

MARCELO AUGUSTO FILARDI

**POTENCIAL ANTITUMORAL DE EXTRATOS DA PRÓPOLIS  
BRASILEIRA E DE FOLHAS DE GRAVIOLA (*Annona muricata*): EFEITO  
CITOTÓXICO SOBRE CÉLULAS HEPATOCARCINOGENÉTICAS HEPG2**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica Agrícola, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F478p  
2010

Filardi, Marcelo Augusto, 1968-

Potencial antitumoral de extratos da própolis brasileira e de folhas de graviola (*Annona muricata*): efeito citotóxico sobre células hepatocarcinogênicas HEPG2 / Marcelo Augusto Filardi – Viçosa, MG, 2010.  
xx, 140f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Tânia Toledo de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 115-135.

1. Flavonóides. 2. Produtos naturais. 3. *Annona muricata*.  
4. Graviola. 5. Própolis. 6. Agentes antineoplásicos.  
7. Bioquímica. 8. Fitoquímica. 9. Câncer. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

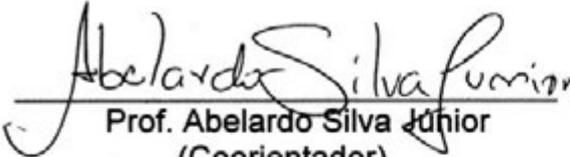
CDD 22.ed. 572.59

MARCELO AUGUSTO FILARDI

**POTENCIAL ANTITUMORAL DE EXTRATOS DA PRÓPOLIS  
BRASILEIRA E DE FOLHAS DE GRAVIOLA (*Annona muricata*): EFEITO  
CITOTÓXICO SOBRE CÉLULAS HEPATOCARCINOGÊNICAS HEPG2**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica Agrícola, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

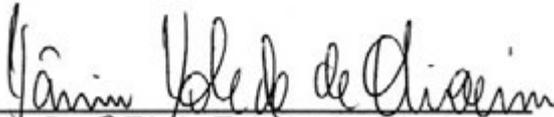
APROVADA: 19 de fevereiro de 2010.

  
Prof. Abelardo Silva Júnior  
(Coorientador)

  
Profª Márcia Rogéria de A. Lamêgo  
(Coorientador)

  
Prof. João Paulo Viana Leite

  
Prof. Leandro Licursi de Oliveira

  
Profª Tânia Toledo de Oliveira  
(Orientadora)

**O desafio está em aprender não como vencer a vida,  
mas como compreendê-la. Assim, aprenderemos o valor  
das coisas, não o seu preço.**

## AGRADECIMENTOS

À Maria, Mãe de Deus. Por me fazer vê-Lo também no *mundo* científico. Seres humanos luminosos brilham muito onde mais se precisa de luz.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo ensino de qualidade e pela oportunidade de retribuir à sociedade o conhecimento científico que adquiri. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

À Prof<sup>a</sup> Tânia Toledo de Oliveira, pela orientação segura e confiança. Obrigado por me fazer compreender que muitas respostas estão dentro de nós mesmos.

Aos professores Abelardo Silva Júnior, João Paulo Viana Leite, Leandro Licursi de Oliveira, Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo e Tanus Jorge Nagem (UFOP), minha profunda gratidão pela co-orientação e esclarecimentos. Juntos, lado a lado, fomos muito mais longe, fui muito mais forte.

Minha gratidão e reconhecimento à Prof<sup>a</sup> Célia Alencar de Moraes e ao Prof. Marcos Rogério Tótola, do Depto. de Microbiologia – UFV, à Prof<sup>a</sup> Ana Paula de Melo Loureiro (USP-SP), à Prof<sup>a</sup> Danielle Palmas de Oliveira e Farah Maria Chequer (USP-RP), da Universidade de São Paulo; à

Prof<sup>a</sup>. Eveline Mantovani Alvarenga e ao Prof. Flávio Alencar D'Araújo Couto, do Depto. de Fitotecnia – UFV; ao Prof. Liovando Marciano da Costa, do Depto. de Solos – UFV, ao Prof. Luciano Esteves Pelúzio, do Coluni; aos Professores do Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular – UFV, George Henrique Kling de Moraes, José Humberto de Queiroz, Juliana Lopes Rangel Fietto, Luciano Gomes Fietto e Maria Goreti de Almeida Oliveira; à Prof<sup>a</sup> Maria do Carmo Gouveia Pelúzio, do Depto. de Nutrição e Saúde; aos Professores Marco Aurélio Pedron e Silva e Wagner Campos Otoni, do Depto. de Biologia Vegetal – UFV. Vocês todos são imprescindíveis. O mundo fica melhor assim.

Saudade e minha eterna gratidão ao Prof. Eldo Antônio Monteiro da Silva († 2009). Você tinha razão: *“...maturidade e respeito nos tornam melhores para caminhar na vida; não desistir, acreditar e principalmente trabalhar muito são essenciais para a vitória pessoal...”*

Algumas pessoas são familiares pelos desígnios do sangue, outras são familiares pelos desígnios do céu. Não fui mais o mesmo ao receber em minha vida pessoas como a Adriane Jane Franco, Agnaldo Rodrigues de Melo Chaves, Anália Ataíde de Souza, Eduardo Pereira Monteiro, Gustavo Manoel Rigueira Simão, Humberto Doriguêto Gravina, Leandro Fonseca do Espírito Santo, Marcelo Rocha da Costa, Márcio de Paula Freitas, Marcos José Machado Salgado, Maria Aparecida Leão, Mary Hellen Araújo Fabres, Mauro Pereira Baltazar, Nilcea Cardoso Pinheiro, Orlando Chiarelli Neto, Priscilla Siqueira Paes, Ramon de Freitas Santos, Raphael Contelli Klein, Ricardo Pereira Baltazar, Sr. Valdir Soares Ferreira, Vanderlei Altoé. Muito obrigado. Mesmo. Sempre.

Aos companheiros do Laboratório de Biofármacos – DBA, do Laboratório de Infectologia Molecular Animal – BioAgro, e do Laboratório de Virologia Animal – DPV. Muito obrigado a todos.

Nossos agradecimentos ao José Alexandre Silva de Abreu e Sheila Rago Lemos Abreu (Empresa Néctar Farmacêutica), pelo envio do laudo e das amostras de própolis. E ao João Paulo Borges Lisboa e Valdir Latorre Ribeiro (Indústria Farmacêutica Catedral), pelo envio do extrato da graviola.

Aos meus familiares. Não é preciso estar perto para estar junto...

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
RESUMO .....	xviii
ABSTRACT .....	xix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. O cancer .....	4
2.2. O câncer no mundo .....	5
2.3. O câncer no Brasil .....	11
2.4. O carcinoma hepatocelular .....	13
2.4.1. Incidência do Carcinoma Hepatocelular.....	15
2.4.2. Fatores de Risco do Carcinoma Hepatocelular.....	16
2.4.3. Manifestações clínicas do Carcinoma Hepatocelular.....	21
2.4.4. Vigilância e diagnóstico do Carcinoma Hepatocelular .....	22
2.4.5. Tratamento do Carcinoma Hepatocelular .....	25
2.5. Bases moleculares do câncer .....	30
2.6. Plantas como fonte de agentes antitumorais .....	39
2.7. Flavonoides.....	44
2.7.1. Flavonoides e cancer .....	47

	Página
2.8. Própolis .....	50
2.8.1. Origem biológica da própolis.....	51
2.8.2. Características bioquímicas e propriedades biológicas da própolis .....	53
2.8.3. Própolis e cancer .....	59
2.9. <i>Annona muricata</i> L.....	60
2.9.1. Família Annonaceae e <i>Annona muricata</i> .....	60
2.9.2. Acetogeninas de Annonaceae .....	65
2.9.3. Bioatividade antitumoral de Acetogeninas .....	68
3. OBJETIVOS .....	71
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	72
4.1. Reagentes.....	72
4.2. Equipamentos .....	72
4.3. Linhagem celular HepG2 .....	73
4.4. Cultivo celular .....	73
4.5. Curva de crescimento celular.....	75
4.6. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio do vermelho neutro ( <i>Neutral Red</i> ).....	76
4.7. Extrato de <i>Annona muricata</i> .....	77
4.7.1. Preparo das soluções com o extrato da <i>Annona muricata</i> .....	78
4.7.2. Tratamento das células HepG2 com o extrato da <i>Annona muricata</i> .....	79
4.8. Extrato das própolis verde e vermelha.....	79
4.8.1. Preparo das soluções com os extratos de própolis.....	80
4.8.2. Tratamento das células HepG2 com os extratos das própolis.....	80
4.9. Análise estatística .....	81

	Página
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	82
5.1. Efeitos dos extratos das própolis e de <i>Annona muricata</i> .....	82
5.1.1. Efeito do excipiente das própolis sobre as células HepG2	82
5.1.2. Efeito da própolis vermelha sobre as células HepG2.....	84
5.1.3. Efeito da própolis verde sobre as células HepG2 .....	86
5.2. Efeito do extrato de folhas de <i>A. muricata</i> sobre a linhagem HepG2 .....	102
5.2.1. Efeito do excipiente do extrato de <i>A. muricata</i> sobre as células HepG2 .....	102
5.2.2. Efeito do extrato de <i>A. muricata</i> sobre as células HepG2..	102
5.3. Própolis x <i>Annona muricata</i> x Células HepG2 .....	111
6. CONCLUSÕES .....	113
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
ANEXOS .....	136
1. Caracterização e identificação botânica da própolis verde .....	137
2. Caracterização e identificação botânica da própolis vermelha .....	139

## LISTA DE TABELAS

	Página
1. Mudança de posição no ranque das maiores causas de morte no mundo, entre 2002 e 2030 (MATHERS, LONCAR, 2006) .....	11
2. Classificação dos tumores malignos do fígado; (*) indica a porcentagem de tumores primários, excluindo as metástases (AHMED, LOBO, 2006) .....	14
3. Grupos de risco para o desenvolvimento do Carcinoma Hepatocelular (AHMED, LOBO, 2006) .....	18
4. Etiologia do carcinoma hepatocelular. Fonte: Instituto Nacional de Câncer (NCI, 2009).....	18
5. Intervenções terapêuticas para o tratamento de tumores malignos do fígado (AHMED, LOBO, 2006; RAOUL, 2008).....	25
6. Certificado de análise físico-química e biológica do extrato seco de folhas de <i>A. muricata</i> .....	78
7. Flavonoides e outros constituintes químicos da própolis (Lot# ESAL-270309) de <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	138
8. Flavonoides e outros constituintes químicos da própolis (Lot# PADE-0109-SR) de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> .....	140

## LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Mortes projetadas por causas diversas em países desenvolvidos, países emergentes e países poucos desenvolvidos (WHO, 2008).....	6
2. Incidência e mortalidade (milhares), em homens e mulheres, dos tipos de cânceres mais comuns em todo o mundo (STEWART, KLEIHUES, 2003a).....	8
3. Comparação dos tipos de cânceres mais comuns no mundo em países desenvolvidos e menos desenvolvidos (STEWART, KLEIHUES, 2003a).....	9
4. Projeção de mortes (em milhões) para o câncer, entre 2002 e 2030 (modificado de MATHERS, LONCAR, 2006).....	10
5. Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010 e 2011, exceto pele não melanoma, na população brasileira. Fonte: Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde (INCA, 2009a)	12
6. Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2010 e 2011, segundo a Unidade da Federação Brasileira (todas as neoplasias, exceto as de pele não melanoma). Fonte: Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde (INCA, 2009a)	13
7. Variações regionais em todo o mundo das taxas de mortalidade do carcinoma hepatocelular, reportadas em 100 mil pessoas (EL –SERAG, RUDOLPH, 2007).....	16

8. Incidência e mortalidade de câncer hepático em diferentes grupos humanos, entre os anos 1985 e 2005. Fonte: Instituto Nacional de Câncer (NCI, 2008).....	17
9. Fatores etiológicos do carcinoma hepatocelular. Vírus da hepatite B (HBV) e C (HBC) são os fatores mais importantes, agravados pelo alcoolismo (BRECHOT, 2004) .....	18
10. Vigilância e estratégia recomendadas para o carcinoma hepatocelular. TC, tomografia computadorizada; RM, ressonância magnética; FNAB, biópsia aspirativa por sonda fina US, ultrasonografia, AFP, $\alpha$ -etoproteína (BRUIX et. al., 2001; LLOVET et. al., 2003, AHMED, LOBO, 2006) .....	22
11. Tomografia computadorizada mostrando uma massa aumentada bem definida (setas), consistente com um carcinoma hepatocelular, no lobo direito do fígado (AHMED, LOBO, 2006)..	24
12. Carcinoma hepatocelular. Imagem macroscópica de um carcinoma encapsulado (A) e associado com múltiplos nódulos metastásicos (B) após a ruptura da cápsula fibrosa (RAOUL, 2008) .....	24
13. Evolução anual dos transplantes de órgãos no Brasil, em número absoluto, de acordo com o Registro Brasileiro de Transplante (RBT, 2008) .....	26
14. Causas mais comuns das indicações de transplantes de fígado no Brasil, de acordo com a Associação Brasileira de Transplante de Órgão (ABTO, 2007).....	27
15. Tomografia computadorizada de um paciente com carcinoma hepatocelular após injeção intrarterial de lipiodol $I^{131}$ , mostrando a concentração do lipiodol (setas) no interior do tumor (RAOUL, 2008) .....	28
16. À esquerda, arteriograma hepático seletivo mostrando um adensamento vascular (setas) no carcinoma hepatocelular; à direita, arteriograma após a quimioembolização: o adensamento vascular tumoral foi eliminado em um procedimento bem sucedido (AHMED, LOBO, 2006).....	29

