



**ESTADO DE MINAS GERAIS  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS**



---

**MARIA INGRA OLIVEIRA MARTINS**

**ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DE PRINCÍPIOS ATIVOS OBTIDOS  
A PARTIR DO EXTRATO DA CASCA DO FRUTO DO PEQUIZEIRO (*Caryocar  
brasiliense* Camb.)**

**Montes Claros-MG  
Agosto de 2016**

**MARIA INGRA OLIVEIRA MARTINS**

**ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DE PRINCÍPIOS ATIVOS OBTIDOS  
A PARTIR DO EXTRATO DA CASCA DO FRUTO DO PEQUIZEIRO (*Caryocar  
brasiliense* Camb.)**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Montes Claros.

**Orientador: Prof. Dr. Geraldo Aclecio Melo**

**Montes Claros-MG  
Agosto de 2016**

**MARIA INGRA OLIVEIRA MARTINS**

**ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DE PRINCÍPIOS ATIVOS OBTIDOS  
A PARTIR DO EXTRATO DA CASCA DO FRUTO DO PEQUIZEIRO (*Caryocar  
brasiliense* Camb.)**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Montes Claros.

APROVADA: 29 de Agosto de 2016

D.Sc. Geraldo Aclecio Melo  
Orientador/UNIMONTES

D.Sc. Lourdes Silva de Figueiredo  
UFMG

D.Sc. Dario Alves de Oliveira  
UNIMONTES

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, a Deus que é meu escudo e fortaleza, por me iluminar, conduzir, conceder paciência e me dar sabedoria. Foi Deus que me fortaleceu nos momentos mais difíceis, não me deixando desistir, mesmo quando tudo parecia impossível, me apresentou pessoas que me ajudaram, me deu a oportunidade de ter minha família e meus amigos. Sem Deus nada seria possível e esta vitória jamais teria sido alcançada. A Deus toda honra e toda glória!

Aos meus pais Aníbal e Anaides, que em todo momento me deram o apoio necessário pra chegar até aqui. Aos meus irmãos Marcus, Euler e a minha “boadrasta” Cida pelas orações.

Ao meu namorado Pedro Henrique pela força e orações durante os momentos difíceis e pela paciência nos momentos em que estive ausente.

Ao Pastor Altair, Pastora Ana e a Das Dores pelas orações e incentivos.

Ao Prof. Dr. Geraldo Aclecio por sua orientação com muita dedicação, seriedade e paciência. Você é o exemplo que pretendo seguir na minha futura vida de docente e pesquisadora. “A alma cresce à altura daquela que admira” E.G. White.

Ao Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães do Laboratório de Pesquisa em Saúde do Hospital Universitário Clemente Faria, pelo fornecimento da linhagem celular SCC-9, indispensável para a conclusão dos estudos com a casca do pequi.

A Prof. Dra Lucyana Conceição Farias e a Me. Eloá Santos pelos ensinamentos e paciência durante o cultivo celular.

A pesquisadora Ane Patrícia do Laboratório de Pesquisas em Agroquímica da UFMG pelas análises em sistema CG-EM.

Ao colega e amigo Sandro Lânio pelo auxílio, pelos momentos de companheirismo e amizade.

Aos professores que ministraram as disciplinas que cursei durante o mestrado, o conhecimento adquirido nas aulas, discussões e seminários contribuíram significativamente para a minha formação.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Montes Claros, pela oportunidade.

Enfim, a todos aqueles – amigos e familiares – que de alguma forma tornaram possível a conclusão deste trabalho.

“Porque dEle  
é a sabedoria e a força; Ele muda os tempos e  
as horas; Ele remove os reis e estabelece os  
reis; Ele dá sabedoria aos sábios e ciência aos  
entendidos”... (Daniel 2: 20 e 21).

(Bíblia Sagrada)

## RESUMO

O Câncer atinge mais ou menos 200 tipos de células e caracteriza-se pela perda de função celular e ausência de diferenciação, além da proliferação descontrolada. Muitos estudos são realizados visando a descoberta de novas drogas e formas de tratamento desta enfermidade. As espécies vegetais são fontes potenciais de novas drogas anticâncer, assim como fornecedoras de precursores de novos quimioterápicos. Dentro desta perspectiva, o objetivo deste trabalho foi fracionar e avaliar o potencial de uso do extrato da casca do fruto do pequi como fonte de princípios ativos com atividade antineoplásica, frente a linhagens de células de carcinoma epidermóide de língua (SCC-9). Após fracionamento obteve-se duas frações do extrato (fração residual final e fração butanólica) que foram testadas *in vitro*, utilizando o teste de viabilidade celular em três concentrações: 0.0375, 0.075 e 0.15 mg.mL<sup>-1</sup>. Apenas a fração butanólica foi ativa e apresentou IC<sub>50</sub> = 22,7 µg.mL<sup>-1</sup>, portanto considerada muito ativa. Na análise do perfil metabólico da fração ativa, a butanólica foram encontrados como compostos majoritários nove carboidratos cujas estruturas não foram identificadas. No extrato bruto foram identificadas substâncias, as quais podem ser candidatas á atividade observada, seja por sinergismo com as moléculas de carboidratos encontrados ou isoladamente, como o ácido gálico, cuja ação antineoplásica é destacada na literatura. Estes resultados demonstram a relevância de substâncias advindas de plantas do Cerrado e destaca que a fração butanólica obtida do extrato hidrometanólico bruto da casca do fruto do pequi, como uma opção promissora para o tratamento do carcinoma epidermóide de língua (SCC-9). Destaca-se, no entanto, que não foram realizados testes em células normais (não cancerígenas), fazendo-se necessário a ampliação do estudo neste sentido e também visando a confirmação da identidade dos compostos encontrados na fração ativa, bem como o mecanismo de ação dos mesmos.

**Palavras-chave:** Câncer, SCC-9, ácido gálico, citotoxicidade

## ABSTRACT

The cancer affects about 200 types of cells and is characterized by loss of cellular function and absence of differentiation, as well as uncontrolled proliferation. Studies are conducted to discover new drugs and treatment forms of this disease. Plant species are potential sources of new anticancer drugs, as well as suppliers of precursors of new chemotherapeutics. From this perspective, the objective was to fractionate and evaluate the potential use of pequi fruit peel extract as a source of active ingredients with antineoplastic activity against tongue squamous cell carcinoma cell lines (SCC-9). After fractionation two fractions yielded from pequi peel extract (butanolic fraction and residual fraction) were tested in vitro using the test of cell viability in three concentrations: 0.0375, 0.075 and 0.150 mg.mL<sup>-1</sup>. Only the butanolic fraction was active and showed IC<sub>50</sub> = 22.7 µg.mL<sup>-1</sup>, therefore considered with high activity. The metabolic profile of the active fraction, the butanolic one, nine carbohydrates were found as majors compounds whose structures were not identified yet. In the crude extract, substances which may be candidates for the observed activity, either by synergism with the carbohydrates or separately, were identified, for example the gallic acid, which antineoplastic action is highlighted in the literature. These results demonstrate the relevance of substances resulting from the Cerrado plants and points out that the butanolic fraction obtained from crude extract of the pequi fruit peel as a promising option for the treatment of squamous cell carcinoma of the tongue. It is noteworthy, however, that tests were not performed in normal cells (not cancerous), making it necessary the extension of the study in this regard and also aiming the identity of the compounds found in the active fraction, as well as to understand their mechanism of action.

