 bar) a partir da *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina, podem estar relacionados à atividade antiproliferativa observada *in vitro*. Esta atividade possivelmente seria devida aos compostos presentes neste extrato que podem ter causado alterações na conformação do DNA por intercalação (Figura 39) e/ou podem ter causado danos oxidativos à esta macromolécula (Figura 40).

Portanto, estes podem ter sido alguns dos mecanismos bioquímicos envolvidos na atividade antitumoral do extrato ESC produzido a 200 bar (40 °C, 240 min), que se encontram resumidos na Figura 46. Estes resultados são importantes e apontam para a necessidade de continuidade das pesquisas com os frutos de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina de maneira a obter novos compostos ou extratos com potenciais usos adjuvantes na terapia antitumoral.

Figura 46 - Resumo gráfico dos eventos associados com atividade antiproliferativa e antitumoral de extrato supercrítico produzido com pimenta preta (*Piper nigrum* L. cultivar Bragantina)



(Fonte: o autor)

4.4 CONCLUSÃO

Os extratos obtidos dos frutos de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina foram citotóxicos para as células MCF-7 resultando em efeito antiproliferativo pronunciado após 72 h de tratamento com o extrato produzido com dióxido de carbono supercrítico e obtido a 200 bar (40 °C, 240 min) que apresentou o maior conteúdo de piperina que, provavelmente, dever ser uma das causas do aumento de danos ao DNA por intercalação e clivagem oxidativa. Os tratamentos com ESC causaram inibição do crescimento tumoral em modelo *in vivo* por mecanismos que envolveram parada no ciclo celular e indução de apoptose. Salientando-se que na maior dose testada para este extrato houve aumento da necrose indicativo de maior toxicidade.

Estes resultados foram condensados em um artigo que foi encaminhado para a revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (ANEXO B).

5 CONCLUSÃO DA TESE

Com base nos resultados obtidos com as análises fitoquímicas e ensaios bioquímicos realizados *in vitro* e *in vivo* com os extratos de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina pode-se concluir que:

- Através da maceração etanólica (ET) foi possível extrair distintas classes de compostos entre as quais se destacaram as piperamidas e os terpenóides.
- A extração supercrítica realizada com dióxido de carbono mantido em condições supercríticas (pressão de 200 ou 300 bar) em temperatura de 40 °C em tempo de extração de 240 min permitiu extrair um maior número de compostos de interesse (piperina, retrofractamida C, β -cariofileno, α -humuleno, pirocatecol) embora o rendimento total tenha sido menor do que o do extrato etanólico.
- O solvente mantido em condições supercríticas a 200 e 300 bar foi capaz de solubilizar e extrair piperamidas (piperina e piperilina), retrofractamida C; um alcaloide imidazólico, terpenóides e ácidos graxos saturados e insaturados.
- Entre os principais compostos secundários isolados do extrato supercrítico ESC produzido a 200 bar, destacam-se a piperina e retrofractamida C e os sesquiterpenos α -humuleno e β -cariofileno; com as razões entre estes compostos dependentes das condições de extração.
- O extrato etanólico foi citotóxico para as linhagens tumorais testadas MCF-7 e HT-29, tendo sido mais efetivo contra as células MCF-7, após 24 h de tratamento.
- O extrato ESC (200 bar) apresentou a menor CE₅₀ após 72 h de tratamento, comparativamente aos demais extratos.

- Todos extratos apresentaram efeito citotóxico e antiproliferativo sobre a linhagem celular MCF-7, sendo que o extrato ESC (200 bar) na maior concentração levou à uma maior redução na área das colônias tratadas.
- O aumento na geração de EROs observado sugere que os efeitos citotóxico e antiproliferativo podem ser decorrentes de danos oxidativos causados por compostos pró-oxidantes presentes nos extratos.
- Ensaio moleculares apontaram para a interação entre os compostos presentes nos extratos com o CT DNA por intercalação. Além disto, tais compostos também foram capazes de causar danos oxidativos ao CT DNA.
- O tratamento com o extrato etanólico (ET) (100 mg/kg/dia) levou a uma boa inibição tumoral (60 %) e sobrevida (76 %).
- Entretanto, os melhores resultados em termos de inibição de crescimento tumoral *in vivo* foram obtidos com ESC (produzido a 200 bar) (10 mg/kg/dia) que apresentou uma redução tumoral (76 %) e sobrevida (67 %) em uma dose dez vezes menor comparativamente aos resultados obtidos com ET (100 mg/kg/dia).
- O tratamento com ET (100 mg/kg/dia) promoveu a indução de apoptose nas células de TAE coletadas dos animais tratados, que pode ser relacionada diretamente com a maior expressão de proteínas pró-apoptose Bax e p53 e com a redução na expressão da proteína Bcl-xL (anti-apoptose).
- O tratamento com ET (100 mg/kg/dia) causou inibição da expressão da ciclina A que atua no controle da progressão do ciclo celular.
- Nos tratamentos com ET (100 mg/kg/dia) houve aumento de células apoptóticas após a parada do ciclo

celular em G1/S sugerindo que este extrato apresenta compostos que podem afetar a síntese de DNA.

- O tratamento dos animais com ET (100 mg/kg/dia) induziu estresse oxidativo nas células de TAE perceptível através da elevação na atividade de enzimas de defesas antioxidantes (CAT, SOD e GR), com depleção de GSH e ao aumento da peroxidação lipídica e carbonilação proteica.
- Os efeitos observados (antiproliferativo e antitumoral) em ensaios realizados *in vitro* e *in vivo* com ESC (200 bar) podem ser associados principalmente ao sinergismo entre a piperina, retrofractamida C e os sesquiterpenos (β -cariofileno e α -humuleno) e pirocatecol, além de algum outro componente citotóxico presente no extrato que ainda não foi indentificado.
- Desta forma, os resultados deste estudo alinham-se com as alegações tradicionais referentes aos efeitos antitumorais de preparações herbais contendo frutos de *Piper nigrum*.
- Com relação a cultivar Bragantina a presente pesquisa demonstrou ser boa fonte de compostos com atividade antitumoral em modelos *in vitro* e *in vivo*.
- O uso de frutos desta cultivar pode ser uma alternativa adicional para o excedente da produção ou para os frutos considerados como de menor qualidade e, desta forma, pode ser uma forma inovadora de agregar mais valor à produção desta *commodity* agrícola brasileira.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 PERSPECTIVAS

Com base nos resultados apresentados nesta tese permaneceram alguns pontos a serem investigados, entre os quais destacam-se os estudos com os extratos obtidos de frutos de *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina para:

- Investigar as vias de sinalização em MCF-7 empregando menores tempos de tratamento.
- Efetuar avaliação da indução de senescência celular após tratamento com extratos.
- Investigar a presença de compostos ligantes nas fendas do DNA através de dicroísmo circular empregando CT DNA tratado com os extratos solubilizados em acetonitrila, utilizando distamicina e mitomicina C como controles de ligantes de fenda maior e fenda menor, respectivamente.
- Avaliar a expressão de marcadores de autofagia em MCF-7 através de imunodeteção.
- Avaliar as alterações ultraestruturais com microscopia eletrônica de transmissão de células MCF-7 e de células de carcinoma ascítico de Ehrlich dos animais tratados com os extratos.
- Avaliar os efeitos dos extratos na cadeia respiratória mitocondrial isolada (complexo II) e no potencial de membrana de mitocôndrias de células MCF-7.
- Avaliar os efeitos dos extratos sobre a liberação de cálcio (Ca^{+2}) pelo retículo endoplasmático em células MCF-7.
- Investigar *in vivo* a atividade de marcadores bioquímicos de citotoxicidade periférica (enzimas

aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e lactato desidrogenase).

