

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA – PPGBTOX**

**EFEITO IN VITRO DO EXTRATO DE *Solanum
sessiliflorum*: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTITUMORAL (MCF-7 E HT29)**

TESE DE DOUTORADO

Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

EFEITO IN VITRO DO EXTRATO DE *Solanum sessiliflorum*: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL (MCF-7 E HT29)

Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner

Tese de doutorado apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Área de concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica**.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS, Brasil
2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Montagner, Greice Franciele Feyh dos Santos
Efeito in vitro do extrato de Solanum sessiliflorum:
atividade antioxidante e antitumoral (MCF-7 E HT29) /
Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner.-2014.
99 f.; 30cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2014

1. Caracterização química 2. Atividade antioxidante 3.
Atividade antitumoral I. Cruz, Ivana Beatrice Mânica da
II. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA – PPGBTOX**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado**

**EFEITO IN VITRO DO EXTRATO DE *Solanum sessiliflorum*:
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL (MCF-7 E HT29)**

elaborada por
Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dra.
(presidente/orientadora)

Daniela da Rosa Leal, Dr. (UFSM)

Félix Antunes Soares, Dr. (UFSM)

Guilherme Bergamaschi Bresciani, Dr. (UA)

Michel Mansur Machado, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 05 de novembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida, pelos meus objetivos já alcançados e por estar sempre iluminando o meu caminho.

Ao meu esposo Eduardo, por seu amor, dedicação, incentivo, compreensão nos dias de ausência, e por sempre estar ao meu lado sempre me apoiando.

À minha família, em especial aos meus pais, Enio e Marelei, pelo carinho e incentivo depositados em mim desde o princípio. Aos demais familiares, Suzana e Luiz, pelo carinho e atenção.

À minha orientadora Prof^a Ivana, pela oportunidade, esforço dedicado, confiança, amizade, paciência e por todos os ensinamentos transmitidos. A você, quero expressar toda minha gratidão e admiração pela pessoa que és e pelo exemplo de dedicação e amor a pesquisa.

Às minhas grandes amigas Fernanda Lima e Maria Fernanda, agradeço pela amizade verdadeira e pela ajuda imprescindível e incansável em todos os momentos.

A toda a equipe do laboratório de Biogenômica que contribuiu para a execução da parte experimental deste trabalho, em especial a Francine, Alencar, Fernanda, Eduardo, Clarice, Pauline e Felipe.

Ao Prof Euler Ribeiro e a UNATI/UEA pela colaboração.

À Prof^a Margareth Athayde, Prof Félix Soares e aos colegas Aline e Rômulo pelo auxílio e apoio.

À Universidade Federal de Santa Maria, referência em qualidade pela formação acadêmica.

A CAPES, FAPEAM e CNPq pela concessão de recursos a pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, pelo alto nível de seus docentes e discentes na produção científica.

A todos os demais amigos e pessoas que não foram citadas, mas que de alguma forma foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITO IN VITRO DO EXTRATO DE *Solanum sessiliflorum*: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL (MCF-7 E HT29)

AUTORA: Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, 05 de Novembro de 2014.

Estudos epidemiológicos têm sugerido que a ingestão de frutas e verduras atuam na prevenção de diversas patologias, tais como o câncer e doenças cardiovasculares. Isto pode ser explicado por estes alimentos apresentarem compostos bioativos na sua matriz nutricional que podem ter diversas atividades biológicas, incluindo atividade antioxidante, antitumoral, genoprotetor e na prevenção da oxidação do LDL. Entretanto, uma grande parte dos frutos ainda precisa ser estudada. Este é o caso do *Solanum sessiliflorum* popularmente conhecido como mana-cubiu ou cubiu fruto oriundo da região amazônica do Brasil, considerado a “maçã amazônica” que é popularmente utilizado como medicamento no controle do prurido da pele e na redução dos níveis de colesterol, glicose e ácido úrico no sangue. Uma vez que estudos sobre o *S. sessiliflorum* são ainda incipientes, o objetivo deste estudo foi caracterizar quimicamente o extrato de *S. sessiliflorum* e realizar ensaios de prospecção para determinar seu potencial efeito antioxidante, antitumoral e na prevenção da oxidação do colesterol LDL através de ensaios *in vitro*. Para isto, o estudo foi conduzido em duas etapas, na primeira etapa foram preparados dois extratos hidroalcoólicos 1) da casca e 2) da semente e polpa do *S. sessiliflorum*. Após preparo do extrato, foi conduzida a caracterização química do mesmo através da determinação de compostos bioativos totais (flavonoides, taninos e polifenóis), em seguida, o extrato foi caracterizado quimicamente por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na segunda etapa, foi avaliado o potencial antioxidante e citoprotetor em plasma humano exposto ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e também em PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells). Também foi verificada a atividade antitumoral em linhagens de célula de câncer de mama (MCF7) e de câncer de colorretal (HT29), avaliando a proliferação e a viabilidade celular. Após, foi avaliado o efeito na oxidação do LDL (isolado de indivíduos saudáveis). Os resultados obtidos indicam que o extrato de *Solanum sessiliflorum* apresenta em sua composição compostos bioativos totais como os flavonóides, taninos e polifenóis. Estes resultados corroboram com as análises realizadas por CLAE que indicaram que os extratos apresentam em sua composição ácido gálico, ácido caféico, quercetina, rutina, β-caroteno e catequina (este último exceto no extrato de polpa e semente). Quando analisado o efeito antioxidante *in vitro* foi observado que os extratos nas concentrações testadas não apresentaram potencial pró-oxidante. No entanto o extrato da polpa e da semente apresentou atividade antioxidante e citoprotetora. Também foi observado que o extrato da polpa e da semente apresentou atividade antígeno-tóxica e antitumoral específica para células de câncer de colorretal (teste *in vitro* realizado com linhagem de células HT29), e não foi observado atividade antitumoral em relação à linhagem de células de câncer de mama (MCF7), pelo

contrário do esperado, em altas concentrações o extrato aumentou a viabilidade e a proliferação celular. Outro importante achado foi que ambos os extratos, semente e polpa e casca apresentaram potencial de inibição da oxidação do LDL. Em síntese, os dados obtidos nos experimentos *in vitro* indicam que o *S. sessiliflorum* apresenta atividade antioxidante, antitumoral, antígenotóxica e potencial de inibir a oxidação do LDL. Estes resultados devem-se a presença de compostos bioativos em sua composição como flavonóides, polifenóis e catequina. Na literatura há diversos estudos que relatam que a ingestão de alimentos ricos nestes tipos de compostos está relacionada à prevenção de diversas doenças crônicas, como o câncer e doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: *Solanum sessiliflorum*. Caracterização química. Antitumoral. Antioxidante. LDL-oxidado.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree
Graduate Program Biological Sciences: Biochemical Toxicology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

IN VITRO EFFECT OF *Solanum sessiliflorum* EXTRACT: ANTIOXIDANT AND ANTITUMORAL ACTIVITY (MCF-7 and HT29)

AUTHOR: Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner

ADVISE: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, November 05, 2014.

Epidemiological studies have suggested that intake of fruits and vegetables act in the prevention of several diseases such as cancer and cardiovascular diseases. This can be explained by these bioactive compounds are present in their food nutritional matrix that may have different biological activities, including antioxidant, antitumor, genoprotective and in preventing the oxidation of LDL. However, much of the fruit remains to be studied. This is the case of *Solanum sessiliflorum* popularly known as mana-cubiu or cubíu fruit coming from the Amazon region of Brazil, considered the "Amazonian apple". This fruit is popularly used as a medicine to control the itching of the skin and reducing cholesterol levels, glucose and uric acid in the blood. Once *S. sessiliflorum* studies are still incomplete, the aim of this study was to chemically characterize the extract and perform tests to determine their prospecting potential antioxidant, antitumoral and effect *in vitro* on preventing the oxidation of LDL. For this, the study was conducted in two stages, the first stage was prepared hydroalcoholic extract of the peel and seed and pulp. After preparation of the extract, the chemical characterization was conducted by the same determination of total bioactive compounds (flavonoids, tannins and polyphenols), then the extract was chemically characterized by high performance liquid chromatography (HPLC). In the second step, we evaluated the antioxidant potential and in citoprotetor in and in PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) and human plasma exposed to hydrogen peroxide (H₂O₂). We also evaluated the antitumor activity in lines of breast (MCF7) and colorectal (HT29) cancer cell cancer, assessing cell proliferation and viability. After this, the effect has been evaluated on the oxidation of LDL (isolated from healthy individuals). The results obtained indicate that the extract of *Solanum sessiliflorum* presents in its composition total bioactive compounds such as flavonoids, tannins and polyphenols. These results corroborate the analysis performed by HPLC which indicated that the extracts present in its composition gallic acid, caffeic acid, quercetin, rutin, β –carotene and catechin (the latter except in the pulp and seed extract). When examined the *in vitro* antioxidant effect was observed that extracts at different concentrations did not show any pro-oxidant potential. However extract the pulp and the seeds had antioxidant and cytoprotective activity. It was also observed that the extract of the pulp and the seeds had antigenotoxic and specific antitumor activity for colorectal cancer cells (*in vitro* tests performed with strain HT29 cells), and no antitumor activity was observed for breast cancer cells (MCF7), instead of the expected high concentrations in the extract increased the viability and proliferation. Another important finding was that both extracts, seeds and pulp and peel showed potential for inhibiting oxidation of LDL. In synthesis, the *in vitro* results obtained data indicate that *S. sessiliflorum* has antioxidant, antitumor and citoprotetor activity and present potential to inhibit the oxidation of LDL. These

results should be proof of the presence of bioactive compounds in its composition as flavonoids, polyphenols and catechins. In literature there are several studies that report that eating foods rich in these types of compounds are related to the prevention of several chronic diseases, such as cancer and cardiovascular diseases.

Key words: *Solanum sessiliflorum*. Chemical characterization. Antitumoral. Antioxidant. Oxidized LDL.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 O ENVELHECIMENTO E DOENÇAS CRÔNICAS	10
1.1.1 Doenças cardiovasculares	11
1.1.2 Câncer.....	12
1.2 O PAPEL DO DESBALANÇO OXIDATIVO EM DOENÇAS CRÔNICAS.....	12
1.2.1 O estresse oxidativo e o processo da carcinogênese	15
1.2.2 O estresse oxidativo e as doenças cardiovasculares: a oxidação do LDL	17
1.3 O PAPEL DA DIETA NA PREVENÇÃO DAS DOENÇAS	18
1.3.1 Dieta do Mediterrâneo	19
1.3.2 Dieta Oriental	20
1.3.3 Dieta Amazônica	21
1.4 SOLANUM SESSIFLORUM: POTENCIAL EFEITO NA PREVENÇÃO DE DOENÇAS CRÔNICAS.....	22
2 OBJETIVO	26
2.1 GERAL	26
2.2 ESPECÍFICOS	26
3 ARTIGOS CIENTÍFICOS	27
3.1 ARTIGO 1.....	28
3.1.1 Caracterização química, atividade antioxidante e antitumoral <i>in vitro</i> do <i>Solanum sessiliflorum</i>	28
<i>Introduction</i>	33
<i>Material and methods</i>	35
<i>Results</i>	43
<i>Discussion</i>	45
<i>Conclusions</i>	49
3.2 ARTIGO 2.....	62
3.2.1 Efeito do <i>in vitro</i> do <i>Solanum sessiliflorum</i> na oxidação do LDL	62
<i>Introduction</i>	65
<i>Material and Methods</i>	66
<i>Results</i>	71
<i>Discussion</i>	76
<i>Conclusions</i>	78
<i>References</i>	79
4 DISCUSSÃO	85
5 CONCLUSÃO	89
6 REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 O envelhecimento e doenças crônicas

Nas últimas duas décadas, o envelhecimento populacional no Brasil tornou-se objeto de discussões e estudos, devido ao aumento progressivo de indivíduos nessa faixa etária (PANZIERA et al 2011) uma vez que estão nascendo menos pessoas e morrendo menos crianças, restando mais adultos e jovens. A Organização as Nações Unidas (ONU) estabeleceu este fenômeno como a “Era do Envelhecimento”, que compreende o período de 1975 até 2025 (CHAIMOVICKZ 1997).

A definição de envelhecimento é difícil e controversa, porém, este faz parte do desenvolvimento biológico de um organismo vivo multicelular. Ou seja, o envelhecimento biológico é considerado uma das etapas biológicas da vida de todo o indivíduo (RIBEIRO & CRUZ, 2012).

O envelhecimento humano é um fenômeno complexo, com o acúmulo de mudanças fisiológicas ocasionadas pelo tempo que conduzem o indivíduo a uma maior vulnerabilidade a doenças, principalmente às doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) e, com isso, ao desenvolvimento de incapacidades associadas a esse processo (GIL et al 2006). Há diversas teorias que tentam explicar o envelhecimento, porém, o fato é que não existe uma única explicação aceita do porque envelhecemos. Entretanto, como todos os membros de uma mesma espécie apresentam processos de envelhecimento que são comuns, acredita-se que parte deste fenômeno seja universal e geneticamente programado (RIBEIRO & CRUZ, 2012).

Outro importante fator é que o envelhecimento é caracterizado por ser um fenômeno universal, pois todos os animais envelhecem, inclusive o ser humano. Este processo está associado ainda com o aumento da fragilidade a doenças, pois ocorrem modificações nas células, tecidos e órgãos (RIBEIRO & CRUZ 2012). Este processo também não pode ser revertido e/ou interrompido, apenas poder ser desacelerado. Ou seja, pode-se protelar o aparecimento de doenças e disfunções relacionadas à idade através de comportamentos preventivos, como o caso da dieta,

hábito de exercitar-se, a não utilização de substâncias como o álcool e cigarro (MEDAWAR 1952; KIRKWOOD 2000).

Diversas investigações tem sugerido que 25 a 30% da longevidade humana é atribuída a fatores genéticos, sendo que os demais 75% correspondem diretamente a fatores ambientais, como os citados anteriormente (HERSKIND et al 1996). Juntamente com o envelhecimento biológico, temos também a maior susceptibilidade do indivíduo ao aparecimento de doenças crônicas, como as doenças cardiovasculares e o câncer.

1.1.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte no mundo: mais pessoas morrem anualmente dessas desordens do que qualquer outra causa de morte (IRITI & VITALINI 2012). Os dados do perfil de mortalidade no Brasil indicam que as doenças do aparelho circulatório (com predomínio das doenças cerebrovasculares e doença isquêmica do coração) estão entre as principais causas de morte (CERVATO et al 1997).

Uma quantidade extensa de estudos epidemiológicos têm indicado vários fatores de risco envolvidos na etiologia das doenças cardiovasculares, sendo um dos principais fatores associados o envelhecimento (BRAUNWALD et al 2005). Além do envelhecimento há também outros fatores com importante relevância, tais como: dieta, sedentarismo e tabagismo. Tais fatores são responsáveis por aproximadamente 80% dos casos de doenças coronarianas e acidentes cerebrovasculares (IRITI & VITALINI 2012).

Estudos clínicos mostraram mudanças no colesterol dietético que podem promover alterações nos níveis séricos de colesterol e evidências de que o efeito do colesterol dietético no plasmático pode ser significativamente modificado pela quantidade e qualidade dos ácidos graxos ingeridos. Além disso, tem sido demonstrada a existência de associação entre alguns fatores de risco – obesidade, hipertensão, dislipidemias – e a ingestão de macro e micronutrientes (CERVATO et al 1997). Por outro lado, não é de hoje que existem relatos de um sinergismo entre esses fatores de tal forma que a presença simultânea de vários deles aumenta o

perigo de desenvolver a doença em proporção maior àquela esperada com a soma de cada um individualmente (Organização Mundial da Saúde – OMS, 1990).

1.1.2 Câncer

A OMS tem indicado que de 2000 até 2020, em países desenvolvidos e em desenvolvimento, é esperado um aumento no número de casos de indivíduos com câncer (OMS, 2003). No Brasil, nos anos de 1930, o câncer era a 5ª causa de morte, passando para a 3ª nos anos de 1980 (Instituto Nacional de Câncer – INCA, 2003). Atualmente, no Brasil, o câncer tem sido a segunda causa de morte por doença, apenas superada pelas doenças cardiovasculares (GARÓFOLO et al 2004).

O câncer é definido como uma enfermidade multicausal crônica, caracterizada pelo crescimento descontrolado das células. Sua prevenção tem tomado uma dimensão importante no campo da pesquisa, uma vez que está entre uma das principais causas de mortalidade no mundo (GARÓFOLO et al 2004). O desenvolvimento de várias das formas mais comuns de câncer resulta de uma interação entre fatores genéticos e ambientais, sendo o mais notável desses fatores a dieta (BÉLIVEAU & GINGRAS, 2007). Béliveau & Gingras (2007) descrevem que dietas inadequadas podem aumentar em 30% o risco do desenvolvimento do câncer, risco igual ao do tabagismo. Há diversas teorias que explicam o processo da carcinogênese, no entanto, uma das mais aceitas é a teoria baseada no desbalanço do metabolismo oxidativo (BÉLIVEAU & GINGRAS, 2007).

1.2 O papel do desbalanço oxidativo em doenças crônicas

O desbalanço oxidativo nas doenças crônicas é caracterizado pelo processo do estresse oxidativo. O estresse oxidativo dá-se por uma maior produção de espécies reativas (ERs) em relação aos mecanismos de defesa antioxidante (tanto endógeno quanto exógeno) (OLIVEIRA & SCHOFFEN 2010).

No organismo humano as espécies reativas (tanto de oxigênio quanto de nitrogênio) são formadas por diversos processos metabólicos (BARREIROS et al, 2006) e/ou por diferentes fatores ambientais (MOTA et al, 2004). Estas moléculas são quimicamente instáveis, apresentam meia vida extremamente curta e são capazes de reagir com inúmeros componentes celulares (BERRA et al, 2006). Como exemplos de espécies reativas de oxigênio (EROs) podemos destacar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH\cdot$) e como exemplo de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) destacamos óxido nítrico ($NO\cdot$) e o peróxinitrito ($NOO\cdot$) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Os mecanismos de defesa antioxidante podem ser dois tipos: endógena ou exógena. Os mecanismos endógenos ocorrem principalmente pela ação e enzimas antioxidantes capazes de converter estas espécies em substâncias com menor potencial reativo. Este é o caso das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Estas enzimas são responsáveis por dismutar o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, o peróxido de hidrogênio em água via glutathiona reduzida e peróxido de hidrogênio em oxigênio e água respectivamente (Figura 1) (VASCONCELOS et al., 2007).

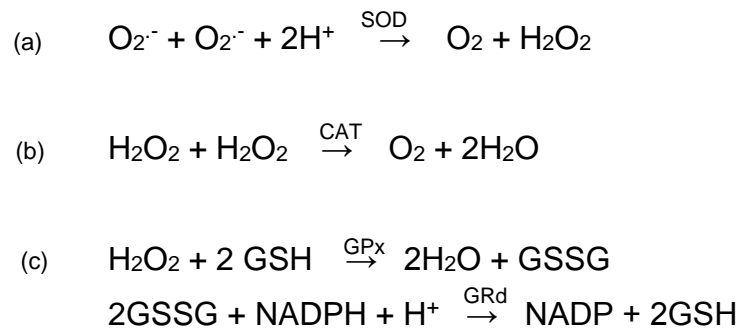


Figura 1: (a) Dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio pela ação da SOD. (b) Redução do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio pela CAT. (c) Redução do peróxido de hidrogênio pela ação da GPx consumindo glutathiona reduzida (GSH) e formando glutathiona oxidada, e formação da GSH através da GSSG pela ação da enzima glutathiona redutase (GRd).