Keywords: Cancer, SCC-9, gallic acid, cytotoxicity

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	vi
<b>Abstract</b> .....	vii
<b>Lista de Figuras</b> .....	ix
<b>Lista de Tabela</b> .....	x
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Material e Métodos</b> .....	3
<b>2.1.</b> Obtenção e preparo do material de estudo .....	3
<b>2.2.</b> Preparo do extrato hidrometanólico .....	3
<b>2.3.</b> Fracionamento do extrato hidrometanólico .....	4
<b>2.4.</b> Ensaio <i>in vitro</i> .....	6
<b>2.4.1.</b> Cultura de células.....	6
<b>2.4.2.</b> Teste da citotoxicidade celular (MTT).....	7
<b>2.5.</b> Análise do perfil metabólico .....	8
<b>2.5.1.</b> Preparo das amostras.....	8
<b>2.5.2.</b> Análises cromatográficas .....	9
<b>2.6.</b> Análise Estatística .....	9
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	9
<b>3.1.</b> Processo de extração e fracionamento .....	9
<b>3.2.</b> Avaliação da atividade antineoplásica .....	10
<b>3.3.</b> Análise do perfil metabólico .....	14
<b>4. Conclusões e Considerações Finais</b> .....	20
<b>5. Referências</b> .....	22



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema do preparo do extrato hidrometanólico bruto da casca do fruto do pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.), para posterior processo de fracionamento.....04
- Figura 2: Fluxograma do fracionamento do extrato hidrometanólico bruto da casca do fruto do pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) pela técnica da partição líquido-líquido, utilizando os solventes hexano, diclorometano, clorofórmio e butanol, separando classes de compostos conforme o incremento de polaridade.....05
- Figura 3: Desenho experimental. Disposição das células na microplaca e seus tratamentos nas concentrações de 0.0375, 0.075, 0.15 mg/mL, em 3 repetições para cada fração.....07
- Figura 4: Porcentagem de morte celular da linhagem celular do carcinoma epidermóide de língua (SCC-9), quando colocadas em contato com a fração butanólica em diferentes concentrações, por 24 horas. ....13
- Figura 5: Grupos utilizados para análise da atividade antineoplásica da fração butanólica. O primeiro grupo é o controle negativo, em que havia apenas as células, o segundo grupo havia células e o veículo DMSO 50% utilizado como diluente da FB e o terceiro grupo células tratadas com diferentes concentrações da FB.....13
- Figura 6: Cromatograma obtido em sistema cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas e identificação dos compostos presentes na fração butanólica obtida do extrato da casca do fruto do pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.).....17

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos identificados no extrato bruto da casca do pequi por análise CG/EM.....	16
---	----

## 1. INTRODUÇÃO

O Câncer é uma doença, que atinge mais ou menos 200 tipos de células, caracterizada pelo desvio no controle da proliferação, diferenciação e morte celular, com multiplicação desordenada das células, podendo invadir órgãos e tecidos (MESQUITA, 2009). O processo carcinogênico pode iniciar-se de forma espontânea ou ser provocado pela ação de agentes carcinogênicos, ou seja, predisposição genética, estilo de vida, alimentação, danos oxidativos ao DNA e fatores ambientais (hábito de fumar, a ocupação, e a exposição à radiação e a agentes químicos) que vão resultar na indução de alterações mutagênicas e não mutagênicas ou epigenéticas nas células (CAMARGO, 2011).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2016), a estimativa para o ano de 2016 aponta para a ocorrência de aproximadamente 596 mil casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não-melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão em homens e, os cânceres de mama e de colo do útero em mulheres. Ainda segundo o INCA, os tipos que abrangem a cavidade oral, gengivas, mucosa jugal (bochechas) palato duro (céu da boca), língua (principalmente as bordas) e assoalho (região embaixo da língua), têm como estimativa para 2016 a ocorrência de aproximadamente 15.000 novos casos, sendo em torno de 11.000 em homens e de 4.000 em mulheres. Dentre estes, o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC) compreende tumores da mucosa do trato aerodigestivo superior como cavidade oral (lábio, rebordo alveolar, mucosa bucal, triângulo retromolar, assoalho da boca e língua), orofaringe, laringe e faringe (WARNAKULASURIYA, 2009, BELCHER et al., 2014), tem-se tornando cada vez mais prevalente (VITALE-CROSS et al., 2012).

A terapêutica dos processos cancerígenos do tipo HNSCC, à semelhança demais tipos, baseia-se, de forma geral, na associação da ressecção cirúrgica dos tumores ao

tratamento radioterápico, e a quimioterapia (COSTA-LOTUFO, et al., 2010). Também pode se considerar a quimioprevenção que tem se tornado uma abordagem promissora na prevenção das neoplasias malignas, podendo reduzir significativamente os índices de incidência e mortalidade, pois pode ter efeitos de inibição, supressão e até mesmo reversão do processo de carcinogênese (SURH, 2003; STEWARD e BROWN, 2013).

As plantas são consideradas fonte nobre de moléculas para tratamento e prevenção de várias formas de câncer e, mesmo que a molécula isolada do vegetal não possa ser usada diretamente como medicamento, pode servir de modelo para síntese ou para gerar um pró-fármaco para o desenvolvimento de novos agentes (BRANDÃO, et al., 2010). Estima-se que a maioria (60%) dos fármacos antitumorais introduzidos na terapêutica nas últimas décadas são de origem vegetal, demonstrando a contínua e valiosa contribuição da natureza no combate a doenças, em especial o câncer (COSTA-LOTUFO, et al., 2010).

*Caryocar brasiliense* Camb. da família *Caryocaceae* também conhecido como pequi, piqui, pequiá, amêndoa de espinho, grão de cavalo ou amêndoa do Brasil (GONÇALVES et al., 2011) é uma planta de ampla distribuição no Cerrado brasileiro, e cujo fruto é uma drupa composta por 76,7% de casca, 21,6% de caroço (perênios) e 1,7% de frutinhos (pirênios que não completaram seu desenvolvimento fisiológico) (VERA et al., 2005). Tem grande valor para os povos do Cerrado que exploram principalmente a polpa do fruto na culinária e na indústria agrícola para extração de óleos e produção de licores (CHÉVES, 1997). Além do valor gastronômico e tecnológico, alguns estudos têm demonstrado que o fruto do pequi pode ser fonte de compostos bioativos importantes para a saúde humana inclusive anticancerígenos. Khouri et al. (2007), Grisólia e Oliveira (2007) e Mesquita (2009) demonstraram o potencial antígeno-tóxico e anticarcinogênico do pequi ressaltando o potencial principalmente da polpa do fruto (mesocarpo interno). Rocha

(2011) avaliou o potencial citotóxico do mesocarpo (mesocarpo externo), contra células cancerígenas e observou alta atividade citotóxica dos extratos, considerando-os muito ativos.

Dentro da perspectiva de que a casca do fruto do pequi é uma parte da planta pouco explorada e que estudos revelam seu potencial como fonte de compostos com atividade inibitória do crescimento de células cancerígenas, o objetivo deste trabalho foi fracionar e avaliar o potencial do extrato da casca do fruto do pequi como fonte de substâncias antineoplásicas em linhagens celulares do carcinoma epidermóide de língua (SCC-9), bem como identificar estas substâncias através da análise do perfil metabólico.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

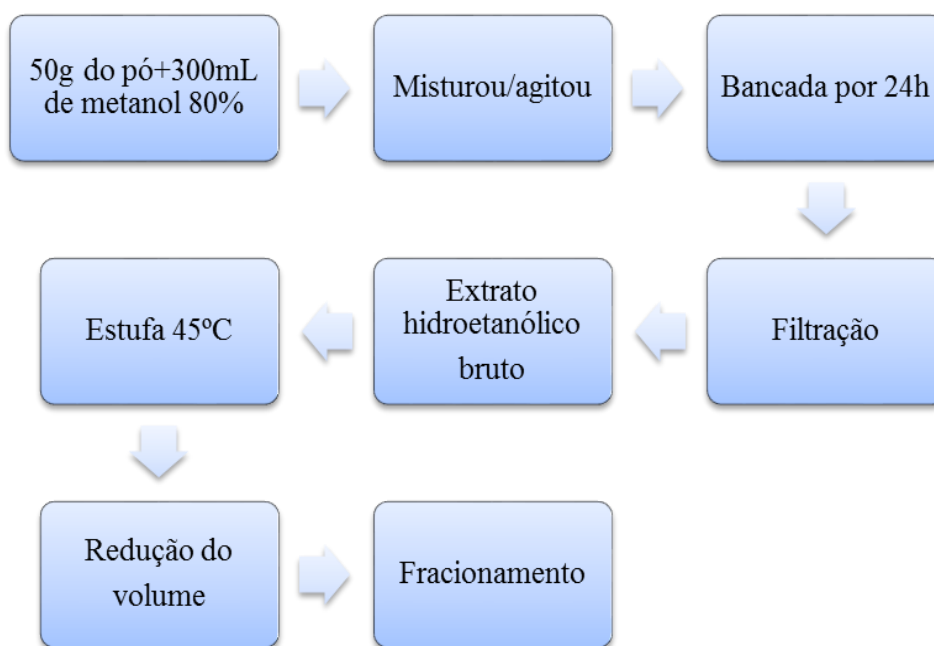
### **2.1. Obtenção e preparo do material de estudo**