17. Probabilidade de sobrevivência de pacientes acometidos com CHC não tratados de acordo com o estágio do tumor. Estágio intermediário: tumores multinodulares assintomáticos, com média de sobrevivência de 40 meses. Estágio avançado: estágio sintomático, invasão vascular e expansão extra-hepática; média de sobrevivência de 4-5 meses (LLOVET et. al., 2003). ..... 30
18. Pontos regulatórios no ciclo celular em mamíferos em G1, S e G2. Múltiplos mecanismos previnem a passagem inapropriada da fase G1 para S, onde ocorre a síntese de DNA. Um ponto central é a fosforilação de membros da família RB, como o P107 pelas enzimas quinase ciclino-dependentes (CDKs). A fosforilação libera e ativa o fator de transcrição E2F que controla transcrição de um número de genes requeridos para entrada da célula na fase S e ciclinas adicionais que mantêm o estado fosforilado de RB, permitindo a continuidade do processo na fase S. Estão mostrados também outros pontos de checagem que podem ser ativados em G2 ou M do ciclo celular em resposta a danos no DNA (BERTRAM, 2001). ..... 33
19. Alterações mais frequentes nos pontos de restrição do ciclo celular e apoptose associados ao carcinoma hepatocelular. Quatro dos mais comuns pontos da via são afetados em 60-100% dos casos de CHC incluindo as vias p53, Rb, p27 e transformação do fator de crescimento  $\beta$ IGF2R. Os números em vermelho indicam inativação e em azul, ativação (EL-SERAG e RUDOLPH, 2007). ..... 35
20. Alterações nas vias de desenvolvimento embrionário associadas com a hepatocarcinogênese. As vias mais comuns são ativadas em 20-60% dos carcinomas hepatocelulares incluindo as vias Akt, myc,  $\beta$ -catenina, *hedgehog* e met. Apesar de não ser por si só um oncogene, a ativação da telomerase é muito comum e um passo essencial para a imortalização das células tumorais. Os números em vermelho indicam inativação e em azul, ativação (EL-SERAG e RUDOLPH, 2007). ..... 35
21. Agentes antitumorais derivados de plantas utilizados pela medicina tradicional isoladas em várias partes do mundo. 1. Vinblastina (Madagascar); 2. Vincristina (Madagascar); 3. Podofilotoxina (EUA); 4. Etoposide (semi-sintético); 5. Indirubins (China); 6. Flavopiridol (China); 7. Rohitukina (Índia) (CRAGG et al., 2009). ..... 40

22. Novos compostos químicos registrados pela FDA entre os anos de 1981 a outubro de 2008, num total de 1020 drogas químicas. N: produto natural sem modificação; NM: produto natural com modificação; S: produto totalmente sintético; SI: produto sintético inibidor da molécula-alvo de interesse, com inibição competitiva ao substrato do produto natural; SN: produto sintético com o farmacóforo do produto natural; SNI: produto sintético com o farmacóforo do produto natural apresentando inibição competitiva com o substrato do produto natural (CRAGG et al., 2009). ..... 42
23. Estrutura dos alcaloides *vimblastina* e *vincristina*, os primeiros agentes antitumorais derivados de plantas (CRAGG, NEWMAN, 2005). ..... 43
24. Estrutura geral e padrão de numeração para os flavonoides mais comuns. Para a maioria dos flavonoides,  $R_4 = H$ ,  $R_5 = OH$  e  $R_6 = H$ . Flavonoides individuais adicionais dentro de cada classe são caracterizados por grupos funcionais únicos de  $R_3$ ,  $R_3'$  e  $R_5'$  (BEECHER, 2003). ..... 45
25. Estruturas químicas da família dos flavonoides (REN et. al., 2003; LEITE, 2009). ..... 46
26. Modelo esquemático do mecanismo de ação de isoliquiritigenina. A combinação de isoliquiritigenina e o fator de necrose tumoral (TRAIL) induz à apoptose. TRAIL é uma proteína endógena envolvida na resposta imune antitumoral. A regulação da expressão do receptor DR5 induzida por isoliquiritigenina é capaz de aumentar a ação do fator TRAIL, resultando na via de sinalização apoptótica através das caspases-8/10, -9 e -3 (YOSHIDA et. al., 2008) ..... 51
27. Coleta de própolis por abelhas *Apis mellifera*. O exsudado resinoso presente no caule de *Dalbergia ecastophyllum* (A, B) ou nas folhas jovens de *Baccharis dracunculifolia* (D) é coletado pela abelha; o exsudado é passado para as patas posteriores (C) para ser levado à colmeia (E,F), ser processado e formar a própolis vermelha (DAUGSH et. al., 2007) ou verde (KUMASAWA et. al., 2003). O comportamento das abelhas é semelhante durante a coleta dos dois tipos de exsudados vegetais ..... 52

28. Estruturas químicas de compostos identificados na própolis verde, de origem botânica do “alecrim-do-campo” - <i>Baccharis dracunculifolia</i> . <b>1</b> : ácido clorogênico; <b>2</b> : ácido cafeico; <b>3</b> : ácido <i>p</i> -cumárico; <b>4</b> : ácido 4,5-dicafeoilquínico; <b>5</b> : ácido 3,4-dicafeoilquínico; <b>6</b> : ácido 4,5-dicafeoilquinico metil ester; <b>7</b> : ácido 3,4,5-tricafeoilquínico; <b>8</b> : diidrokamferida; <b>9</b> : 6-metoxikamferol; <b>10</b> : drupanin; <b>11</b> : diidroconiferol <i>p</i> -cumarato; <b>12</b> : capillartemisin A; <b>13</b> : ácido ( <i>E</i> )-3-[2,3-diidro-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-7-prenil-5-benzofuranil]-2-propenoico; <b>14</b> : ácido ( <i>E</i> )-3-[2,3-diidro-2-(1-metiletil)-7-prenil-5-benzofuranil]-2-propenoic; <b>15</b> : ácido ( <i>E</i> )-3-(2,2-dimetil-3,4-diidro-3-hidroxi-8-prenil-2 <i>H</i> -1-benzopirano-6-il)-2-propenoico; <b>16</b> : artemillin C; <b>17</b> : ácido ( <i>E</i> )-3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi)-cinâmico; <b>18</b> : ácido ( <i>E</i> )-3-prenil-4-(di-idro cinamoiloxi)-cinâmico (KUMAZAWA et. al., 2009) .....	54
29. Estrutura química de alguns dos flavonoides (JAGANATHAM et. al., 2009) presentes nos extratos das própolis verde e vermelha utilizados nos ensaios experimentais deste trabalho.....	60
30. A gravioleira <i>A. muricata</i> (A), com detalhe das folhas (B). (Fotografia: Marcelo A. Filardi) .....	61
31. Flores (C) e o fruto de <i>A. muricata</i> (D) (Fotos: Marcelo A. Filardi)	62
32. Fruto em corte (E) e sementes secas (F) de <i>Annona muricata</i> (Fotos: Marcelo A. Filardi) .....	63
33. Características botânicas de algumas partes da planta de <i>Annona muricata</i> (PINTO et. al., 2005) .....	65
34. Estrutura geral de Acetogeninas (BERMEJO, 2005; HU et. al., 2006) .....	67
35. Classificação de Acetogeninas com base no sistema tetrahydrofurano (THF), tetrahidropirano (não clássicas), epóxi e $\gamma$ -lactona (ZAFRA-POLO et. al., 1996; ALALI et. al., 1999) .....	68
36. Efeito do excipiente amido contido nos extratos das própolis vermelha e verde sobre a viabilidade de células HepG2. Concentrações específicas do excipiente (75, 150, 300 e 600 $\mu\text{g/mL}$ ) foram analisadas em relação ao controle (0 $\mu\text{g/mL}$ ), pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO <sub>2</sub> , na quantidade de 1 x 10 <sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24 (A), 48 (B) e 72 h (C). .....	83

37. Efeito do extrato de própolis vermelha sobre a viabilidade de células HepG2. Concentrações específicas do extrato (25, 50, 100 e 200 µg/mL) foram analisadas em relação ao controle (0 µg/mL), pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de 1 x 10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C). As barras com letras comuns não diferem estatisticamente (p < 0,05) pelo teste Tukey ..... 85
38. Efeito do extrato de própolis vermelha sobre a viabilidade de células HepG2. Concentrações específicas do extrato (25, 50, 100 e 200 µg/mL) foram analisadas em relação ao controle (0 µg/mL), pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de 1 x 10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24, 48 e 72 horas..... 86
39. Efeito do extrato de própolis verde sobre a viabilidade de células HepG2. Concentrações específicas do extrato (50, 100, 200 e 400 µg/mL) foram analisadas em relação ao controle (0 µg/mL), pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de 1 x 10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24 (A), 48 (B) e 72 h (C). Os dados são de experimentos conduzidos em sextuplicatas, e barras com letras comuns não diferem estatisticamente (p < 0,05) pelo teste Tukey ..... 87
40. Efeito dos extratos de própolis verde sobre a viabilidade de células HepG2. O cultivo foi realizado em concentrações específicas (50, 100, 200 e 400 µg/mL), avaliado pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de 1 x 10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24, 48 e 72 horas..... 88
41. Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 em um cultivo controle (a) e em cultivo com amido (b). Aumento de 200x (a) e 400x (b) ..... 89
42. Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 em cultivo após tratamento com vermelho neutro. Nota-se o acúmulo do vermelho neutro no interior das células. Aumento de 200x (a) e 400x (b) ..... 90
43. Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 expostas ao extrato de própolis vermelha. As células foram cultivadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 25 (a), 50 (b), 100 (c) e 200 µg/mL (d), após 24 horas de exposição. Aumento de 400x ..... 91

44. Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 expostas ao extrato de própolis vermelha. As células foram cultivadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 25 (a), 50 (b), 100 (c) e 200 µg/mL (d), após 48 horas de exposição. Aumento de 200x ..... 92
45. Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 expostas ao extrato de própolis vermelha. As células foram cultivadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 25 (a), 50 (b), 100 (c) e 200 µg/mL (d), após 72 horas de exposição. Aumento de 200x (a, b, c) e 400x (d). ..... 93
46. Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 expostas ao extrato de própolis verde. As células foram cultivadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 50 (a), 100 (b), 200 (c) e 400 µg/mL (d), após 24 horas de exposição. Aumento de 200x (a, b, c) e 400x (d) ..... 94
47. Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 expostas ao extrato de própolis verde. As células foram cultivadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 50 (a), 100 (b), 200 (c) e 400 µg/mL (d), após após 48 horas de exposição. Aumento de 200x. .... 95
48. Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 expostas ao extrato de própolis verde. As células foram cultivadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 50 (a), 100 (b), 200 (c) e 400 µg/mL (d), após 72 horas de exposição; imagens (b), (c) e (d) em vermelho neutro. Aumento de 200x. .... 96
49. Efeito do excipiente maltodextrina do extrato da graviola sobre a viabilidade de células HepG2. Concentrações específicas (1, 2, 4 e 8 mg/mL) foram analisadas em relação ao controle (C), pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de 1 x 10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C). Os dados são de experimentos conduzidos em sextuplicatas, e barras com letras comuns não diferem estatisticamente (p < 0,05) pelo teste Tukey ..... 103
50. Efeito do extrato de graviola sobre a viabilidade de células HepG2. Concentrações específicas (1, 2, 4 e 8 mg/mL) foram analisadas em relação ao controle (0 mg/), pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de 1 x 10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C)..... 104

51. Efeito dos extratos de graviola sobre a viabilidade de células HepG2. O cultivo foi realizado em concentrações específicas (1, 2, 4 e 8 mg/mL) e avaliado pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de 1 x 10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24, 48 e 72 horas..... 105
52. Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 cultivadas em meio contendo maltodextrina. Os cultivos foram mantidos a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, na concentração 400 µg/mL de maltodextrina, após 72 horas de exposição. Aumento de 200x..... 106
53. Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 cultivadas em meio contendo extrato de graviola. O cultivo foi mantido a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 1 (a), 2 (b), 4 (c) e 8 mg/mL (d), após 24 horas de exposição. Aumento de 200x (a, b, c) e 400x (d). 107
54. Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 cultivadas em meio contendo extrato de graviola. O cultivo foi mantido a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 1 (a), 2 (b), 4 (c) e 8 mg/mL (d), após 48 horas de exposição. Aumento de 200x (c, d) e 400x (a, b). ..... 108
55. Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 cultivadas em meio contendo extrato de graviola. O cultivo foi mantido a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 1 (a), 2 (b), 4 (c) e 8 mg/mL (d), após 72 horas de exposição. Aumento de 200x (a) e 400x (b, c, d). ..... 109
56. Efeito comparativo dos extratos de graviola e própolis sobre a viabilidade de células HepG2. Concentrações mais eficazes dos extratos de graviola (8 mg/mL) e própolis vermelha (200 µg/mL) e verde (400 µg/mL), foram avaliadas pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de 1 x 10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24, 48 e 72 horas..... 112
57. CLAE-FR de extrato etanólico da própolis (Lot# ESAL-270309) e da resina exsudata de *Baccharis dracunculifolia*. Os respectivos números dos picos representando os constituintes químicos estão descritos na Tabela 8..... 137
58. CLAE-FR de extrato etanólico da própolis (Lot# PADE-0109-SR) e da resina exsudata de *Dalbergia ecastophyllum*. Os respectivos números dos picos representando os constituintes químicos estão descritos na Tabela 9. .... 139

## RESUMO

FILARDI, Marcelo Augusto, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Potencial Antitumoral de extratos da própolis brasileira e de folhas de graviola (*Annona muricata*): efeito citotóxico sobre células hepatocarcinogênicas HepG2.** Orientador: Tânia Toledo de Oliveira. Coorientadores: Abelardo Silva Júnior, Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo e Tanus Jorge Nagem.