O mecanismo de defesa de fonte exógena dá-se pela ação de substâncias antioxidantes principalmente ingeridas com a dieta. Este é o caso da vitamina E, vitamina C, glutatona, β -caroteno, flavonóides, polifenóis, entre outros (Figura 2). Estas substâncias agem principalmente doando um elétron às ERs tornando-as menos reativas e impedindo a reação com biomoléculas (lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos) evitando assim a formação de danos celulares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

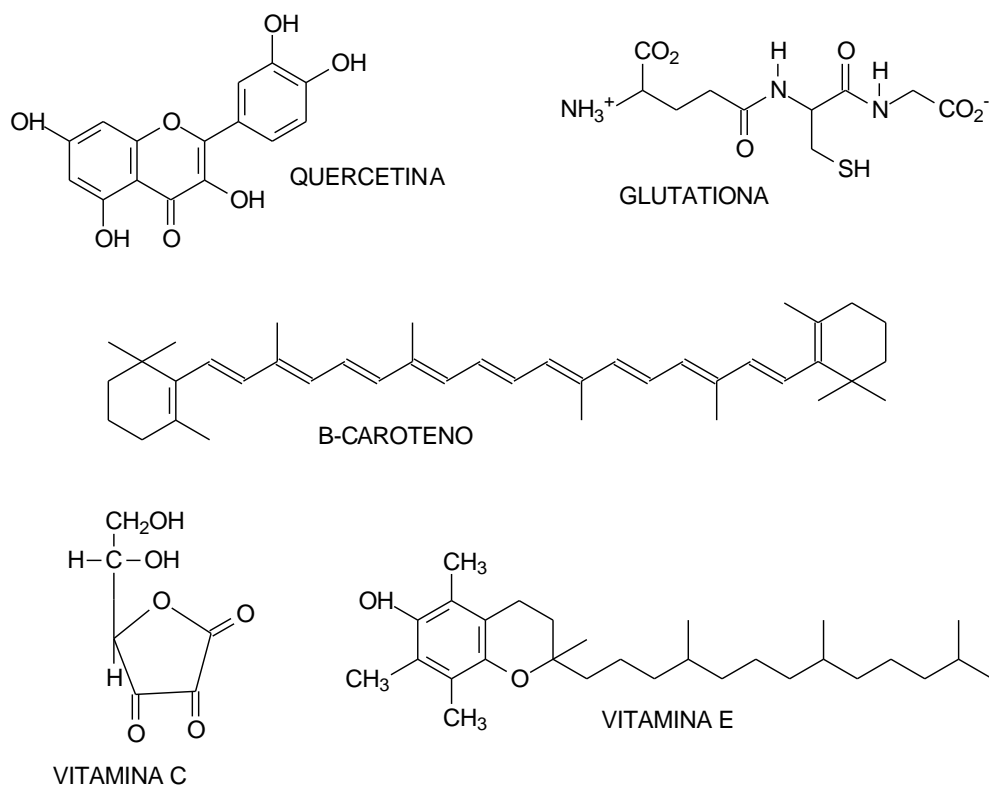


Figura 2: Estrutura dos principais antioxidantes de fonte exógena.

As ERs são necessárias para o funcionamento normal do organismo, sendo produzidas continuamente e neutralizadas pelo sistema antioxidante. Atuam de forma fisiológica regulando diversos processos metabólicos. No entanto, quando produzidas em altas concentrações ou o sistema antioxidante é deficiente, o aumento dos seus níveis caracteriza o estresse oxidativo que está diretamente

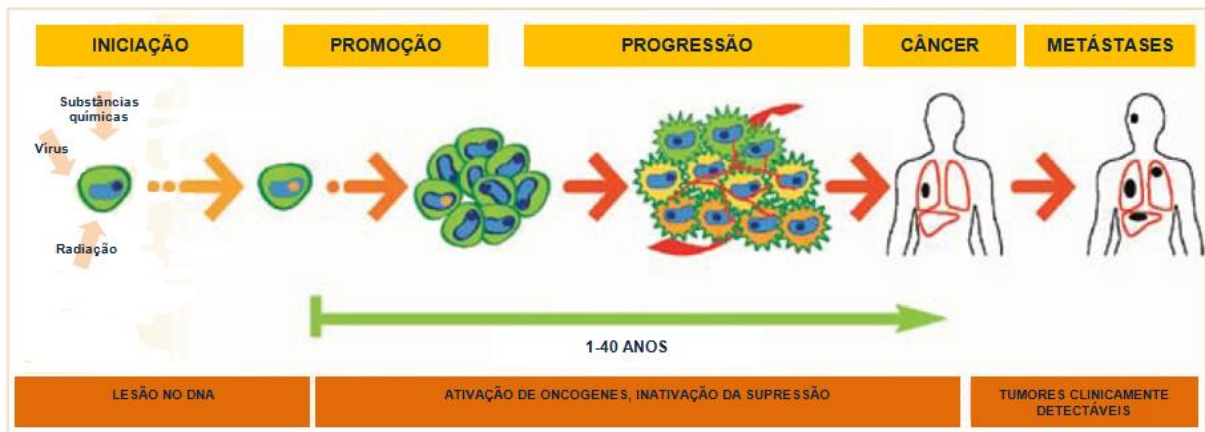
associado ao mecanismo de indução de diversas doenças, incluindo as doenças cardiovasculares e o processo de carcinogênese (VASCONCELOS et al., 2007).

Diversos estudos epidemiológicos e laboratoriais têm demonstrado que dietas hipercalóricas ricas lipídios estão associadas ao maior risco de doenças cardiovasculares, diabetes e certos tipos de câncer (FERRARI & TORRES 2002). Os principais mecanismos fisiopatológicos são constituídos pelas reações de peroxidação de lipídios e de oxidação do DNA provocadas por espécies EROs e ERNs (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

1.2.1 O estresse oxidativo e o processo da carcinogênese

É antiga a observação de que a exposição dos seres humanos a determinadas substâncias presentes no meio ambiente ou no seu local de trabalho pode levar ao desenvolvimento de câncer. Um grande avanço na área do estudo do câncer ao longo dos últimos 20 anos foi à observação de que danos em DNA e mutações ocorrem mesmo na ausência de exposição à agentes carcinógenos (LOUREIRO et al 2002). Os agentes que levam a esses danos incluem produtos normais do metabolismo celular, como EROs, produtos da peroxidação lipídica, agentes alquilantes, estrógenos, ERNs e certos intermediários de algumas vias metabólicas (BURCHAM 1999). Ainda incluem fontes exógenas inevitáveis, tais como radiação UV, radiação ionizante, radioisótopos de ocorrência natural e numerosas substâncias químicas genotóxicas presentes naturalmente ou como contaminantes na dieta e no ar (GUPTA et al 1999).

É denominado carcinogênese o processo de conversão de uma célula normal em uma célula maligna, sendo os indutores desse processo denominados carcinógenos. É necessária uma exposição repetida à agentes carcinógenos para que haja o desenvolvimento de tumores malignos (LOUREIRO et al 2002). Esse desenvolvimento dá-se lentamente devido à complexa natureza deste processo, sendo marcado por um descontrolado crescimento celular (CLAES et al 2010) e dividido em três estágios: iniciação, promoção e progressão (Figura 3) (BALMAIN 2000).



Fonte: BÉLIVEAU & GRINGAS (2007) adaptado.

Figura 3: Estágios do processo da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão.

O processo de iniciação é caracterizado por uma alteração irreversível do DNA, seguida da replicação e a proliferação celular, de modo que a mutação inicial possa se fixar. Assim, mecanismos de detoxificação de carcinógenos, reparo do DNA e eliminação das células que tenham DNA modificado (por apoptose, por exemplo) são importantes para a proteção contra a iniciação do câncer. A iniciação é seguida pela promoção, que envolve a seleção e expansão das células iniciadas, podendo levar ao desenvolvimento de um tumor benigno. Durante esta etapa o material genético alterado da célula altera a expressão dos genes que regula a diferenciação e o crescimento celular. O último estágio da carcinogênese consiste na progressão de uma lesão benigna ou pré-maligna para uma maligna, o que envolve alterações adicionais no DNA (por exemplo, nos genes supressores de tumor). A conversão de tumores benignos para malignos é acompanhada por perda no controle do crescimento, invasão de tecidos, metástase e instabilidade genética aumentada (LOUREIRO et al 2002).

1.2.2 O estresse oxidativo e as doenças cardiovasculares: a oxidação da LDL

A indução do estresse oxidativo tem sido relacionada ao dano nos tecidos cardiovasculares (DHALLA et al; 2000). Existem evidências diretas da relação entre a indução do estresse oxidativo e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como, por exemplo, aterosclerose, doença isquêmica do coração, hipertensão, cardiomiopatias, hipertrofias e insuficiência cardíaca (VALKO et al 2007).

Segundo a revisão de Valko et al (2007) as maiores disfunções causadas pelo estresse oxidativo no sistema cardiovascular envolvem: (i) as enzimas xantina oxidoreductase, (ii) NAD(P)H oxidase (complexos de membrana com múltiplas subunidades), e (iii) óxido nítrico sintetase (NOS) bem como (iv) os citocromos mitocondriais e (v) a hemoglobina, que são as principais vias de produção de ERNs, incluindo o radical $\text{NO}\cdot$ e o grupos NO modificados de cisteínas, tióis em aminoácidos, peptídeos e proteínas.

Existem diversas evidências da participação do estresse oxidativo nestes tipos de doenças cardiovasculares citados anteriormente. Uma das evidências está associada aos altos níveis de colesterol, com destaque nos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (low density lipoprotein – LDL), especialmente quando na forma oxidada (LDL-ox), o qual pode ter uma forte importância no desenvolvimento da aterosclerose (PODREZ et al, 2000).

As lipoproteínas oxidadas têm sido relatados como mediadores da formação do superóxido, que por sua vez, desencadeia vários processos celulares. O maior efeito direto da presença do radical superóxido é a reação com o NO, resultando na formação do peróxinitrito, o qual inicia o processo de peroxidação lipídica ou a oxidação de lipoproteínas, ambos os eventos importantes na incidência da aterosclerose (VALKO et al, 2007).

A oxidação do LDL têm dois fatores importantes associados. O primeiro fator é que o LDL-ox é uma molécula com papel citotóxico, ou seja, que podem causar danos diretos às células arteriais (HESSLER et al, 1983). O segundo fator é que a captação de LDL nativa pelo macrófago ocorre a uma velocidade suficientemente baixa para suportar a formação de células espumosas, pois a captação de LDL-ox é desregulada e leva à formação de células espumosas (STEINBRECHER et al, 1984). A formação de células espumosas está diretamente associada à formação da

placa aterosclerótica justamente pois estas células estão mais propensas ao rompimento. Fica evidente que a LDL-ox, juntamente com seus muitos lipídeos modificados oxidativamente e produtos de degradação, contribuem para a patofisiologia tanto da iniciação da lesão aterosclerótica quanto da progressão da lesão (STEINBERG et al, 1999).

1.3 O papel da dieta na prevenção das doenças

Estudos epidemiológicos conduzidos na década de 70 sugeriram que 70 a 80% de todas as neoplasias diagnosticadas nos Estados Unidos poderiam ser prevenidas por alterações no estilo de vida, como a dieta adequada e prevenção do tabagismo. Atualmente, pesquisadores estimam que a dieta influencie em 30% o risco do desenvolvimento de câncer, prevalência similar encontrada no tabagismo (BÉLIVEAU & GINGRAS, 2007).

O consumo abundante de alimentos de origem vegetal parece reduzir diversos tipos de câncer e prevenir outras DCNT como as doenças cardiovasculares (DIVISI et al, 2006). Os efeitos quimiopreventivos estão relacionados com a quantidade alta de fitoquímicos com propriedades antitumorais e anti-inflamatórias potentes (GESCHER et al 1998). Estas propriedades parecem inibir células pré-tumorais no desenvolvimento de células malignas impedindo também a geração de um microambiente inflamatório que sustenta a progressão tumoral (GESCHER et al, 1998).

Elementos protetores contra o câncer na dieta incluem o selênio, ácido fólico, a vitamina B₁₂, clorofila e diversos tipos de antioxidantes (DIVISI et al, 2006). A base bioquímica e fisiológica da ação dos antioxidantes como quimioprotetores está baseada na evidência de que as células humanas estão continuamente expostas a ERs, o que pode resultar em dano oxidativo. Estas ERs são comumente produzidas no organismo, mas fatores ambientais, genéticos e ocupacionais podem elevar sua produção. Quando em excesso, as ERs causam um desbalanço no estado redox denominado estresse oxidativo (LIZCANO et al., 2010).

Estudos clínicos e epidemiológicos têm discutido a importância de substâncias fenólicas (flavonoides e ácidos fenólicos), encontradas em alimentos de

origem vegetal, na prevenção de doenças cardiovasculares (PIETTA 2000, ARABBI et al 2004). Segundo Vasconcelos et al. (2007), os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos existentes na natureza e estão amplamente distribuídos nos vegetais. A ingestão de flavonoides pela população brasileira é de 60 a 106 mg/dia, quantidade obtida principalmente dos vegetais, tomate, alface e laranja, muito embora o café pertença ao grupo de alimentos com maior conteúdo de antioxidantes (LIMA et al 2006).

Sendo assim, a dieta pode ser uma variável tanto pró-oxidante quanto antioxidante. Os autores Béliveau & Gingras (2007) destacam os seguintes alimentos com atividade antioxidante e anticarcinogênica: chá verde, tomate, soja, sucos de frutas cítricas e a uva e seus produtos derivados. Ainda, há diversos alimentos de consumo comum em regiões específicas que se acredita desempenharem funções antioxidantes e antitumorais (GESCHER et al 1998), como é o caso dos alimentos ingeridos nas regiões Mediterrânea, Oriental e Amazônica.

1.3.1 Dieta Mediterrânea

A dieta do Mediterrâneo é caracterizada pelo uso diário do azeite de oliva, alto consumo de frutas e vegetais, sementes, cereais e legumes e também em grande quantidade peixes de origem marinha e frutos do mar. Por outro lado, o consumo de queijo, iogurte, bebidas alcólicas (principalmente o vinho) é moderado e o consumo de carne e seus derivados é baixo (SERRA-MAJEM et al, 2006). Ou seja, a dieta é menos calórica e muito mais rica em vitaminas e fibras (LIMA et al, 2006).

Diversos estudos epidemiológicos, experimentais e clínicos têm demonstrado os benefícios da dieta Mediterrânea e seus principais alimentos na saúde humana (ROMAN et al, 2008; IRITI & VITALINI, 2012). ROMAN et al (2008) observou em sua revisão bibliográfica que a dieta Mediterrânea apresenta benefícios na redução do risco de doenças cardiovasculares por agir diretamente nos níveis de lipoproteínas, na diminuição da resistência à insulina, na redução da prevalência da síndrome metabólica e dessa forma aumentando a capacidade antioxidante do organismo.

Este resultado está de acordo com o observado por Esposito et al (2010), o qual evidenciou que a dieta Mediterrânea age de modo a diminuir o estresse

oxidativo e aumentar a sensibilidade à insulina. Isso se deve aos compostos bioativos presentes nestes alimentos que atuam de forma hipolipimiente e diminuem os níveis de glicose no sangue.

Também foi observado que os indivíduos que consumiam os alimentos presentes nessa dieta apresentaram menor risco de morte quando comparados aos indivíduos que não utilizavam a dieta (BUCKLAND et al, 2011). Também foi observado que a aderência a esta dieta está associada à longevidade aumentada dos idosos (TOGNON et al 2010; HAMER et al, 2010). Além destes benefícios foi observado que esta dieta parece reduzir o risco de alguns tipos específicos de câncer, como o caso do câncer de próstata (ITSIOPOULOS et al, 2009).

1.3.2 Dieta Oriental

A dieta oriental é baseada principalmente no consumo de alimentos à base de soja e peixes. Também se observa no extremo Oriente o elevado consumo de chás, especialmente o verde, que constitui um importante fator de proteção contra doenças cardiovasculares e câncer devido à presença de catequinas (SGARBIERI & PACHECO, 1999; RAMASARMA, 2000). Além disso, os peixes são ricos em ácidos graxos poliinsaturados, sendo, portanto, alimentos funcionais benéficos à saúde (KUSHI et al, 1995).

Nos estudos conduzidos por Willcox e col. (2006, 2009), onde foi observada a população japonesa de Okinawa, destacou-se um número significativo de centenários. Essa longevidade aumentada tem sido atribuída ao estilo de vida saudável e à dieta de baixa ingestão calórica, nutricionalmente densa e rica em fitonutrientes como os antioxidantes e flavonóides. Também foi observado o consumo de raízes, vegetais, ervas e temperos que são considerados alimentos funcionais.

Na literatura o consumo de chá verde tem sido associado a diversos benefícios à saúde, devido à sua composição química, que é composta por diversos polifenóis. Estes polifenóis presentes no chá verde têm sido associados às suas propriedades antioxidantes (KAVANAGH et al, 2001). Além das propriedades antioxidantes, também tem se observado que o chá verde atua diminuindo a oxidação

do LDL (YANG & KOO, 2000; MIURA et al, 2000) e também diminuindo a incidência de câncer (ZHENG et al, 1996; BUSHMAN et al 1998; FUJIKI et al, 1998; YANG & CHUNG et al, 2000; NAGANO et al, 2001).

1.3.3 Dieta Amazônica

A dieta Amazônica, apesar de ainda pouco estudada, tem sido associada ao aumento da longevidade uma vez que está baseada principalmente na ingestão de frutas, peixes e farinhas. A recente revisão de Ribeiro & Cruz (2012) descreve vários alimentos ingeridos por esta população que apresentam diversas propriedades funcionais. Dentre estes destacam-se o guaraná, tucumã, abacaxi, açaí, buriti, camu-camu, castanha do Brasil, cupuaçu, cubiu, pupunha entre outros.

Um estudo realizado por Ribeiro et al (2012) comparou idosos ribeirinhos com idosos da cidade de Manaus e observou uma menor incidência de hipertensão, obesidade, diabetes tipo 2 e de câncer nos idosos ribeirinhos do que nos idosos de Manaus. Outro estudo realizado por Krewer et al (2011) mostrou que os idosos que consumiam habitualmente guaraná apresentaram menor prevalência de obesidade e de hipertensão arterial sistêmica, níveis menores de LDL e de biomarcadores de oxidação de proteínas.

O estudo conduzido por Maia-Ribeiro et al (2012) observou um ótimo perfil de atividade e aptidão física nos idosos de Maués. Aliados então os fatores da dieta (rica em frutas e peixes) que apresentam alta quantidade de compostos bioativos, e juntamente com os fatores de qualidade de vida (atividade e aptidão física) fazem com que os idosos ribeirinhos apresentem maior longevidade em relação aos idosos de Manaus.

Diversos alimentos da dieta amazônica merecem destaque, dentre eles, o guaraná. Apesar de já bem estudado, o guaraná apresenta propriedades anticancerígenas (FUKUMASU et al 2006; FUKUMASU et al 2008, FUKUMASU et al 2010), antiobesogênicas (PORTELLA et al 2013, BOOZER et al 2001, OPALA et al 2006) entre outras. Também merece destaque a castanha do Brasil, que apresenta em sua composição grande quantidade de selênio, mineral essencial para o metabolismo antioxidante (RIBEIRO & CRUZ et al 2012).