Frutos de pequi foram adquiridos no mercado local da cidade de Montes Claros-MG, dos quais foram selecionados aqueles com o epicarpo aparentemente saudável. Em laboratório, os frutos foram cortados e as cascas (mesocarpo externo e epicarpo) separadas e colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar, até peso constante à temperatura de 45°C. Após secagem, as cascas foram trituradas em moinho de faca até obtenção de pó fino (300 mesh), sendo esta a matéria seca a ser trabalhada.

### **2.2. Preparo do extrato hidrometanólico**

A extração foi realizada em erlemeyer onde foi adicionado o material triturado (casca) e metanol 80% como solvente de extração na proporção de 50 gramas de material para 300 mL de solvente. Após um período de 24 horas de extração sob agitação periódica, a mistura foi filtrada e o filtrado considerado o extrato hidrometanólico bruto. Este foi colocado

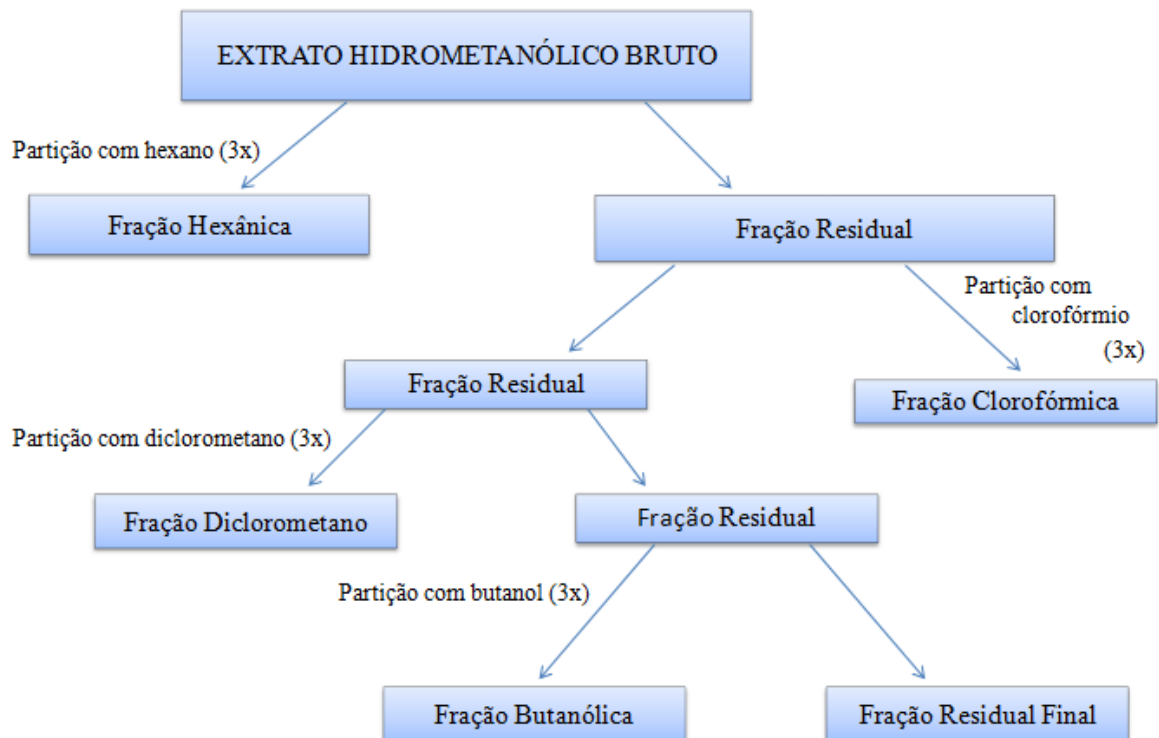
em estufa de ar circulante a 45° C para redução do volume, conforme figura 1, para posterior processo de fracionamento.



**Figura 1.** Esquema do preparo do extrato hidrometanólico bruto da casca do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), para posterior processo de fracionamento.

### 2.3. Fracionamento do extrato hidrometanólico

Para procedimentos de fracionamento líquido-líquido adicionou-se água destilada no extrato hidrometanólico bruto, na proporção de 50 mL de água para 100 mL de extrato. Este procedimento foi realizado para que se proporcionasse melhor partição durante o fracionamento. O fracionamento foi realizado de forma seqüencial utilizando-se hexano, diclorometano, clorofórmio e butanol, conforme fluxograma da figura 2.



**Figura 2.** Fluxograma do fracionamento do extrato hidrometanólico bruto da casca do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) por partição líquido-líquido utilizando os solventes: hexano, diclorometano, clorofórmio e butanol, separando classes de compostos conforme o incremento de polaridade.

Ao final do fracionamento foram obtidas cinco frações: hexânica, diclorometano, clorofórmica, butanólica e residual, da casca do pequi. Todas elas foram levadas para estufa de ar circulante a 45° C para redução do volume por 24h. No entanto, após este processo, foi dada continuidade apenas com as frações residual final e butanólica por terem apresentado maior rendimento.

Para ambas as frações pesou-se 150 mg do material após a secagem e diluiu em 15 mL de DMSO 50%. As diluições preparadas das duas frações foram levadas para o Laboratório de Pesquisa em Saúde do Hospital Universitário Clemente Faria onde foram filtradas para a avaliação da citotoxicidade *in vitro*.

## **2.4. Ensaio *in vitro***

### **2.4.1. Cultura de células**

Foram utilizadas células imortalizadas de carcinoma epidermóide de língua (SCC-9), cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães do Laboratório de Pesquisa em Saúde do Hospital Universitário Clemente Faria. Para o cultivo das linhagens SCC-9 foi utilizado o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM F12/DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal, mantidas em incubadora umidificada a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>.

No procedimento, foram selecionadas células com crescimento visível ao microscópico e o meio e as células sobrenadantes foram removidos. Em seguida, aplicou-se 3 mL de tripsina e deixou agir por oito minutos. Após os oito minutos foram adicionados 2 mL de soro (fator  $\alpha$ 1 anti-tripsina) mais 1 mL de meio para inativar a ação da tripsina. As células foram transferidas para um tubo falcon e o meio foi removido. Em seguida, os tubos falcon foram levados para a centrífuga a 900 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e logo após foi feita a ressuspensão das células que foram colocadas em microtubos de 2mL.