O carcinoma hepatocelular é o mais frequente câncer primário do fígado e já se tornou a quinta neoplasia mais comum no mundo e a terceira causa de óbitos relatados por câncer. Estima-se que 2/3 das neoplasias humanas poderiam ser prevenidos pela modificação do estilo de vida, incluindo a dieta. A própolis, elaborada de diversas partes das plantas por abelhas *Apis mellifera*, apresenta propriedades farmacológicas efetivas no tratamento do câncer pela atividade biológica atribuída aos seus componentes químicos, principalmente a própolis brasileira. Mais de 300 compostos da própolis já foram identificados. Estudos farmacológicos também se intensificaram nos últimos anos com plantas da família *Annonaceae*, cujo interesse científico está nas acetogeninas, uma classe de compostos derivados de ácidos graxos com forte atividade antitumoral. Três experimentos foram conduzidos no Laboratório de Infectologia Molecular Animal, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na Universidade Federal de Viçosa, para testar *in vitro* as propriedades

antitumorais de extratos das folhas de graviola (*Annona muricata*) e de própolis verde e vermelha. Para isso, foram utilizadas células tumorais hepáticas da linhagem HepG2, cultivadas em quatro concentrações dos extratos de graviola (1, 2, 4 e 8 mg/mL) e dos extratos de própolis vermelha (25, 50, 100 e 200 µg/mL) e verde (50, 100, 200 e 400 µg/mL), com análise espectrofotométrica da viabilidade celular pela metodologia do corante vermelho neutro, em três períodos de tempo (24, 48 e 72 horas). As células expostas aos tratamentos exibiram forte inibição na proliferação, principalmente nas concentrações de 8 mg/mL do extrato da graviola (86% após 24 horas e 95% após 48 horas), 200 µg/mL do extrato da própolis vermelha (92% após 24 horas e 100% após 48 horas) e 400 µg/mL do extrato da própolis verde (92% após 72 horas), o que provocou alterações visíveis na arquitetura celular e na organização da monocamada de cultivo, com formas apoptóticas abundantes. A análise cromatográfica do perfil químico dos extratos das própolis verde e vermelha revelou a presença de flavonoides e outros compostos com efeito antitumoral conhecido, como artepilin C, pinocembrina, pinobanskina, quercetina, kanferol, crisina, galangina e bacarina. Os dados do presente trabalho permitem concluir que a graviola (*A. muricata*) e as própolis verde e vermelha são fontes de compostos citotóxicos em potencial contra células hepatocarcinogênicas HepG2.

## ABSTRACT

FILARDI, Marcelo Augusto, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Anti-tumorous potencial of Brazilian propolis and soursop leaf extract (*Annona muricata*): cytotoxic effect on hepatic carcinogenic HepG2 cells.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Co-advisers: Abelardo Silva Júnior, Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo and Tanus Jorge Nagem.

The hepatocellular carcinoma is the most common adult primary liver câncer and it has already become the fifth most common neoplasia in the world and the third in number of deaths related to cancer. It is estimated that 2/3 of all human neoplasias could be prevented by a change in lifestyle, including a diet. The propolis, elaborated from various plant parts by *Apis mellifera* bees, present pharmacological properties effective in cancer treatment by biological activity attributed to its chemical components, mainly with the Brazilian propolis. More than 300 propolis compounds have been identified. Recently pharmacological studies, in which scientific interest is focused on the acetogenins, a compound class derived from fatty acids and presenting a strong anti-tumorous activity. Three experiments were carried out in the Animal Molecular Infectology Lab, in the Biochemistry and Molecular Biology Department, in the Federal University of Viçosa, for testing *in vitro*, the anti-tumorous properties of soursop extracts (*Annona muricata*) and green and red propolis extracts. For so, tumorous hepatic cells from the

the HepG2 lineage were used, cultivated in four different concentrations of soursop extracts (1, 2, 4 e 8 mg/mL) and red propolis (25, 50, 100 and 200 µg/mL) and green extracts (50, 100, 200 and 400 µg/mL), with espectrophotometry analysis of the cellular viability by the methodology of neutral red dye, in three time periods (24, 48 and 72 hours). The cells wich were exposed th the treatments showed strong inhibition to proliferation, mainly in the concentration of 8 mg/mL of soursop extract (86% after 24 hours and 95% after 48 hours), 200 µg/mL of red propolis extract (92% after 24 hours and 100% after 48 hours) and 400 µg/mL of green propolis extract (92% after 72 hours), which caused visible alterations in the cellular architecture as well as in the single-layer cultivation organization, showing abundant apoptotic forms. The chromatographic analysis of the chemical profile of green and red propolis extracts revealed the presence of flavonoids and other compounds with known anti-tumorous effect, such as artepellin C, pinocembrin, pinobankisin, quercetina, kanpherol, chrysin, galangin and bacarin. The main conclusion to be drawn from this discussion is that the soursop (*A. muricata*) along with the green and red propolis are sources of cytotoxic compounds with pontential against hepatic carcinogenics HepG2 cells.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer não é totalmente conhecido, especialmente devido à complexidade etiológica que o envolve. Os tratamentos são desconfortáveis, agressivos ao paciente, sendo importante entender o melhor momento de intervenção ao tipo de câncer e seu estágio, utilizando a modalidade terapêutica apropriada. A qualidade de vida do paciente deve ser considerada prioridade no tratamento oncológico.

É estimado que mais de dois terços das neoplasias humanas poderiam ser prevenidos pela modificação do estilo de vida, incluindo a dieta. Nos últimos anos, mais componentes da dieta têm sido reconhecidos como agentes quimiopreventivos do câncer pela sua atividade anticarcinogênica (LI et. al., 2008; SARKAR et. al., 2007). Estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais mostram que muitos constituintes da dieta, entre os quais encontram-se curcumina, licopeno, polifenóis, isoflavonas e carotenos, estão associados à quimioproteção contra diferentes tipos de câncer em órgãos como mama, próstata, pulmão, cólon, estômago, fígado e rim. Dentre os mecanismos descritos para estes constituintes estão: prevenção de danos oxidativos ao DNA pela ação antioxidante, promoção de reparos no DNA, indução de apoptose e da resposta imunológica, redução da produção de fatores de crescimento responsáveis pela proliferação de algumas linhagens de células tumorais, entre outros (FERRARI, TORRES, 2003; HEBER, 2004).

A incidência do carcinoma hepatocelular (CHC) praticamente dobrou nos últimos 20 anos e já se tornou a quinta neoplasia mais comum no mundo e a terceira causa de óbitos relatados por câncer, ultrapassada apenas pelo câncer de pulmão e estômago. A taxa de incidência é cerca de 10 casos por 100 mil na América do Norte e Europa Ocidental a 50-150 casos por 100 mil em regiões da África e Ásia (AHMED, LOBO, 2006; SATIR, PATH, 2007; GOMAA et. al., 2008). O Brasil é considerado um país de média prevalência, com 5-10 casos/100.000 habitantes/ano. Existe forte associação com a cirrose hepática em 70% dos casos de CHC, muito comum em pacientes portadores do vírus da hepatite B e C, respectivamente em 2 e 2,5 por 100 pessoas/ano, além do alcoolismo (CONTE, 2000; KOJIRO, 2006; SATIR, PATH, 2007). A busca ativa da doença nos grupos de risco, por meio da realização de ultra-sonografia e da dosagem sérica de  $\alpha$ -fetoproteína, tem permitido o diagnóstico de tumores iniciais menores e com maiores chances de ressecção ou transplante hepático (WASLEY, ALTER, 2000; PAIXÃO, 2001).

O CHC é o mais frequente câncer primário do fígado. O número anual de novos casos no mundo é aproximadamente 550.000, representando mais que 5% dos cânceres humanos. É um câncer com alta taxa de mortalidade e a incidência mundial vem aumentando devido ao crescimento dos casos de hepatites (B e C) e das doenças relacionadas à obesidade. A taxa de sobrevida é baixa e não ultrapassa os seis meses. A cirurgia (ressecção ou transplante) é o principal tratamento, mas muitos pacientes em estágios avançados podem submeter-se somente a tratamentos paliativos, sendo a quimioembolização o tratamento mais efetivo (AHMED, LOBO, 2006; LLOVET et. al., 2003, RAOUL, 2008).

Própolis, pela suas atividades biológicas atribuídas aos seus componentes químicos, apresenta-se como um suplemento alimentar natural com propriedades farmacológicas efetivas no tratamento do câncer e na qualidade de vida dos pacientes (GALVÃO et. al., 2007). Mais de 300 compostos constituintes da própolis têm sido relatados (AWALE et. al., 2005; BARROS et. al., 2007). Elaborada a partir de diversas plantas por abelhas *Apis mellifera*, a própolis apresenta diversas propriedades biológicas conhecidas (DOBROWOLSKI et. al., 1991; BANKOVA et. al., 2000;

SANTOS et. al., 2003; AHN et. al., 2004; HRONEK et. al., 2005; LU et. al., 2005; MARQUELE et. al., 2005; TRUSHEVA et. al., 2006; CHEN et. al., 2007b; DAUGSH et. al., 2007; DRAGO et. al., 2007; SALOMÃO et. al., 2008).

Estudos com própolis originada dos diferentes continentes têm mostrado propriedades citotóxicas em diferentes linhagens de células tumorais (YANAGIHARA, et. al., 1993; BASNET et al., 1996; BURDOCK, 1998; BANSKOTA et. al., 1998; 2000a; 2001b; 2002; BANKOVA, 2005; GUNDUZ et. al., 2005; CHEN et. al., 2004; 2007b; LI et. al., 2008; YANG et. al.; 2009).

Estudos farmacológicos têm se intensificado nos últimos anos com plantas tropicais da família *Anonaceae*. Com mais de 2.300 espécies, o interesse científico está na descoberta das acetogeninas, uma classe de compostos encontrada apenas nesta família de plantas (ALALI et. al., 1999).

Estruturalmente, as acetogeninas são derivadas de ácidos graxos alifáticos de cadeias longas, apresentando grande variedade de propriedades biológicas, em especial sua citotoxicidade e propriedades antitumorais. Sintéticas ou isoladas de plantas anonáceas, exibem propriedades farmacológicas antitumorais que poderão ser promissoras contra as neoplasias quimioterápico-resistentes. Propriedades antineoplásicas já foram descritas *in vivo* e *in vitro* com efeitos atribuídos às acetogeninas, incluindo tumores de fígado, pulmão, rim, ovário, próstata, leucemia, ileocecal, nasofaríngeal e melanoma (ALALI et. al., 1999; CHANG, WU, 2001; CHIH et. al., 2001; LIAW et. al., 2005; MCLAUGHLIN, 2008).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* dos extratos secos de graviola e própolis em células do carcinoma hepatocelular da linhagem HepG2 (ATCC HB-8065). Para isso, foi analisada a viabilidade celular dos cultivos submetidos a três concentrações do extrato de própolis verde e vermelha, em função do tempo (24, 48 e 72 horas).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O câncer

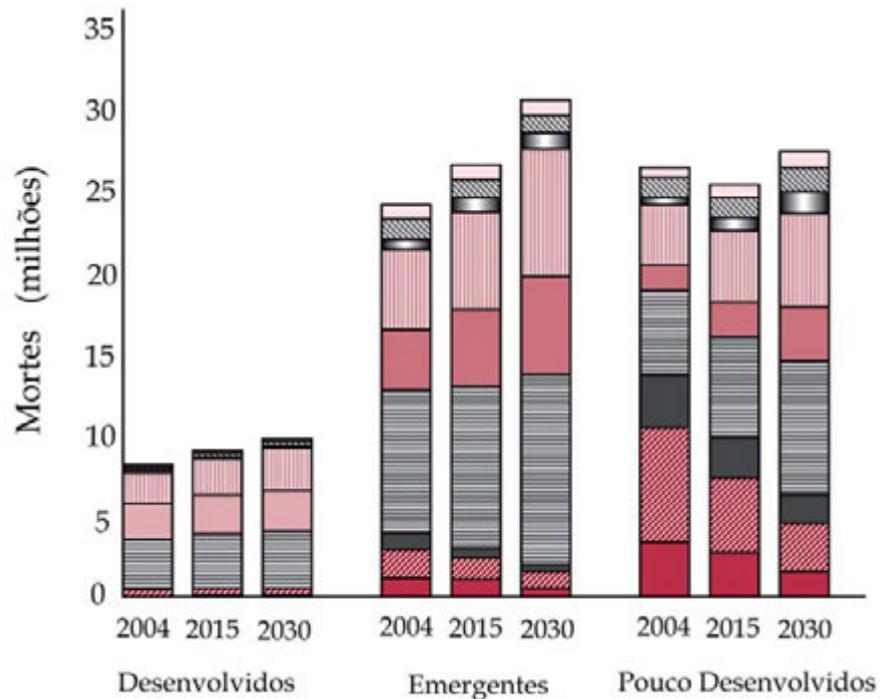
*Câncer* ou *neoplasia* (*neo*, novo; *plasia*, crescimento) é um grupo de doenças caracterizado por crescimento anárquico e errático (displasia) com expansão anormal de células desordenadas formando uma massa celular ou um *neoplasma*. É um distúrbio do crescimento e comportamento celulares, onde as figuras mitóticas são tipicamente mais abundantes com perda da orientação arquitetônica local. Fatores externos (tabagismo, organismos infecciosos, substâncias químicas e radiação) e fatores internos (mutações hereditárias, mutações decorrentes do metabolismo, hormônios, condições imunológicas) podem atuar juntos ou em sequência para iniciar e promover a carcinogênese. Entre os tratamentos, incluem cirurgia, radiação, quimioterapia, terapia hormonal e terapia biológica (COTRAN et. al., 2000; BERTRAM, 2001).