1.4 *Solanum sessiliflorum*: potencial efeito na prevenção de doenças

Apesar da ação protetora dos alimentos vegetais, com destaque aos frutos, muitos destes ainda não foram investigados quanto a sua composição e propriedades funcionais. Este é o caso de diversos frutos consumidos na região Amazônica desde o período pré-colombiano. Muitos destes alimentos pertencem ao gênero *Solanum* que é um dos maiores gêneros do Reino Vegetal e inclui cerca de 1400 espécies distribuídas no mundo, sendo que a maior parte concentra-se na Amazônia. Estas espécies produzem uma grande variedade de metabólitos secundários como alcalóides esteroidais, saponinas, terpenos, etc. (WINK, 2003).

Dentre estes alimentos, o *Solanum sessiliflorum* (cubiu) merece destaque por ser um fruto (Figura 4a) que é amplamente consumido na Amazônia. O *Solanum sessiliflorum* também é popularmente conhecido como topiro e tupiro no Perú, cocona na Colômbia, Peru e Venezuela, tomate de índio no Estado de Pernambuco, *orinoco apple* e *peach tomato* nos países de Língua Inglesa (OLIVEIRA, 1999). É originário da Amazônia, onde foi domesticado pelos Índios pré-colombianos, e ocorre em toda a Amazônia brasileira, peruana, colombiana e venezuelana. É um arbusto ereto e ramificado de ciclo anual, com altura variando de 80 centímetros a 2 metros (SCHUELTER et al., 2009) (Figura 4b).

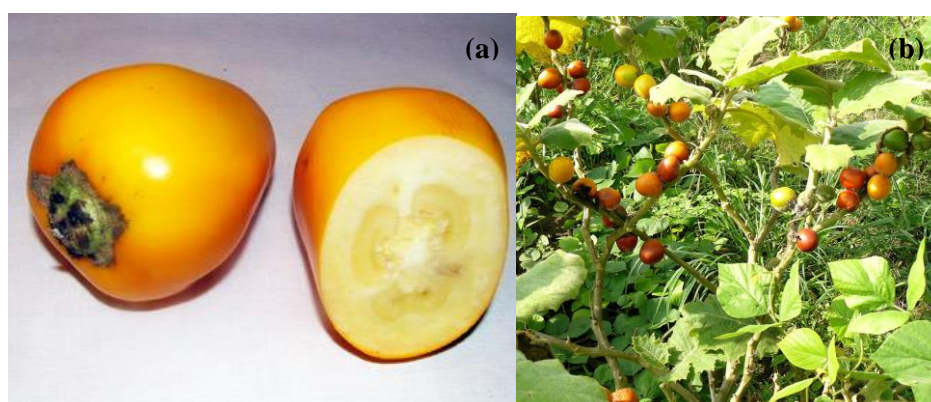


Figura 4: *Solanum sessiliflorum*, (a) fruto e (b) arbusto.

O fruto do *S. sessiliflorum* é bastante nutritivo, apresentando ferro, niacina, ácido cítrico e pectina (SILVA FILHO et al 1997) em sua composição. A Tabela 1 apresenta a composição nutricional do fruto do *S. sessuliflorum*. Por ser um alimento bastante nutritivo, é amplamente consumido na forma *in natura* ou na forma de sucos e geléias. Popularmente este fruto também é utilizado como medicamento no controle do prurido da pele e para a redução dos níveis de colesterol, glicose e ácido úrico no sangue (PIRES et al 2006, SOUZA et al 2008).

Tabela 1: Composição nutricional do *Solanum sessiliflorum* em 100g do fruto.

Composição		Valores
Calorias (Kcal)		41
Fibras (g/100g)		9,2
Macronutrientes (g/100g)	Proteínas	0,90
Micronutrientes e sais Minerais	Cálcio (mg)	16
	Fósforo (mg)	30
	Ferro (mg)	1,5
	Vitamina B1 (mg)	0,06
	Vitamina B2 (mg)	0,10
	Niacina (mg)	2,25
	Vitamina C (mg)	4,5
Compostos Bioativos	Caroteno (mg)	0,18

Fonte: RIBEIRO & CRUZ (2012).

As folhas, galhos e raízes das plantas jovens são popularmente utilizadas fervidas e maceradas para tratar picadas de cobras, escorpiões e aranhas (PIRES et al 2006). Estas possíveis propriedades conferidas ao *S. sessiliflorum* podem estar relacionadas com a presença de compostos bioativos em sua composição química. Um estudo mostrou a presença de flavonóides e fenóis e atividade antioxidante do *S. sessiliflorum* (LIZCANO et al 2010). Outro estudo mostrou que o *S. sessiliflorum* possui na sua composição solasodina (Figura 5), que é um alcalóide esteroidal análogo a diosgenina. A diosgenina possui propriedades farmacológicas já que pode ser matéria prima de hormônios esteroides como a progesterona e o cortisol bem como na síntese de drogas anti-inflamatórias (BARBOSA-FILHO et al 1991).

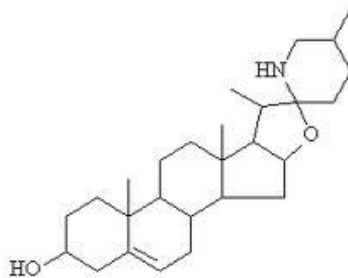


Figura 5: Estrutura química da solasodina, principal alcaloide presente no *Solanum sessiliflorum*.

Apesar do potencial uso farmacológico do *S. sessiliflorum*, estudos sobre as suas propriedades funcionais e toxicológicas ainda são bastante incipientes.

O único estudo clínico sobre o *Solanum sessiliflorum* disponível é o estudo conduzido por Pardo et al (2004). Neste estudo foi avaliada a ingestão do extrato de *S. sessiliflorum* sobre o potencial efeito hipoglicemiante em 100 pessoas. Os voluntários ingeriram 40 ml de extrato de *S. sessiliflorum* durante três dias sendo observado efeito hipoglicimante e também no perfil lipídico com destaque ao aumento dos níveis de HDL.

No estudo conduzido por Maia (2010) foi avaliado o consumo da farinha de *S. sessiliflorum* por ratos hipercolesterolêmicos. Os dados obtidos indicaram que a farinha de *S. sessiliflorum* reduziu os níveis de colesterol total, aumentou a excreção do colesterol pelas fezes e diminuiu a produção de colesterol pelo fígado. Assim, de acordo com os resultados obtidos por Pardo et al (2004) e Maia (2010), acredita-se que o *S. sessiliflorum* possa ter ação benéfica sobre o perfil lipídico, o que pode representar a longo prazo uma proteção contra doenças cardiovasculares.

Outro estudo disponível é o realizado por Pereira (2001) que mostrou que a fibra alimentar do *S. sessiliflorum* reduziu a glicose circulante em ratos diabéticos. Juntamente com o estudo de Pardo et al (2004) fica evidenciado que o *S. sessiliflorum* apresenta efeito hipoglicimante. O mais recente estudo publicado por Rodrigues et al (2013), caracterizou quimicamente o extrato de *S. sessiliflorum* e observou a presença de 17 carotenóides por análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) sendo o carotenoide presente em maior concentração o β -caroteno e o composto fenólico mais abundante o ácido 5-cafeoilquinico. Além de

que também ficou evidenciado que o extrato de *S.sessiliflorum* apresenta atividade antioxidante *in vitro* em relação aos radicais peróxil, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso (RODRIGUES et al 2013).

Têm se buscado elucidar os efeitos dos alimentos na prevenção de diversas patologias. Frutas e verduras apresentam diversos compostos bioativos que desempenham papel fundamental no metabolismo oxidativo, podendo atuar diretamente na diminuição do estresse oxidativo e conseqüentemente na prevenção de patologias associadas a esta disfunção (CERQUEIRA et al 2007), como o câncer e as doenças cardiovasculares. Desta forma, neste estudo visa-se observar a presença e compostos bioativos no extrato de *S. sessiliflorum*, caracterizar quimicamente o extrato, confirmar seu potencial antioxidante, avaliar o efeito citoprotetor, antitumoral e na inibição da oxidação do LDL para melhor esclarecer sua relação com o metabolismo oxidativo e conseqüentemente na prevenção de doenças.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Identificar e avaliar compostos bioativos em extratos hidroalcoólicos de *Solanum sessiliflorum* e avaliar sua ação *in vitro* antioxidante e antitumoral.

2.2 Específicos

- Caracterizar quimicamente o extrato hidroalcoólico de *Solanum sessiliflorum* e determinar quantidades de compostos bioativos totais preliminarmente;
- Verificar o efeito antioxidante e citoprotetor *in vitro* do extrato de *Solanum sessiliflorum*;
- Avaliar o efeito antitumoral em linhagens de célula de câncer mama (MCF7) e de câncer de colorretal (HT29);
- Verificar o efeito *in vitro* na proteção à oxidação do LDL.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios artigos. Os artigos estão apresentados na forma em que foram submetidos às revistas.

3.1 Artigo 1

3.1.1 Caracterização química, atividade antioxidante e antitumoral *in vitro* do *Solanum sessiliflorum*

The *in vitro* antioxidant and antitumoral activities of *Solanum sessiliflorum* (dunal), an amazonian fruit known as indigenous tomato.

Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner, Pauline Christ Ledur, Aline Boligon, Margareth Linde Athayde, Euler Esteves Ribeiro, Francine Carla Cadoná, Alencar Kolinski Machado, Fernanda Barbisan, Eduardo Bortoluzzi Dornelles, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

NUTRITION AND CANCER

THE *IN VITRO* ANTIOXIDANT AND ANTITUMORAL ACTIVITIES OF *Solanum sessiliflorum* (Dunal), AN AMAZONIAN FRUIT KNOWN AS INDIGENOUS TOMATO

Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner

Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, RS, Brasil.

Pauline Christ Ledur

Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Aline Bolignon

Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Margareth Linde Athayde

Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Euler Esteves Ribeiro

Universidade Estadual do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

Francine Carla Cadoná

Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Alencar Kolinski Machado

Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Fernanda Barbisan

Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Eduardo Bortoluzzi Dornelles

Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Corresponding Author:

Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner, MS

Postal address: Unijuí/DCVida, Rua do Comércio 3000, Bairro Universitário, Ijuí, Rio

Grande do Sul, 98700-000, Brasil. Telephone: +55-3332-0461

Email: greicemontagner@gmail.com

THE *IN VITRO* ANTIOXIDANT AND ANTITUMORAL ACTIVITIES OF *Solanum sessiliflorum* (Dunal), AN AMAZONIAN FRUIT KNOWN AS INDIGENOUS TOMATO

Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner^{a,b}, Pauline Christ Ledur^b, Aline Bolignon^b, Margareth Linde Athayde^b, Euler Esteves Ribeiro^c, Francine Carla Cadoná^b, Alencar Kolinski Machado^b, Fernanda Barbisan^b, Eduardo Bortoluzzi Dornelles^b, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^b.

^a Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

^b Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, RS, Brasil

^c Universidade Estadual do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

Abstract

The aim of this study is to identify the potential antitumoral activity of *Solanum sessiliflorum* hydro-alcoholic extract. In this study chemical compounds were quantified in the extract as well as their antioxidant capacity was determined to confirm the presence bioactivity. From this, two protocols were performed: First, the analysis of protective *S. sessiliflorum* effect against cytotoxic effects caused by H₂O₂ exposition on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs); second, an *in vitro* analysis of *S. sessiliflorum* anticarcinogenic effect against breast (MCF7) and colorectal cancer (HT29) cell lines. The extract at 1000 µg/mL reverted the H₂O₂ cytotoxicity when compared to untreated control group. Also the extract decrease

total ROS levels at 1000 µg/mL. In respect to anticarcinogenic activity, it was not observed decrease the viability and cell proliferation in the breast cancer MCF7 cell lines. However, concentrations from 1 to 100 µg/mL decreased significantly the HT29 cell viability as well as cell proliferation. The results show that *S. sessiliflorum* extract has important antioxidant bioactive molecules in its composition that probably contributes to protect the cells against oxidative stress. However, the antitumoral effect was limited just to HT29 cells since was not detected effect against MCF-7 breast cancer cells.

Keywords: Solanun sessiliflorum, chemical characterization, antioxidant activity, antitumoral effect

1. Introduction

The *Solanum sessiliflorum* (Dunal) is an Amazonian fruit domesticated since pre-Colombian period named “cubú, maná-cubú” in Brazil, “topiro or tupiro” in Peru, “cocona” in Colombia and Venezuela, “oricono” or apple/peach tomato in the English-speaking countries (1). In northeast Brazilian regions, this fruit is also known as “indigenous tomato” as analogy with “tomato” food and to be rich in iron, niacin, citric acid, pectin. It is an upright shrub and branched annual cycle, with heights ranging from 80 cm to 2 meters. The *S. sessiliflorum* is an oval fruit 4-12 cm diameter and peel color goes from green to reddish orange during ripening (Figure 1). The pulp presents a light yellow color due the carotenoid content. The high citric acid concentration in the pulp gives an acid pleasant taste similar to citrus fruits (1, 2).

Figure 1 here.

The ripe fruit is peeled and eaten out-of-hand by Amazonian Indians. In local population, it is widely used as food, consumed raw or in the form of juice, jellies and people that are more sophisticated use the fruit in salads, cook it with fish and also in meat stews (1). Sweetened, it is used to make sauce and pie filling. It is prized for making jam, marmalade, paste, and jelly, and is sometimes pickled or candied.

The *S. sessiliflorum* also presents solasodine; an important alkaloid molecule associated to synthesis of steroidal hormones (3), as well as some polyphenol compounds (4). Additional investigation described the presence and structure of some secondary metabolites in three *S. sessiliflorum* morphotypes as *p*-coumaric acid, *p*-hydroxidihydrocumaric acid, methyl and ethyl esters and the flavonoid naringenin (5).

Beyond these molecules, a recent study performed by Rodrigues (6) described seventeen carotenoids and three phenolic compounds that are quantified by high-performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometry detectors. The major carotenoids found *S.sessiliflorum* were (all-E)- β carotene, (all-E)-lutein and the major phenolic compound was 5-caffeoylquinic acid. The studies performed by Lizcano (4) and Rodrigues (6) also described important antioxidant activity of *S. sessiliflorum* pulp extracts.

Traditional Amazonian populations also used this fruit with medicinal purpose. Popularly *S. sessiliflorum* is used to fight skin disease, against snakebites and scorpion stings as well as antihypertensive and to cholesterol, glucose and uric acid levels reduction in the blood (4, 7, 8). In addition, there are some popular reports of *S. sessiliflorum* used as cancer treatment. In fact, some molecules presented in *S. sessiliflorum* fruit have recognized antitumoral activity as well its effect on cholesterol metabolism. This is the case of carotenoids and flavonoids compounds (9, 10, 11, 12).

Based in these evidences the main goal of this study was to identify the potential antitumoral activity of peel and pulp hydro-alcoholic extracts. Initially some chemical compounds were quantified in the extracts as well as their antioxidant capacity was determined to confirm the presence bioactivity. From this characterization, two protocols were performed: First, the analysis of protective *S. sessiliflorum* effect against cytotoxic effects caused by H₂O₂ exposition on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs); second, an *in vitro* analysis of *S. sessiliflorum* anticarcinogenic effect against breast and colorectal cancer cell lines.

2. Material and Methods

2.1 Chemicals

All reagents and solvents used were of analytical grade. Methanol, acetic acid, gallic acid, catechin and caffeic acid purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Quercetin, rutin and β -carotene were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The other chemicals used to perform the protocols were purchased from Sigma[®] St. Louis, MO, USA and Gibco[®] Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA. The Quant-iT[™] Picogreen[®] dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen, CO) was used to extracellular DNA quantification. The cancer cell lines (T24 bladder cancer, MCF7 breast cancer and HT29 colorectal cancer cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC[®]). High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), Prominence Auto Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to the degasser DGU 20A5 with integrator CBM 20A, UV-VIS detector DAD (diode) SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1. The biochemical analyses were performed using a multi-mode Plate Reader (Spectra Max M2/M2e, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

2.2 Fruit samples

The present study is part a project previously authorized by Brazil Environmental Ministry to access the components of genetic patrimony in national territory (n^o 010547/2013-4) according Brazilian legislation (n^o 2186-16). Therefore, the *S. sessiliflorum* fruits (~20 kg) were harvested just in the geographic region legally authorized located in Maués City region (03^o 23' 01" S, 57^o 43' 07" W, Amazonas, Brazil). The *S. sessiliflorum* fruit was identified by Dr. Euler Esteves

Ribeiro, from Universidade do Estado do Amazonas (Manaus, Amazonas State). Three samples (weighting 3 kg each) of randomly chosen fruits were collected during February, 2011 from three native areas and used to produce the extracts. The fresh fruit samples were transported to Biogenomic Lab located in Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria City, Rio Grande do Sul State) where were processed.

2.3 S. sessiliflorum hydro-alcoholic extract preparation

The fresh fruits used in the present study weighted 147 ± 38 g and exhibit the following composition: approximately 88.5% of fruit is consisted of water and remaining components are carbohydrates with glucose and fructose predominance and citric acid. The energetic value in 100 g peel is 41 kg/cal. To obtain the *S. sessiliflorum* extract the fruits were washed, peeled and the pulp with small seeds were triturated using a mixer (particles ≤ 3 mm) for approximately 5 min and placed into sealed amber glass containers with 70% hydro alcoholic solution where they remained for 7 days with solvent exchanged three times. After extraction, the product obtained was filtered, evaporated and then lyophilized.

2.4 Chemical characterization of Solanum sessiliflorum extracts

Initially the *S. sessiliflorum* extract was chemically characterized and the antioxidant capacity was confirmed by DPPH assay using the method described by Brand-Williams (13). Aliquots (40 μ l) of extract solutions were added to 3 ml of DPPH solution ($6 \cdot 10^{-5}$ mol/l). After 90 minutes, the absorbance was spectrophotometrically determined at 515 nm.

2.4.1 Determination of total phenolics

The determination of total phenolic contents was performed by the Folin–Ciocalteu method with slightly modifications (14). The samples were read at 730 nm in spectrophotometer. The total phenolics content was expressed in milligrams equivalents of gallic acid (GAE) per gram of each fraction. The equation obtained for the calibration curve of gallic acid in the range of 0.005 - 0.030 mg/mL was $Y = 11.983x + 0.0466$ ($r = 0.9997$). The experiments were conducted in triplicate.

2.4.2 Determination of total flavonoids contents

The determination of flavonoids was performed as described by Woisky and Salatino (15). The absorbance was determined by spectrophotometer at 420 nm. Ethanol was used as a blank. The equation obtained for the calibration curve of quercetin in the range of 0.010 - 0.200 mg/mL was $Y = 0.0039x + 0.017$ ($r = 0.9998$). The content of flavonoids was established as quercetin mg/g dry extract. The experiments were conducted in triplicate.

2.4.3 Determination of tannins contents

The tannins content was performed using the method described by Morrison (16) with some modifications. Samples in concentrations of 0.25 mg/mL, 5mL of solution A (1 g vanillin in 100 mL of methanol) and solution B (8 mL HCl in 100 mL of methanol) were used to experiment. The samples were read at 500 nm in spectrophotometer. The total tannins content was expressed in milligrams equivalents of catechin per gram of each fraction. The equation obtained for the calibration curve of catechin in the range of 0.001 - 0.030 mg/mL was $Y = 0.00014x + 0.005$ ($r = 0.9997$). The experiments were conducted in triplicate.

2.4.4 Determination of total alkaloids contents

The alkaloids content was performed using the method described by Sreevidja & Mehrotra (17), where Dragendorff's reagent precipitates alkaloids in plants materials. It is based on the formation of yellow bismuth complex in nitric acid medium with thiourea lyophilized extracts of *S. sessiliflorum* in concentrations of 20 mg/mL were used in experiment. Mixture of thiourea and nitric acid were used as a blank. The samples were read at 435 nm in spectrophotometer. The equation obtained for the calibration curve of bismuth nitrate pentahydrate solution in the range of 0.01 - 0.09 mg/mL was $Y = 2.2783x + 0.0361$ ($r = 0.9997$). The experiments were conducted in triplicate.