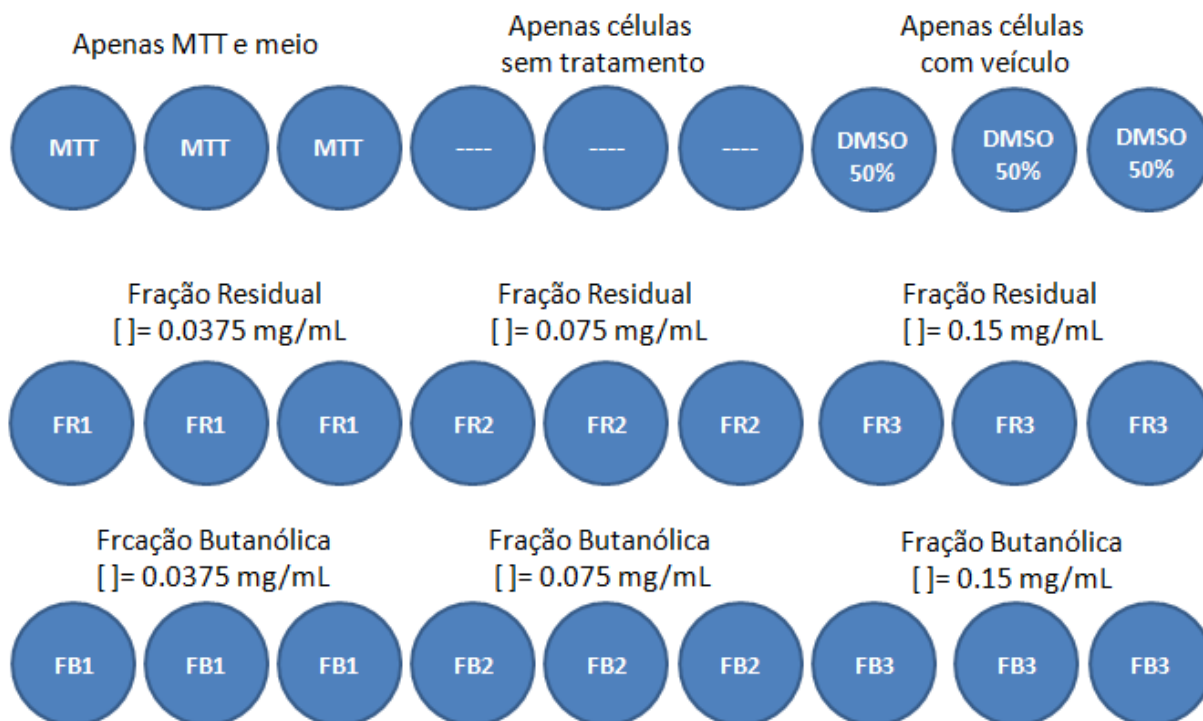
Transferiu-se 25  $\mu$ L de células para um microtubo e neste adicionou-se 25  $\mu$ L de corante azul de tripan e 200  $\mu$ L de PBS (Phosphate Buffer Solution). O conteúdo foi aplicado na câmara de Neubauer e após dois minutos a câmara foi levada para o microscópio onde foi feita a contagem de células. Em seguida, as células foram transferidas para microplacas (3,5  $\mu$ L de células e 196,5  $\mu$ L de meio de cultivo), deixadas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas à 37°C.

### **2.4.2. Teste da citotoxicidade celular**

Depois de haver aderência e proliferação foram adicionados 50  $\mu$ L de soluções da fração residual e butanólica nas concentrações de 0.0375, 0.075, 0.15 mg/mL em cada



cavidade da placa (Figura 3).



**Figura 3:** Desenho experimental. Disposição das células na microplaca e seus tratamentos nas concentrações de 0.0375, 0.075, 0.15 mg/mL, em 3 repetições para cada fração. MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio).

Os efeitos citotóxicos das frações residual e butanólica foram avaliados por meio da inibição da proliferação de células cancerígenas. A citotoxicidade ocasionada pelo tratamento com os extratos brutos foi aferida pelo teste de avaliação da atividade mitocondrial das células. Esse teste avalia a capacidade de enzimas mitocondriais das células tratadas em reduzir MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) em formazam. Assim, somente as células viáveis têm a capacidade de fazer essa redução e, por isso, a absorbância medida corresponde às células viáveis, ou às células que não sofreram toxicidade suficiente para reduzir sua atividade mitocondrial.

Após 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, o meio foi retirado e aplicada a solução de MTT (solução estoque de 0,3 mg/mL em meio não suplementado) e voltou-se a placa à estufa por 4 horas. Após esse período o meio de cultura foi retirado de cada cavidade e adicionou-se 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar os sais de formazan gerados a partir da redução do MTT. A concentração de “zero” mg/mL (adição de solvente, apenas) do extrato foi considerada 100% de viabilidade. A leitura das absorbâncias foi aferida a 570 nm em leitora de microplaca. Com os valores obtidos na absorbância, calculou-se a porcentagem de inibição da viabilidade celular através da seguinte fórmula:

$$X = \frac{Abs(amostra) \times 100}{Abs (controle)}$$

$$\% \text{ de inibição} = 100 - X$$

## 2.5. Análise do perfil metabólico

A análise do perfil metabólico foi realizada no Laboratório de Química Instrumental do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.

### 2.5.1. Preparo das amostras

Para análise por CG-EM (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) a amostra foi submetida à derivatização. Em um *vial* internamente cônico contendo 0,0010 g de amostra foram adicionados 60 µL de piridina e 100 µL BSTFA. A mistura foi aquecida a 60 °C por 30 minutos. Em seguida, o volume foi transferido para um *vial* de injeção (2 mL) com *insert* e realizada a análise cromatográfica.

### 2.5.2. Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a gás da Agilent Technologies (GC 7890A) equipado com detector de ionização por impacto de elétrons (MS 5975C) e coluna capilar DB-5MS (Agilent Technologies, 30 m comprimento x 0,25 mm diâmetro interno x 0,25  $\mu\text{m}$  espessura do filme). Hélio (99,9998% de pureza) foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de 1 mL min<sup>-1</sup>. Utilizando um autoinjeter (CTC combiPaL), 1  $\mu\text{L}$  da amostra foi injetada no cromatógrafo a uma razão de *split* 1:100. O injeter *split/splitless* foi mantido a 230 °C. A coluna cromatográfica inicialmente a 40 °C, isoterma por 5 min, foi aquecida a uma taxa de 10 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C. Após a separação dos compostos a temperatura foi elevada até 300 °C e permanecendo por 2 minutos (*postrun*). A temperatura da interface foi mantida a 280 °C. A ionização realizada com impacto de elétrons a 70 eV. A fonte de íons mantida a 230 °C e a aquisição de dados realizada no modo de varredura total (*scan*) na faixa de 35-650 (*m/z*). A identificação dos compostos extraídos das amostras foi realizada por comparação com os dados espectrais da biblioteca NIST 2.0.

### 2.6. Análise Estatística

Todos os dados foram submetidos à análise de variância, “one way (ANOVA)”, utilizando o software R 2.9.2 e considerando  $p=0.05$ . Através da curva de regressão obtida com dados de crescimento celular em função da concentração do princípio ativo utilizado, foi calculado o  $\text{IC}_{50}$ , concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Processo de extração e fracionamento

O extrato bruto da casca (mesocarpo externo e epicarpo) do fruto do pequi, obtido com a utilização de metanol 80% como solvente, apresentou um peso final de 19,365g com rendimento de 38,73%. Segundo Porto (2008), quando se analisa a eficiência de extração, independente da parte da planta do pequizeiro observa-se que o etanol e o metanol são os solventes que apresentam um melhor rendimento.

O fracionamento do extrato bruto foi realizado por partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: hexano, diclorometano, clorofórmio e butanol. As frações que apresentaram rendimento suficiente para dar continuidade ao trabalho foram as frações butanólica (FB) e residual final (FR) com respectivamente 24,26% e 14,23%. Entretanto, valores consideráveis da atividade antineoplásica, foram observados apenas na fração butanólica. Rocha (2011) avaliou a atividade fotoprotetora e citotóxica em frações de maior polaridade do extrato da casca do pequi, evidenciando o potencial de substâncias presentes na casca do fruto do pequi.

### **3.2. Avaliação da atividade antineoplásica**

O ensaio de viabilidade celular pelo método de metabolização do MTT permite avaliar a quantidade de células vivas em uma cultura, uma vez que avalia a funcionalidade das mitocôndrias. Uma célula para permanecer viva deve apresentar mitocôndrias funcionando perfeitamente e, portanto, gerando ATP, que é empregado nos processos metabólicos celulares (BARBOSA, 2009; BERNAS et al., 2002).