Os tumores podem ser benignos ou malignos e a maioria das neoplasias benignas não se torna cancerosa, entretanto, há casos raros de malignização de tumores benignos (COTRAN et. al., 2000).

Mais comumente, tumores constituídos de células malignas em tecidos epiteliais originados de qualquer um dos folhetos embrionários (ectoderme, mesoderme, endoderme) são denominados “carcinomas”. Quando as células de toda a espessura de um epitélio perdem a uniformidade individual, sua orientação e arquitetura (displasia), a lesão é considerada pré-invasiva e tem-se um carcinoma *in situ*. Neste caso, exibem as características citológicas de malignidade sem infiltração da membrana basal, um estágio anterior de um câncer invasivo que, com o decorrer do tempo, penetra na membrana basal e acaba infiltrando-se no estroma subepitelial. Em muitos órgãos (mama, fígado, pulmão, intestino) a maioria dos cânceres são carcinomas. Enquanto podem ter certas características em comum, diferentes tipos de câncer têm causas diferentes e podem apresentar respostas diferentes aos tratamentos (COTRAN et. al., 2000; STEWART, KLEIHUES, 2003a).

## **2.2. O câncer no mundo**

A Figura 1 apresenta uma projeção das mortes provocadas por causas diversas em países desenvolvidos, países emergentes (grupo ao qual pertence o Brasil) e países pouco desenvolvidos. Para 2030, a projeção é que o câncer, doenças cardiovasculares e acidentes rodoviários sejam responsáveis em conjunto por 56% de um total de 67 milhões de mortes projetadas (WHO, 2008).



- Injúrias intencionais
- ▨ Outras injúrias não intencionais
- ▩ Acidentes de automóveis
- ▤ Outras doenças não comunicadas
- Câncer
- ▨ Doenças cardiovasculares
- Condições perinatais, maternal e nutricional
- ▤ Outras doenças infecciosas
- HIV, malária, Tabagismo

Figura 1 – Mortes projetadas por causas diversas em países desenvolvidos, países emergentes e países pouco desenvolvidos (WHO, 2008).

Nove fatores de risco ambientais e comportamentais são responsáveis por 35% das mortes por câncer: índice de massa corporal elevado, baixa ingestão de frutas e verduras, sedentarismo, tabagismo, alcoolismo, sexo não seguro, poluição do ar nas cidades e em locais fechados, seringas injetáveis contaminadas. Associados a causas infecciosas, alcançam 45% das mortes por câncer em todo o mundo: 63% das mortes por câncer de estômago são causados pela infecção com *Helicobacter pylori* e 73% das mortes por câncer no fígado são causados por infecção com vírus da hepatite (WHO, 2009b).

Em termos de incidência, as neoplasias mais comuns no mundo (excluindo os cânceres de pele não-melanoma) são: pulmão (12,3% de todos os cânceres), mama (10,4%) e colorretal (9,4%), sendo que o câncer de pulmão é o mais fatal (17,8%), seguido pelo câncer de estômago (10,4%) e fígado (8,8%). Em homens, predomina o câncer de pulmão, sendo que esôfago, estômago e bexiga também são mais comuns em homens; câncer de pâncreas e de colorreto, por outro lado, apresenta pouca diferença em ambos os sexos; tumores de mama, próstata e cérvix (Figura 2) causam a morte de uma minoria de pacientes (STEWART, KLEIHUES, 2003a). Nos Estados Unidos, e em muitas outras partes do mundo, o câncer é o maior problema de saúde pública. Uma em cada quatro mortes nos Estados Unidos é devido ao câncer (SIEGEL et. al., 2008).

Em 2005, as neoplasias ocupavam a 4ª causa de mortes e a projeção para 2030 é que alcance o 3º lugar, ficando atrás das doenças cardiovasculares e desordens fisiológicas, como as do sistema digestório, respiratório, genito-urinário e neuro-endócrinas. Em 2008, o câncer de pulmão foi a principal causa de morte (1,31 milhões), seguido pelo câncer de estômago (780 mil óbitos) e o câncer de fígado (699 mil óbitos) em todo o mundo (IARC, 2009).

A distribuição dos casos de câncer difere entre países desenvolvidos e países em desenvolvimento, com alguns tipos particulares de câncer exibindo diferentes padrões de distribuição (Figura 3). O câncer de mama e de pulmão são igualmente distribuídos entre nações desenvolvidas e em desenvolvimento, mas o câncer cervical é particularmente sério nos países em desenvolvimento como centro sul da Ásia, África e América do Sul; o câncer de fígado apresenta particular importância na África e partes da Ásia e o câncer de bexiga é o maior problema do norte da África e Oeste da Ásia (STEWART, KLEIHUES, 2003a).

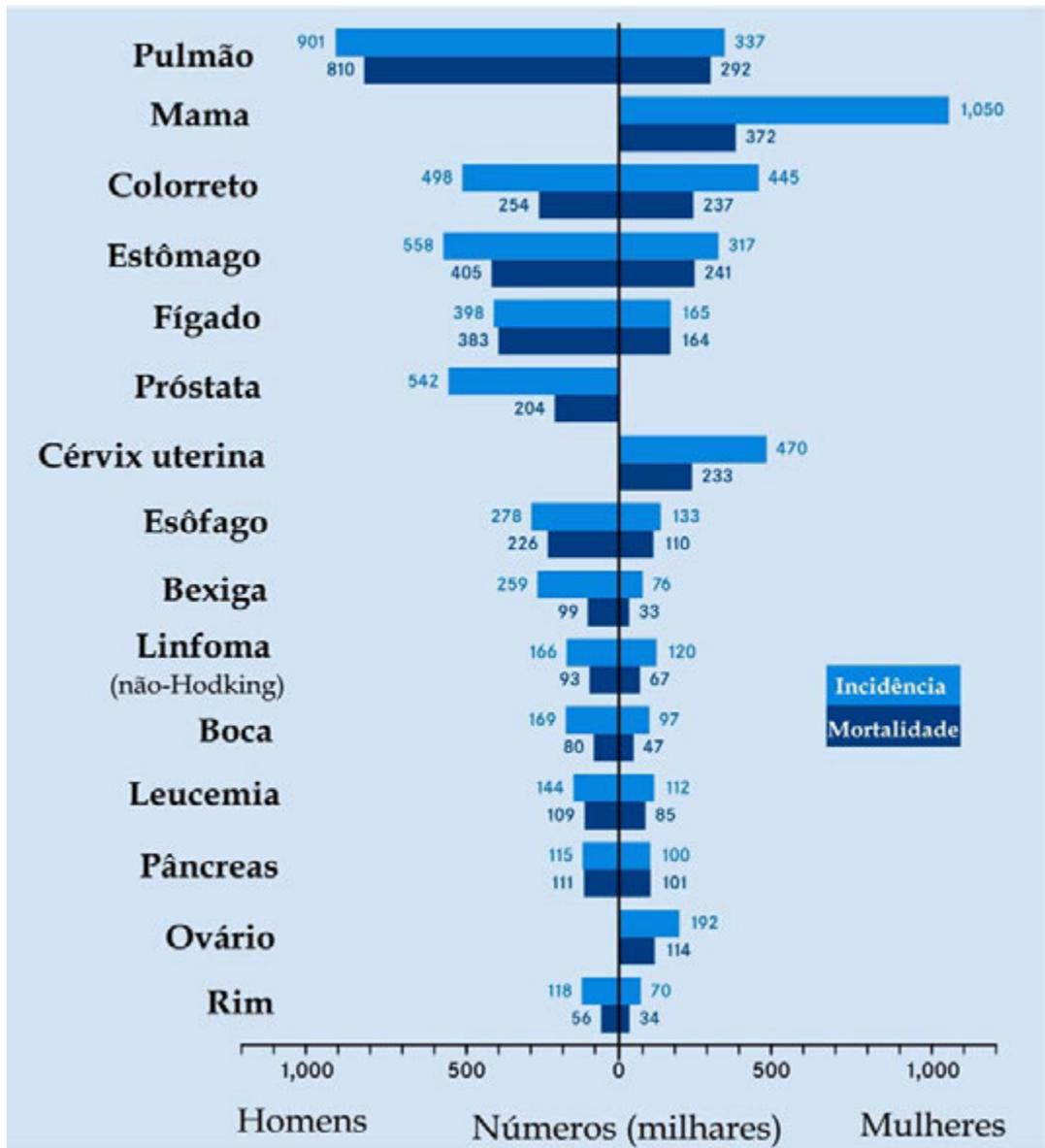


Figura 2 – Incidência e mortalidade (milhares), em homens e mulheres, dos tipos de cânceres mais comuns em todo o mundo (STEWART, KLEIHUES, 2003a).

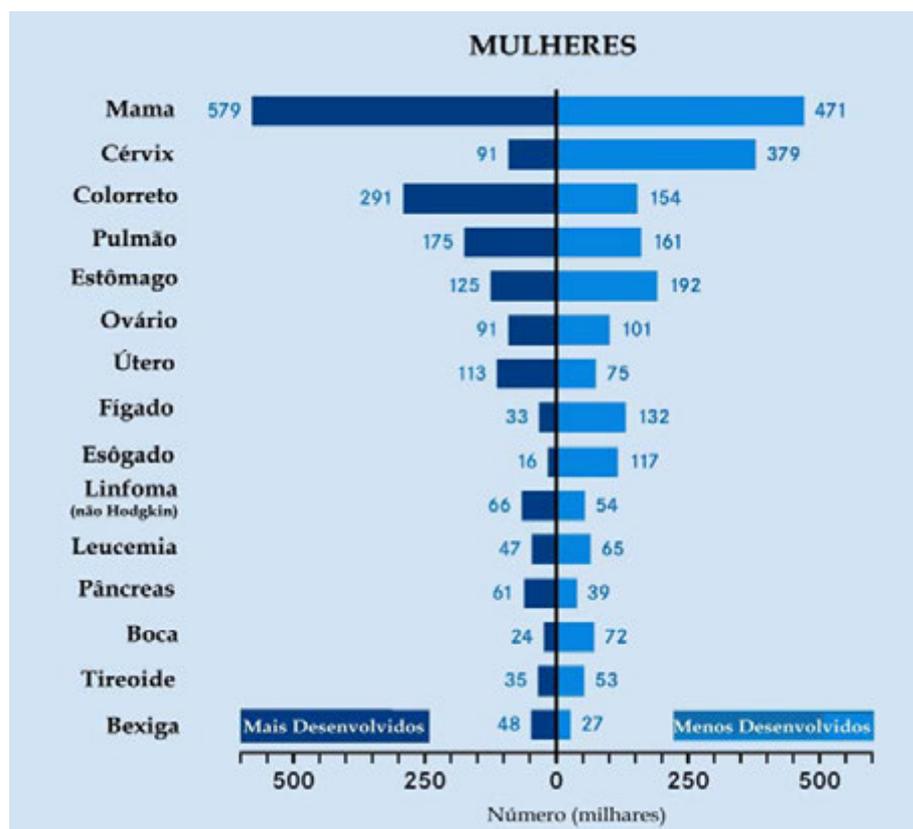
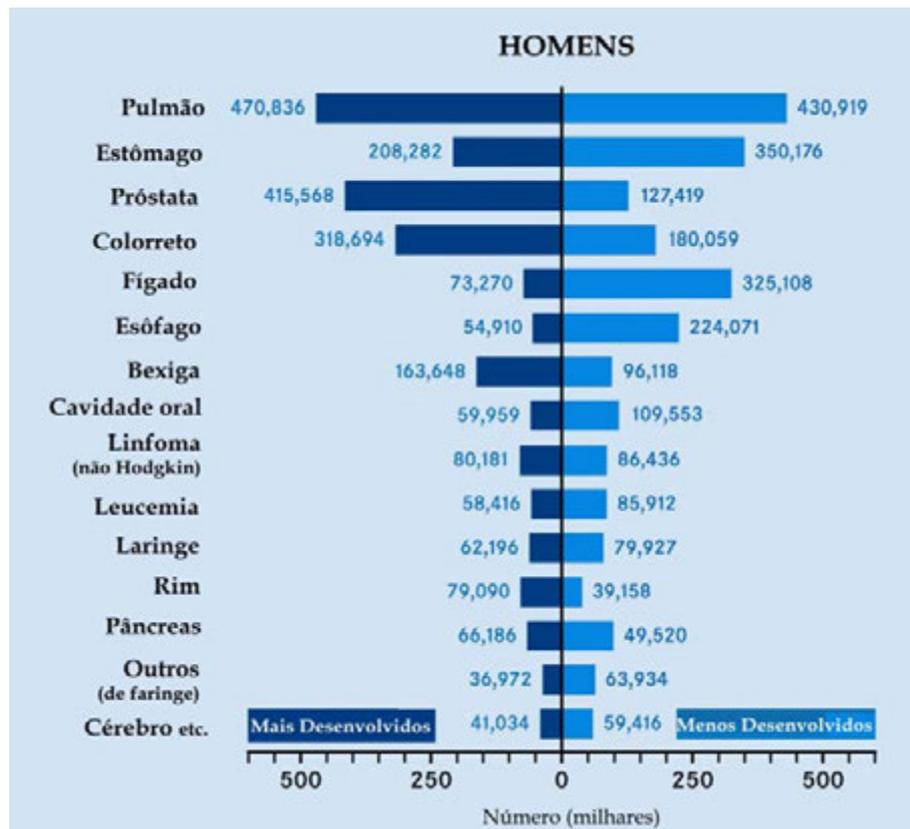


Figura 3 – Comparação dos tipos de cânceres mais comuns no mundo em países desenvolvidos e menos desenvolvidos (STEWART, KLEIHUES, 2003a).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o impacto global do câncer mais que dobrou nos últimos 30 anos (WHO, 2008a) e poderá ter um aumento de até 50% até 2020, de 10 milhões de novos casos no ano 2000 para 15 milhões em 2020, sendo que dois terços dos óbitos ocorrerão principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento (WHO, 2003). O número de óbitos por câncer aumentará muito nos próximos 30 anos, de 7,4 milhões em 2004 para 11,8 milhões de mortes em 2030 (WHO, 2008).