2.4.5 Quantification of compounds by HPLC-DAD

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5µm diameter particles; the mobile phase was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 5% of B until 2 min and changed to obtain 25%, 40%, 50%, 60%, 70% and 100% B at 10, 20, 30, 40, 50 and 80 min, respectively, following the method described by Laghari (18) with slight modifications. The lyophilized extract of stem and seeds of the *S. sessiliflorum* were analyzed dissolved in ethanol at a concentration of 5 mg/mL. The presence of six antioxidants compounds was investigated, namely, gallic acid, catechin, caffeic acid, quercetin, rutin and β-carotene. Identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. The flow rate was 0.8 ml/min, injection volume 40 µl and the wavelength were 254 nm for gallic acid, 280 nm for catechin, 325 nm for caffeic acid, 365 nm for quercetin

and rutin, and 450 nm for β -carotene. All the samples and mobile phase were filtered through 0.45 μ m membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.020 – 0.200 mg/ml for catechin, β -carotene, quercetin and rutin; and 0.050 – 0.250 mg/ml for gallic and caffeic acids. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm). Calibration curve for gallic acid: $Y = 11523x + 1374.8$ ($r = 0.9999$); catechin: $Y = 10932x + 1258$ ($r = 0.9987$), caffeic acid: $Y = 12765x + 1381.6$ ($r = 0.9995$); rutin: $Y = 12791 + 1462.5$ ($r = 0.9998$); quercetin: $Y = 10495x + 1092.6$ ($r = 0.9999$) and β -carotene: $Y = 13681x + 1518.7$ ($r = 0.9999$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

2.4.6 Determination of antioxidant capacity with DPPH assay

The antioxidant capacity of the *S. sessiliflorum* crude extract was initially assessed by monitoring their ability to neutralize the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) according to the method of Mohamad (19) and Zhang (20). Spectrophotometric analysis was used to determine the percentage inhibition (% PI) of crude extract. The ability DPPH is expressed as PI50 (potential inhibition of 50%) and was compared with PI50 of known antioxidants such as ascorbic acid, gallic acid and rutin.

2.5 In vitro assays to evaluate *S. sessiliflorum* protection against H_2O_2 cytotoxicity

To evaluate the antioxidant effect of *S. sessiliflorum* extract *ex vivo* assays were performed using human PBMCs and plasma with blood sample obtained from

healthy adult donors. All volunteers signed consent term and the study was previously approved by Ethics Committee Board of the Universidade Federal de Santa Maria (n° 23081.015838/2011-10). Briefly, peripheral blood samples were collected after 12-h overnight fasting by venipuncture and lymphocytes were obtained using gradient centrifugation with Ficoll-Histopaque (Montano et al., 2012). The PBMCs were immediately transferred to a 96-well microplate at a concentration of 2.5×10^5 cells/well in phosphate buffered saline (PBS) [NaCl, 137 mmol/L; KCL 2.7 mmol/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 mmol/L, KH_2PO_4 2.0 mmol/L, ph 7.4] plus 5% glucose. The isolated plasma was not discarded, but also used in additional test.

The cytoprotective effect of PBMCs exposed to H_2O_2 (3M) was evaluated using a rapid assay described by Batel (21) and further adapted to evaluation of cytotoxic effects of fruit extracts on microorganisms by Jobim (22). PBMCs samples were pre-exposed to *S. sessiliflorum* extract at different concentrations during 5 minutes. After this procedure, H_2O_2 3M was added in the microplates. The final volume of each well was 200 μL . The high H_2O_2 concentration causes oxidative stress with extreme and acute cell damage inducing a rapid cell death and consequently releasing of double-strand DNA (dsDNA) to extracellular medium. The dsDNA in medium is quantified using the DNA PicoGreen[®] dye that interact preferentially with dsDNA despite the presence of single strand DNA (ssDNA), RNA, and proteins at high pH (>12.0). This selectivity characteristic was used to follow cell toxicity that release dsDNA fragments to medium increasing the fluorimetric signal intensity. The test was performed in fluorescence microplate's 96-well using Quant-iT[™] PicoGreen[®] kit following the manufacturer's instructions. A DNA denaturation kinetic (0, 15, 30 45 and 60 minutes) was determined in the PBMCs samples with PicoGreen dye addition in the dark at room temperature. To minimize photobleaching

effects, time for fluorescence measurement was kept constant for all samples. PicoGreen dye was diluted 1:200 with TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5) and incubated with plasma DNA in the dark at room temperature for 5 min. Fluorescence emission was recorded at 528 nm and excitation wavelength of 488 nm in a SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA. The dsDNA concentration in extracellular medium represents the presence of death cell degradation compounds. The results were expressed as percent of fluorescence values in relation of positive control group treatment (H₂O₂). Therefore, percent values lower than H₂O₂ group indicated protective effect of *S. sessiliflorum* extracts.

A second *in vitro* assay also evaluated the antioxidant *S. sessiliflorum* effect using human plasma exposed to H₂O₂ (3M) and subsequent ROS quantification. The extracts were added to plasma and tested at final concentrations of 30, 100, 300 and 1000 µg/mL at 1 hour. The ROS determination was performed with the fluorimetric assay of ethyl dichlorofluorescein acetate (DCFH-DA) used according to the protocol described by Lebel (23) with slight modifications. In this assay, the DCFDA is hydrolyzed by esterases to DCFH. This is a non-fluorescent molecule that is easily oxidized in the presence of ROS. When DCFH oxidation occur a production of a fluorescent molecule (dichlorofluorescein, DCF) that can be quantified. The fluorescence is measured at an excitation of 488 nm and an emission of 525 nm. The results were obtained from three replicates and expressed as percent of fluorescence values in relation of negative untreated control group.

2.5 Antitumoral assays

The *in vitro* antitumoral effect of *S. sessiliflorum* extract was assessed using two commercial cell cancer lines: breast (MCF7) and colorectal (HT29) obtained from ATTC. The cancer cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) medium. All cell cultures were supplemented with 10% FBS, 100 Units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 2mM L-glutamine and maintained at 37°C under a humidified 5% CO₂ and 95% air at one atmosphere. All assays were performed at least in triplicate with cells in exponential growth after adhesion to the bottom of the plates. To test the *S. sessiliflorum* anticarcinogenic effect, the cancer cells/well (2×10^5) was seeded into 12-well plates for cell adherence with three wells for each concentration level. Cancer cell lines were also exposed to chemotherapy drugs used in clinical therapy as positive controls. The *S. sessiliflorum* effect on cancer cell lines viability was observed after 24 hour of exposition and the effect on cell proliferation was determined after 72 hours of exposition. Both analysis were performed using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay. Briefly, MTT was dissolved in phosphate buffered saline at 5 mg/ml, and added to each well and incubated for 4 hours. To dissolve formazan crystals, further incubation with 200 μ L of DMSO was performed. However, before the DMSO addition, the treatment samples into 96-well plate were visualized by optic microscopy (400 x) and photographed. The images show living cells with purple formazan and dying cells without this molecule. The absorbance at 570 nm was measured with a microplate reader. The cell viability observed in each treatment was expressed as a percentage of the control absorbance value. Since the MTT assay presents some limitations that can underestimated the anti-proliferative effects of extracts rich in polyphenols (19) before the analysis the cells were centrifuged at

3000 rpm for 3 minutes, the supernatant discarded and the cells were resuspended in PBS buffer (24).

2.6 Statistical analysis

The treatments were compared by one-way analysis of variance followed by *post hoc* Dunnett or Tukey tests. A *p* value of less than 0.05 was considered to be statistically significant. The results were presented at mean \pm standard deviation (SD). Statistical differences $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1 Chemical characterization and antioxidant capacity of *S. sessiliflorum* extract

The *S. sessiliflorum* hydro-alcoholic extract showed 149.11 ± 0.05 SE of total polyphenols expressed as gallic acid (mg/g fraction), 19.23 ± 0.03 SE flavonoids expressed as quercetin (mg/g fraction), 2.96 ± 0.02 SE tannins expressed as catechin (mg/g fraction) and 0.15 ± 0.11 alkaloids mg/g.

The HPLC fingerprinting of *S. sessiliflorum* lyophilized extracts revealed the presence of the 15.16 ± 0.03 mg/g gallic acid ($t_R = 13.87$ min; peak 1), 10.67 ± 0.01 mg/g caffeic acid ($t_R = 25.78$ min; peak 3), 4.95 ± 0.04 mg/g rutin ($t_R = 37.53$ min; peak 4), 4.92 ± 0.02 mg/g quercetin ($t_R = 47.61$ min; peak 5) and 11.53 mg/g β -carotene ($t_R = 55.84$ min; peak 6).

3.2 DPPH antioxidant capacity of *S. sessiliflorum* extract

To confirm the potential biological effect of *S. sessiliflorum* extract, initially was performed the DPPH assay that evaluated the antioxidant capacity. The potential for 50% inhibition of DPPH free radical capture of extracts of peel and pulp *S. sessiliflorum* extract was 267.72 $\mu\text{g/mL}$. Since the crude extract were evaluated, the antioxidant capacity observed in *S. sessiliflorum* pulp extract was lower than purified antioxidant molecules used as control (ascorbic acid = 5.70; gallic acid= 2.68 and rutin = 16.03 $\mu\text{g/mL}$).

3.2 Cytoprotective effect of *S. sessiliflorum* extract

The present study analyzed if different concentrations in PBMC of *S. sessiliflorum* extracts are able to decrease the acute cell injury induced by H_2O_2 (Figure 2). The H_2O_2 was highly cytotoxic increasing significantly the dsDNA levels in extracellular medium during the first 60 minutes of exposition. The *S. sessiliflorum* extract at ≤ 300 $\mu\text{g/mL}$ concentrations reverted partially the H_2O_2 cytotoxicity until 30 minutes of exposition and totally after this time. On the other hand, from 15 minutes of exposition, high *S. sessiliflorum* concentration (1000 $\mu\text{g/mL}$) decreased significantly the dsDNA levels when compared to untreated control group.

Figure 2 here.

Additional analysis was performed to evaluate the influence of *S. sessiliflorum* extract at different concentrations on ROS production measured in blood plasma also exposed to higher H_2O_2 . As can see in Figure 2B, the extract was able to decrease partially the ROS levels at 300 $\mu\text{g/mL}$ and totally at 1000 $\mu\text{g/mL}$ concentration.

3.4 Antitumoral effect of *S. sessiliflorum* extract

The viability and antiproliferative effect of *S. sessiliflorum* extract on two cell lines was determined and the results are shown in Figure 3. The breast cancer MCF7 cell lines did not decrease the viability and cell proliferation in the of *S. sessiliflorum* pulp extract at lower concentrations (< 100 µg/mL) whereas concentrations higher similar or higher than 100 µg/mL stimulated the viability and proliferation of MCF-7 cell lines.

Figure 3 here.

Contrary effect was observed when colorectal HT29 cells were treated with *S. sessiliflorum* extract. Concentrations from 1 to 100 µg/mL decreased significantly the HT29 cell viability as well as cell proliferation. The *S. sessiliflorum* at 10 µg/mL concentration presented similar antitumoral effect than 5-fluoracil a chemotherapy used in the clinical colorectal cancer treatment (Figure 4).

Figure 4 here.

4. Discussion

A large number of studies have showed that high dietary intake of fruit and vegetables are associated with decreased risk of some forms of cancer (25, 26, 27, 28). This effect is closely related with polyphenols presented in many fruits. However, these studies are performed considering fruits produced in large scale and commercialized in a broad part of the world. Many fruits consumed by regional populations are not well studied, as *S. sessiliflorum* consumed from pre-Colombian populations living in the Amazonia region. Traditional population also attributes some

curative effects of this fruit that were not yet studied (7). In these terms, the present study contributes to elucidation of some *S. sessiliflorum* biological properties that can act on human health.

To perform the present study, the extract initially was chemically characterized and the results obtained are according previous investigations that described the presence of bioactive molecules in the *S. sessiliflorum* including β -carotene and phenol compounds (4, 6). However, for our best acknowledgment this is the first study to identify some specific bioactive molecules in *S. sessiliflorum* extracts that present anticarcinogenic activity as quercetin, rutin, gallic acid and caffeic acid (9, 29, 30, 31). In addition, the extract showed antioxidant capacity determined by DPPH assay despite this effect to be lower than reported by Gonçalves (32). These authors found an IC₅₀% DPPH of 65.12 μ g/mL. Several factors can be influence the differences between our and the Gonçalves's study. There are high number of ethnic varieties of *S. sessiliflorum* that determine several shapes and sizes of its fruits and potentially variation in the chemical composition (33). In addition, the differences between DPPH results described here and in the work developed by Gonçalves (32) can be related to different process that extracts were obtained that can to be some influence or interference in DPPH assay.

In fact, DPPH assay is one of the most widely method employed to express the antioxidant capacity and to compare the antioxidant capacity of various samples; however its measurement requires some care, considering the non-linear relation between antioxidant concentration and antiradical activity (34). Since several factors may influence the DPPH assay such as solvent and pH (35), reagent and sample concentrations, reaction time, and reporting of the results (36), antioxidant contents

as carotenoids concentration (37), the antioxidant activity of a plant extract needs to be complemented with additional assays, mainly tests involving biological models.

Therefore, this study also tested if *S. sessiliflorum* could present some cytoprotective effect in cells exposed to acute oxidative stress. The results showed that fruit extract from 30 µg/mL concentration was able to revert the cell mortality caused in human PBMCs cells exposed to H₂O₂. The effect on plasma ROS levels was also observed although has been detected only in higher *S. sessiliflorum* concentrations (> 300 µg/mL). The *S. sessiliflorum* antioxidant effect described here is corroborated by Rodrigues (6) study that analyzed *S. sessiliflorum* hydrophilic and carotenoid extracts. These authors observed that carotenoid extract had a potent scavenger of peroxy radical, while the hydrophilic extract was a potent hydrogen peroxide and hypochlorous acid scavenger.

Evidences have showed that some ROS, as H₂O₂ present important functions as signaling molecules that regulate a wide variety of physiologic processes (38).

However, imbalance of these molecules caused by intrinsic or extrinsic factors that increase the cellular oxidative stress present serious consequences. Oxidative stress induced by ROS excess has been implicated in several human pathologic processes including carcinogenesis (39). The H₂O₂ is considered a major form of ROS, and when is present in elevated levels causes cell damage either through direct oxidation of lipids, proteins and DNA or acting as a signaling molecule to trigger cellular apoptosis. DNA damage also can result from production of hydroxyl radical (•OH), in which H₂O₂ is reduced in the presence of transition metal ions, as iron (39). Therefore, taken together, these results indicate that *S. sessiliflorum* present preventive effect against oxidative stress.

This study also investigates if *S.sessiliflorum* could present some antitumoral effect on two cancer cell lines: breast and colorectal cancer. The colorectal cancer is one of the most common malignancies worldwide. The results showed differential effect of this fruit extract dependent of cancer cell-type. Whereas in MCF-7 cells the *S.sessiliflorum* did not present any effect on cell viability and proliferation in the HT29 cells its action was similar to observed in antitumoral antimetabolic agent 5-fluorouracil. This anticancer agent is part of 10 drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the management of advanced colorectal cancer (40).

Chemically the 5-fluorouracil is a nucleoside analog that inhibits the enzyme thymidylate synthase, and leads to the incorporation of fluoropyrimidine metabolites into DNA and RNA (41). This antitumor agent is able to increase the Bax gene expression that presents proapoptotic action (42). The quercetin presented in *S. sessiliflorum* extract could contribute with the antitumoral effect since a previous study performed by Priego et al (43) showed that HT29 cells treated with polyphenol causes down regulation of bcl-2 expression. Indeed, at the molecular level, natural polyphenols have been reported to modulate several key elements in cellular signal transduction pathways linked to the apoptotic process (44).

Different from the anticarcinogenic effect of *S. sessiliflorum* on colorectal cells, this extract did not present action on MCF-7 breast cancer cell lines. Considering the bioactive molecules determined in the extract this result is surprising. For example, previous investigations described that MCF-7 cells treated with quercetin decreased significantly the viability and proliferation involving down regulation of Bcl-2 protein expression and upregulation of Bax expression (45). The B-carotene (46), gallic acid (47) and caffeic acid (48) are also present antitumoral effect against MCF-7 cells. In these terms, appears that *S.sessiliflorum* extract presents some other or others no

identified compounds that prevent the anticarcinogenic effect of these bioactive molecules. These contradictory results of *S. sessiliflorum* extract on HT29 and MCF-7 cells suggest that presence of polyphenol molecules in some fruit extracts that have individual cytotoxic action against cancer cells does not guarantee a universal anticarcinogenic effect.

5. Conclusions

On the whole, our results show that *S. sessiliflorum* extract has important antioxidant bioactive molecules in its composition as β -carotene, quercetin, rutin, gallic and caffeic acid that probably contributes to protect the cells against oxidative stress. However, the antitumoral effect was limited just to HT29 cells since was not detected effect against MCF-7 breast cancer cells. The antitumoral effect against Ht29 cells it seems involves differential modulation of genes related to apoptosis pathway.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the follow Brazilian research agencies: CNPq, FAPERGS, FAPEAM.

References

1. Marx F, Andrade EHA, Maia JG. Chemical composition of the fruit of *Solanum sessiliflorum*. *Z Lebensm Unters Forsch A* **206**, 364-366, 1998.
2. Schuelter AR, Grunvald AK, Amaral AT Jr, da Luz CL, Luz CL, Gonçalves LM, Stefanello S, Scapim CA. *In vitro* regeneration of cocona (*Solanum sessiliflorum*, *Solanaceae*) cultivars for commercial production. *Genet Mol Res* **8**, 963-975, 2009.
3. Barbosa-Filho JM, Agra MF, Oliveira RA, Paulo MQ, Trolin G, Cunha EV, Ataíde JR, Bhattacharyya J. Chemical and pharmacological investigation of *Solanum* species of Brazil – a search for solasodine and other potentially useful therapeutic agents. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **86**, 89-191, 1991.
4. Lizcano LJ, Bakkali F, Ruiz-Larrea MB, Ruiz-Sanz JI. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chem* **119**, 1566-1570, 2010.
5. Cardona JEC, Cuca LES, Barrera JAG. Determinación de algunos metabolitos secundarios en tres morfotipos de cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal). *Rev Colomb Quim* **40**, 185-200, 2011.
6. Rodrigues E, Mariutti LR, Mercadante AZ. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. *J Agric Food Chem* **61**, 3022-3029, 2013.

7. Pires, AMB; Silva, PS; Nardelli, PM; Gomes, JC. Caracterização e processamento de cubiu (*Solanum sessiliflorum*). *Rev Ceres* **53**, 309-316, 2006.
8. Souza LT, Zonta JB, Zonta JH, Braun H, Martins Filho S. Caracterização física e química de cúbio (*Solanum sessiliflorum* Dunal) durante o seu desenvolvimento. *Rev Ciênc Agron* **39**, 449-454, 2008.
9. Mendoza EE, Burd R. Quercetin as a systemic chemopreventative agent: structural and functional mechanisms. *Med Chem* **11**, 1216-1221, 2011.
10. Slattery ML, Lundgreen A, Wolff RK. Dietary influence on MAPK-signaling pathways and risk of colon and rectal cancer. *Nutr Cancer* **65**, 729-738, 2013.
11. Sen A, Ren J, Ruffin MT, Turgeon DK, Brenner DE, Sidahmed E, Rapai ME, Cornellier ML, Djuric Z. Relationships between serum and colon concentrations of carotenoids and fatty acids in randomized dietary intervention trial. *Cancer Prev Res* **6**, 558-565, 2013.
12. Eliassen AH, Hendrickson SJ, Brinton LA, Buring JE, Campos H, Dai Q, Dorgan JF, Franke AA, Gao YT, Goodman MT, Hallmans G, Helzlsouer KJ, Hoffman-Bolton J, Hultén K, Sesso HD, Sowell AL, Tamimi RM, Toniolo P, Wilkens LR, Winkvist A, Zeleniuch-Jacquotte A, Zheng W, Hankinson SE. Circulating carotenoids and risk of breast cancer: pooled analysis of eight prospective studies. *J Natl Cancer Inst* **104**, 1905-1916, 2012.

13. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Technol* **28**, 25-30, 1998.
14. Boligon AA, Pereira RP, Feltrin AC, Machado MM, Janovik V, Rocha JB, Athayde ML. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresour Technol* **100**, 6592-6598, 2009.
15. Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality y control. *J Apic Res* **37**, 99-105, 1998.
16. Morrison M, Asiedu EA, Stuchbury T, Powell AA. Determination of tannins and lignin in cowpea seed coat. *Ann Bot* **76**, 287-290, 1995.
17. Sreevidja N, Mehrotra S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *J AOAC Int* **86**,1124-1127, 2003.
18. Lagharia AH, Memona S, Nelofarb A, Khanc KM, Yasminb A. Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. *Food Chem* **126**, 1850-1855, 2011.
19. Mohamad H, Abas F, Permana D, Lajis NH, Ali AM, Sukari MA, Hin TY, Kikuzaki H, Nakatani N. DPPH free radical scavenger components from the fruits of *Alpinia rafflesiana* Wall ex Bak. *Z Naturforsch C* **59**, 811-815, 2004.

20. Zhang X, Xu JK, Wang J, Wang NL, Kurihara H, Kitanaka S, Yao XS. Bioactive libenzyl derivatives and fluorenones from dendrobium nobile. *J Nat Prod* **70**, 24-28, 2007.
21. Batel R, Jaksić Z, Bihari N, Hamer B, Fafandel M, Chauvin C, Schröder HC, Müller WE, Zahn RK. A microplate assay for DNA damage determination (fast micromethod). *Anal Biochem* **270**, 195–200, 1999.
22. Jobim ML, Santos RC, Dos Santos Alves CF, Oliveira RM, Mostardeiro CP, Sagrillo MR, de Souza Filho OC, Garcia LF, Manica-Cattani MF, Ribeiro EE, da Cruz IB. Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. *Microbiol Res*, *in press*, 2013.
23. Lebel CP, Ali SF, Bondy SC. Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol* **112**, 161-165, 1992.
24. Montagner GFFS, Sagrillo M, Almeida RC, Machado MM, Mostardeiro CP, Duarte MFF, Manica-Cattani MF, Algarve TD, da Rocha MIMU, Cruz IBM. Manganese superoxide dismutase V16A gene polymorphism in lymphocyte culture cells response to ultraviolet radiation exposition. *Toxicol In Vitro* **24**, 1410-1416, 2010.
25. Béliveau R, Gingras D. Role of nutrition in preventing cancer. *Can Fam Physician* **53**, 1905-1922, 2007.

26. Divisi D, Tommaso S di, Salvemini S, Garramone M, Crisci R. Diet and câncer. *Acta Biomed* **77**, 118-123, 2006.

27. Gescher A, Pastorino U, Plummer SM, Manson MM. Suppression of tumor development by substances derived from the diet – mechanisms and implications. *British Journal of Clinical Pharmacology* **45**, 1-12, 1998.

28. Gonçalves AESS, Lajolo FM, Genovese MI. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. *J Agric Food Chem.***58**, 4666-4674, 2010.

29. Verma M, Rogers S, Divi RL, Scully SD, Nelson S, Su LJ, Ross S, Pilch S, Winn DM, Khoury MJ. Epigenetic Research in Cancer Epidemiology: Trends, Opportunities, and Challenges. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, in press*, 2013.

30. Touaibia M, Jean-François J, Doiron J. Caffeic Acid, a versatile pharmacophore: an overview. *Mini Rev Med Chem* **11**, 695-713, 2011.

31. Araújo JR, Gonçalves P, Martel F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr Res* **31**, 77–87, 2011.

32. Gonçalves KM, Soldati PP; Da Silva AF; Venâncio RP; Das Graças M, Miranda AM Chaves; Raposo NRB. Biological activities of *Solanum sessiliflorum* dunal. *Biosci J* **29**, 1028-1037, 2013.

33. Yuyama LKO, Macedo SHM, Aguiar JPL, Filho DS, Yuyama K, Fávero DIT, Vasconcelos MBA. Quantificação de macro e micro nutrientes em algumas etnovarietades de cubiu (*Solanum sessiliflorum Dunal*). *Acta Amazon* **37**, 425-430, 2007.
34. Locatelli M, Gindro R, Travaglia F, Coisson JD, Rinaldi M, Arlorio M. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chem* **114**, 889-897, 2009.
35. Litwinienko G, Ingold KU. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph*) in alcohols. *J Org Chem* **68**, 3433-3438, 2003.
36. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* **26**, 211–219, 2004.
37. Wettasinghe M, Shahidi F. Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chem* **70**, 17-26, 2000.
38. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* **48**, 158-167, 2012.

39. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res* **46**, 382-419, 2012.
40. National Cancer Institute, <http://www.cancer.gov/>, 2013.
41. Longley DP, Harkin P, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat rev cancer* **3**, 330-338, 2003.
42. Yang CS, Wang H: Mechanistic issues concerning cancer prevention by tea catechins. *Mol Nutr Food Res* **55**, 819–831, 2011.
43. Priego S, Feddi F, Ferrer P, Mena S, Benlloch M, Ortega A, Carretero J, Obrador E, Asensi M, Estrela JM. Natural polyphenols facilitate elimination of HT-29 colorectal cancer xenografts by chemoradiotherapy: a Bcl-2- and superoxide dismutase 2-dependent mechanism. *Mol Cancer Ther* **7**, 3330-3342, 2008.
44. Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem* **18**, 427–442, 2007.
45. Duo J, Ying GG, Wang GW, Zhang L. Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Mol Med Rep* **5**, 1453-466, 2012.
46. Cui Y, Lu Z, Bai L, Shi Z, Zhao WE, Zhao B. Beta-Carotene induces apoptosis and up-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and

reactive oxygen species production in MCF-7 cancer cells. *Eur J Cancer* **43**, 2590-2601, 2007.

47. Khaledi H, Alhadi AA, Yehye WA, Ali HM, Abdulla MA, Hassandarvish P. Antioxidant, cytotoxic activities, and structure-activity relationship of gallic acid-based indole derivatives. *Arch Pharm (Weinheim)* **344**, 703-709, 2011.

48. Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, Shimizu N, Nakaki T. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFkappaB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem* 2004; 279(7):6017-26.

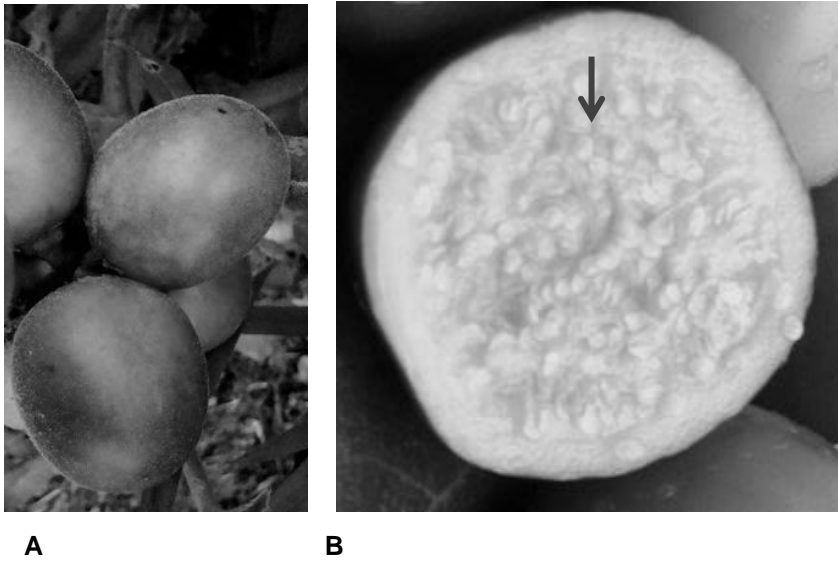


Figure 1 – *Solanum sessiliflorum*, an Amazonian fruit known as “indigenous tomato” also named cubú, mana-cubú, topiro and cocona. (A) External appearance; (B) endocarp showing pulp mixed with little seeds (arrow).

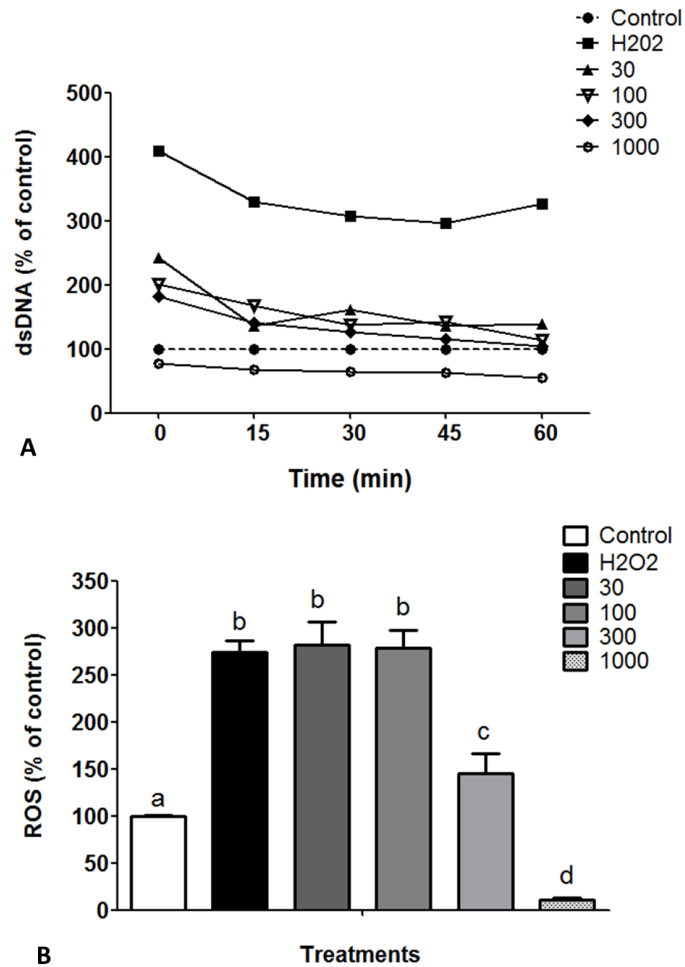


Figure 2 – Cytoprotective effect of *Solanum sessiliflorum* at different concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL}$) against H_2O_2 exposition. (A) Effect on human PBMCs evaluated by dsDNA levels in the supernatant evaluated by DNA PicoGren assay; (B) Effect on ROS levels of human plasma evaluated by DCFH-DA assay. The treatments were compared by one-way analysis of variance followed by Dunnet *post hoc* test. Different letters indicated significant differences at $p < 0.05$.

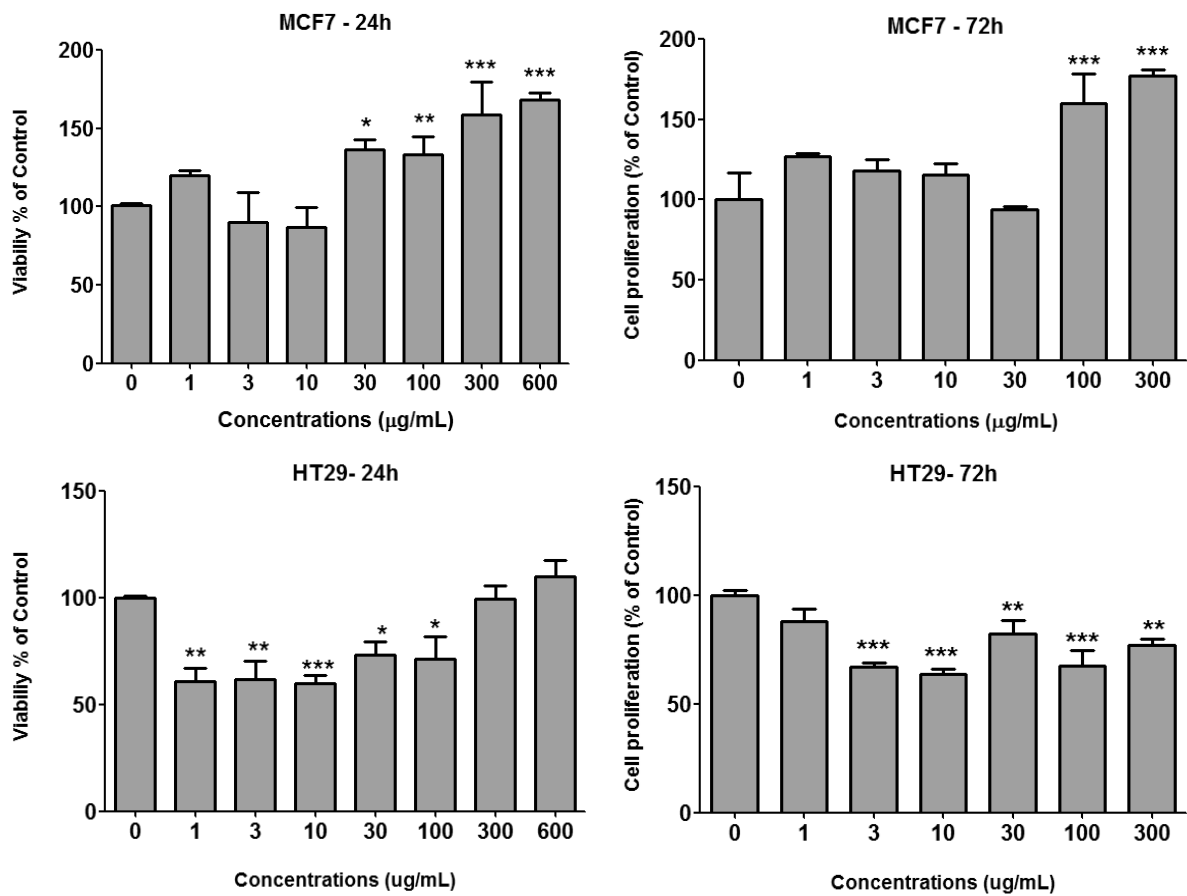


Figure 3 – *Solanum sessiliflorum* effect at different concentrations on MCF-7 breast and HT29 colorectal cancer cells viability measured after 24h of exposition and cell proliferation measured after 72 h of exposition determined by MTT assay. The treatments were compared by one-way analysis of variance followed by Tukey *post hoc* test. Different letters indicated significant differences at $p < 0.05$.

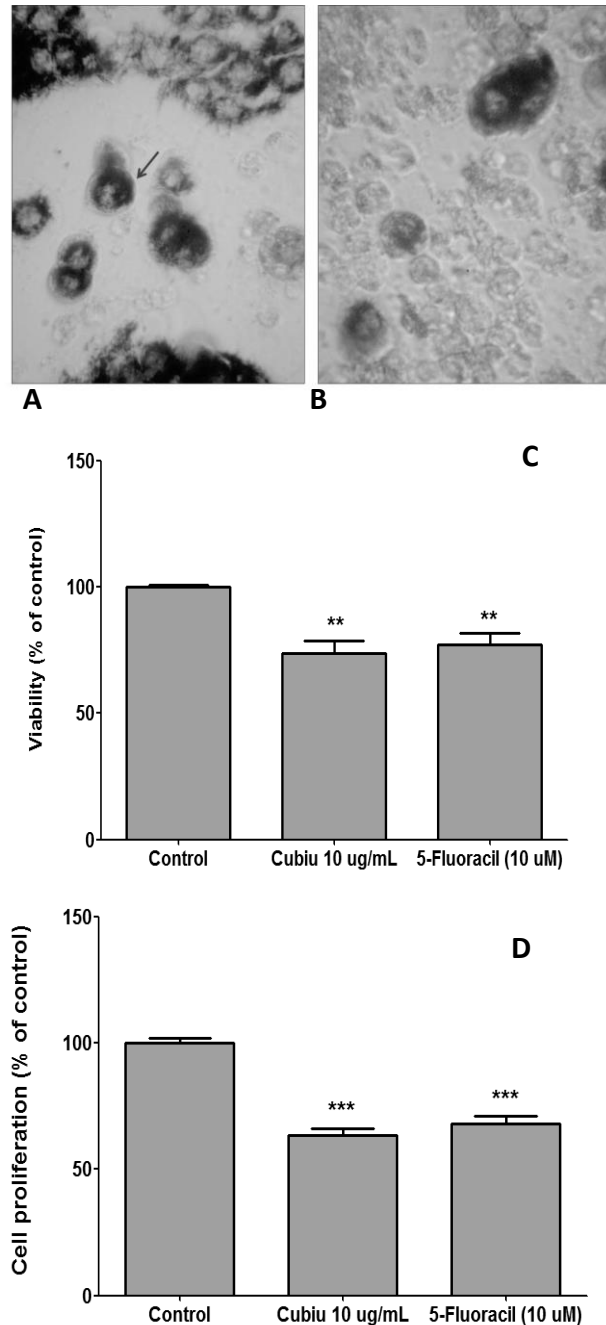


Figure 4 – Comparison of viability and antiproliferative effect of *Solanum sessiliflorum* and the antitumor agent 5-fluoracil on HT29-cells. (A) HT29 untreated cells showed violet formazan crystals into cells (arrow); (B) HT29 cells treated with 10 µg/mL *Solanum sessiliflorum* extract showed dead cells or cells with low metabolic activity that indicates cytotoxicity. (C) viability; (D) cell proliferation. The treatments were compared by one-way analysis of variance followed by Tukey *post hoc* test. Different letters indicated significant differences at $p < 0.05$.

3.2 Artigo 2

3.2.1 Efeito *in vitro* do *Solanum sessiliflorum* na oxidação do LDL

The *Solanum sessiliflorum* (Dunal) a pre-Colombian fruit presents protective effect against *in vitro* LDL

Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner, Rômulo Pilon Barcellos, Pauline Christ Ledur, Felipe Rogalski, Euler Esteves Ribeiro, Félix Antunes Soares, Francine Carla Cadoná, Alencar Kolinski Machado, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

1. Title: *The Solanum sessiliflorum (Dunal)* a pre-Colombian fruit presents protective effect against *in vitro* LDL oxidation

2. Authors & affiliations: Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner^{1,2,3}, Rômulo Pillon Barcellos¹, Pauline Christ Ledur², Felipe Rogalski², Euler Esteves Ribeiro⁵, Félix Antunes Soares¹, Francine Carla Cadoná^{1,2}, Alencar Kolinski Machado^{1,2}, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2,3}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

² Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

³ Departamento de Ciências da Vida, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, RS, Brasil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

⁵ Universidade Estadual do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

3. Corresponding Author:

Name: Greice F.F.S. Montagner, MS

Postal address: Unijuí/DCVida, Rua do Comércio 3000, Bairro Universitário, Ijuí, Rio Grande do Sul, 98700-000, Brasil.