A citotoxicidade é um indicativo inicial da atividade antineoplásica presente na maioria dos quimioterápicos e atualmente, os agentes antitumorais usados clinicamente, na sua grande maioria, possuem marcada atividade citotóxica (AJITH e JANARDHANAN, 2003).

Estudos têm demonstrado a presença da citotoxicidade na casca do pequi. Almeida e colaboradores (2009) investigaram a toxicidade do extrato hidroalcolico do farelo da casca de pequi, inoculado via intraperitoneal em camundongos e relataram toxicidade aguda. A dose letal foi igual a  $0,31 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Roesler e colaboradores (2007), também avaliaram a citotoxicidade *in vitro* do extrato etanólico da casca do pequi na concentração de até  $3000 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (máxima solubilidade desse extrato) e, verificou a produção de um precipitado no meio de cultura celular, que causou apenas uma diminuição da viabilidade celular. Miguel (2011) utilizou o extrato hidroalcolico da casca do pequi, para testar o possível efeito antioxidante do extrato na isquemia e reperfusão cerebral em ratos, e verificou que os animais dos grupos tratados com  $100, 300$  e  $600 \text{ mg.kg}^{-1}$  deste extrato, em diferentes tempos de isquemia, apresentavam mais células com característica isquêmica no hipocampo. Conforme a autora o extrato pode apresentar substâncias indutoras de degeneração ou até mesmo de morte celular por necrose e/ou apoptose, de neurônios do hipocampo, o que reforça a possibilidade da presença de substâncias tóxicas na casca do fruto. Palmeira (2014) avaliou o potencial antineoplásico do óleo da polpa do fruto e observou efeito hepatoprotetor no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas em fígado de camundongos induzidos por dietilnitrosamina (DEN). Este resultado indica o potencial do óleo do pequi na prevenção do câncer hepático, destacando que compostos bioativos presentes no óleo bruto podem estar atuando em sinergismo potencializando os efeitos benéficos observados.

Estudos com fitoquímicos têm mostrado que a combinação entre eles pode ser mais efetiva contra neoplasias que o composto individual (THARAPPEL et al., 2008). Os fitoquímicos possuem propriedades anticarcinogênicas e antimutagênicas substanciais e são compostos que estão presentes na dieta a base de planta (SURH, 2003). Os compostos como tocóis e tocotrienóis (vitamina E), carotenóides (provitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos como taninos, ácidos fenólicos e flavonóides são exemplos de

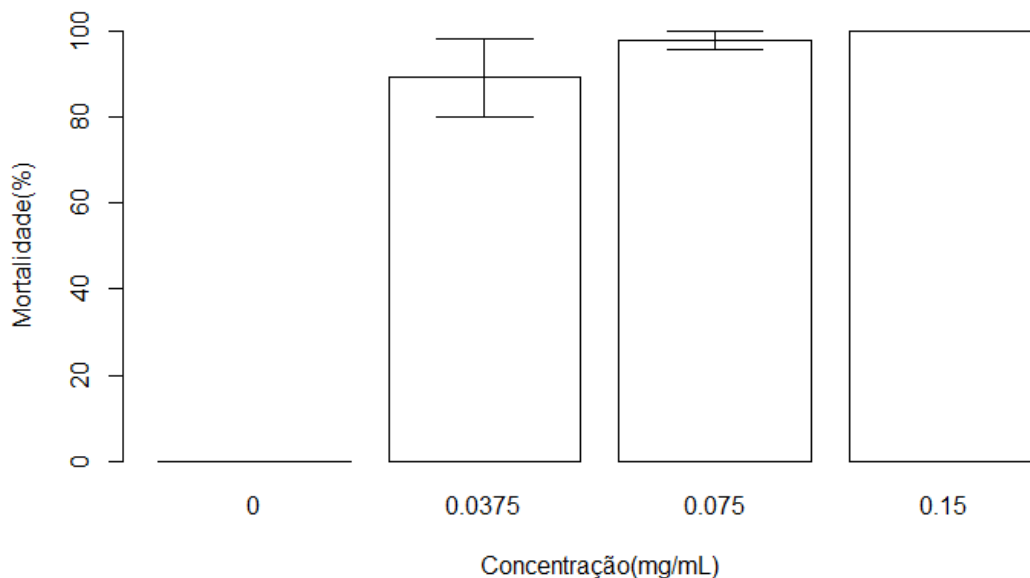
fitoquímicos com propriedades antioxidantes que estão presentes nos vegetais. Eles podem ser incorporados no organismo através da alimentação (CERQUEIRA et al., 2007; FERREIRA, 2009), atuando como agentes quimiopreventivos com efeitos tanto bloqueadores como supressores na carcinogênese (PARK et al., 2003).

Conforme observado neste estudo, a casca do fruto do pequi contém substâncias tóxicas capazes de promover a morte celular. A viabilidade da linhagem celular SCC-9 neste trabalho foi avaliada e calculada frente à fração residual e butanólica do extrato da casca do fruto do pequizeiro, sendo observada morte celular apenas nos tratamentos em que foi utilizada a fração butanólica, que causou 100% de morte celular quando utilizada na concentração de  $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

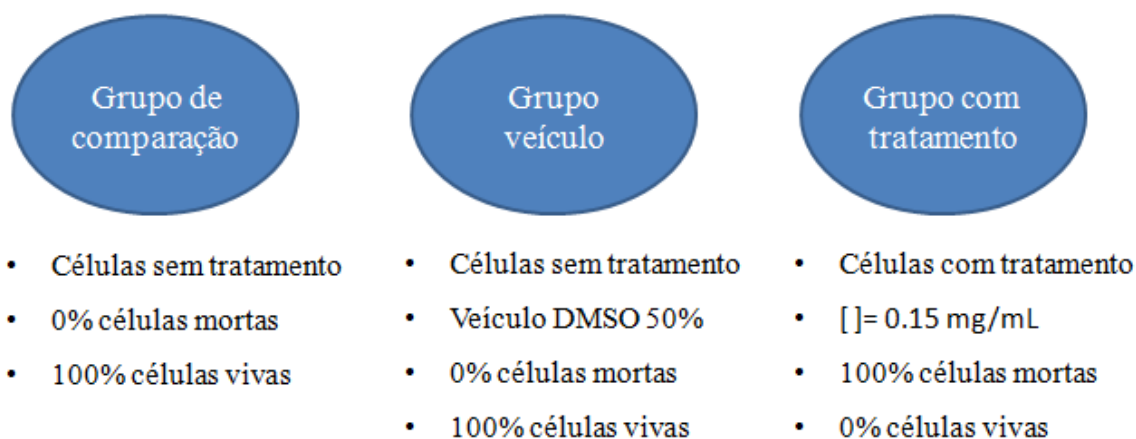
O uso de plantas para desenvolvimento de fármacos não é recente e muitos dos fármacos encontrados hoje no mercado são derivados de plantas (com atividade popular medicinal ou não). Daqueles usados no tratamento de câncer destaca-se a camptotecina, vincristina, vimblastina, taxol, podofilotoxina e combredastatina (SRIVASTAVA et al., 2005). Apesar do grande número de fármacos hoje existentes, que tiveram suas substâncias ativas encontradas em plantas, muitas são as espécies que ainda não tiveram seu potencial farmacológico explorado (ELIAS, 2009).

Na Figura 4 apresenta-se os dados de inibição do crescimento de células cancerígenas em função das concentrações da fração butanólica obtida. Observou-se elevada dependência da porcentagem de células mortas em função da concentração da fração butanólica ( $R^2 = 0,932$ ;  $p < 0,001$ ), mostrando a atividade citotóxica da fração. A mortalidade de células foi significativamente maior em comparação aos grupos controle: apenas meio de cultivo e apenas meio de cultivo e solvente utilizado para a diluição dos extratos, onde não houve morte celular (Figura 5). Destaca-se que não foram realizados testes em células normais (não cancerígenas). Nesse sentido, faz-se necessário a avaliação da atividade desta

fração em linhagens normais, bem como ensaios *in vivo* dos extratos e frações, empregando modelos experimentais com animais e investigação de sua toxicidade.