- Efetuar extrações supercríticas empregando água como cossolvente avaliando os efeitos através de modelos *in vitro*, *in vivo* e *in silico*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M.A. et al. Beta-Caryophyllene causes regression of endometrial implants in a rat model of endometriosis without affecting fertility. **European Journal of Pharmacology**, v. 702, p. 12-19, 2013.
- ADAMS, J.M.; CORY, S. Apoptosomes: engines for caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, n. 6, p. 715-720, 2002.
- AEBI**, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 204, p. 234-254, 1984.
- AKTER. R. et al. Wortmannin induces MCF-7 breast cancer cell death via the apoptotic pathway, involving chromatin condensation, generation of reactive oxygen species, and membrane blebbing, **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 4, p. 103 -113, 2012.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 5 ed. New York: Taylor & Francis Group. 2008. 1555 p.
- ALBUQUERQUE, U.P. de et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.
- AL-LIHAIBI, S.S. et al. Three new cembranoid-type diterpenes from Red Sea soft coral *Sarcophyton glaucum*: isolation and antiproliferative activity against HepG2 cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.81, p. 314-322, 2014.
- ALMEIDA, V. L. de et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ÁLVAREZ ALDANA, A.; SEPULVEDA ARIAS, J. C.; SILLER LOPEZ, F. Carcinogenesis inducida por el virus del papiloma humano. **Investigaciones Andina**, v.14, n.24, p. 438-456, 2012.
- ANDRADE, K.S. **Extração e microencapsulamento de extratos de interesse biológico provenientes de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) e de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* R.)**. Tese (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Centro

Tecnológico. Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Trindade, Florianópolis, 2015, 165 p.

ANDRADE, K.S.; FERREIRA, S.R.S. Antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) oil obtained by supercritical CO₂. **In:** III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids. Cartagena de Indias, Colombia, 2013.

ANDRADE, K.S. et al. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, v. 88, p. 544-552, 2012.

ATJANASUPPAT, K. et al. *In vitro* screening for anthelmintic and antitumor activity of ethnomedicinal plants from Thailand. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 475-482, 2009.

ATTI-SANTOS, A.C. et al. Extraction of Essential Oils from Lime (*Citrus latifolia* Tanaka) by Hydrodistillation and Supercritical Carbon Dioxide. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 155-160, 2005.

AUDIC, Y.; HARTLEY, R. S. Post-transcriptional regulation in cancer – Review. **Biology of the Cell**, v. 96, p. 479-498, 2004.

BADMAEV, V.; MAJEED, M.; PRAKASH, L. Piperine derived from black pepper increases the plasma levels of coenzyme q10 following oral supplementation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, n. 2, p. 109-113, 2000.

BAGHERI, H.; MANAP, M.Y.B.A.; SOLATI, Z. Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydro-distillation. **Talanta**, v. 121, p. 220-228, 2014.

BARBOZA DA SILVA, N. C. et al. Uso de plantas medicinais na comunidade quilombola da Barra II - Bahia, Brasil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 11, n. 5, p. 435-453, 2012.

BARINAGA, M. Death by Dozens of Cuts. **Science**, v. 280, p. 32-34, 1998.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V. da S. Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 670-688, 2009.

BENNETT, B; PRANCE, G. Introduced Plants in the Indigenous Pharmacopoeia of Northern South America. **Economic Botany**, v. 54, n. 1, p. 90-102, 2000.

BERTHET, C.; KALDIS, P. Cell-Specific Responses to Loss of Cyclin-Dependent Kinases. **Oncogene**, v. 26, p. 4469-4477, 2007.

BERTINI, I. et al. The Anti-Apoptotic Bcl-xL Protein, a New Piece in the Puzzle of Cytochrome C Interactome. **PLoS ONE**, v. 6, e18329, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0018329

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-890, 1963.

BEZERRA D.P. et al. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by pipartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 6, v. 39, p. 801-807, 2006.

BIAVATTI, M.W. Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, 2009.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 90, p. 105-110, 1984.

BISCARO, F. et al. Anticancer activity of flavonol and flavan-3-ol rich extracts from *Croton celtidifolius* latex. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 6, p. 737-743, 2013.

BLEICH, I.; MÜLLER, B.W.; WAßMUS, W. Aerosol solvent extraction system - a new microparticle production technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 97, p. 111-117, 1993.

BOARD, R.; JAYSON, G. C. Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR): A target for anticancer therapeutics. **Drug Resistance Updates**, v. 8, p. 75-83, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de bases técnicas da oncologia – SIA/SUS** - Sistema de Informações Ambulatoriais. 17 ed, Brasília: Secretaria de Atenção à Saúde/ Departamento de Regulação, Avaliação e Controle/Coordenação Geral de Sistemas de Informação. 2014, 120 p.

BROWN, R. The Bcl-2-family of proteins. **British Medical Bulletin**, v. 53, n.3, p. 466-477, 1997.

BUCK, K. et al. Estimated enterolignans, lignan-rich foods, and fibre in relation to survival after postmenopausal breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 105, p. 1151-1157, 2011.

BUETTNER, G.R.; WAGNER, B.A.; RODGERS, V.G.J. Quantitative Redox Biology: An approach to understanding the role of reactive species in defining the cellular redox environment. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 67, n. 2, 2013.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484-490, 1985.

CARRILHO, E.; TAVARES, M.C.H.; LANÇAS, F.M. Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 509-515, 2001.

CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. **Nucleic Acids Research**, v. 42, Database issue D459–D471, 2014.

CASTEDO, M. et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v.23. p. 2825-837, 2004.

CHAHAL, J. et al. Introduction, Phytochemistry, Traditional uses and Biological Activity of Genus *Piper*: A review. **International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research**, v. 2, n. 2, p. 130-144, 2011.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CHANDRA, P. et al. Metabolic profiling of piper species by direct analysis in real time mass spectrometry combined with principal component analysis. **Analytical Methods**, v. 6, p. 4234-4239, 2014.

CHAVEERACH, A. et al. Ethnobotany of the genus *Piper* (Piperaceae) in Thailand. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 4, p. 223-231, 2006.

CHAVES, J. S. et al. Pharmacokinetics and Tissue Distribution of the Sesquiterpene α -Humulene in Mice. **Planta Medica**, v. 74, p. 1678-1683, 2008.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 192-208, 2004.

CHENG, Q. et al. Regulation of MDM2 E3 Ligase Activity by Phosphorylation after DNA Damage. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 24; p. 4951-4963, 2011.

CHITHRA, S. et al. Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, v. 21, p. 534-540, 2014.

COSTANTINI, P. et al. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. **Oncogene**, v. 19, p. 307-14, 2000.