Phone: +55-55-3332-0461

Email: greicemontagner@gmail.com

Abstract

Aims: The *Solanum sessiliflorum* a fruit regionally consumed by traditional Amazonian populations is rich in carotenoids and phenolic compounds. These compounds present free radical scavenging action which lowers atherosclerosis progression. The potential *S. sessiliflorum* effect of edible (pulp and seed) and no edible (peel) parts on *in vitro* LDL oxidation were tested here.

Main methods: The *S. sessiliflorum* hydro-alcoholic pulp and peel extracts were obtained and the main chemical bioactive compounds were initially quantified. Further, an *in vitro* protocol was performed using LDL obtained from three healthy, non-fasted, normolipidemic voluntary donors. The LDL samples were exposed to five different concentrations of the hydro-alcoholic extracts and oxidation rate was evaluated.

Key findings: The results showed that *S. sessiliflorum* extract have important antioxidant bioactive molecules in its composition. It was observed that the pulp and the seed extract present antioxidant activity in concentrations approximately 300µg/mL. Both the extracts (peel; pulp and seed) demonstrated to prevent LDL oxidation *in vitro* in concentrations about 3µg/mL.

Significance: *Solanum sessiliflorum*, similar to the other tropical fruits, has some effect on LDL oxidation that could partially explain the protective effects of this fruit in chronic disorders, such as cardiometabolic diseases observed in some riverine populations.

Keywords: *Solanun sessiliflorum*, *LDL-oxidation*, *chemical characterization*.
antioxidant effect

1. Introduction

Epidemiological studies conducted in European countries demonstrated that the adoption of the Mediterranean diet protect against clustered risk factors associated to metabolic syndrome and cardiovascular diseases (Grosso et al., 2013). In this diet, fruits and vegetables typically present an important biochemical and physiological protective effects mainly in lipid profile including down-regulation of oxidizable cholesterol molecules as LDL-cholesterol (Jones et al., 2012). This effect is associated within an large variety of bioactive molecules present in their composition, such as polyphenols, carotenoids and others (Barona et al, 2012).

The Amazonian region offers a large number of fruits consumed since pre-Colombian period by traditional populations. However, whereas some these fruits are broadly consumed, as well as the cocoa, pineapple and passion fruit, other fruits have a regional consumption and the determination of these substances and functional properties becomes necessary (Barreto et al., 2009).

This is the case of *Solanum sessiliflorum* that popularly is known by several names, such as topiro and tupiro in Peru, Cocona in Colombia, Peru and Venezuela, cubú, mana-cubú or indigenous tomato in Brazil. In English-speaking countries this fruit is known as apple or peach tomato orinoco (Oliveira 1999). The fruit of *S. sessiliflorum* is remarkably nutritious, being source of iron, niacin, pectin and citric acid (Silva Filho et al., 1997). For this reason, it is widely used as food, consumed raw or in the form of juices and jellies. Furthermore, *S. sessiliflorum* is also used as a traditional medicine in the control of pruritus of the skin and reduction in cholesterol, glucose and uric acid in blood (Pires et al., 2006; Souza et al., 2008). This fruit is also popularly used to treat bites from snakes, scorpions and spiders (Pires et al., 2006).

A previous study performed by Ribeiro et al. (2012) observed lower prevalence of cardiovascular risk factors in Amazonian riverine elderly that live in river banks than urbanized elderly. An additional study suggested important influence of physical activity (Maia-Ribeiro et al., 2012), and some diet component such as guaraná (*Paullinia cupana*) habitual consumption. The *S. sessiliflorum* is among other fruits that the riverine elderly reported to consume seasonally.

Despite the number of *S. sessiliflorum* studies to be relative scarce previous investigations described that *S. sessiliflorum* is a fruit rich in carotenoids and phenolic compounds as well as present an important antioxidant capacity (Barbosa-Filho et al., 1991; Pardo 2004; Lizcano et al., 2010; Rodrigues et al., 2013) due the presence of molecules as carotenoids and phenolic compounds (Lizcano et al., 2010).

This set of evidences suggests that *S. sessiliflorum* could contribute to cardiovascular health of riverine elderly from specific biological activities as decrease in LDL-oxidation. Therefore, the aim of this study was to identify, quantify six chemical molecules recognized by antioxidant effects and to evaluate the *in vitro* *S. sessiliflorum* supplementation *in vitro* on LDL serum oxidation.

2. Material and Methods

2.1 Fruit samples

The *S. sessiliflorum* fruits (~20 kg) were harvested just in the geographic region legally authorized located in Maués City region (03° 23' 01" S, 57° 43' 07" W, Amazonas, Brazil). Three samples (weighting 3 kg each) of randomly chosen fruits

were collected during February, 2011 from three native areas and used to produce the extracts. The fruits were conserved in dry conditions at $\pm 4^{\circ}\text{C}$, protected against light action until the extracts preparation.

2.2 *Solanum sessiliflorum* extract

A hydro-alcoholic extract from edible (pulp and little seeds immersed) and peel *Solanum sessiliflorum* were produced using alcohol and water (70:30) to 100mL of extraction fluid. The fruits were washed, peeled and the pulp with small seeds was triturated using a mixer (particles $\leq 3\text{mm}$) for approximately 5 min and placed into sealed amber glass containers with 70% hydro alcoholic solution where they remained for 7 days. During that period, the extracting solvent was exchanged three times. After extraction, the product obtained was filtered, evaporated and then lyophilized.

2.3 Chemical characterization of *S. sessiliflorum* extracts by HPLC-DAD

Initially the *S. sessiliflorum* extract was chemically characterized by HPLC-DAD. The presence of six antioxidants compounds was investigated, namely, gallic acid, catechin, caffeic acid, quercetin, rutin and β -carotene. Identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards.

The lyophilized extract of stem and seeds of the *S. sessiliflorum* were analyzed dissolved in ethanol, at a concentration of 5 mg/mL. The analysis was done according to the method described by Laghari et al. (2011) with few modifications.

Reverse phase of chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm), packed with 5µm diameter particles; the mobile phase was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 5% of B until 2 min and changed to obtain 25%, 40%, 50%, 60%, 70% and 100% B at 10, 20, 30, 40, 50 and 80 min, respectively. The flow rate was set in 0.8 ml/min, injection volume of 40 µl and the wavelength of 254 nm for gallic acid, 280 nm for catechin, 325 nm for caffeic acid, 365 nm for quercetin and rutin, and 450 nm for β-carotene. All the samples and mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use.

Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range from 0.020 to 0.200 mg/ml for catechin, β-carotene, quercetin and rutin; and 0.050 to 0.250 mg/ml for gallic and caffeic acids. The chromatography peaks were confirmed by comparing retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm). All chromatography operations were carried out at in ambient temperature and in triplicate.

2.4 DCFH-DA *in vitro* assay

An *in vitro* assay was performed to evaluate the antioxidant *S. sessiliflorum* effect using human plasma exposed to H₂O₂ (3M) and subsequent Reactive Oxygen Species (ROS) quantification. The extracts were added to plasm and tested at final concentrations of 30, 100, 300 and 1000 µg/mL. The ROS determination was performed with the fluorimetric assay of ethyl dichlorofluorescein (DCFH-DA) used according to the protocol described by Lebel et al. (1992) with minor modifications. In

this technique, the DCFDA is hydrolyzed by esterases to DCFH. This is a non-fluorescent molecule that is easily oxidized in the presence of ROS. When DCFH oxidizes, occurs a production of a fluorescent molecule (dichlorofluorescein, DCF) that can be quantified. The fluorescence is measured at an excitation of 488 nm and an emission of 525 nm. The results were obtained from three replicates and expressed as percent of fluorescence values in relation to the negative untreated control group.

2.5 *In vitro* LDL-oxidation assays

2.5.1 LDL isolation to *in vitro* protocol tests

To evaluate *in vitro* LDL-oxidation assays, the LDL was isolated from fresh human plasma by discontinuous density-gradient ultracentrifugation as described by Silva et al. 1998 updated. All volunteers signed a term of consent and the study was previously approved by Ethics Committee Board of the Universidade Federal de Santa Maria (n° 23081.015838/2011-10).

Briefly, plasma of non-fasted three healthy normolipidemic voluntary donors was collected with EDTA (1 mg/mL) was pooled and sucrose (final concentration of 0.5%) and it was added to prevent LDL aggregation. The subjects did not intake *S. sessiliflorum* in your habitual diet. Five milliliters of EDTA-plasma adjusted to a density of 1.22 g/mL with solid KBr (0.326 g/mL) was layered on the bottom of a centrifuge tube. Then, 5 mL EDTA containing sodium chloride solution (density of 1.006 g/mL) was overlaid on the top of the plasma. Ultracentrifugation was set at 350,000g for 2h at 4°C, in a Himac CP80MX ultracentrifuge. LDL particles were

collected by the aspiration of the yellow/orange band at the middle of the saline layer and dialyzed exhaustively overnight at 4°C with 10 mM of phosphate buffer (pH 7.4). Protein concentration in LDL solution was determined by Lowry's method (Lowry et al., 1951). The purity of LDL preparation was verified by agarose gel electrophoresis. Isolated LDL was stored at -20°C for no longer than two weeks.

2.5.2 Conjugated diene (CD production)

LDL samples (50µg of protein/mL) were pre-incubated at 37°C in a medium containing 10mL of phosphate buffer (pH 7.4) and different *S. sessiliflorum* concentrations (3µg/mL – 300 µg/mL). After 5 minutes, the oxidation was initiated by the addition of CuSO₄ (5µM). The oxidation was monitored by measuring the increase in absorbance at 234nm by the conjugated diene (CD) formation as previously described (Giese et al 1994).

2.5.3 Determination of lag phase and maximum oxidation rate

In the studies of CD formation, there are several parameters which can be obtained from diene vs. time profiles. The value of the lag phase is commonly determined graphically by the intercept of the tangents to the slow and fast increase of the diene absorption. Another parameter is the maximum oxidation rate, given by the peak of the first derivative (Giese et al 1994).

2.6 Statistical analysis

The treatments were compared by one-way analysis of variance followed by Dunnett or Tukey *post hoc* tests. A *p* value of less than 0.05 was considered to be statistically significant. The results were presented as mean \pm standard deviation (SD).

2.7 Ethics

This study is part of the project entitled: In vitro studies in human cells and cell lines of extracts and bioactive compounds present in diet foods Amazon, approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Santa Maria and by the National Research Ethics (CONEP) (Case 23081.015838/2011-10). The protocols will be implemented according to the norms of Resolution 196/1996 and Resolution 354/2004 of CONEP.

3. Results

3.1 Chemical characterization of *S. sessiliflorum* extracts

The HPCL analysis of *Solanum sessiliflorum* extracts showed the presence of flavonoids, phenolic acids and tannin. The extract of stem showed gallic acid (28.53 ± 0.02 mg/g; 2.85%), catechin (5.61 ± 0.03 mg/g; 0.56%), caffeic acid (30.95 ± 0.01 mg/g; 3.09%), rutin (9.24 ± 0.01 mg/g; 0.92%), quercetin (14.72 ± 0.04 mg/g, 1.47%), β -carotene (12.38 ± 0.07 mg/g, 1.23%). The seeds and pulp showed no catechin, but presented gallic acid (15.16 ± 0.03 mg/g; 1.51%), caffeic acid (10.67 ± 0.01 mg/g;

1.06%), rutin (4.95 ± 0.04 mg/g; 0.41%), quercetin (4.92 ± 0.02 mg/g, 0.49%), β -carotene (11.53 ± 0.01 mg/g, 1.15%). Figure 1 shows the chemical characterization of the extracts.

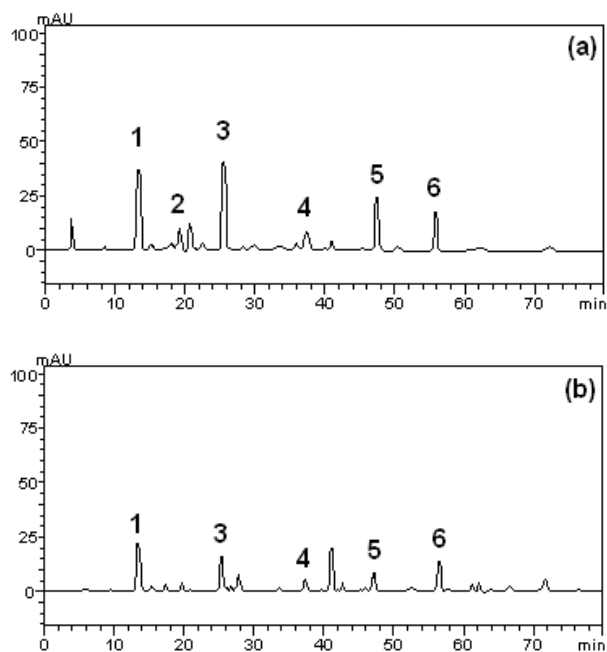


Figure 1 – Representative high performance liquid chromatography profile of *Solanum sessiliflorum*, lyophilized extract of stem (a) and lyophilized extract of seeds and pulp (b), detection UV was at 325nm. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), caffeic acid (peak 3), rutin (peak 4), quercetin (peak 5) and β -carotene (peak 6). Chromatographic conditions are described in the Methods section.

3.2 Antioxidant activity of extracts – scavenger activity

The extracts in different concentrations (previously determined by DPPH assay – data not shown) were incubated with H_2O_2 and the ROS production was determined by fluorescence assay of diclorofluorcein (DCF). It was observed that

after 1 hour of incubation that the extracts of the stem, such as pulp and seed did not increase ROS production, had equal or lower ROS production to the control (Figure 1), or even no pro-oxidant potential present at the concentrations used. It was also noticed that the pulp and seed extract at a concentration of 300 and 1000 mg/mL showed antioxidant potential compared to H₂O₂, showing to be better than the control (vehicle and plasma) and statistically different from the control for H₂O₂ ($p < 0.05$).

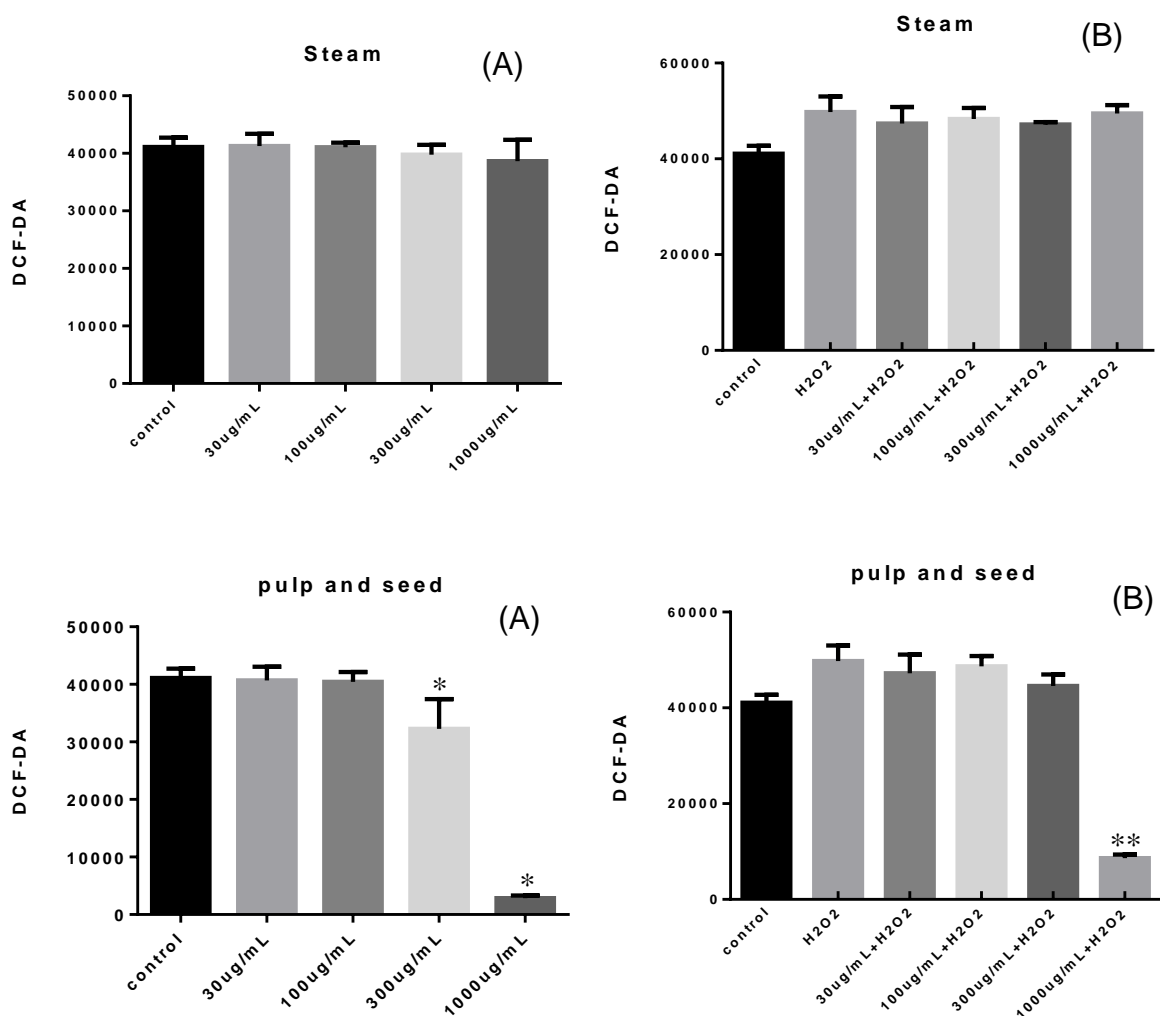


Figure 1: (A) Rate of oxidation of diclorofluorescein acetate observed in crude extracts of the steam and seed and pulp *S.sessiliflorum*. (B) Reversion rate of oxidation of diclorofluorescein acetate by crude extracts of the steam and seed and

pulp. * statistically different from control ($p < 0.05$); ** statistically different from H₂O₂ control ($p < 0.001$). Control: Plasma and vehicle. H₂O₂: plasma and H₂O₂ 3M.

3.3 *In vitro* LDL-oxidation assays

After assays of antioxidant activity, it was observed that concentrations about 300 μ g/mL presented ROS scavenger activity. From this data, was performed that *in vitro* assay to observe the protect effect to LDL-oxidation.

3.2.1 Conjugated diene (CD) production

Isolated LDL samples were incubated with different concentrations. Both the extracts of *S. sessiliflorum* and were observed a significantly increase the lag phase of LDL oxidation ($p < 0.05$; Figure 2). *S. sessiliflorum* concentration at 3 μ g/mL significantly inhibited CuSO₄-induced LDL oxidation (Figure 2A and 2C).