**Figura 4:** Porcentagem de morte celular da linhagem celular do carcinoma epidermóide de língua (SCC-9), quando colocadas em contato com a fração butanólica em diferentes concentrações, por 24 horas. Média  $\pm$  desvio padrão, n=3.



**Figura 5:** Grupos utilizados para análise da atividade antineoplásica da fração butanólica (FB). O primeiro grupo é o controle negativo, em que havia apenas as células, o segundo

grupo havia células e o veículo DMSO 50% utilizado como diluente da FB e o terceiro grupo células tratadas com diferentes concentrações da FB.

O principal fármaco utilizado no tratamento do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC) é o quimioterápico cisplatina. Entretanto, estudos demonstraram que este fármaco não apresenta bons resultados (ABUZEID et al., 2011). Segundo Elias (2009), o problema identificado no tratamento com a cisplatina é que a repetição de vários ciclos gera resistência nas células de carcinoma de cabeça e pescoço. Também foi averiguado o potencial citotóxico de plantas do Bioma Cerrado em linhagens de HNSCC. Destaca-se que as linhagens celulares do carcinoma epidermóide de língua (SCC-9), foram sensíveis a 3 extratos de plantas das espécies: *Erythroxylum suberosum*, *Pouteria tortae* e *Erythroxylum daphnite*.

Para a fração butanólica do extrato da casca do fruto do pequizeiro aqui estudada foi observado um valor de  $IC_{50}$  nas análises feitas para a linhagem SCC-9 de  $22,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , podendo ser considerado como muito ativo. Segundo Anderson e colaboradores (1991) a substância que apresentar concentração inibitória para 50% das células ( $IC_{50}$ )  $\leq 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  é comparável com a camptotecina e sulfato de vincristina, sendo considerada muito ativa e, aquela que apresentar  $IC_{50} \geq 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , no intervalo entre 100 e  $900 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , comparável ao ácido hipúrico é considerada medianamente ativa. Substâncias com  $IC_{50} > 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  são consideradas inativas.

### **3.3. Análise do perfil metabólico**

De acordo com os critérios do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), para considerar um extrato bruto promissor para o fracionamento cromatográfico, posterior purificação e caracterização de seus constituintes ativos, sua  $IC_{50}$  deve ser menor que  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (SUFFNESS e PEZZUTO 1990). Neste trabalho, obteve-se  $IC_{50} < 25 \mu\text{g.mL}^{-1}$



e, por isso, foi realizado a análise do perfil metabólico tanto do extrato bruto hidrometanólico, quanto da fração butanólica.

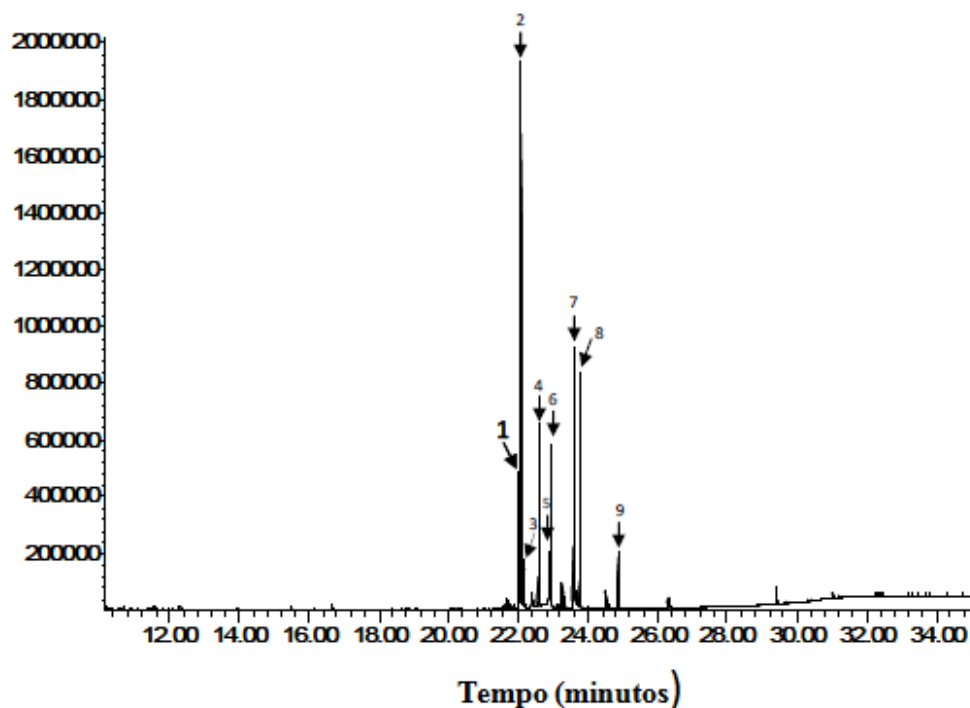
Conforme análises foram encontradas 29 substâncias no extrato bruto (Tabela 1) e 9 substâncias na fração butanólica (Figura 6).

**Tabela 1:** Compostos identificados no extrato bruto da casca do pequi por análise CG/EM

<b>Nº</b>	<b>Compostos</b>	<b>RT</b>
01	Alanina	7,407
02	Glicerol	15,878
03	Butano,1,2,3-Tris (Trimetilsiloxi)	16,271
04	Ácido Glicérico	17,648
05	Treitol	21,812
06	Eritritol	21,887
07	2,4,6-Tri-tert.-butilbenzenotiol	23,074
08	Ribose / Manose / Sorbose	23,502
09	Xilose / Ribose / Arabinose	24,525
10	Ribose / Arabinose	24,878
11	Fucose/Xilose	24,912
12	Xilose/Ribose/Arabinose	25,027
13	Arabinose/Xilose/Ribose	25,726
14	3-desoxiglicosona	27,984
15	Dihidroxiacetona/ Frutose	28,201
16	Dihidroxiacetona	29,219
17	Ácido chiquímico	29,625
18	Frutose	29,971
19	Sorbose	30,171
20	Glicose	30,439
21	Galactose/Manose	30,541
22	Furanose / Glicose / Ribose	31,572
23	Glicose	31,904
24	Glicose	32,291
25	Ácido gálico	32,603
26	Ácido gálico	32,643
27	Inositol	34,21
28	Ácido esteárico	37,011
29	Melibiose	44,214

RT: Tempo de retenção (minutos)

### Abundância Relativa



Pico	TR (min)	Composto (nome IUPAC)	Composto (nome comum)	Área relativa (%)
1	22.001	NI	Carboidrato	6,550
2	22.069	NI	Carboidrato	41,28
3	22.148	NI	Carboidrato	2,490
4	22.575	NI	Carboidrato	9,385
5	22.875	NI	Carboidrato	2,478
6	22.932	NI	Carboidrato	8,386
7	23.582	NI	Carboidrato	14,37
8	23.759	NI	Carboidrato	11,82
9	24.871	NI	Carboidrato	3,246
				100

**Figura 6:** Cromatograma obtido em sistema cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas e identificação dos compostos presentes na fração butanólica obtida do extrato da casca do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).

Observa-se que na fração butanólica as substâncias majoritárias encontradas foram predominantemente carboidratos. Entretanto, não foi possível encontrar a identidade dos mesmos. Estudos demonstram que cerca da metade da composição da casca do fruto do pequi

é composta por carboidratos (BARBOSA e AMANTE, 2005). Carboidratos como a glicose, frutose e sacarose apresentam papel essencial no metabolismo das plantas, pois além de servirem como substrato para a respiração, são fontes de carbono para a produção de uma grande variedade de metabólitos incluindo aminoácidos, lipídios, proteínas e carboidratos mais complexos, como o amido e a celulose (ROLLAND et al., 2006).