COSTA, P.R.R. Safrol e Eugenol: Estudo da reatividade química e uso síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 357-369, 2000.

COUGHLIN, S.S.; EWKUEME, D. U. Breast cancer as a global health concern. **Cancer Epidemiology**, v. 33, n. 5, p.315-318, 2009.

COUSSENS, L. M.; WERB Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860-867, 2002.

COUSSENS, L. M.; ZITVOGEL L.; PALUCKA A. K. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? **Science**, v. 339, p. 286-291, 2013.

CREPALDI, M.O.S.; PEIXOTO, A.L. Use and knowledge of plants by “Quilombolas” as subsidies for conservation efforts in an área of Atlantic Forest in Espírito Santo State, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 19, p. 37-60, 2010.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites. **In:** BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Singapore: Craft Print International Ltda, 2006.

CROWELL, P.L. et al. Identification o the antitumor agent d-limonene capable of inhibiting protein isoprenylation and cell growth. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 31, p. 205-212, 1992.

CROWELL, P.L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 775S-778S, 1999.

DAKUBO, G.D. **Mitochondrial genetics and cancer**. Berlin: Springer-Verlag. 2010, 372 p.

DANIEL, M. **Medicinal Plants: Chemistry and Properties**, Boca Raton, CRC Press, 2006. 266 p.

DA SILVA, J. K. R. et al. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 55-60, 2014.

DA SILVEIRA, V.C. et al. Binding of oxindole Schiff base copper (II) complexes to DNA and its modulation by the ligand. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 1692-1703, 2011.

DE CARVALHO, P. M.; RODRIGUES, R. F. O.; SAWAYA, A. C. H. F.; MARQUES, M. O. M.; SHIMIZU, M. T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, 297-301, 2004.

DE PAULA, W. F. et al. Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. **Pest Management Science**, v. 56, p. 168-174, 2000.

DEJEANS, N. et al. Endoplasmic reticulum calcium release potentiates the ER stress and cell death caused by an oxidative stress in MCF-7 cells. **Biochemistry and Pharmacology**, v. 79, p. 1221-1230, 2010.

DICKINSON, B.C.; CHANG, C.J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 8, p. 504-511, 2011.

DICKSON, M.A.; SCHWARTZ, G.K. Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. **Current Oncology**, v. 16, n. 32, p. 36-43, 2009.

DIMRI, G.P. What has senescence got to do with cancer? **Cancer Cell**, v.7, p. 505-512, 2005.

DUDAREVA, N. et al. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, p. 417-440, 2006.

DYER, L. A. et al. Synergistic effects of three *Piper* amides on generalist and specialist herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p. 2499-2514, 2003.

DYER, L.A.; RICHARDS, J.; DODSON, C.D. Isolation, Synthesis, and Evolutionary Ecology of *Piper* Amides. Chapter, p.117-139. **In:** DYER, L.A.; PALMER, A.D.N. *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004.

EE, G.C.L. et al. Pellitorine, a Potential Anti-Cancer Lead Compound against HL60 and MCT-7 Cell Lines and Microbial Transformation of Piperine from *Piper nigrum*. **Molecules**, v. 15, p. 2398-2404, 2010.

EGUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. **Cancer Research**, v. 57, n. 10, p. 1835-1840, 1997.

EHRlich, P. Experimentelle Karzinomstudien an Mäusen. **Arbeiten Institut für Experimentelle Therapie zu Frankfurt**, v. 1, p. 78-80, 1906.

ELINAV, E. et al. Inflammation-induced cancer: Crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, p. 759-771, 2013.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual Segurança e Qualidade para a Cultura da Pimenta-do-Reino**. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 65 p. (Qualidade e Segurança dos Alimentos). Projeto PAS Campo. Convênio CNI/SENAI/SEBRAE/EMBRAPA.

ENO, C. O. et al. Distinct roles of mitochondria- and ER-localized Bcl-xL in apoptosis resistance and Ca²⁺ homeostasis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, p. 2605-2618, 2012.

ESTRELA, J.L.V. et al. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p. 217-222, 2006.

FAGEN, H.J.; KOLEN, E.P.; HUSSONG, R.V. Spectrophotometric method for determining piperine in oleoresins of black pepper. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 3, n. 10, p. 860-962. 1955.

FARIAS, M.S. et al. Substituted 3-acyl-2-phenylamino-1,4-naphthoquinones intercalate into DNA and cause genotoxicity through the increased generation of reactive oxygen species culminating in cell death. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, p. 405-410, 2014.

FELIPE, K.B. et al. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1492-1499, 2014.

FERNANDES, E.S et al. Anti-inflammatory effects of compounds alphahumulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, p. 228-236, 2007.

FERREIRA, S. R. S. **Cinética de Transferência de Massa na Extração Supercrítica de OE de Pimenta do Reino**. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 1996. 218 f.

FERREIRA, S.R.S. **Extração com dióxido de carbono líquido subcrítico de óleo essencial de pimenta-do-reino**. Dissertação (mestrado). Universidade de Campinas. Campinas, SP. 1991. 206 f.

FERREIRA, S.R.S.; MEIRELES, M.A.A.; CABRAL, F.A. Extraction of Essential Oil of Black Pepper with Liquid Carbon Dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 20, p. 121-133, 1993.

FERREIRA, S.R.S. et al. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p. 235-245, 1999.

FERREIRA, S.R.S.; MEIRELES, M.A.A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 263-269, 2002.

FICH, E. A.; SEGERSON, N.A.; ROSE, J.K.C. The Plant Polyester Cutin: Biosynthesis, Structure and Biological Roles. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, n.18, p. 18.1 - 18.27, 2016.

FOFARIA, N.M.; KIM, S.H.; SRIVASTAVA, S.K., Piperine Causes G1 Phase Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Melanoma Cells through Checkpoint Kinase-1 Activation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, e94298, 2014.

FOODB. **Showing Compound (+)-1(10),4-Cadinadiene (FDB013710)**. 2015. Disponível em:<<http://foodb.ca/compounds/FDB013710>>. Acesso em dezembro 2016.

FRANCISCO, J. DA C. et al. Comparison of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Oils from Mozambique As Obtained by Hydrodistillation and

Supercritical Carbon Dioxide Extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 2339-2342, 2001.

FRANKEN, N.A.P. et al. Clonogenic assay of cells *in vitro*. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2315-2319, 2006.

FULDA, S.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Targeting mitochondria for cancer therapy. **Nature Reviews, Drug discovery**, v. 9, p. 447-464, 2010.

GABRIEL, M. et al. Tumor cytotoxicity of leucurolysin-B, a P-III snake venom metalloproteinase from *Bothrops leucurus*. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, n. 1, p. 24-33, 2012.

GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ**, p. 14, p. 1237-1243, 2007.

GALLUZZI, L. et al. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, p. 1113-1123, 2008.

GENG, C.X.; ZENG, Z.C.; WANG, J.Y. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis, **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, p. 696-700, 2003.

GERTSCH, J. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of National Academy of Sciences, USA**, v. 105, p. 9099-9104, 2008.

GLORIEUX, C. et al. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, p. 1384-1390, 2011.

GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 60-74, 2010.

GONZÁLEZ, A. et al. New Targets to Treat the Structural Remodeling of the *Myocardium*. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 18, p. 1833-1843, 2011.