A Figura 4 apresenta uma projeção para as mortes por câncer de 2002 a 2030 em todo o mundo (modificado de MATHERS, LONCAR, 2006). A Tabela 1 lista as dezoito maiores causas de morte no mundo para homens e mulheres e sua projeção mundial para 2030, com mudança na posição do ranking em 2002 e 2003. Infecções nas vias respiratórias inferiores, condições perinatais, doenças da diarreia, malária e sarampo apresentam projeção ao declínio substancial até 2030. Por outro lado, diabete melitos, cânceres de fígado, estômago, colorretal e pulmão têm projeção para subir três ou mais posições no ranking (MATHERS, LONCAR, 2006).

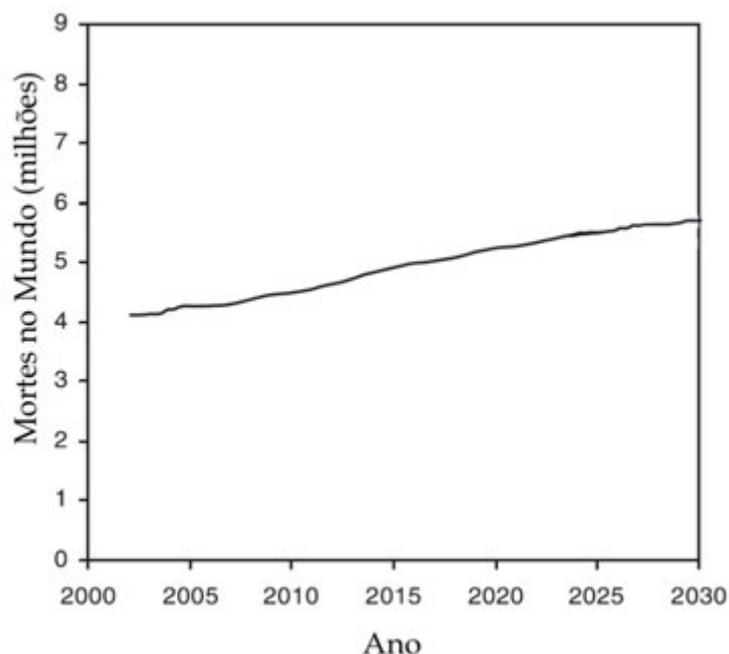


Figura 4 – Projeção de mortes (em milhões) para o câncer, entre 2002 e 2030 (modificado de MATHERS, LONCAR, 2006).

Tabela 1 – Mudança de posição no ranque das maiores causas de morte no mundo, entre 2002 e 2030 (MATHERS, LONCAR, 2006)

DOENÇA OU INJÚRIA	RANQUE 2002	RANQUE 2030	MUDANÇA NO RANQUE
Doenças Isquêmicas do Coração	1	1	0
Doenças Cerebro-Vasculares	2	2	0
Infecções Respiratórias Inferiores	3	5	-2
AIDS	4	3	+1
Doença Obstrutiva Pulmonar Crônica	5	4	+1
Condições Perinatais	6	9	-3
Doenças da Diarreia	7	16	-9
Tuberculose	8	23	-15
Câncer de Traqueia, Brônquio e Pulmão	9	6	-3
Acidentes Automobilísticos	10	8	+2
Diabete Melitos	11	7	+4
Malária	12	22	-10
Doenças Cardíacas Hipertensivas	13	11	+2
Injúrias auto-Imunes	14	12	+2
Câncer de Estômago	15	10	+5
Nefrites e Nefrose	17	13	+4
Cânceres de cólon e reto	18	15	+4
Cânceres hepáticos	19	14	+5

### 2.3. O câncer no Brasil

No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2009a) para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, surgirão mais de 480 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 no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no

sexo feminino (Figura 5), acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina. Os tumores mais incidentes para o sexo masculino serão devidos ao câncer de pele não melanoma (53 mil casos novos), próstata (52 mil), pulmão (18 mil), estômago (14 mil) e cólon e reto (13 mil). Para o sexo feminino, destacam-se os tumores de pele não melanoma (60 mil casos novos), mama (49 mil), colo do útero (18 mil), cólon e reto (15 mil) e pulmão (10 mil).

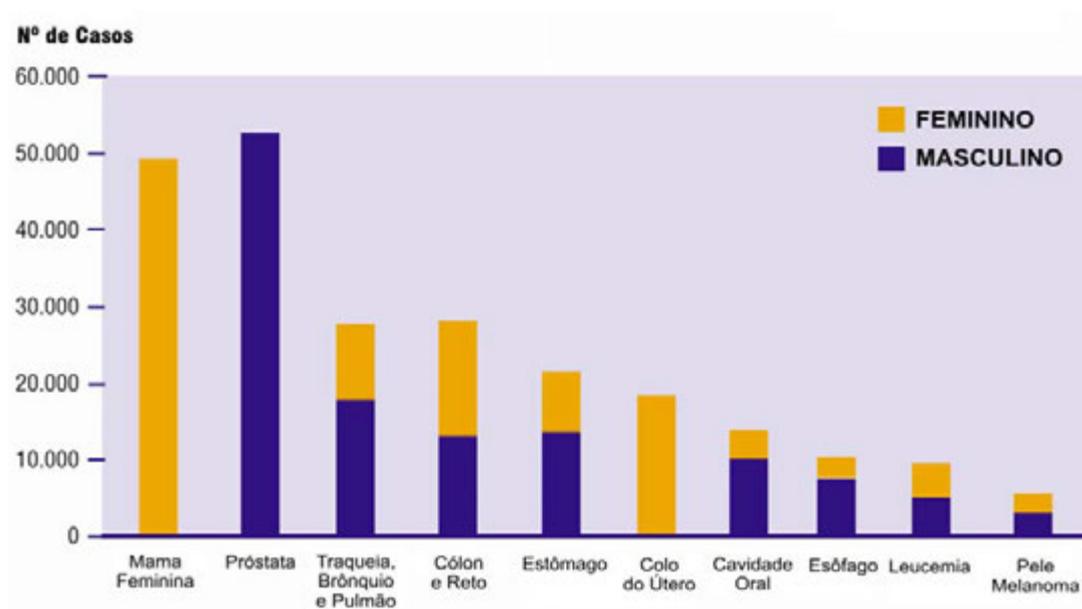


Figura 5 – Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010 e 2011, exceto pele não melanoma, na população brasileira. Fonte: Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde (INCA, 2009a).

A distribuição dos casos novos de câncer segundo localização primária mostra-se heterogênea entre Estados e capitais do país, o que fica em evidência ao observar-se a representação espacial das diferentes taxas brutas de incidência (Figura 6). As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto que as regiões Norte e Nordeste mostram as menores taxas. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (INCA, 2009a).

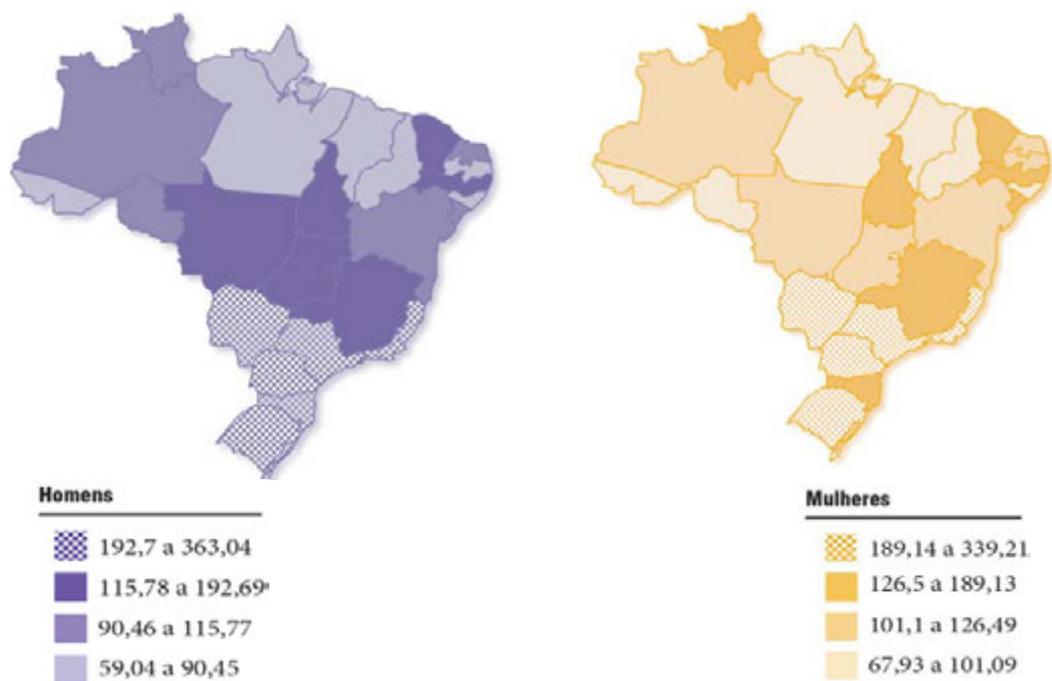


Figura 6 – Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2010 e 2011, segundo a Unidade da Federação Brasileira (todas as neoplasias, exceto as de pele não melanoma). Fonte: Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde (INCA, 2009a).

#### 2.4. O carcinoma hepatocelular

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um câncer que começa nos hepatócitos e é o tumor sólido mais comum no mundo. O fígado, atrás apenas dos linfonodos, é o segundo maior alvo de metástases provenientes de outros tumores sólidos, o que é particularmente comum em pacientes com adenocarcinoma colorretal (BISCEGLIE et. al., 1988). É a terceira causa de mortes por câncer entre homens em todo o mundo e responde por 4% de todas as neoplasias humanas (STEWART, KLEIHUES, 2003).

Tumores malignos do fígado (Tabela 2) são classificados em primários ou secundários (metastásicos), alguns dos quais apresentam-se sintomáticos e com disfunções hepáticas, mas a maioria permanece assintomáticos sem alterar inicialmente as funções hepáticas. Tumores primários comuns são o carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma, sendo que o primeiro é 10 vezes mais comum. Metástases de cânceres

adenocarcinoma colorretal e neuroendócrino são os dois tipos em que a ressecção do fígado é potencialmente curável. Com o progresso das técnicas de imagens (Tomografia Computadorizada/Emissão de Pósitrons, Ressonância Magnética) e a descoberta de marcadores tumorais hepáticos, juntamente com diagnósticos precoces nos estágios iniciais da doença, aumentam as chances de cura da doença. O tratamento requer multidisciplinaridade (médico oncologista, cirurgião hepatobiliar, radioterapeuta, radiologista intervencional) com acesso aos sistemas de transplante, e as cirurgias junto ao desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos oferecem cada vez mais potencial de recuperação do paciente e cura (AHMED, LOBO, 2006).

Tabela 2 – Classificação dos tumores malignos do fígado; (\*) indica a porcentagem de tumores primários, excluindo as metástases (AHMED, LOBO, 2006)

PRIMÁRIO	SECUNDÁRIO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• TUMORES EPITELIAIS <i>Hepatocelular</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hepatoblastoma (7%)*</li> <li>- Carcinoma Hepatocelular (75%)*</li> <li>- Colangiocelular (6%)</li> <li>- Colangiocarcinoma</li> <li>- Cistadenocarcinoma</li> </ul> </li> <li>• TUMORES MESENQUIMAIS <i>Tumores de Vasos Sanguíneos</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Angiosarcoma</li> <li>- Hemangioendotelioma</li> </ul> <i>Outros Tumores</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sarcoma embrional</li> <li>- Fibrosarcoma</li> </ul> </li> <li>• TUMORES DO TECIDO MUSCULAR <ul style="list-style-type: none"> <li>- Leiomiosarcoma</li> <li>- Rabdomyosarcoma</li> </ul> </li> <li>• MISTOS <ul style="list-style-type: none"> <li>- Carcinosarcoma</li> <li>- Teratoma</li> <li>- Tumor do Saco Vitelínico</li> <li>- Carcinoide</li> <li>- Carcinoma Escamoso</li> <li>- Linfoma Primário</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TUMORES GASTROINTESTINAIS <ul style="list-style-type: none"> <li>- Colorretal</li> <li>- Pâncreas</li> <li>- Estômago</li> <li>- Esôfago</li> <li>- Carcinoide</li> </ul> </li> <li>• TUMORES NÃO GASTROINTESTINAIS <ul style="list-style-type: none"> <li>- Brônquios</li> <li>- Mama</li> <li>- Ovário</li> <li>- Melanoma</li> <li>- Linfoma</li> <li>- Renal</li> </ul> </li> </ul>

### **2.4.1. Incidência do Carcinoma Hepatocelular**

Praticamente o número de casos dobrou nos últimos 20 anos, provavelmente relacionado ao aumento dos casos de hepatite C, obesidade e diabetes (LAINO, 2008), sendo que 73% das mortes por câncer hepático são causados por infecção com o vírus da hepatite (WHO, 2009).