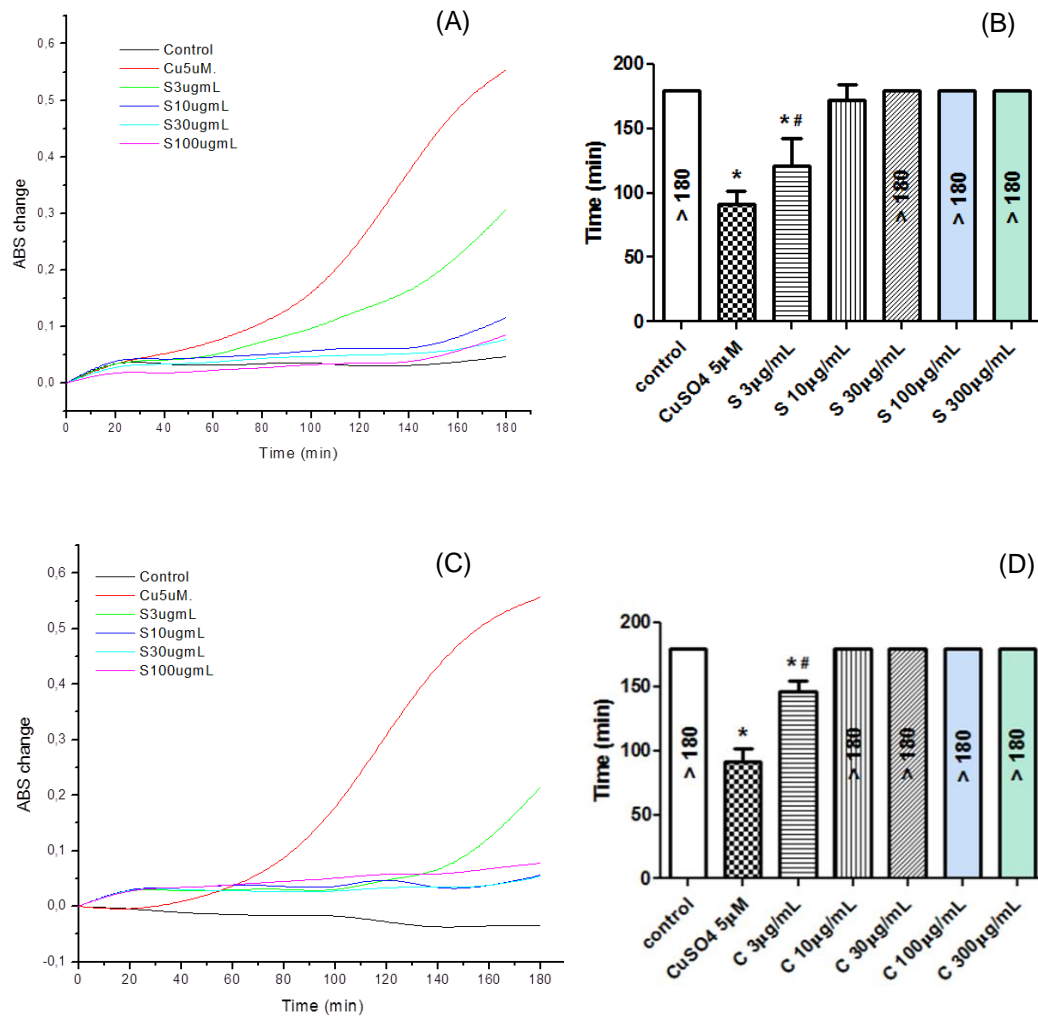


Figure 2: Effect of seed and pulp (A and B) and peel (C and D) extract on conjugated dienes formation. LDL was incubated in the presence of CuSO₄. (A, C) Representative figure of the dienes formation. Dotted line represents the control without CuSO₄ in seed and pulp (A) and in peel (C) extract. (B, D). The values are expressed as mean \pm SD of four independent experiments in duplicate. Conjugated dienes were measured by determining the absorbance at 234 nm every 20 min. “> 180 min” indicates a lag phase higher than the time assay.

* indicates statistical difference from the control group ($p < 0.05$)

indicates statistical difference from the CuSO₄ group ($p < 0.05$)

It was also observed the effect of extracts on maximum formation values for conjugated dienes in isolated human LDL (Figure 3). No LDL oxidation occurred when the medium contained no CuSO₄. Figure 3 shows that *S. sessiliflorum* pulp and seed (3A) and peel (3B) extract at concentrations of 3 to 300 µg/mL was able to cause a significant decrease in LDL oxidation, and was concentration dependent. Both extracts showed a certain activity to prevent to LDL oxidation.

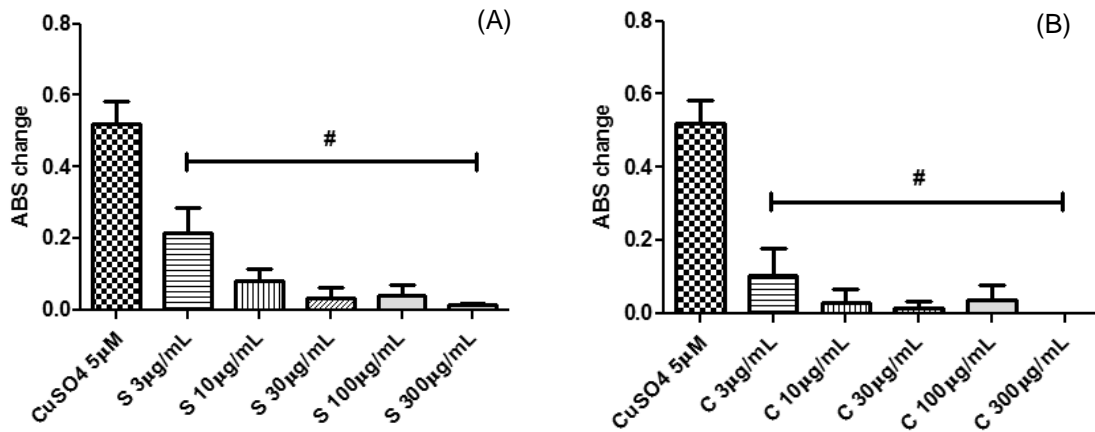


Figure 3: The effect of seed and pulp (A) and peel (B) extract on maximum formation values for conjugated dienes in isolated human LDL. The values are expressed as mean \pm SD of four independent experiments in duplicate. Conjugated dienes were measured by determining the absorbance at 234 nm every 20 min.

indicates statistical difference from the CuSO₄ group ($p < 0.05$)

4. Discussion

The present study described an important *in vitro* effect of *S. sessiliflorum* extracts on antioxidant system and LDL-oxidation processes, suggesting that the

ingestion of this fruit could contribute in cardiovascular risk prevention. This results are in consonance of a large number of previous investigations that suggests fruit consumption is associated with a lower risk of chronic diseases (Beecher 1999; Van't Veer et al 2000; Who 2003, Scalbert et al., 2005; He et al., 2007; Bae et al., 2008). Nonetheless, these studies are performed considering fruits produced in large scale and commercialized in a broad part of the world. A great deal has been reported regarding the functional properties of tropical fruits; however, there is only limited information about Amazonian fruits consumed from pre-Colombian period.

The compounds as polyphenols, flavonoids and carotenoids found in *S. sessiliflorum* extracts might be responsible for the protective effects (Contreras-Calderón et al., 2011). These results corroborates with previous investigations that described bioactive molecules in the *S. sessiliflorum*, including β -carotene and phenolic compounds (Pardo 2004; Lizcano et al., 2010). However, in our study we also identified other specific bioactive molecules that may be capable to contribute to health benefits (Kris-Etherton et al., 2002).

In this investigation the antioxidant effect found in the edible *S. sessiliflorum* endorses previous investigations (Lizcano et al., 2012; Rodrigues et al., 2013). Oxidative damage to lipids is considered a primary cause of atherosclerosis associated to cardiovascular disorders. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) is an important molecule involved in progression of atherosclerotic plaques, as well as in the transition of stable atherosclerotic lesions into active lesions (Victor et al., 2009). For this reason, epidemiological and experimental studies has being performed to evaluate the potential benefits of antioxidant supplementation on atherosclerotic prevention. However, the results suggests that prolonged use of vitamins supplements, such as vitamin E is not recommended for human being. On

the other hand, a diet rich in antioxidant fruits and vegetables demonstrates positive effects to prevent of cardiovascular events. Since in Amazonian popular medicine, *S. sessiliflorum* is considered to be a hypocholesterolemic agent (Silva Filho et al., 1999), the *in vitro* experiment on LDL oxidation was evaluated here.

The results shows that *S. sessiliflorum* presents the capacity to prevent LDL oxidation. This results corroborates with a number of findings related to other tropical fruits of the Amazonian diet. It is the case of *Paullinia cupana* (Portella et al., 2013).

To our knowledge, this is the first study conducted to investigate the potential association between *S. sessiliflorum* effect on LDL oxidation. The results of *in vitro* assays showed that *S. sessiliflorum* increased the lag phase in the oxidation of LDL and it was able significant decrease of LDL oxidation.

The effects of *Sollanum sessiliflorum* on LDL oxidation are also probably associated with high concentrations of bioactive compounds (polyphenols). The mechanisms of how polyphenols acts, are well understood. There are studies that consistently describes these bioactive compounds as exerting antioxidant, anti-inflammatory, hypocholesterolemic, antihypertensive, antiobesogenic effect (Portella et al., 2013).

5. Conclusions

The *S. sessiliflorum* is an Amazonian fruit consumed by traditional populations since pre-Colombian period that presents notable antioxidant activity, mainly decreasing the oxidation of LDL-cholesterol molecule. This effect might be related to

the presence of several bioactive compounds, such as galic acid, cafeic acid, rutin, quercetin, catechin, β -carotene in its nutritional matrix.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the follow Brazilian research agencies: CNPq, FAPERGS, FAPEAM.

References

Bae J M, Lee EJ, Guyatt G. Citrus fruit intake and stomach cancer risk; a quantitative systematic review. *Gastric Cancer* 2008; 11:23-32.

Barbosa-Filho JM, Agra MF, Oliveira RA, Paulo MQ, Trolin G, Cunha EV, et al. Chemical and pharmacological investigation of *Solanum* species of Brazil – a search for solasodine and other potentially useful therapeutic agents. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86:189-91.

Barona J, Jones JJ, Kopec RE, Comperatore M, Andersen C, Schwartz SJ, et al. A Mediterranean-style low-glycemic-load diet increases plasma carotenoids and decreases LDL oxidation in women with metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 2012; 23:609-15.

Barreto GPM, Benassib MT, Mercadante AZ. Bioactive Compounds from Several Tropical Fruits and Correlation by Multivariate Analysis to Free Radical Scavenger Activity. *J Braz Chem Soc* 2009; 20:1856-61.

Beecher G R. Phytonutrients' role in metabolism: Effects on resistance to degenerative processes. *Nutr Rev* 1999; 57:S3-6.

Contreras-Calderón J, Calderón-Jaimes L, Guerra-Hernández E, García-Villanov B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from exotic fruits from Colombia. *Food Research International* 2011; 44:2047-53.

Giese SP, Esterbauer H. Low density lipoprotein is saturable by pro-oxidant copper. *FEBS Lett* 1994; 343:188-94.

Grosso G, Mistretta A, Marventano S, Purrello A, Vitaglione P, Calabrese G, et al. Beneficial Effects of the Mediterranean Diet on Metabolic Syndrome. *Curr Pharm Des* 2013; *in press*.

He F, Nowson C, Lucas M, Macgregor G. Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: Metaanalysis of cohort studies. *J Human Hypertension* 2007; 21:717-28.

Jones JL, Comperatore M, Barona J, Calle MC, Andersen C, McIntosh M, et al. A Mediterranean-style, low-glycemic-load diet decreases atherogenic lipoproteins and reduces lipoprotein (a) and oxidized low-density lipoprotein in women with metabolic syndrome. *Metabolism* 2012; 61:366-72.

Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, et al. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *Am J Med* 2002; 113:71S-88.

Laghari AH, Memona S, Nelofarb A, Khanc KM, Yasminb A. Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. *Food Chem* 2011; 126:1850-5.

Lebel CP, Ali SF, Bondy SC. Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; 112:161-5.

Lizcano LJ, Bakkali F, Ruiz-Larrea MB, Ruiz-Sanz JI. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chem* 2010; 119:1566-70.

Lowry OH, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951, 193: 265-75.

Maia-Ribeiro EA, et al. Functional, balance and health determinants of falls in a free living community Amazon riparian elderly. Arch Gerontology Geriatrics 2012, 56:350-357.

Oliveira HP. Elaboração de néctar de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) e avaliação das características físico-químicas e sensoriais durante o armazenamento. Master dissertation, Manaus: University of Amazonas, 1999.

Pardo SMA. Efecto de *Solanum sessiliflorum* Dunal sobre el metabolismo lipídico y de la glucosa. Ciência e Investigación 2004; 2:43-48.

Pires AMB, Silva OS, Nardelli PM, Gomes JC. Caracterização e processamento de cubiu (*Solanum sessiliflorum*). Rev Ceres 2006; 53:309-16.

Portella RL, et al. Guaraná (*Paullinia cupana Kunth*) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. Lipids Health Dis 2013, 12:1-9.

Ribeiro EE, Maia-Ribeiro EA, Brito E, Souza J, Viegas K, Veras RP, et al. Aspects of the health of Brazilian elderly living in a riverine municipality of Amazon rainforest. Journal of Cross-Cultural Gerontology 2012; 4:7-22.

Rodrigues E, Mariutti LR, Mercadante AZ. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. *J Agric Food Chem* 2013; 61:3022-9.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Rev Food Nutr* 2005; 45:287–306.

Silva Filho DF, Machado FM. Hortaliças não convencionais da Amazônia. Brasília: EMBRAPA-SPI, Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1997; 97-104.

Silva L, Tsushida T, Terao J. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. *Arch Biochem Biophys* 1998; 349:313-20.

Silva Filho DF, Andrade JS, Clement CR, Machado FM, Noda H. Correlações fenotípicas, genética e ambientais entre descritores morfológicos e químicos em frutos de cubiu (*Solanum sessiliflorum Dunal*) da Amazônia. *Acta Amazôn* 1999; 29:503-11.

Souza LT, Zonta JB, Zonta JH, Braun H, Martins Filho S. Caracterização física e química de cúbio (*Solanum sessiliflorum Dunal*) durante o seu desenvolvimento. *Rev Ciênc Agron* 2008; 39:449-54.

Van't Veer P, Janson M, Klert M, Kok F. Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public Health Nutr* 2000; 3:103-7.

Victor VM, et al. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design* 2009; 15:2988-3002.

WHO (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO, Technical Report Series 916. Geneva.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a potencial atividade biológica do fruto amazônico *S. sessiliflorum* conhecido na Região Norte do Brasil como cubú. Esta investigação mostrou efeito antioxidante, na diminuição dos níveis de LDL-oxidado que é uma molécula aterogênica bem como atividade antitumoral. A partir da revisão da literatura estima-se que estes resultados são pioneiros não tendo sido descritos anteriormente em estudos científicos publicados.

Um grande número de estudos tem demonstrado que dietas com altas ingestões de frutas e verduras estão associadas a diminuição do risco do desenvolvimento de algumas formas de câncer (GESCHER et al, 1998; DIVISI et al, 2006; BÉLIVEAU & GRINGAS et al 2007; GONÇALVES et al 2010) e ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BEECHER 1999; VAN'T VEER et al, 2000; WHO 2003; SCALBERT et al 2005). Este efeito tem sido associado as biomoléculas presentes na sua composição química, como o caso de polifenóis e carotenoides. No entanto, estes estudos são desenvolvidos considerando frutas consumidas em larga escala e comercializadas em boa parte do mundo. Ainda há alguns estudos que relatam as propriedades funcionais de frutas e tropicais, no entanto as informações sobre os frutos da região amazônica consumidos desde o período pré-colombiano.

Muitos frutos consumidos por populações regionais ainda não foram estudados, como o caso do *Solanum sessiliflorum*, consumido na região amazônica. O uso popular desse fruto tem sido associado principalmente aos seus possíveis efeitos no perfil lipídico e na modulação da glicose circulante, além de suas propriedades cicatrizantes (raiz, folha e caule da planta). No entanto os estudos publicados que abrangem as propriedades funcionais do *Solanum sessiliflorum* são muito escassos. Nestes termos, o presente estudo visou contribuir na elucidação destas propriedades funcionais e na forma como a ingestão do fruto do *S. sessiliflorum* pode contribuir nos efeitos benéficos à saúde.

Para desenvolver este estudo, inicialmente foram produzidos extratos hidroalcóolicos do fruto e verificado nestes extratos a presença de compostos bioativos totais (extrato da polpa e semente). Após esta análise, foi realizada uma

análise de CLAE em ambos os extratos para quantificar a presença de moléculas bioativas, incluindo β -caroteno e compostos fenólicos e comprovou-se a presença de moléculas bioativas na sua composição química como ácido gálico, ácido caféico, quercetina, rutina, β -caroteno e catequina (este último apenas no extrato da casca). Este é o primeiro estudo que analisa estas moléculas bioativas nos extratos de *S. sessiliflorum*. É bem descrito que estas moléculas apresentam diversas atividades, dentre elas atividades anticarcinogênicas, antioxidante, e cardioprotetora (MENDOZA & BURD, 2011; TOUAIBIA et al, 2011; ARAÚJO et al, 2011; VERMA et al, 2013).

Também foi determinada a capacidade antioxidante através do ensaio DPPH. No entanto os resultados aqui descritos apresentaram um efeito menor do que o observado por Gonçalves et al (2013), que descreveu o potencial de inibição da oxidação em 50% (PI50) de 65,12 $\mu\text{g/mL}$. Diversos fatores podem influenciar os resultados do teste DPPH, um destes fatores é a variação na composição química (YUYAMA et al, 2007). Outra diferença entre o estudo aqui conduzido e o estudo de Gonçalves et al (2013) é quanto a preparação do extrato, aqui foi utilizado um extrato hidroalcolólico (etanol 70%) enquanto que no estudo de Gonçalves foi utilizado um extrato aquoso. Diferenças no solvente e preparo do extrato podem refletir diretamente nos tipos de compostos a serem extraídos e conseqüentemente nas propriedades dos referidos extratos.

Outro fato relevante é que o ensaio do DPPH é um dos métodos mais empregados para expressar a atividade antioxidante comparando várias amostras. No entanto, essa medida requer alguns cuidados devido a relação não-linear entre a concentração antioxidante e a atividade antiradicalar (LOCATELLI et al, 2009). Diversos fatores podem influenciar o ensaio do DPPH como por exemplo o uso de solventes e o pH (LITWINIENKO et al, 2003), tempo de reação e a forma de reportar os dados (MOLYNEUX 2004), conteúdo de antioxidantes como a concentração de carotenoides (WETTASINGHE & SHAHIDI, 2000). É necessário complementar os estudos de atividade antioxidante em plantas com testes adicionais em modelos biológicos.

O efeito citoprotetor do extrato da polpa e semente (parte do fruto habitualmente ingerido) foi avaliado em dois modelos biológicos *in vitro* (plasma e PBMCs) expostas a o estresse oxidativo agudo causado por H_2O_2 . No modelo em PBMCs humanos foi observado que em concentrações de 30 $\mu\text{g/mL}$ o extrato foi

capaz de reverter a mortalidade celular. Já no plasma foi observado que os níveis de EROs foram diminuídos somente em concentrações mais altas do extrato (>300µg/mL). O efeito antioxidante encontrado neste estudo corrobora com os dados descritos por Rodrigues et al (2013), que além de observarem que o extrato de *Solanum sessiliflorum* é rico em β-caroteno e ácido clorogênico, observaram também que este extrato apresenta potente atividade antioxidante em relação ao radical H₂O₂ e em relação ao radical hipocloroso.

Evidências tem demonstrado que EROs, como o H₂O₂, apresentam importantes funções como moléculas de sinalização que regulam uma variedade de processo fisiológicos (SENA & CHANDEL, 2012). No entanto, o desbalanço causado tanto por fatores intrínsecos quanto extrínsecos que aumentam o estresse oxidativo celular apresentam sérias consequências. O estresse oxidativo induzido pelo excesso de EROs tem sido associado a diversos processos patológicos como o caso do câncer e doenças cardiovasculares, como a aterosclerose (DIZDAROGLU & JARUGA, 2002; VICTOR et al., 2009).

O H₂O₂ é considerado uma das formas mais agressivas de EROs, e em níveis elevados pode causar danos a diversas biomoléculas, como oxidação de lipídeos, proteínas e DNA ou ainda agir diretamente na sinalização celular da apoptose. Os danos no DNA pode ser resultado da produção do radical hidroxila, resultado da reação do H₂O₂ com metais de transição como o ferro (DIZDAROGLU & JARUGA, 2012). Os resultados obtidos indicam que o *Solanum sessiliflorum* apresenta efeito preventivo no desenvolvimento do estresse oxidativo.