GOODSELL, D. p53 Tumor Suppressor. Molecule of the month, July 2002. DOI: http://dx.doi.org/10.2210/rcsb_pdb/mom_2002_7.
Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=31>>.
Acesso em agosto 2016.

GREEN, D.R. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. **Cell**, v. 102, p. 1-4, 2000.

HAIL JR., N. et al. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11, p. 889-904, 2006.

HALESTRAP, A.P.; CLARKE, S.J.; JAVADOV, S.A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion - A target for cardioprotection. **Cardiovascular Research**, v. 61, p. 372-385, 2004.

HALESTRAP, A.P.; MCSTAY, G.P.; CLARKE, S.J. The permeability transition pore complex: another view. **Biochimie**, v. 84, p. 153-166, 2002.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: Some new concepts. **Faseb Journal**, v.1, p. 358-364, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine** v. 3. Oxford University Press: New York, 1999.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and cell culture. How should you do it and what does it mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 637-644, 2013.

HAN, E.N. et al. The *in vivo* gene expression signature of oxidative stress. **Physiological Genomics**, v. 34, p. 112-126, 2008.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p. 57-70, 2000.

HARIS, P. et al. Energetics, Thermodynamics, and Molecular Recognition of Piperine with DNA. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n.12, p. 2644-2656, 2015.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v. 11, p. 298-300, 1956.

HICKEN, E. J. et al. Discovery of a Novel Class of Imidazo[1,2-a]Pyridines with Potent PDGFR Activity and Oral Bioavailability. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, p.78-83, 2014.

HIGUCHI, Y.; YOSHIMOTO, T. Archidonic acid converts the glutathione depletion-induced apoptosis to necrosis by promoting lipid peroxidation in rat glioma cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 400, n. 1, p. 133-140, 2002.

HILMER, S.N. et al. The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 8, p. 794-799, 2004.

HOSSAIN, M. D. et al. Studies on Fatty Acids Composition and Some Valuable Nutrients of *Piper nigrum* Linn. (Gol Morich). **Dhaka University Journal of Science**, v. 62, n. 2, p. 65-68, 2014.

HOSSAIN, M.; KUMAR, G.S. DNA binding of benzophenanthridine compounds sanguinarine versus ethidium: Comparative binding and thermodynamic profile of intercalation. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 41, n. 6, p. 764-774, 2009.

HURST, R.E. et al. Targeting dormant micrometastases: rationale, evidence to date and clinical implications. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 8, n. 2, p. 126-137, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER- INCA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: INCA- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2011. 128 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER- INCA. (a) **Tipos de câncer. Mama.** Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama>. Acesso em abril 2016 a.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA. (b) **Quimioterapia.** Disponível em:<http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101>. Acesso em agosto 2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. **GLOBOCAN 2012:** Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso fevereiro 2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. **Some Naturally Occurring Substances:** Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. d-Limonene. v. 53. Lion, France: World Health Organization (WHO); International Agency for Research on Cancer (IARC), 1993. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56-9.pdf>>. Acesso em fevereiro 2016.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. ISO 959-1:1989. **Pepper (*Piper nigrum* Linnaeus), whole or ground** -- Specification -- Part 1: Black pepper. 2 ed. ISO/TC 34/SC 7 Spices, culinary herbs and condiments. 2015. 11 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. ISO 3061: 2008. **Oil of black pepper (*Piper nigrum* L.).** 2 ed. ISO/TC 54 Essential oils. 2011. 9 p.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P.S. Phylogeny and Patterns of Floral Diversity in the Genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 4, p. 706-716, 2001.

JIANG, Q. et al. Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, p. 1951-1972, 2007.

JIN, Y.; QIAN, D.; DU, Q. Preparation of bioactive amide compounds from black pepper by countercurrent chromatography and preparative HPLC. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 258-262, 2013.

JUANG, J.K.; LIU, H.J. The Effect of DMSO on Natural DNA Conformation in Enhancing Transcription. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 146, n. 3, p. 1458-1464, 1987.

JUN, T.; BOCHU, W.; LIANCAI, Z. Hydrolytic cleavage of DNA by quercetin manganese (II) complexes. **Colloid Surface B**, v. 55, p. 149-152, 2007.

KADAM, P.V. et al. Pharmacognostic, Phytochemical and Physicochemical Studies of *Piper nigrum* Linn. Fruit (Piperaceae). **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4, n.5, p. 189-193, 2013.

KAKARALA, M. et al. Targeting Breast Stem Cells with the Cancer Preventive Compounds Curcumin and Piperine. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 122, n.3, p. 777-785, 2010.

KAMIJO, T. et al. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. **Proceedings of National Academy of Sciences, USA**, v. 95, p. 8292-8297, 1998.

KHAJURIA, A.; THUSU, N.; ZUTSHI, U. Piperine modulates permeability characteristics of intestine by inducing alterations in the membrane dynamics: Influence on brush border membrane fluidity, ultrastructure and enzyme kinetics. **Phytomedicine**, v. 9, p. 224-231, 2002.

KHAJURIA, R.K. et al. Concentration dependent Electrospray Ionisation Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) studies on (E,E)-1-[5-(1,3-benzodioxol-5yl)-1-oxo-2,4-pentadienyl]-piperidine (Piperine) and its analogues. **SpringerPlus**, v. 2, 427, 2013, 8 p.

KIUCHI, F. et al. Studies on Crude Drugs e Effective on Visceral Larva Migrans, IV. Isolation and Identification of Larvicidal Principles in Pepper. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 7, p. 2452-2465, 1988.

KONG, H. et al. Thymidine kinase/ganciclovir and cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy-induced cell apoptosis in breast cancer cells. **Oncology Reports**, v. 30, p. 1209-1214, 2013.

KOLACHANA, P. et al.. Benzene and its phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells *in vitro* and in the bone marrow *in vivo*. **Cancer Research**, v. 53, n. 5, p. 1023-1026, 1993.

KOTTE, S.C.B.; DUBEY, P.K.; MURALI, P.M. Identification and characterization of stress degradation products of piperine and profiling of a black pepper (*Piper nigrum* L.) extract using LC/QTOF-dual ESI-MS. **Analytical Methods**, v.6, p. 8022-8029, 2014.

KRISHNAMURTHY, K.S. et al. Ideotype concept in black pepper (*Piper nigrum* L.). **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v. 19, n. 1 & 2, p. 01-13, 2010.

KUBAŘ, T. et al. Binding of Cationic and Neutral Phenanthridine Intercalators to a DNA Oligomer Is Controlled by Dispersion Energy: Quantum Chemical Calculations and Molecular Mechanics Simulations. **Chemistry – A European Journal**, v. 12, p. 280-290, 2006.

KURIAN, J.C. Ethno-medicinal Plants of India, Thailand and Vietnam. **Journal of Biodiversity**, v. 3, n. 1, p. 61-75, 2012.

KVIECINSKI, M.R. et al. SFE from *Bidens pilosa* Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 243-248, 2011.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAI, L.H. et al. Piperine suppresses tumor growth and metastasis *in vitro* and *in vivo* in a 4T1 murine breast cancer model. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, p. 523-530, 2012.