Mais de 80% dos casos de câncer de fígado ocorrem na Ásia e África (devido às infecções pelo vírus da hepatite B e exposição à aflatoxina); no Japão, o câncer é predominantemente provocado pela infecção com o vírus da hepatite C; em países ocidentais, a cirrose hepática provocada pelo uso abusivo do álcool favorece o câncer hepático. Em todo o mundo, homens são três vezes mais afetados que as mulheres, sendo que é o quinto câncer mais comum entre os homens, e o oitavo entre as mulheres de todo o mundo (STEWART, KLEIHUES, 2003a).

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um câncer primário derivados dos hepatócitos representando mais de 90% das neoplasias primárias hepáticas, com incidência anual estimada em cerca de 500.000 a 1.000.000 de casos, causando 600.000 mortes por ano em todo o mundo. É o quinto câncer mais comum no mundo e a terceira causa de morte relatada por câncer, ultrapassado apenas pelo câncer de pulmão e estômago. A taxa de incidência é cerca de 10 casos por 100 mil na América do Norte e Europa Ocidental a 50-150 casos por 100 mil em regiões da África e Ásia. Nos países em desenvolvimento, os registros de CHC é de 2 a 3 vezes maior que em países desenvolvidos. O Brasil é considerado um país de média prevalência, com 5-10 casos/100.000 habitantes/ano. A incidência anual de CHC em pacientes cirróticos varia entre 2 a 8% (CONTE, 2000; EL-SERAG, 2001; LLOVET et. al., 2003; AHMED, LOBO, 2006; SATIR, PATH, 2007; GOMAA et. al., 2008; RAOUL et. al., 2008).

A Figura 7 apresenta a incidência global do CHC, reportadas em 100 mil pessoas (EL-SERAG, RUDOLPH, 2007). Mais que 80% dos casos de CHC ocorrem na África e Oeste da Ásia; América do Norte e do Sul, Norte da Europa e Oceania respondem por < 5/100.000 casos de câncer hepático.

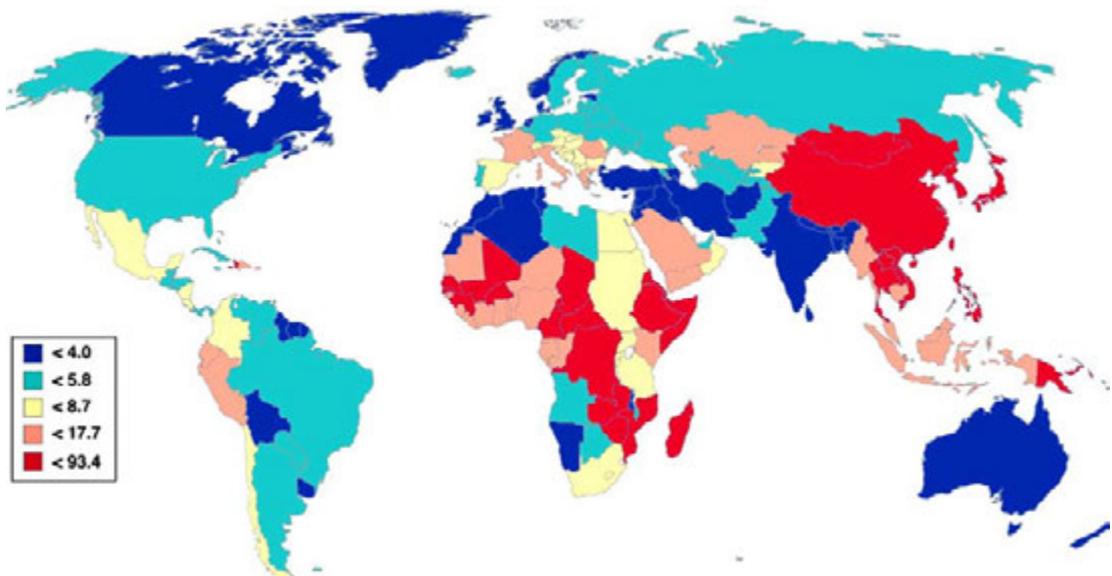


Figura 7 – Variações regionais em todo o mundo das taxas de mortalidade do carcinoma hepatocelular, reportadas em 100 mil pessoas (EL - SERAG, RUDOLPH, 2007).

Nas últimas décadas, as taxas de incidência e mortalidade de CHC têm aumentado em ambos os sexos de todos os grupos humanos, sendo que as taxas são duas vezes maiores em negros e afro-americanos que em brancos; a incidência de câncer hepático em homens e mulheres hispânicos é duas vezes maior que em brancos. A Figura 8 apresenta índices de incidência e mortalidade do CHC em diferentes grupos humanos desde 1985 (NCI, 2008).

#### 2.4.2. Fatores de risco do Carcinoma Hepatocelular

A Figura 9 apresenta alguns fatores que favorecem o acometimento de CHC e as Tabelas 3 e 4 mostram os grupos de risco para o CHC. Existe forte associação com a cirrose hepática em até 80% dos casos de CHC, sendo comum em pacientes portadores de cirrose hepática por vírus B (VHB) e C (VHC), respectivamente em 2 e 2,5% ao ano (CONTE, 2000; AHMED, LOBO; 2006; KOJIRO, 2006; INCA, 2009a, NCI, 2009a).

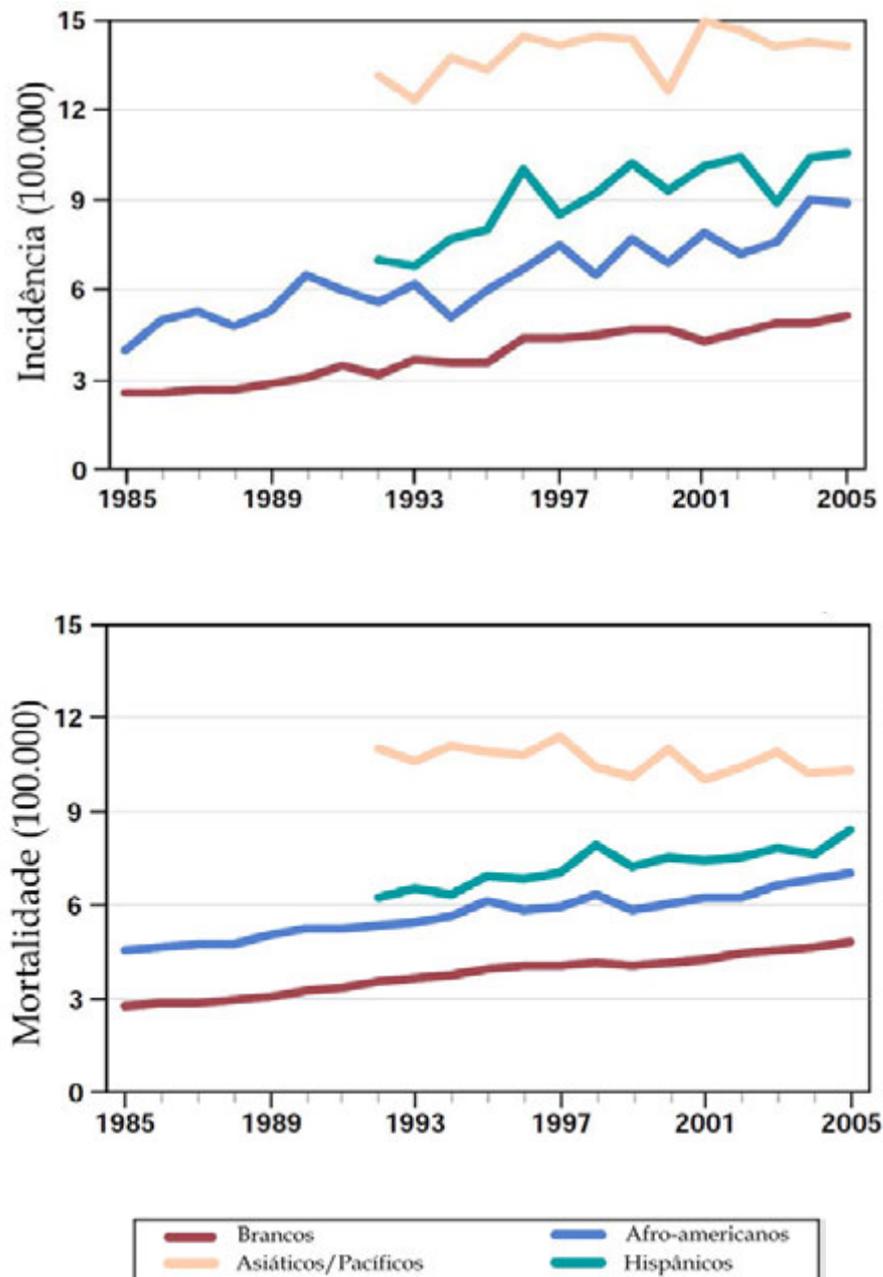


Figura 8 – Incidência e mortalidade de câncer hepático em diferentes grupos humanos, entre os anos 1985 e 2005. Fonte: Instituto Nacional de Câncer (NCI, 2008).

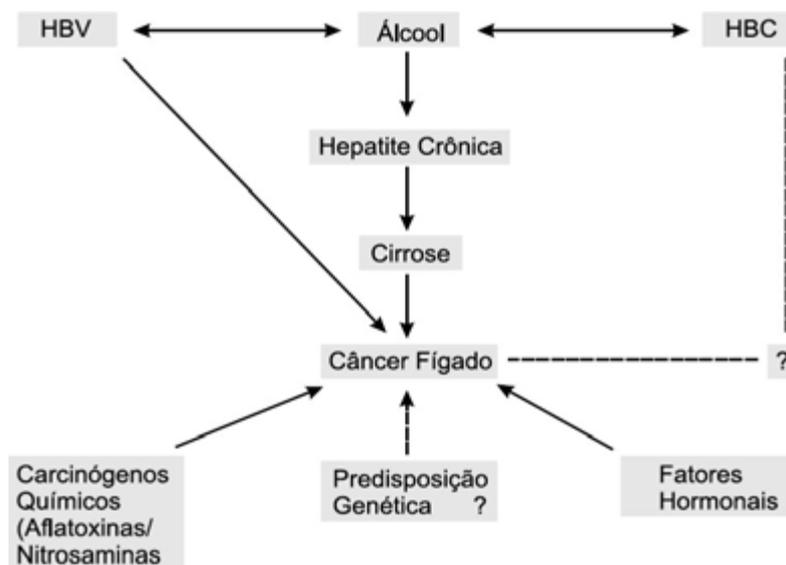


Figura 9 – Fatores etiológicos do carcinoma hepatocelular. Vírus da hepatite B (HBV) e C (HBC) são os fatores mais importantes, agravados pelo alcoolismo (BRECHOT, 2004).

Tabela 3 – Grupos de risco para o desenvolvimento do Carcinoma Hepatocelular (AHMED, LOBO, 2006)

SEXO	DOENÇA PRIMÁRIA
Homens	Cirrose biliar primária Cirrose associada ao alcoolismo
Homens e Mulheres	Cirrose estabelecida devido ao vírus da hepatite B Cirrose estabelecida devido à Hemocromatose.

Tabela 4 – Etiologia do carcinoma hepatocelular. Fonte: Instituto Nacional de Câncer (NCI, 2009).

PRINCIPAIS AGENTES CAUSADORES	ÁREA GEOGRÁFICA DOMINANTE
Vírus da Hepatite B	Ásia and África
Vírus da Hepatite C	Europa, Estados Unidos e Japão
Álcool	Europa e Estados Unidos
Aflatoxina	Oeste da Ásia e África

A infecção crônica pelo VHB é o mais importante fator de risco do carcinoma hepatocelular. Mundialmente, 380 milhões de pessoas são portadoras do VHB e, em países desenvolvidos, a maioria das infecções ocorre por contato sexual, uso de drogas injetáveis, procedimentos médicos invasivos ou transfusões de sangue (HILLEMANN, 2003). Os portadores da hepatite B apresentam de 20 a 100 vezes mais chance de desenvolver CHC, agravado pelos seguintes fatores: duração da infecção, idade, sexo masculino, coinfeção com outros vírus hepatotrópicos (C ou D), alcoolismo, fumo, aflatoxina, inflamação hepática crônica (fibrose e proliferação celular) (BRECHOT, 2004). Infecção crônica pelo vírus da hepatite C é a maior causa de CHC na Europa, Japão e Estados Unidos, com 170 milhões de pessoas infectadas. Os fatores de risco incluem coinfeção com o vírus da hepatite B, fumo, doenças hepáticas (fibrose, cirrose), hemocromatose (anomalia genética no metabolismo do ferro), alcoolismo, idade, sexo masculino, diabetes e obesidade (RAOUL, 2008).

O tempo de duração da infecção viral, a evolução da cirrose e a idade da paciente estão diretamente relacionados ao desenvolvimento do CHC (VELAZQUEZ et. al., 2003). Maiores incidências e desenvolvimento precoce de CHC foram relatados em pacientes com mais de 52 anos de idade; queda no número de plaquetas a níveis inferiores a  $105 \times 10^3/\text{mm}^3$ , valores séricos de  $\alpha$ -fetoproteína superiores a 0,5 ng/ml, portadores de *diabete mellitus* tipo 2 elevam as condições de risco (RODRIGUEZ-DIAZ et. al., 2007).

Como reportado na 43ª Reunião Anual da Associação Europeia para Estudos das Doenças do Fígado, investigações na taxa de incidência e nos fatores de risco do câncer hepático incluem principalmente os portadores do VHC e cirrose, superando os pacientes acometidos de fibrose hepática. Vida sedentária, idade avançada, baixo índice de massa corpórea, presença de varizes esofágicas, baixos níveis de plaquetas e níveis elevados de fosfatase alcalina sérica são fatores significativamente associados ao CHC. Sexo, raça, diabetes, alcoolismo e tipo de terapia não foram significativamente associados ao CHC (LOCK et. al., 2008).