A oxidação de lipídeos é considerada a primeira causa da aterosclerose que está associada às doenças cardiovasculares. O LDL-ox é uma importante molécula envolvida na progressão das placas ateroscleróticas bem como nos estados de transição das lesões ativas (VICTOR et al., 2009). Por essa razão, estudos epidemiológicos e experimentais têm sido desenvolvidos para avaliar o potencial benéfico da suplementação com antioxidantes na prevenção da aterosclerose.

Este é o primeiro estudo que investiga o efeito do extrato de *Solanum sessiliflorum* na oxidação do LDL. Os resultados dos testes *in vitro* indicam que tanto o extrato da casca quanto o extrato da polpa e semente aumentaram a fase lag na oxidação do LDL bem como diminuíram significativamente a oxidação do LDL. Estes efeitos observados podem ser associados aos compostos bioativos presentes na composição química do *Solanum sessiliflorum*, que atuam de forma antioxidante,

diminuído o estresse oxidativo, evitando a oxidação o LDL e também diminuindo o ambiente citotóxico. Resultados similares foram obtidos em outros frutos consumidos na região amazônica (PORTELLA et al 2013).

Este estudo também avaliou as propriedades antitumorais do *Solanum sessiliflorum* em duas diferentes linhagens de câncer de mama (MCF7) e colorretal (HT29). Foi observado que o extrato da polpa e semente apresentou efeitos diferenciais em relação ao tipo de câncer. Enquanto que nas células MCF-7 o extrato não afetou a viabilidade e proliferação celular, nas células HT29 este efeito foi similar ao quimioterápico 5-fluorouracil, onde observou-se a diminuição da viabilidade e da proliferação celular. O quimioterápico 5-fluorouracil é um importante agente anticâncer e compõe parte da formulação de dez drogas aprovadas pela FDA (Food and Drug Administration) no tratamento de câncer colorretal (National Cancer Institute, 2013).

Quimicamente o 5-fluorouracil é um nucleosídeo análogo que inibe a enzima timidilato sintetase, que incorpora metabólitos de fluoropirimidina no DNA e RNA (LONGLEY et al, 2003). Este agente é capaz de modular a expressão de genes com ação pró-apoptótica (YANG & WANG, 2011). A quercetina, também presente no extrato do *Solanum sessiliflorum* também é descrita por contribuir no efeito antitumoral, como observado no estudo realizado por Priego et al (2008).

Os resultados contraditórios observados nas células HT29 e MCF-7 sugerem que a presença de moléculas bioativas como os polifenóis em alguns extratos de frutas tem efeitos citotóxicos individuais e não garantem um efeito anticarcinogênico universal.

Por fim é importante comentar que a principal limitação metodológica do estudo é que o mesmo foi conduzido apenas em modelos experimentais *in vitro*. Entretanto, tal limitação não desqualifica o trabalho, cujos resultados podem servir para a realização de pesquisas adicionais em modelos *in vivo* animais e de seres humanos.

O presente estudo descreve importantes propriedades funcionais do *Solanum sessiliflorum*, tais como propriedades antioxidantes, antitumorais (câncer colorretal) e na inibição da oxidação do LDL. Tais achados corroboram com estudos previamente descritos na literatura de que dietas ricas em frutas e verduras podem contribuir para a diminuição do risco e prevenção de diversas doenças crônicas

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados aqui apresentados, podemos inferir que o *Solanum sessiliflorum*:

- Apresenta compostos bioativos em sua composição como flavonóides, polifenóis e taninos. Verificou-se também a presença de β -caroteno, quercetina, rutina, ácido gálico, ácido caféico e catequina em sua composição, sendo este último presente apenas no extrato da casca.

- Ambos os extratos (da casca e da polpa e semente) apresentaram atividade antioxidante *in vitro*, dado que está de acordo com estudos prévios relatados na literatura. Foi observado também que o extrato da polpa e semente, parte habitualmente ingerida, apresentou um efeito citoprotetor. Este efeito foi observado tanto na diminuição da produção de ERs quanto na proteção à quebra do DNA de PBMCs.

- Em relação ao efeito antitumoral, este foi observado na linhagem de células de câncer de colorretal (HT29), onde o extrato da polpa e semente demonstrou diminuir a viabilidade celular bem como a proliferação. No entanto, efeito contrário foi observado na linhagem de células de câncer de mama (MCF7), onde o extrato aumentou a viabilidade e proliferação das células tumorais. Ficou evidenciado que o efeito antitumoral ficou restrito às células HT29 e pode estar relacionado à modulação de diferentes genes envolvidos nas vias apoptóticas.

- Ambos os extratos da polpa e semente quanto o extrato da casca apresentaram propriedades benéficas na diminuição da produção de dienos conjugados, muitas vezes associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, em especial a aterosclerose.

Em suma, apesar de preliminares, os dados obtidos indicam potenciais atividades funcionais e farmacológicas associadas ao *Solanum sessiliflorum*, fruto amplamente consumido na região Amazônica. No entanto fazem-se necessários mais estudos para melhor entender a interação entre o *Solanum sessiliflorum* e o metabolismo oxidativo, bem como sua correlação na prevenção de doenças como o câncer e doenças cardiovasculares.

6 REFERÊNCIAS

ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1124-1131, 2004.

ARAÚJO, J. R. GONÇALVES, P.; MARTEL, F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. **Nutrition Research**, v. 31, p. 77-87, 2011.

BALMAIN, A.; HARRIS, C. C. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 371-377, 2000.

BARBOSA-FILHO, J. M.; et al. Chemical and pharmacological investigation of Solanum species of Brazil – a search for solasodine and other potentially useful therapeutic agents. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 89-191, 1991.

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, p.113-23, 2006.

BEECHER, G. R. Phytonutrients' role in metabolism: Effects on resistance to degenerative processes. **Nutrition Reviews**, v. 57, p. S3-S6, 1999.

BÉLIVEAU, R.; GINGRAS, D. Role of nutrition in preventing cancer. **Canadian Family Physician**, v. 53, n. 11, p. 1905-1922, nov. 2007.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v.29, 1340-1344, 2006.

BRAUNWALD E.; ZIPES, D. P. **Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine**. 7 ed. Philadelphia: Saunders, 2005.

BOOZER, C. N.; et al. An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. **International Journal of Obesity**, v. 5, p. 316-324, 2001.

BUCKLAND, G.; et al. Adherence to the Mediterranean-style diet and reduces mortality in the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). **Br J. Nutr**, v. 17, p. 1-11, may. 2011.

BURCHAM, P. C. Internal hazards: baseline and damage by endogenous products of normal metabolism.. **Mutation Research**, v.. 1999, n. 443, p.11-36.

BUSHMAN, J. L. Green tea and cancer in humans: a review in literature. **Nutrition and Cancer**, v. 31, p. 151-158, 1998.

CERVATO, A. M.; et al. Dieta habitual e fatores de risco para doenças cardiovasculares. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 3, p. 227-35, 1997.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v.30, p.441-449, 2007.

CHAIMOVICKZ, F.A. A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 2, p. 184-200, 1997.

CLAES, B.; BUYSSCHAERT, I.; LAMBRECHTS, D. Pharmaco-epigenomics: discovering therapeutic approaches and biomarkers for cancer therapy. **Heredity**, v.105, n. 1, p. 152-160, jul. 2010.

DHALLA, N. S.;TEMSAH, R. M.; NETTICADAN,T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases **Journal of Hypertension**, v.18, p. 655-673, (2000).

DIVISI, D.; et al. Diet and câncer. **Acta Bio-medica: Atenei Parmensis**, v.77, n.2, p.118-123, aug. 2006.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. **Free Radical Research**, v. 46, n. 4, p. 382-419, 2012.

ESPOSITO, K.; et al. Longterm effect of mediterranean-style diet and calorie restriction on biomarkers of longevity and oxidative stress in overweight men. **Cardiology Research and Practice**, v. 2011, p. 1-5 2010.

FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. F. S. Alimentos funcionais: quando a boa nutrição melhora a nossa saúde. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 20, n. 31-34, 2002.

FUJIKI, H.; et al. Cancer inhibition by green tea. **Mutation Research**, v. 402, p. 307-310, 1998.

FUKUMASU, H.; et al. Chemopreventive effects of Paullinia cupana Mart var. sorbilis, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 233, p. 158-164, 2006.

FUKUMASU, H.; et al. Paullinia cupana Mart var. sorbilis, the guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 305-310, 2008.

FUKUMASU, H.; et al. Paullinia cupana Mart var. sorbilis, the guaraná, increases survival of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1-16, 2010.

GARÓFOLO, A.; et al. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4., p. 491-505, Campinas, out./dez., 2004.

GIL, L.; et al. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. **Free Radical Research**, v. 40, n. 5, p. 495-505, 2006.

GESCHER A.; et al. Suppression of tumor development by substances derived from the diet – mechanisms and implications. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, n. 1, p. 1-12, 1998.

GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.58, n.8, p. 4666-4674, apr. 2010.

GUPTA, R. C.; LUTZ, W. K. Background DNA damage for endogenous and unavoidable exogenous carcinogens: a basis for spontaneous cancer incidence?. **Mutation Research**, v. 424, n. 1-2, p. 1-8, mar.1999.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: **Free Radical Biology and Medicine**. 3rd ed. New York: Oxford University Press. p. 187-267, 2007.

HAMER, M.; et al. Dietary patterns, assessed from a weighed food record, and survival among elderly participants from the United Kingdom. **Eur J Clin Nutr**, v. 64, n. 8, p. 853-861, 2010.

HESSLER, J. K.; et al. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. **Arteriosclerosis**, v. 3, n. 3, p. 215-222, 1983.

HERSKIND, A. M., et al. The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born. **Human and Genetics**, v. 97, n. 3, p. 319-323, 1996.

ITSIPOULOS, C.; HODGE A., KAIMAKAMIS, M. Can the Mediterranean diet prevent prostate cancer. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n. 2, p. 227-239, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil em 2003. **Instituto Nacional de Câncer**, Rio de Janeiro, 2003.

IRITI, M.; VITALINI, S. Health-Promoting Effects of Traditional Mediterranean Diets – A Review. *Polish Journal of Food Nutrition Science*, v. 62, n. 2, p. 71-76, 2012.

KAVANAGH, K. T.; et al. Green Tea Extracts Decrease Carcinogen-Induced Mammary Tumor Burden in Rats and Rate of Breast Cancer Cell Proliferation in Culture. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 82, p. 387-398, 2001.

KIRKWOOD, T. B.; AUSTAD, S. N. Why do we age? **Nature (Lond)**, v. 408, p. 233-238, 2000.

KREWER, C. C.; et al. Habitual intake of guarana and metabolic morbidities: an epidemiological study of an elderly amazonian population. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 9, p. 1367-1374, 2011.

KUSHI, L. H.; LENART, E. B.; WILLETT, W. C. Health implications of Mediterranean diets in light of contemporary knowledge: Meat, wine, fats, and oils. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p. 1416S-1427S, 1995.

LIMA, F. A.; et al. Café e saúde humana: um enfoque nas substâncias presentes na bebida relacionadas às doenças cardiovasculares. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 6, p. 1063-1073, nov/dez, 2010.

LITWINIENKO, G.; INGOLD, K. U. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph) in alcohols. **J Org Chem**, v. 68, n. 9, p. 3433-3438, 2003.

LIZCANO, L.J.; et al. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. **Food Chemistry**, v.119, n.4, .1566-1570, apr. 2010.

LOCATELLI, M.; ET AL. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. **Food Chemistry**, v. 114, p. 880-897, 2009.

LONGLEY, D. P.; HARKIN, P.; JOHNSTON, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature reviews in cancer**, v. 3, p. 330-338, 2003.

LOUREIRO M. A. P.; PAOLO M. Di; MEDEIROS M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**, vol. 25,, n. 5, p. 777-793, 2001.

MIURA, Y.; et al. Green tea polyphenols (flavan-3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: an ex vivo study in humans. **Jounal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, p. 216-222, 2000.

MAIA, J. R. P. Efeito hipercolesterolêmico do cubiu (*Solanum sessiliflorum Duna*) em ratos. **Dissertação de mestrado**, Manaus: Universidade do Amazonas, 2010.

MAIA-RIBEIRO, E. A.; et al. Functional, balance and health determinants of falls in a free living community Amazon riparian elderly. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 56, n. 2, p. 350-357, 2012.

MENDOZA, E.E.; BURD, R., Quercetin as a systemic chemopreventative agent: structural and functional mechanisms. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1216-1221, 2011.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, p. 211-219, 2004.

MOTA, P.; FIGUEIREDO, P. A.; DUARTE, J. A. Teorias biológicas do envelhecimento. **Revista Portuguesa de Ciencia & Desporto**, v. 4, p. 81-110, 2004.

MEDAWAR, P. B. **An unresolved problem of biology**. London: H. K. Lewis, 1952.

NAGANO, J.; et al. A prospective study of green tea consumption and cancer incidence, Hiroshima and Nagasaki (Japan). **Cancer Causes Control**, v. 112, p. 501-508.

OLIVEIRA, H. P. Elaboração de néctar de cubiu (*Solanum sessiliflorum Dunal*) e avaliação das características físico-químicas e sensoriais durante o armazenamento. **Dissertação de mestrado**, Manaus: Universidade do Amazonas, 1999.

OLIVEIRA, M. C., SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative Stress Action in Cellular Aging. **Brazilian Archives f Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, nov./dec. 2010.

OPALA, T.; et al. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects – a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. **European Journal of Medical Research**, v. 11, p. 343-350, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Organização Mundial Da Saúde**, 1990.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Organização Mundial Da Saúde**, 2003.

PANZIERA, F.B., et al. Avaliação da ingestão de minerais antioxidantes em idosos Evaluation of antioxidant minerals intake in elderly. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 49-58, jan. 2011.

PARDO, SMA. Efecto de *Solanum sessiliflorum* Dunal sobre el metabolismo lipídico y de la glucosa. **Ciência e Investigación**, v.2, p. 43-48, 2004.

PEREIRA, Z. R. F O efeito hipoglicêmico da fibra do Cubiu (*Solanum sessiliflorum Dunal*) em ratos diabéticos. **Dissertação de mestrado**, Manaus: Universidade do Amazonas, 2001.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PRIEGO, S.; et al. Natural polyphenols facilitate elimination of HT-29 colorectal cancer xenografts by chemoradiotherapy: a Bcl-2- and superoxide dismutase 2-dependent mechanism. **Mol Cancer Ther**, v. 7, n. 10, p. 3330-3342, 2008.

PIRES, A. M. B. et al. Caracterização e processamento de cubiu (*Solanum sessiliflorum*). **Revista Ceres**, v. 53, n. 307, p. 309-316, 2006.

PODREZ, E. A.; ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 28, p. 1717-1725, 2000.

PORTELLA, R. L.; et al. Guaraná (*Paullinia cupana Kunth*) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, p. 1-9, 2013

RAMASARMA, T. Some radical queries. **Toxicology**, v. 148, p. 85-91, 2000.

RIBEIRO, E. E.; CRUZ, I. B. M. **Dieta amazônica: saúde e longevidade**. 2. ed. Manaus: Editora da Amazônia, 2012.

RIBEIRO, E. E.; et al. Aspects of the health of Brazilian elderly living in a riverine municipality of Amazon rainforest. **Journal of Cross-Cultural Gerontology**, v. 4, p. 7-22, 2012.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 12, p. 3022-3029, 2013.

ROMAN, B.; et al. Effectiveness of the Mediterranean diet in the elderly. **Journal of Clinical Interventions in Aging**, v. 3, n. 1, p. 97-109, 2008.

SCALBERT, A.; et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food and Nutrition**, v. 45, p. 287-306, 2005.

SCHUELTER, A.R.; et al. *In vitro* regeneration of cocona (*Solanum sessiliflorum*, *Solanaceae*) cultivars for commercial production. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 3, p. 963-975, 2009.

SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Mol Cell**, v. 48, n. 2, p. 158-167, 2012.

SERRA-MAJEM, L.; ROMAN, B.; ESTRUCH, R. Scientific evidence of interventions using the Mediterranean diet: a systematic review. **Nutrition Review**, v. 64, n. 2, p. S27-S47, 2006.

SILVA FILHO, D. F.; MACHADO, F. M. Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). In: Cardoso, M. O. **Hortaliças não convencionais da Amazônia**. Brasília: EMBRAPA-SPI. Manaus: EMBRAPA-CPAA, p. 97-104, 1997.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Revisão: alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, n. 2, p. 7-19, 1999.

SOUZA, L. T.; et al. Caracterização física e química de cúbio (*Solanum sessiliflorum* Dunal) durante o seu desenvolvimento. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 3, p. 449-454, 2008.

STEINBERG, D.; WITZTUM, J. L. Lipoproteins, lipoprotein oxidation, and atherogenesis., in: CHIEN. K. R., (Ed.), *Molecular Basis of Cardiovascular Disease.*, W. B. Saunders Co., **Philadelphia**, 1999, p. 458-475.

STEINBRECHER, U. P.; et al. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation os low density lipoprotein phospholips. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 12, p. 3883-3887, 1984.

TOGON, G.; et al. Does the Mediterranean diet predict longevity in the elderly? A Swedish perspective. **Age**, 2010.

TOUAIBIA, M.; et al. Caffeic Acid, a versatile pharmacophore: an overview. **Mini Reviews in Medical Chemistry**, v. 11, n. 8, 695-713, 2011.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p.1-40, 2006.

VAN'T VEER, L. J.; et al. Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. **Public Health Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 103-107, 2000.

VASCONCELOS, S.M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, p.1323-1338, 2007.

VERMA, M.; ET AL. Epigenetic Research in Cancer Epidemiology: Trends, Opportunities, and Challenges. **Cancer Epidemiology, Biomarkers Prevention**, in press, 2013.

VICTOR, V. M.; et al. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. **Current Pharmaceutical Design**, .v. 15, n. 26, p. 2988-3002, 2009.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. **Food Chemistry**, v. 70, p. 17-26, 2000.

WHO (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO, Technical Report Series 916. Geneva.

WILLCOX, D. C., et al. Caloric restriction and human longevity: what can we learn from Okinawans? **Biogerontology**, v. 7, n. 3, p. 173-177, 2006.

WILLCOX, D. C., et al. The Okinawan diet: health implications of a low-calorie, nutrient-dense, antioxidant-rich dietary pattern low in glycemic load. **Journal of the American College of Nutrition**, suppl, p. 500S-516S, 2009.

YANG, T. T.; KOO, M. W. Inhibitory effect of Chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation. **Atherosclerosis**, v. 148, p. 67-73, 2000.

YANG, C. S.; WANG, H. Mechanistic issues concerning cancer prevention by tea catechins. **Mol. Nutr. Food Res**, v. 55, p. 819-831, 2011.

YUYAMA, L. K. O.; et al. Quantificação de macro e micro nutrientes em algumas etnovarietades de cubiu (*Solanum sessiliflorum Dunal*). **Acta Amazônica**, v. 37, n. 3, 425-430, 2007.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3-19, sep. 2003.

YANG, C. S.; CHUNG, J. Y.; et al. Tea and tea polyphenols in cancer prevention. **Journal of Nutrition**, v.130, p. 472S-478S, 2000.

ZHENG, W.; et al. Tea consumption and cancer incidence in a prospective cohort study of postmenopausal women. **American Journal of Epidemiology**, v. 144, p. 175-182, 1996.