LANE, J.D.; ALLAN, V.J.; WOODMAN, P.G. Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 17, p.4059-4071, 2005.

LANT, B.; STOREY, K.B. An Overview of Stress Response and Hypometabolic Strategies in *Caenorhabditis elegans*: Conserved and Contrasting Signals with the Mammalian System. **International Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 9-50, 2010.

LAVIN, M.F; GUEVEN, N. The Complexity of p53 Stabilization and Activation. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, p. 941-950, 2006.

LEE, S.W. et al. Alkamides from the fruits of *Piper longum* and *Piper nigrum* displaying potent cell adhesion inhibition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 4544-4546, 2008.

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 12, p. 1643-1647, 2007.

LEHNINGER, A. L.; VERCESI, A.; BABABUNMI, E. A. Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. **Proceedings of National Academy of Sciences, USA**, v. 75, n.4, p.1690-1694, 1978.

LEMOS, O. F. de et al. **Conservação e Melhoramento Genético da Pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) em Associação com as Técnicas de Biotecnologia**. Belém, Pará: Embrapa Amazônia Oriental, 2011. 45 p.

LEVINE, A. J.; OREN, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. **Nature Reviews**, v. 9, p. 749-758, 2009.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LEWIS, E. A. et al. Complexity in the binding of minor groove agents: netropsin has two thermodynamically different DNA binding modes at a single site. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 9649-9658, 2011.

LI, C. et al. Apoptosis regulation by Bcl-x(L) modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel isoform gating. **Proceedings of National Academy of Sciences, USA**, v. 104, p. 12565-12570, 2007.

LIAO, G. -S.; APAYA, M. K.; SHYUR, L. F. Review Article Herbal Medicine and Acupuncture for Breast Cancer Palliative Care and Adjuvant Therapy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, Article ID 437948, 17 p.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, 2001.

LINDSTEN, T. et al. The Combined Functions of Proapoptotic Bcl-2 Family Members Bak and Bax Are Essential for Normal Development of Multiple Tissues. **Molecular Cell**, v. 6, p. 1389-1399, 2000.

LIPORACCI, H. S. N. **Plantas medicinais e alimentícias na Mata Atlântica e Caatinga: Uma revisão bibliográfica de cunho etnobotânico**. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 329 p. 2014.

LIU, L.; SONG, G.; HU, Y. GC/MS Analysis of the Essential Oils of *Piper nigrum* L. and *Piper longum* L. **Chromatographia**, v. 66, n. 9-10, p. 785-790, 2007.

LIU, Y. et al. Inhibitory effects of black pepper (*Piper nigrum*) extracts and compounds on human tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzymes, lipid peroxidation and nuclear transcription factor-kappa-B. **Natural Products Communications**, v. 5, n. 8, p. 1253-1257, 2010.

LOEWENTHAL, H.; JAHN, G. Übertragung-Suersuche Mit Carcinomatöser Mause-Asciteslussigkeit Und Ihr Verhalten Gegen Physikalische Und Chemische Einwirkungen. **Zeitschrift für Krebsforschung**, v. 37, p. 439-447, 1932.

LUCIANI, M. G. et al. The C-terminal regulatory domain of p53 contains a functional docking site for Cyclin A. **Journal of Molecular Biology**, v. 300, p. 503-518, 2000.

MA, H. et al. The roles of herbal remedies in survival and quality of life among long-term breast cancer survivors - results of a prospective study. **BMC Cancer**, v. 11, 222, 2011.

MAITI, M.; NANDI, R.; CHOWDHURI, K. The effect of pH on the absorption and fluorescence spectra of sanguinarine. **Photochemistry and Photobiology**, v. 38, n.2, p. 245-249, 1983.

MAJDALAWIEH, A. F.; CARR, R. I. *In vitro* Investigation of the Potential Immunomodulatory and Anti-Cancer Activities of Black Pepper (*Piper nigrum*) and Cardamom (*Elettaria cardamomum*). **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 2, p. 371-381, 2010.

MARTÍN-CORDERO, C. et al. Pro-Oxidant Natural Products as Anticancer Agents. **Current Drug Targets**, v.13, p.1006-1028, 2012.

MARTÍNEZ, R.; CHACÓN-GARCÍA, L. The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What is Worked and What did not Work. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, p. 127-151, 2005.

MATTSON, M. P.; KROEMER, G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 5, p. 196 - 205, 2003.

MBEMBA, F. et al. Subcellular localization and modification with ageing of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in human fibroblasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 838, n. 2, p. 211-220, 1985.

MCGAHON, A. J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. **Methods in Cell Biology**, v. 46, p. 153-185, 1995.

MEGHWAL, M.; GOSWAMI, T. K. *Piper nigrum* and Piperine: An Update. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 1121-1130, 2013.

MENDES, M. F.; PESSOA, F. L. P.; ULLER, A. M. C. An economic evaluation based on an experimental study of the vitamin E concentration present in deodorizer distillate of soybean oil using supercritical CO₂, **Journal of Supercritical Fluids**, v. 23, p. 257-265, 2002.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 131-138, 2005.

MICHELIN, E. M. Z. et al. High-pressure phase equilibrium data for systems with carbon dioxide, α -humulene and trans-caryophyllene. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 41, n. 1, p. 130-137, 2009.

MICHELIN, E. M. Z. et al. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 89-96, 2011.

MIQUEL, J.; BINNARD, R.; FLEMING, J. E. Role of metabolic rate and DNA-repair in *Drosophila* aging: implications for the mitochondrial mutation theory of aging. **Experimental Gerontology**, v. 18, p. 167-171, 1983.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170-3175, 1972.

MITTAL, R., GUPTA, R. L. *In vitro* antioxidant activity of piperine. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v.22, p. 271-274, 2000.

MIYAKADO, M.; NAKAYAMA, I.; OHNO, N. Insecticidal unsaturated isobutylamides from natural products to agrochemical leads. **In: ARNASON, J. T., PHILOGÈNE, B. J. R., MORAND, P., Eds. Insecticides of Plant Origin. Washington, DC: American Chemical Society. ACS Symposium Series 387, p. 173-187, 1989.**

MOFFATT, J. et al. Apoptosis induced by 1-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumor cells is associated with modulation of polyamine metabolism and caspase-3 activation. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 12, p. 2151-2157, 2000.

MORALES, R., Farmacología y farmacognosia como fuentes de validación y contraste en etnobotánica. **In: Monografías del Jardín Botánico. Ed Córdoba, v. 3, p. 93-98, 1996.**

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983.

MOTYL, T. et al. Apoptosis and autophagy in mammary gland remodeling and breast cancer chemotherapy. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, supplement 7, 2006.

MUJUMDAR, A. M. et al. Anti-inflammatory Activity of Piperine. **Japanese Journal of Medicinal Science & Biology**, v. 43, p. 95-100, 1990.

NAG, S. et al. The MDM2-p53 pathway revisited. **The Journal of Biomedical Research**, v. 27, n. 4, p. 254-271, 2013.

NAHAK, G.; SAHU, R.K. Phytochemical Evaluation and Antioxidant activity of *Piper cubeba* and *Piper nigrum*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 8, p. 153-157, 2011.