Os agentes virais B e C das hepatites crônicas são os fatores etiológicos mais importantes dos cânceres primários do fígado devido às suas estreitas ligações com as mutações genéticas tumorais supressoras

que provocam, particularmente, nos genes p53 e na proteína-quinase retinoblastoma inibidora (pRB) Existem evidências de que tanto os vírus VHB como os VHC, podem exercer esses efeitos oncogênicos, de modo progressivo, desde a lesão hepatocelular direta inicial, passando pela inflamação, mitoses proliferativas, regeneração e a malignização final (CONTE, 2000).

WASLEY, ALTER (2000) desenvolveram um estudo na Itália avaliando o papel do vírus da hepatite B (VHB), C (VHC) e G (VHG), ingestão de álcool e uso de fumo como fatores de risco de desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, na presença ou ausência de cirrose. Não houve diferença significativa nos casos de CHC com e sem cirrose em relação à idade e sexo dos pacientes, nível de escolaridade e área geográfica de origem; tabagismo e o VHG não foram associados ao CHC. VHB, VHC e o alcoolismo foram fatores determinantes para o desenvolvimento de CHC, na presença de cirrose (86,7%) ou ausência (91,5%); nos pacientes com cirrose, houve forte associação com o VHC; nos pacientes sem cirrose e infectados pelo VHC, o acometimento pelo CHC pode advir de um quadro histológico crônico a partir de um processo inflamatório crônico, o mesmo encontrado nos portadores do VHB. O desenvolvimento de CHC ocorre mais facilmente em fígados histologicamente anormais e que as doenças hepáticas crônicas predis põem os pacientes aos riscos da hepatocarcinogênese. Tumores multinodulares foram mais comuns nos pacientes com cirrose.

JEPSSEN et. al. (2007) compararam a incidência de CHC nos Estados Unidos e Dinamarca entre os anos de 1978 e 2004. A taxa de incidência de CHC nos Estados Unidos, entre os homens com idade entre 45 e 59 anos, foi semelhante à da Dinamarca até 1995. Após esse período, aumentou e atualmente está 2,5 vezes maior que a taxa deste país. O aumento na incidência de CHC coincide com o aumento dos casos de contaminação pelo VHC no mesmo período e envolveu uma geração exposta ao uso de drogas intravenosas e transfusões de sangue contaminado, fatores responsáveis primariamente pela contaminação do vírus. Segundo os autores, além disso, o vírus adquirido durante o serviço militar no Vietnã pode parcialmente explicar o aumento evidente deste tipo de tumor entre os homens norte-

americanos. Na Dinamarca, a taxa de incidência de CHC entre os homens foi duas vezes maior que entre as mulheres; no período analisado, a taxa incidente de homens dinamarqueses afetados pelo VHC prevalece acima da encontrada para as mulheres (6,2 por 1000 e 2,6 por 1000, por ano, respectivamente), sugerindo que, do mesmo modo observado para os Estados Unidos, o VHC tem um papel central aos índices de casos de CHC nos dois países. A diabetes, que apresentou aumento no período para ambas as populações, mas notavelmente superior nos Estados Unidos, pode explicar o aumento dos casos de CHC.

Há uma relação linear entre a taxa de ingestão de álcool e hepatocarcinogênese, para quantidades acima de 60 g/dia, sem diferença expressiva entre homens e mulheres. O risco de desenvolver CHC e a ingestão de álcool foi evidente mesmo na ausência da infecção de VHB e VHC e dobrou em pacientes portadores de cada tipo de hepatite em ingestões de álcool maior que 60 g/dia (DONATO et. al., 2002). Há interação sinérgica também em pacientes portadores de hepatite, ingestão de álcool (> 80 mL/dia) e diabetes mellitus. Independente do efeito de VHB, VHC e diabetes, o consumo intenso de álcool contribui para 32% dos casos de CHC nos pacientes, contra 22, 16 e 20% de VHC, VHB e diabetes mellitus, respectivamente (HASSAN et. al., 2002).

Pacientes cirróticos com elevação nos níveis de alfa-fetoproteína apresentam alto risco. A busca ativa da doença nos grupos de risco, por meio da realização de ultra-sonografia e da dosagem sérica de alfa-fetoproteína, tem permitido o diagnóstico de tumores iniciais menores e com maiores chances de ressecção ou transplante hepático (WASLEY, ALTER, 2000; PAIXÃO, 2001).

#### **2.4.3. Manifestações clínicas do Carcinoma Hepatocelular**

O câncer hepático inicial não manifesta sintomas. Em estágios mais avançados da tumorigênese, os sinais e sintomas dos pacientes são: dor na região superior direita do abdômen, inchaço e peso abdominal, anorexia, perda de peso, náusea, vômito, olhos e pele amarelados, urina escurecida e ascite. Alguns pacientes poderão evoluir para ruptura espontânea do tumor

com dor súbita de forte intensidade, seguida de choque hipovolêmico (SATIR, PATH, 2007; INCA, 2009b; NCI, 2009b).

#### 2.4.4. Vigilância e diagnóstico do CHC

Infelizmente, a maioria dos cânceres hepáticos é diagnosticada em estágios avançados e a sobrevivência destes pacientes é menor que 30% em 1 ano. Nos Estados Unidos e Europa, 40% dos cânceres hepáticos são diagnosticados tardiamente (LAINO, 2008).

Não há estudos efetivos que definem o melhor momento para realizar procedimentos de vigilância, mas baseando-se em dados clínicos disponíveis, é sugerido o esquema da Figura 10 (BRUIX et. al., 2001; LLOVET et. al., 2003, AHMED, LOBO, 2006).

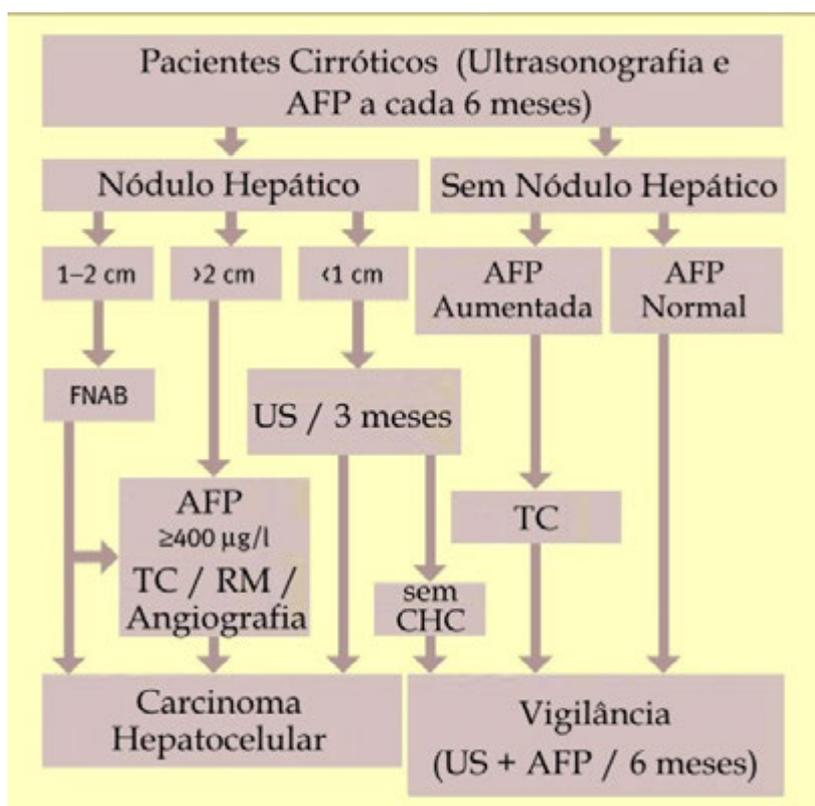


Figura 10 – Vigilância e estratégia recomendadas para o carcinoma hepatocelular. TC, tomografia computadorizada; RM, ressonância magnética; FNAB, biópsia aspirativa por sonda fina US, ultrasonografia, AFP,  $\alpha$ -etoproteína (BRUIX et. al., 2001; LLOVET et. al., 2003, AHMED, LOBO, 2006).

Alfa-fetoproteína é produzida por hepatócitos fetais e células do saco vitelínico e está presente em 80% dos CHC. Os níveis de alfa-fetoproteína no soro são utilizados para detecção de estágios iniciais de CHC. A taxa normal é de 10-20 ng/mL e valores superiores a 400 ng/mL podem indicar CHC. Anticorpos também são utilizados como marcadores para CHC e diferenciá-lo de outras neoplasias, como Hep Par1 (Hepatócito Parafin 1) ou HSA (Antígeno Hepatócito Específico). Anticorpos monoclonais ao antígeno carcinoembrionário (mCEA) é positivo para a maioria das neoplasias, mas negativo para CHC, e anticorpos policlonais (pCEA) conferem resultado positivo para CHC e outros tipos de carcinomas, mas apresenta um padrão de diagnóstico específico e distintivo para o hepatocarcinoma (SATIR, PATH, 2007).

No caso da detecção de nódulos menores que 1 cm, um protocolo razoável seria repetir a ultrasonografia a cada 3 meses; quando o nódulo torna-se maior que 1 cm, a lesão pode ser um CHC, e a confirmação do diagnóstico e o estágio da lesão devem ser realizados. Para nódulos menores que 2 cm, é recomendada a biópsia do nódulo para investigação da malignidade, e a patologia pode se confirmar pelas técnicas histológicas e citológicas; para nódulos maiores que 2 cm técnicas de imagem podem estabelecer o diagnóstico (BRUIX et. al., 2001; EL-SERAG et. al., 2008). A Figura 11 apresenta uma tomografia computadorizada mostrando um CHC sólido.

De um fígado cirrótico, podem surgir pequenos nódulos, mas macronódulos também são comuns. Quando menores que 5 mm, frequentemente são benignos ou associados com baixo grau de displasia, mas podem proliferar-se em lesões ou focos pré-neoplásicos. Em casos de elevado grau de nódulos displásicos (> 5 mm), o risco de transformação maligna excede 33%. É comum o aparecimento de carcinomas formando uma lesão unifocal circunscrita por uma cápsula fibrosa (Figura 12A), ou lesões multifocais (Figura 12B) resultantes de metástases intra-hepáticas (RAOUL, 2008).

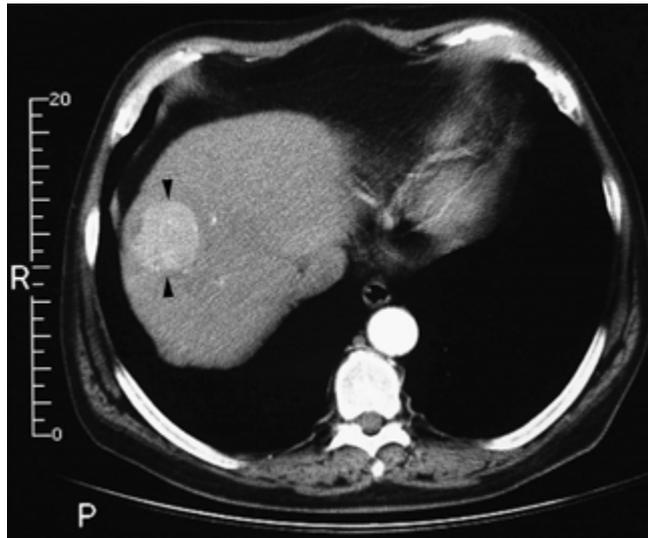


Figura 11 – Tomografia computadorizada mostrando uma massa aumentada bem definida (setas), consistente com um carcinoma hepatocelular, no lobo direito do fígado (AHMED, LOBO, 2006).

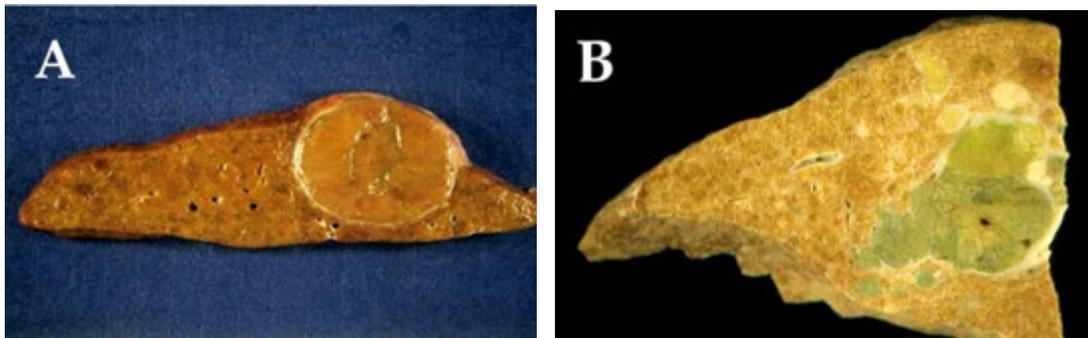


Figura 12 – Carcinoma hepatocelular. Imagem macroscópica de um carcinoma encapsulado (A) e associado com múltiplos nódulos metastásicos (B) após a ruptura da cápsula fibrosa (RAOUL, 2008).

Quando os pacientes com CHC apresentam sintomas clínicos, o tumor está tipicamente muito avançado e o doente tem muito poucas opções terapêuticas. Assim, a descoberta nos estágios mais precoce desta patologia é muito importante para um tratamento mais efetivo.