Pesquisas demonstram que os açúcares em geral favorecem o crescimento e proliferação de células cancerígenas (SIRCUS, 2012). Nesse sentido, os carboidratos encontrados nos resultados do perfil metabólica da fração butanólica, provavelmente não seriam os responsáveis pela inibição da proliferação celular da linhagem SCC-9 observada. No entanto, como os carboidratos estão presentes em grandes quantidades inclusive no extrato bruto, no qual não foi avaliada a atividade citotóxica nas linhagens SCC-9, presume-se duas situações. A primeira é que como os carboidratos são os compostos majoritários na fração butanólica, mesmo após o fracionamento, estes podem estar mascarando a identificação de outras substâncias presentes em quantidades menores, as quais seriam de fato as responsáveis pela atividade antineoplásica observada. A segunda presunção é que a atividade antineoplásica ocorre em função de substâncias compostas, contendo carboidratos na sua estrutura. Assim a atividade seria em função dessa interação de substâncias, podendo tratar de um efeito de sinergismo ou os carboidratos seriam facilitadores da absorção ou da ação das outras moléculas associadas e este seria o mecanismo para a atividade observada. Uma evidência de que pode estar havendo a associação de moléculas é o fato de não ter sido possível a identificação dos carboidratos encontrados no resultado do perfil metabólico da fração butanólica, sendo que os mesmos não foram observados no extrato bruto.

Em plantas superiores, grande parte dos flavonóides presentes nos tecidos vegetais encontra-se conjugada a moléculas de carboidratos (CROZIER et al., 1997; SKERGET et al. 2005). Segundo Harborne e Williams (2000), o canferol e a quercetina são os flavonóis mais

frequentemente encontrados na forma conjugada a carboidratos, representando uma estratégia de adaptação e sobrevivência das plantas a condições adversas. Na análise do perfil metabólico do extrato hidrometanólico bruto da casca do fruto do pequizeiro, foi possível a identificação de 10 carboidratos presentes como: glicose, frutose, ribose, galactose, arabinose, fucose, xilose, manose, melibiose e sorbose. Também foram identificadas outras substâncias que podem ter relação com a atividade citotóxica, ainda não identificadas na fração butanólica, como os compostos fenólicos, ácido gálico, ácido chiquímico, ácido esteárico, ácido glicérico, alanina, entre outros, conforme demonstrado na tabela 1.

Conforme Roelser e colaboradores (2007) e Miranda-Vilela e colaboradores (2009) no mesocarpo externo e interno são encontradas altas concentração de compostos fenólicos, incluindo o flavonoide, quercetina e quercetina 3-*O*-arabinose, bem como componentes ácidos, como ácido gálico e ácido chiquímico, os quais são encontrados em maior concentração quando a elaboração do extrato é por extração etanólica. Esses compostos são antioxidantes naturais capazes de neutralizar radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo em doenças crônicas, cardiovasculares, neurodegenerativas e até mesmo na carcinogênese (LEOPOLDINI et al., 2011; QUIDEAU et al., 2011).

Vários estudos exploram o efeito anticancerígeno de compostos fenólicos (KAMATHAM et al., 2015). Em estudo com linhagens do tipo SCC-9 relacionando o uso de compostos fenólicos com atividade antitumoral (HAGHIAC e WALLE (2005), foi observada ação efetiva da quercetina, que induziu irreversivelmente o crescimento celular e inibiu a síntese de DNA, e com isso provocando apoptose das células sobreviventes. Em outros estudos foi demonstrado que o ácido gálico apresenta forte ação antioxidante, antiinflamatória, antimutagênica e antitumoral (KAMATHAM et al., 2015). Com relação à atividade antitumoral, o ácido gálico tem demonstrado também atividade citotóxica seletiva, afetando principalmente células tumorais e não as linhagens celulares normais (VERMA et

al., 2013). Conforme Serrano (1998), o ácido gálico e seus alquil ésteres induzem a apoptose, apresentando efeito citotóxico e antiproliferativo distinto entre diferentes linhagens de células tumorais. Guimaraes e colaboradores (2016) avaliaram a atividade antineoplásica do ácido gálico em carcinoma epidermóide oral e demonstrou que em condições de hipóxia o tratamento com ácido gálico resultou na inibição da proliferação celular, migração e invasão de células neoplásicas. Inoue e colaboradores (1995) e Isuzugawa e colaboradores (2001), observaram que o ácido gálico inibiu o crescimento de células cancerígenas e não exerceu nenhum efeito sobre células normais. Neste estudo, no extrato bruto foi observado o ácido gálico, provavelmente em duas formas conforme resultado da análise em CG-MS (Tabela 1). Este composto pode ser encontrado em plantas nas formas de ácido gálico e do ester metil gálico (KAMATHAM et al., 2015). Conforme Rocha e colaboradores (2015), o ácido gálico é o principal antioxidante encontrado na casca do fruto do pequi.

#### **4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que a casca do fruto do pequi é fonte de substâncias ativas, responsáveis pela atividade antineoplásica em células da linhagem de carcinoma de língua SCC-9. A fração butanólica do extrato apresentou  $IC_{50}$  igual a 22,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  na linhagem testada, portanto considerada muito ativa.

Através da análise dos perfis metabólicos notou-se presença majoritária de carboidratos tanto no extrato bruto hidrometanólico como na fração butanólica. Outras substâncias com ação anticancerígena foram encontradas e identificadas apenas no extrato bruto, como o ácido gálico. As mesmas podem ser as responsáveis pela citotoxicidade sobre a linhagem SCC-9, presente na fração butanólica, seja por sinergismo com as moléculas de

carboidratos ou isoladamente, estando presentes em quantidades que foram mascaradas pelos carboidratos que foram majoritários.

Diante dos resultados obtidos, este estudo demonstra a relevância biológica das substâncias advindas de plantas do Cerrado e destaca que a fração butanólica obtida do extrato bruto hidrometanólico da casca do fruto do pequi, como uma opção promissora para o tratamento do carcinoma epidermoide de língua (SCC-9).

Definir o potencial biológico de extratos de plantas é uma importante ferramenta na descoberta de novos agentes terapêuticos e, por fim, reforça-se a necessidade de identificar potencialidades das plantas nativas do Cerrado para que seja possível valorizar a preservação e encontrar formas alternativas para a exploração.

## 5. REFERÊNCIAS

ABUZEID W.M, DAVIS S, TANG A.L, SOUNDERS L, BRENNER J.C, LIN J, FUCHS J.R, LIGHT E, BRADFORD C.R, PRINCE M.E.P, CAREY T.E. Sensitization of head and neck cancer to cisplatin through the use of a novel curcumin analog. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2011; 137(5):499-07.

AJITH T.A, JANARDHANAN K.K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. *J Ethnopharmacol* 2003; 84: 157-162.

ALMEIDA, A. C.; SOBRINHO, E. M., PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R.; SANTOS, H. O.; BRANDI, I. V.; CANGUSSU, A. S.; COSTA, J. P. R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. *Revista Ciência Rural*. Santa Maria, 2009; v. 39; 88-92.

ANDERSON, J., GOETZ, C., MCLAUGHLIN, J., & SUFFNESS, M. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis* , 1991; 2, pp. 107-111.

BARBOSA, C.V. Avaliação do potencial antineoplásico de plantas medicinais como coadjuvantes no tratamento do câncer pelos pacientes do CACON/UFAL. *Dissertação de Mestrado* – Maceió – AL, Universidade Federal de Alagoas, 2009.

BARBOSA, R. C. M. V.; AMANTE, E. R. Caracterização físico-química da farinha de casca de pequi (*Caryocar brasiliensis*), Porto Alegre, RS, 2005. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre. *Anais... Porto Alegre: SBCTA*, 2005. p. 1528-1531.

BELCHER R, HAYES K, FEDEWA S, CHEN A.Y. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. *J Surg Oncol* 2014; 110:551-74.



BERNAS, T; DOBRUCKI, J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 2002; 47(4): 236-242.