NAKAMOTO, K.; TSUBOI, M.; STRAHAN, G. D. Intercalating Drugs, **In: Drug and DNA Interactions**, John Wiley & Sons, Inc., p. 119-208, 2008.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI. **TP53 tumor protein p53 [*Homo sapiens (human)*] Gene ID: 7157**. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157> >. Acesso em janeiro 2016.

NEELIMA, M. et al. Ethnobotanical Studies in Rapur Forest Division of Nellore District in Andhra Pradesh. **Life Science Leaflets**, v. 11, p. 333-345, 2011.

NEIDLE, S. The molecular basis for the action of some DNA-binding drugs. **Progress in Medicinal Chemistry**, v.16, p. 151-221, 1979.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th ed. New York: W.H. Freeman, 2005, 1216 p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. [Trad. Ana B. G. da Veiga et al.] 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, 1220 p.

NIST MASS-SPECTRAL LIBRARY - STANDARD REFERENCE DATA SERIES NATIONAL INSTITUTE OF STANDARD AND TECHNOLOGY. **NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search**

Program (Data Version: NIST 11, Software Version 2.0 g) 2012. Disponível em: < <http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm> >. Acesso em março 2016.

NOUMEDEM, J. A. K. et al. *In vitro* antibacterial and antibiotic-potential activities of four edible plants against multidrug-resistant gram-negative species. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, 190, 2013. 10 p.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature**, v. 4, p. 592-603, 2004.

ORAV, A. et al. Effect of storage on the essential oil composition of *Piper nigrum* L. fruits of different ripening states. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2582-2586, 2004.

OSAWA, C. C.; FELICIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

OURIQUE, F. et al. DNA Damage and inhibition of AKT pathway in MCF-7 cells and Ehrlich Tumor in Mice Treated with 1,4-Naphthoquinones in combination with ascorbate. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2015, article ID 495305, 10 p.

PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P. J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 497-503, 2007.

PANTEL, K.; COTE, R. J.; FODSTAD, O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. **Journal of National Cancer Institute**, v. 91, p. 1113-1124, 1999.

PARISOTTO, E. B. et al. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 101-107, 2012.

PARMAR, V. R. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PARMAR, V. S. et al. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 1069-1078, 1998.

PATIL, U. K.; SINGH, A.; CHAKRABORTY, A. K. Role of Piperine as a Bioavailability Enhancer. **International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 16-23, 2011.

PELUCCHI, C. et al. Cancer risk associated with alcohol, and tobacco use: focus on upper aerodigestive tract and liver. **Alcohol Research & Health**, v. 29, n. 3, p.193-198, 2006.

PENEDO, P. L. M. **Estudo sobre a potencialidade da extração de produtos naturais utilizando CO₂ supercrítico**. Tese (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, Rio de Janeiro. 2007. 126 f.

PERAKIS, C.; LOULI, V.; MAGOULAS, K. Supercritical fluid extraction of black pepper oil. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 386-393, 2005.

PEREIRA, L. A. et al.. Medicinal plants of a community quilombola in the Eastern Amazônia: Utilitarian aspects of species of the families Piperaceae and Solanaceae. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 1385-1388, 2007.

PICAUD, S. et al.. Amorpho-4,11-diene synthase: Mechanism and stereochemistry of the enzymatic cyclization of farnesyl diphosphate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 448, p. 150-155, 2006.

PICH, C.T. **Nucleases sintéticas: análise da atividade de clivagem de DNA, de clivagem de proteína e genotóxica de compostos metálicos**. Tese (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 2010. 139 f.

PUCK, T. T.; MARCUS, P. I. A rapid method for viable cell titration and clone production with Hela cells in tissue culture: the use of X-irradiated

cells to supply conditioning factors. **Proceedings of National Academy of Sciences**, USA, v. 41, n. 7, p. 432-437, 1955.

PFUND, Y.; CHAMBERLIN, B. L.; MATZGER, A. J. The Bioenhancer Piperine is at Least Trimorphic. **Crystal Growth & Design**, v. 15, n. 5, p. 2047-2051, 2015.

QUIRANTES-PINÉ, R. et al. High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. **Journal of Chromatography A**, v. 12, p. 5391-5397, 2009.

RAAY, B. et al. Targeting of piperine intercalated in mannose-coated liposomes in experimental leishmaniasis. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v.36, p. 248-251, 1999.

RAICA; M.; CIMPEAN, A.M. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. **Pharmaceuticals**, 3, p. 572-599, 2010. doi:10.3390/ph3030572

RASKIN, I. et al. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, p. 222-232, 2002.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB Journal**, v. 22, p. 659-661, 2007.

REED, J.C. Drug Insight: cancer therapy strategies based on restoration of endogenous cell death mechanisms. **Nature Clinical Practice Oncology**, v. 3, n.7, p. 388-398, 2006.

REICH, T. The concept of psoriasis as a systemic inflammation: implications for disease management. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, (Suppl. 2), p. 3-11, 2012.

RESCIFINA, A. et al. Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, 95e115, 2014.

REYES, F. A. et al. Adsorbent-assisted supercritical CO₂ extraction of carotenoids from *Neochloris oleoabundans* paste. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 112, p. 7-13, 2016.

RHO, M. C. et al. ACAT inhibition of alkamides identified in the fruits of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v. 6, p. 899-903, 2007.

RICCI, M. S.; ZONG, W. X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**, v.11, p. 342-357, 2006.

ROBBINS, S.L; COTRAN, R. S.; MITCHELL, R. N. **Fundamentos de patologia [de] Robbins & Cotran**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 829 p.

ROCKWELL, S.; LIU, Y.; HIGGINS, S. A. Alteration of the effects of cancer therapy agents on breast cancer cells by the herbal medicine black cohosh. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 90, n. 233-239, 2005.

RONINSON, I. B. Tumor Cell Senescence in Cancer Treatment. **Cancer Research**, v. 3, p. 2705-2715, 2003.

ROZENKRANZ, V.; WINK, M. Alkaloids Induce Programmed Cell Death in Bloodstream Forms of Trypanosomes (*Trypanosoma b. brucei*). **Molecules**, v. 13, p. 2462-2473, 2008.

RYSMAN, E. et al. *De novo* lipogenesis protects cancer cells from Free Radicals and Chemotherapeutics by Promoting Membrane Lipid Saturation. **Cancer Research**, v. 70, n. 20, p. 8117-8126, 2010.

SAHU, P. et al. Enhanced Hepatoprotective activity of Piperine Loaded Chitosan Microspheres. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 4, n. 4, p. 229-233, 2012.

SAKAGUCHI, K. et al. Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. **Biochemistry**, v. 36, p. 10117-10124, 1997.

SALIMPOUR, F.; MAZOOJI, A.; DARZIKOLAEI, S. A. Chemotaxonomy of six *Salvia* species using essential oil composition

markers. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 9, p. 1795-1805, 2011.

SALZER, U. J.; FURIA, T. E. The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasoning - A critical review. **C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 9, n. 4, p. 345-373, 1977.

SAMYKUTTY, A. et al. Piperine, a Bioactive Component of Pepper Spice Exerts Therapeutic Effects on Androgen Dependent and Androgen Independent Prostate Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, e65889, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0065889

SCARPELLINI, M. et al. Phosphate diester hydrolysis and DNA damage promoted by new cis-aqua/hydroxyl cooper (II) complexes containing tridentate imidazole-rich ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 25, p. 8353-8365, 2003.

SCHULZ, H. et al. Characterization of Peppercorn, Pepper Oil, and Pepper Oleoresin by Vibrational Spectroscopy Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3358-3363, 2005.

SCOTT, I. M. et al. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 65-75, 2008.

SCOTT, I. M. et al. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: Synergistic interaction of piperamides. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 4, p. 137-144, 2002.

SCOTT, I.M. et al. Analysis of Piperaceae Germoplasm by HPLC and LCMS: A Method for Isolating and Identifying Unsaturated Amides from *Piper* ssp Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 83, 1907-1913, 2005.

SCHWEIGERT, N.; ZEHNDER, A.J.B.; EGGEN, R.I.L. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 81-91, 2001.

SEMLER, S.; GROSS, G.G. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1566-1567, 1988.

SETHI, G. et al. Multifaceted link between cancer and inflammation. **Bioscience Reports**, v. 32, p 1-15, 2012.

SERTIE, J. A. et al. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**, v. 12, p. 338-344, 2005.

SHERR, C. J. Cancer Cell Cycles. **Science**, v. 274, p. 1672 - 1677, 1996.

SHULTZ, T. D.; CHEW, B. P.; SEAMAN, W. R. Differential stimulatory and inhibitory responses of human MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid and conjugated linoleic acid in culture. **Anticancer Research**, v. 12: p. 2143-2145, 1992.

SIES, H. **Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants**. New York: Academic Press, 1991.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 8022-8028, 1994.

SILVA, M. N. DA; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. DE. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na b-lapachona e derivados. **Química Nova**, v.26, n. 3, p. 407-416, 2003.

SILVA, A.C.P.R. da; OLIVEIRA, M.N. de. **Caracterização botânica e química de três espécies do gênero *Piper* no Acre**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000. 13p. (Boletim de Pesquisa, 23).

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. Cap.18, p. 467-495. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia da planta ao medicamento, 5 ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

SINGH, G. **Chemistry of Terpenoids and Carotenoids**. New Delhi, India: Discovery Publishing House, 2007. 286 p.

SINGH, J.; DHAR, K.L.; ATAL, C.K. Studies on the genus *Piper*- IX, Structure of trichostachine, an alkaloid from *Piper trichostachyon*. **Tetrahedron Letters**, v. 56, p. 4975-4978, 1969.

SINGH, N.K. et al. UV-spectrophotometric method development for estimation of piperine in Chitrakadi Vati. **Der Pharmacia Lettre**, v. 3, p. 178-182, 2011.

SINGH, V. K.; YADAV, P.; TADIGOPPULA, N. Recent advances in the synthesis, chemical transformations and pharmacological studies of some important dietary spice's constituents. **Chemistry & Biology Interface**, v. 4, n.2, p. 66-99, 2014.

SKRZYDLEWSKA, E.; FARBISZEWSKI, R. Protective effect of N-acetylcysteine on reduced glutathione, reduced glutathione-related enzymes and lipid peroxidation in methanol intoxication. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 57, p. 61-67, 1999.

SOTO, A.M.; SONNENSCHNEIN, C. The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the paradigm? **Bioassays**, v. 26, p. 1097-1107, 2004.

SOTO, A.M.; SONNENSCHNEIN, C. The tissue organization field theory of cancer: A testable replacement for the somatic mutation theory. **Bioessays**, v.33, n.5, p. 332 -340, 2011.

SPIERINGS D. et al. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. **Science**, v. 310, p. 66-67, 2005.

SREEDHARA, A.; COWAN, J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 6, p. 337-347, 2001.

SREEDHARA, A.; FREED, J. D.; COWAN, J. A. Efficient Inorganic Deoxyribonuclease. Greater than 50-Million-Fold Rate Enhancement in Enzyme-Like DNA Cleavage. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 37, p. 8814-8824, 2000.

SRUTHI, D. et al. Correlation between chemical profiles of black pepper (*Piper nigrum* L.) var. Panniyur-1 collected from different locations. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 31, p. 2349-2357, 2013.

SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S.V.; REDDANNA, P. Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia *in vitro*. **Cancer Letters**, v. 224, p. 31-43, 2005.

SUCHA, L. et al. The cytotoxic effect of α -tomatine in MCF-7 human adenocarcinoma breast cancer cells depends on its interaction with cholesterol in incubation media and does not involve apoptosis induction. **Oncology Reports**, v. 30, p. 2593-2602, 2013.

SUN, J. D-Limonene: Safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, p. 259-264, 2007.

SUNILA, E.S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 339-346, 2004.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C.R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 157-170, 2013.

TAK, J.K.; LEE, J.H.; PARK, J.W. Resveratrol and piperine enhance radiosensitivity of tumor cells. **BMB Reports**, v. 45, n. 4, p. 242-246, 2012.

TAM, K. The roles of doxorubicin in hepatocellular tumor. **ADMET & DMPK**, v.1, n.3, p. 29-44, 2013.

TAN, L.F. et al. DNA binding and photocleavage studies of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{NMIP})]2^+$. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, p. 2191-2198, 2005.

TAWANI, A. et al. Evidences for Piperine inhibiting cancer by targeting human G-quadruplex DNA sequences. **Scientific Reports**, 6:39239, 2016. DOI: 10.1038/srep39239

THERMOFISHER SCIENTIFIC. **Propidium Iodide**. 2016. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/propidium-iodide.html>>. Acesso em julho 2016.

TROMBONE, A. P. F. et al. Endocytosis of DNA-Hsp65 Alters the pH of the Late Endosome/Lysosome and Interferes with Antigen Presentation. **PLoS ONE**, v. 2, n. 9, e923, 2007. doi:10.1371/journal.pone.0000923

TULER, A. C.; SILVA, N. C. B. da. Women's ethnomedicinal knowledge in the rural community of São José da Figueira, Durandé, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.24, n.2, p. 159-170, 2014.

TUMIR, L.-M.; RADIĆ STOJKOVIĆ, M.; PIANTANIDA, I. Come-back of phenanthridine and phenanthridinium derivatives in the 21st century. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v.10, p. 2930-2959, 2014.

VARDY, J. et al. Investigation of herb-drug interactions with ginkgo biloba in women receiving hormonal treatment for early breast cancer. **SpringerPlus**, 2, 126, 2013. doi: 10.1186/2193-1801-2-126

VARIYAR, P., BANDYOPADHYAY, T. On the carotenoids of ripened pepper berries *Piper nigrum* Linn. **Journal of Food Science and Technology**, v.27, n.5, p.294-295, 1990.

VASEVA, A.V.; MOLL, U.M. The mitochondrial p53 pathway. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1787, p. 414-420, 2009.

VAUX, D.L.; STRASSER, A. The molecular biology of apoptosis. **Proceedings of National Academy of Sciences, USA**, v. 93, p.2239-2244, 1996.

VELLOSO, J. M. **Memórias, e extractos sobre a pipereira negra (*Piper nigrum* L.) que produz o fructo conhecido vulgarmente pelo nome de pimenta da Índia**. Nos quaes se trata de sua cultura, commercio, usos, &c, &c. Lisboa: Na offic. de João Procopio Correa da Silva impressor da Santa Igreja Patriarcal. 1798, 40 p.