BRANDÃO H.N., DAVID J.P, COUTO R.D. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Quim. Nova*, 2010; 33, 1359-1369.

CAMARGO, C.A. Atividade anticâncer de quercetina, narigina, morina e acetoxi dmu no tratamento terapêutico de ratos inoculados com carcinossarcoma de walker 256. *Tese (Doutorado)*. Universidade Estadual de Campinas- Instituto de Biologia, 2011.

CERQUEIRA FM, MEDEIROS MHG, AUGUSTO O. Antioxidantes dietéticos: controvérsia e perspectivas. *Química Nova*. 2007. v. 30 n. 2, p. 441-449.

CHÉVES, P. O. O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado do Norte de Minas Gerais. *Dissertação (Mestrado em Administração Rural)* . Universidade Federal de Lavras / MG, 1997.

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Rev. Virtual Quim*, 2010; 2, 47-58.

CROZIER, A.; JENSEN, E.; LEAN, M.E.J.; MCDONALD, M.S. & BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1997; 45(3): 590-595.

ELIAS, SILVIA TAVEIRA. Efeito apoptótico do extrato bruto de tabaco em linhagem de carcinoma oral humano. *Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)*-Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

FERREIRA R.Q. Desenvolvimento e aplicação de um novo ensaio para a determinação eletroquímica da capacidade antioxidante de compostos modelo e de matrizes complexas (*Tese*). São Carlos: Universidade de São Paulo; 2009.

GONÇALVES, G. A. S.; VILAS BOAS, E. V. DE B.; RESENDE, J. V. Qualidade dos frutos do pequi submetidos a diferentes tempos de cozimento. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 2011; 35, 377-385.

GRISÓLIA, C.K; OLIVEIRA, B.B. Patente: Cápsulas gelatinosas de polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) como suplemento vitamínico, antioxidante e antimutagênico, um novo nutracêutico. Universidade de Brasília, Brasília D.F, 2007.

GUIMARAES T. A, FARIAS L. C, FRAGA C. A, FELTENBERGER J. D, MELO G. A, COLETTA R. D, SOUZA SANTOS S. H, DE PAULA A. M, GUIMARAES A. L. Evaluation of the antineoplastic activity of gallic acid in oral squamous cell carcinoma under hypoxic conditions. *Anticancer Drugs*. 2016 Jun;27(5):407-16. *PubMed*; PMID 26849170.

HAGHIAC, M. & WALLE, T. Quercetin induces necrosis and apoptosis in SCC-9 oral cancer cells. *Nutrition and cancer*. 2005, 53, 220-231.

HARBORNE, J.B. & WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000; 55(6): 481-504.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro, 2016.

INOUE, M., SUZUKI, R., SAKAGUCHI, N., LI, Z., TAKEDA, T., OGIHARA, Y. Selective induction of cell death in cancer cells by Gallic Acid. *Biol. Pharm.* , 1995; 18, pp. 1526-1530.

ISUZUGAWA, K., INOUE, M., & OGIHARA, Y. Catalase contents in cells determine sensitivity to the apoptosis inducer Gallic Acid. *Biol. Pharm.* , 2001; 24, pp. 1022-1026.

KAMATHAM, S.; KUMAR, N.; GUDIPALLI, P. Isolation and characterization of gallic acid and methyl galate from the seed coats of *Givotia rottleriformes* Griff. and their anti-proliferative effect on human epidermoid carcinoma A431 cells. *Toxicology reports*, 2015; 2, 520-529.

KHOURI, J. Anticlastogenic potential and antioxidant effects af an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Genetics and Molecular Biology* , 2007; 30, 442 - 448.

LEOPOLDINI M, RUSSO N, TOSCANO M. Review: The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* 2011; 125(2):288-306.

MESQUITA, M. L. Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas do Cerrado brasileiro: estudos preliminares do mecanismo de ação da atividade citotóxica. *Tese (Doutorado)*. Universidade de Brasília, DF, 2009.

MIGUEL, M. P. Ação neuroprotetora do extrato etanólico da casca de pequi em cérebros de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. *Tese (Doutorado)* - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

MIRANDA-VILELA A.L, RESCK I.S, MENDONÇA M.A GRISOLIA C.K. Characterization of the major nutritional components of *Caryocar brasiliense* fruit pulp by NMR spectroscopy. *Quim Nova.* 2009;32(9):2310-3.

PALMEIRA, S.M. Avaliação do potencial quimiopreventivo do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) na hepatocarcinogênese quimicamente induzida em camundongos *Dissertação (Mestrado)*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

PARK B.S, KWANG-GEUN L, TKYUKI S, SUNG-EUN L, GARY R.T. Antioxidant activity and characterization of volatile constituents of Taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2003 v.51, n.1, p.295-300.

PORTO, C. S. Potencial antioxidante de extratos obtidos a partir de frutos e folhas do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). 2008. Dissertação (Mestrado em Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Montes Claros.

QUIDEAU S, DEFFIEUX D, DOUAT-CASASSUS C, POUYSÉGU L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011;50(3):586-621. doi: 10.1002/anie.201000044.

RIBEIRO, R. F. Pequi o rei do cerrado. Belo Horizonte: *Rede Cerrado*, 2000.

ROCHA, L.B. Fracionamento e avaliação da atividade antioxidante e fotoprotetora do extrato etanólico da casca do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Dissertação (Mestrado)*. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Montes Claros, 2011.

ROCHA, L.B; MELO, A,G; S. L. A. PAULA ; S. A. M. NOBRE ; I. N. ABREU . Gallic acid as the major antioxidant in pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit peel. *Rev. bras. plantas med.* 2015; 17 (4): 592-598.

ROESLER R, MALTA L.G, CARRASCO L.C, HOLANDA R.B, SOUSA C.A.S, PASTORE G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2007;27(1):53-60.

ROLLAND, F., BAENA-GONZALEZ, E. E SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Rev. Plant Biology*, 2006; 57, 675-709.

SERRANO A, PALACIOS C, ROY G, CESPON C, VILLAR ML, NOCITO M. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1998 Feb 1;350(1):49-54.

SIRCUS, MARK .Sugar and Cancer Growth Research. Strategy for Selective Starvation of Cancer Cells. *Filed under Cancer, Medicine*, 2012. Disponível em: <http://drsircus.com/medicine/cancer/sugar-cancer-growth-research> .Acesso em: 03/06/2016

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A.R.; SIMONIC, M. & KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 2005; 89(2): 191–198.

SRIVASTAVA V, NEGI A.S, KUMAR J.K, GUPTA M.M, KHANUJA S.P.S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005;13:5892-08.

STEWART W.P, BROWN K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. *British Journal of Cancer*. 2013. v. 109, p. 1–7.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M.. Assays related to cancer drug discovery. IN: HOSTETTMANN, K. (Ed.) *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*, v.6, Academic Press, London, 1990, p.71 – 133.

SURH Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature reviews cancer*. 2003. v. 3 p. 768-780.

THARAPPEL J.C, LEHMLER H.J, SRINIVASAN C, ROBERTSON L.W, SPEAR B.T, GLAUERT H.P. Effect of antioxidant phytochemicals on the hepatic tumor promoting activity of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB-77). *Food Chem Toxicol*. 2008; 46: 3467-3474

VERA, R.; NAVES, R. V.; NASCIMENTO, J. L. Caracterização física de frutos do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) no Estado de Goiás. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 2005. 35, 71-79.

VERMA S, SINGH A, MISHRA A. Gallic acid: molecular rival of cancer. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2013 May;35(3):473-85.

VITALE-CROSS L, MOLINOLO AA, MARTIN D, YOUNIS RH, MARUYAMA T, PATEL V, CHEN W, SCHNEIDER A, GUTKIND JS. Metformin prevents the development of oral squamous cell carcinomas from carcinogen-induced premalignant lesions. *Cancer Prev Res* 2012;5:562-73.

WARNAKULASURIYA S. Causes of oral cancer--an appraisal of controversies. *Br Dent J* 2009;207:471-5.