VELU, C. S. et al. Human p53 is inhibited by glutathionylation of cysteines present in the proximal DNA-binding domain during oxidative stress. **Biochemistry**, v. 46, p. 7765-7780, 2007.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, p. 31-149, 2003.

VIGUSHIN, D. M. et al.. Phase I and pharmacokinetics study of d-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Research Campaign

Phase I/II Clinical Trials Committee. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 42, n. 2, p. 111-117, 1998.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, p. 307-310, 2000.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis. **A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2 ed. Berlin: Spriger-Verlag, 1996.

WANG, J.; YI, J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. **Cancer Biology & Therapy**, v.7, n.12, p. 1875-1884, 2008.

WANG, Y.H. et al. Anticancer principles from medicinal *Piper* (Hú Jiāo) Plants. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v.4, p. 8-16, 2014.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 351-360, 2002.

WILLIAMS C.S.; MANN M.; DUBOIS R.N. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. **Oncogene**, v.18, p. 7908-7916, 1999.

WILSON, W.D. et al. Antiparasitic compounds that target DNA. **Biochimie**, v. 90, p. 999-1014, 2008.

WINK, M.; SCHMELLER, T.; LATZ-BRÜNING, B. Modes of Action of Allelochemical Alkaloids: Interaction with Neuroreceptors, DNA, and other Molecular Targets. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, n. 11, p. 1881-1937, 1998.

WINK; M.; TWARDOWSKI, T. Allelochemical properties of alkaloids. Effects on plants, bacteria and protein biosynthesis, Chapter 10, p 129-150. **In:** RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. (editors) Allelopathy. Basic and applied aspects. London; Chapman & Hall. 1992.

WOLF, J.K.; RAMIREZ, P.T. The molecular biology of cervical cancer. **Cancer Investigation**, v. 19, n. 3, p. 621-629, 2001.

WONG, N. A. C. S.; MANGWANA, S. KIT and PDGFR α mutational analyses of mixed cell-type gastrointestinal stromal tumors. **Histopathology**, v. 51, p. 758-762, 2007.

WOOD, A.D.; BARROW; M.L.; JAMES, D.J. Piperine determination in Pepper (*Piper nigrum* Linn. and its oleoresins - A reverse-phase High-performance Liquid Chromatographic Method. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 2, p. 55-64, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO - **Cancer Country Profiles**, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/country-profiles/bra_en.pdf?ua=1>. Acesso em dezembro de 2016.

WU, R. control Mechanisms of Glycolysis in Ehrlich Ascites Tumor Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 240, p. 2827-2832, 1965.

XIN, Y. W.; QI, W. D.; HAN, C. Y. Traditional Chinese medicine for treating respiratory cancer. CN Patent: 101455834 A, 2009.

XU, H. et al. Effects of the ancillary ligands of polypyridyl ruthenium (II) complexes on the DNA-binding behaviors. **New Journal of Chemistry**, v. 27, p. 1255-1263, 2003.

YAFFE, P.B. et al. Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 94, p. 109-114, 2013.

YAFFE, P.B. et al. Piperine, an alkaloid from black pepper, inhibits growth of human colon cancer cells via G1 arrest and apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. **Molecular carcinogenesis**, v. 54, n.10, p. 1070-1085, 2015.

YEN, W.L.; KLIONSKY, D.J. How to Live Long and Prosper: Autophagy, Mitochondria, and Aging. **Physiology**, v.23, p. 248-262, 2008.

YOSHIDA, N.C. **Análises filogenéticas e estudo do metabolismo fenilpropanoídico em espécies de *Piper***. Tese (doutorado). Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo, S.P. 199 p. 2013.

YU, J.; ZHANG, L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331, n. 3, p. 851-858, 2005.

ZAHDIKARD, M. et al. Synthesis, characterization and apoptotic activity of quinazolinone Schiff base derivatives toward MCF-7 cells via intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. **Scientific Reports**, 5:11544. DOI: 10.1038/srep11544. 2015.

ZARAI, Z. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvents extract, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **LWT - Food Science and Technology**, v.50, p. 634-641, 2013.

ZAVALETA, A.N. **Medicinal Plants of the Borderlands: A Semi-Bilingual Ethnobotanical Resource Guide**. Indiana, USA: AuthorHouse. 2012, 340 p.

ZELKO, I.N., MARIANI, T.J., FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 33, p. 337-345, 2002.

ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES M.A.A. Standardized Low-cost Batch SFE Units for University Education and Comparative Research. **In: Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**, Versailles, p. 577-581, 2003.

ZHANG, H. et al. Synthesis, crystal structure, cytotoxic activity and DNA-binding properties of the copper (II) and zinc (II) complexes with 1-[3-(2-pyridyl) pyrazol-1-ylmethyl] naphthalene. **Inorganic Biochemistry Journal**, v. 99, p. 1119-1125, 2005.

ZHANG, Y.; XIONG, Y.; YARBROUGH, W. G. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. **Cell**, v. 92, p. 725-734, 1998.

ZHAO, Y. et al. Redox proteomic identification of HNE-bound mitochondrial proteins in cardiac tissues reveals a systemic effect on

energy metabolism after doxorubicin treatment. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 72, p. 55-65, 2014.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological Features of Cell Death. **Physiology**, p. 19, n. 3, p. 124-128, 2004.

ANEXOS

ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO

Primeira página do artigo publicado no periódico *Journal of Ethnopharmacology*




Piper nigrum ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells






Valdelúcia Maria Alves de Souza Grinevicius^a, Maicon Roberto Kviecinski^b,
Nádia Sandrini Ramos Santos Mota^a, Fabiana Ourique^a,
Luiza Sheyla Evenni Porfirio Will Castro^a, Rafaela Rafognato Andreguetti^a,
João Francisco Gomes Correia^a, Danilo Wilhem Filho^c, Claus Tröger Pich^d,
Rozangela Curi Pedrosa^{a,*}

ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO

Comprovante de submissão do artigo “” ao *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Journal of Agricultural and Food Chemistry - Account Created in ACS Paragon Plus  [Entrada x](#)

 Journal of Agricultural and Food Chemistry <onbehalfof+jafco+jafco.acs.org@manuscriptcentral.com>
para mim 

 inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem

17-Aug-2016

Dear Mrs. Grinevicius:

A manuscript titled Antitumor activity of ethanolic and supercritical extracts from *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina through cell cycle arrest and apoptosis induction (J-2016-03675v) | Pedrosa to the Journal of Agricultural and Food Chemistry.

Because you are listed as a co-author for this manuscript, the ACS Paragon Plus system has automatically created a user account for you. You can access this account at the ACS P

<http://paragonplus.acs.org/login>

Your USER ID for this account is:

USER ID: valgrinev@gmail.com

Please note that due to recent security improvements, we cannot provide you with your password in this email. You can re-set and retrieve it by please using the Forgot User ID/Pass page site given above.

Thank you for your participation.

Sincerely,

Prof. Thomas Hofmann

Editor-in-Chief

Journal of Agricultural and Food Chemistry

Fax: 1-202-513-8943

Email: hofmann-office@jafco.acs.org