## 2.4.5. Tratamento do Carcinoma Hepatocelular

Os tratamentos para CHC dependem da extensão da doença dentro e fora do fígado, das condições gerais do órgão e o estado de saúde do paciente, e são convencionalmente divididos em curativos e paliativos (Tabela 5). Tratamentos curativos podem ser cirúrgicos, como a ressecção (hepatotectomia) e o transplante de fígado, ou percutâneos, como radiofrequência e injeções etanólicas; os tratamentos paliativos mais efetivos são demonstrados somente por quimioembolização (EL-SERAG et. al., 2008; RAOUL, 2008). Infelizmente, a recorrência de tumores pós-operatório é comum, sendo a mortalidade após a cirurgia em pacientes com fígados cirróticos menor que 4% e a sobrevida em cinco anos de 30 a 50% (SONG et. al., 2004). Cerca de 20-30% dos pacientes podem ser curados atualmente com cirurgia e a maioria dos pacientes apresenta tumores não ressectáveis. A média de sobrevivência está em somente 5 a 8 meses (LAINO, 2008, INCA, 2009b).

Tabela 5 – Intervenções terapêuticas para o tratamento de tumores malignos do fígado (AHMED, LOBO, 2006; RAOUL, 2008)

<b>INTERVENÇÃO CIRÚRGICA</b>
Ressecção do Fígado
Transplante de Fígado
<b>INTERVENÇÃO PERCUTÂNEA OU MINIMAMENTE INVASIVA</b>
Injeções Etanólicas
Termo-ablação por Radiofrequência
Termo-ablação por Frio - Crioablação
Termo-ablação por Calor - Micro-ondas ou Laser
<b>INTERVENÇÕES TRANSARTERIAIS</b>
Embolização
Quimioperfusão
Quimioembolização
<b>DROGAS</b>
Geneterapia
Imunoterapia

Carcinoma hepatocelular é uma malignidade altamente vascular, associada com inúmeros fatores angiogênicos como Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), receptores VEGF e  $\beta$ -Receptor de Fatores de Crescimento Derivados de Plaquetas (PDGF). Drogas quimioterápicas como sorafeniba e sunitiniba tem claros efeitos antiangiogênicos e são muito utilizadas atualmente no tratamento dos pacientes (LAINO, 2008).

De acordo com os registros de transplantes no Brasil (RBT, 2008), o fígado ocupa a segunda posição nos procedimentos realizados entre os períodos de 1998 a 2008 (Figura 13), e a terceira posição no sistema de Lista Única de espera de órgãos para transplantes, com aumento de 5% do número de transplantes em 2008.

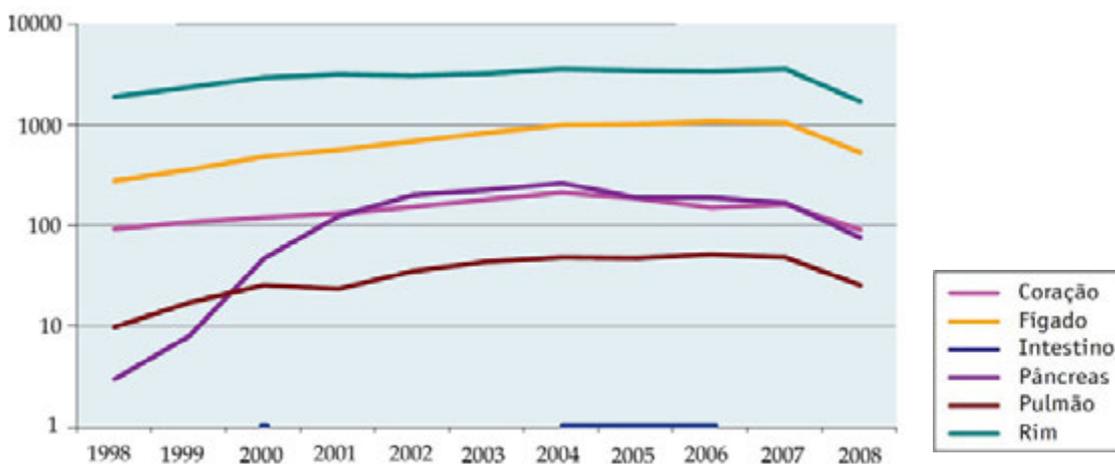


Figura 13 – Evolução anual dos transplantes de órgãos no Brasil, em número absoluto, de acordo com o Registro Brasileiro de Transplante (RBT, 2008).

Segundo a Associação Brasileira de Transplante de Órgão (ABTO, 2007), o carcinoma hepatocelular ocupa a segunda causa em indicação dos transplantes de fígado no Brasil (8%), depois da insuficiência hepática cirrótica causada por infecção com o vírus da hepatite C (69%), como pode ser observado na Figura 14.

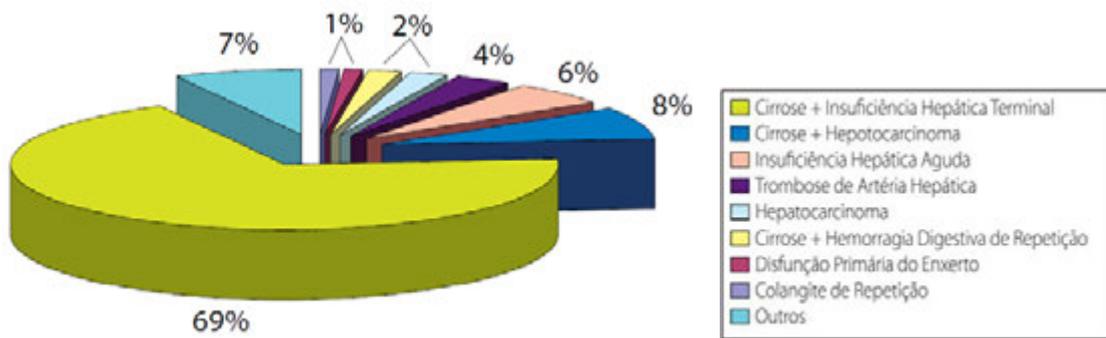


Figura 14 – Causas mais comuns das indicações de transplantes de fígado no Brasil, de acordo com a Associação Brasileira de Transplante de Órgão (ABTO, 2007).

Existe grande preocupação relacionada à sobrevida dos doentes transplantados, pela gravidade da neoplasia, pelos riscos de disseminação local e à distância, agravados pela imunossupressão no período pós-transplante. Transplantes em pacientes com um nódulo solitário de 5 cm de diâmetro, ou não mais que 3 nódulos (< 3 cm de diâmetro), sem invasão na maioria dos vasos sanguíneos ou linfáticos, podem elevar para 85% a sobrevida em 4 anos (MAZZAFERRO et. al., 1996; EL-SERAG et. al., 2008). A sobrevida média dos doentes estaria mais ligada à gravidade da cirrose e de suas complicações, particularmente a insuficiência hepática (68%) e os sangramentos (25%), do que ao tumor propriamente dito (CONTE, 2000). Atualmente, o critério mais aceito para indicação do transplante é restrito a pacientes com doença precoce: nódulo único até 5 cm de diâmetro ou até três nódulos com até 3 cm cada um. Alguns pacientes podem apresentar estabilização da doença após terapia de quimioembolização ou quimioembolização associada à alcoolização, ou mesmo remissão completa da doença evidenciada no exame anátomo-patológico do explante (FREITAS et. al., 2007).

FREITAS et. al. (2007) realizaram revisão de prontuários de pacientes acometidos e não-acometidos pelo CHC, submetidos a transplante hepático cadavérico no período de 2001 a 2006. Pacientes cirróticos acometidos de CHC apresentaram maior sobrevida entre 3 meses e 1 ano (100 e 72,8%, respectivamente) em relação aos não-acometidos (100 e 69,4%,

respectivamente). Isso está associado à realização do transplante em estágio de evolução mais precoce da cirrose.

Procedimentos transarteriais contam com a hipervascularização dos tumores e incluem quimioembolização, embolização e injeção de lipiodol radioativo. A quimioembolização envolve injeção de uma droga citotóxica (usualmente CDDP, mitomicina ou doxorubicina), misturada ao lipiodol, e seguida por embolização pode induzir a necrose do tumor (Figuras 15 e 16). Não há um consenso na escolha do melhor agente quimioterapêutico ou frequência do tratamento, mas a seleção do paciente é o ponto chave. Os pacientes candidatos para quimioembolização são aqueles com as funções hepáticas ainda preservadas, com tumores multi-nodulares assintomáticos envolvendo menos que 50% do órgão e ausência de invasão vascular (AHMED, LOBO, 2006; RAOUL, 2008).



Figura 15 – Tomografia computadorizada de um paciente com carcinoma hepatocelular após injeção intrarterial de lipiodol I<sup>131</sup>, mostrando a concentração do lipiodol (setas) no interior do tumor (RAOUL, 2008).

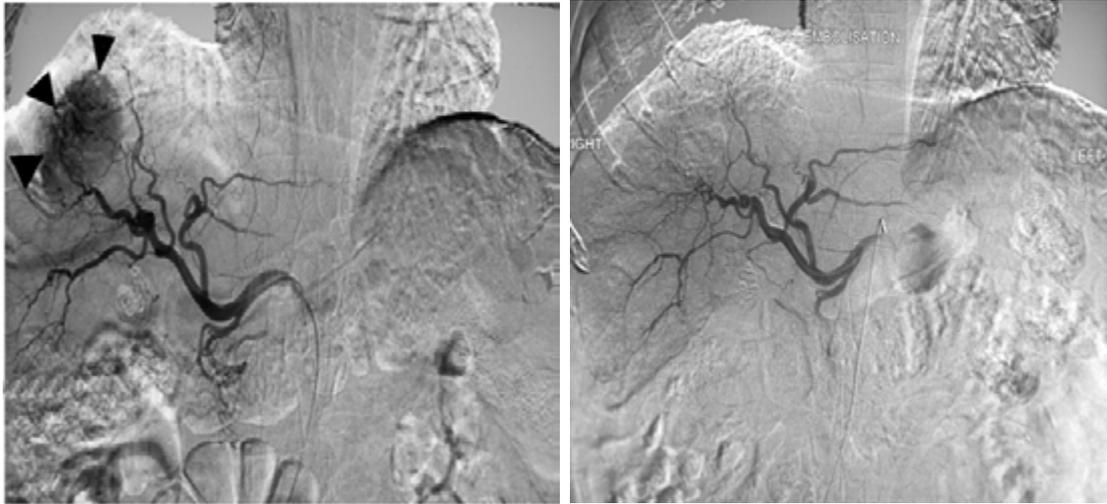


Figura 16 – À esquerda, arteriograma hepático seletivo mostrando um adensamento vascular (setas) no carcinoma hepatocelular; à direita, arteriograma após a quimioembolização: o adensamento vascular tumoral foi eliminado em um procedimento bem sucedido (AHMED, LOBO, 2006).

Injeção etanólica percutânea é uma técnica simples, de baixo custo e de boa tolerabilidade, alcançando respostas superiores a 90% em tumores hepatocarcinogênicos menores que 2 cm, 60-70% em tumores com 3 cm e menos que 60% se o diâmetro for superior a 5 cm (LIVRAGHI et. al., 1995). O tratamento percutâneo, quando comparado ao de radiofrequência, apresentou menor controle local do tumor (LENCIONI et. al., 2003). LIN et. al. (2004) realizaram um estudo comparativo entre o tratamento por injeção percutânea, injeção percutânea com altas doses de etanol e radiofrequência em tumores com 1 a 4 cm de diâmetro, em 157 pacientes. A radiofrequência foi o melhor tratamento em termos de necrose completa do tumor, taxa de recorrência, sobrevivência livre do tumor e sobrevida do paciente. Infelizmente, o equipamento é caro, mas a necrose tumoral é obtida em menor tempo que através de injeções etanólicas percutâneas.

A Figura 17 apresenta a taxa de sobrevivência de pacientes acometidos com CHC não tratados de acordo com o estágio do tumor hepático (LLOVET et. al., 2003).

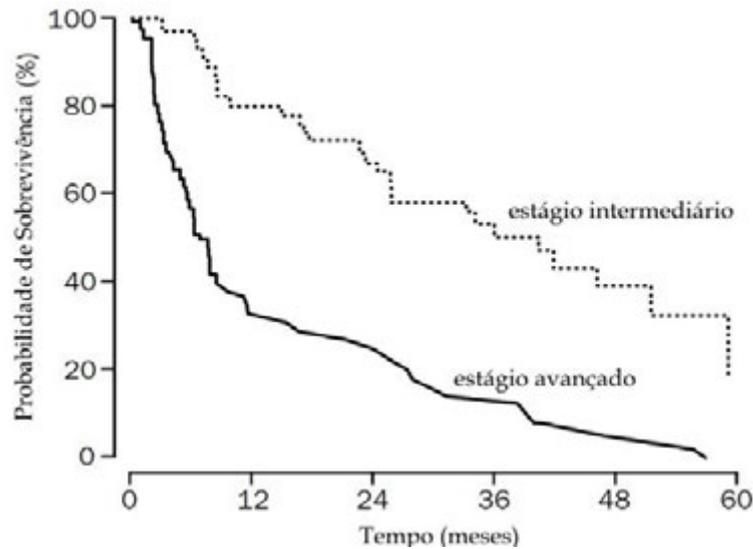


Figura 17 – Probabilidade de sobrevivência de pacientes acometidos com CHC não tratados de acordo com o estágio do tumor. Estágio intermediário: tumores multinodulares assintomáticos, com média de sobrevivência de 40 meses. Estágio avançado: estágio sintomático, invasão vascular e expansão extra-hepática; média de sobrevivência de 4-5 meses (LLOVET et. al., 2003).

## 2.5. Bases moleculares do câncer

As publicações científicas sobre a base molecular do câncer ultrapassaram até mesmo o ritmo de crescimento dos tumores mais malignos! Em mais de duas décadas de pesquisas, um “censo” genético identificou cerca de 400 genes, todos codificam proteínas tumorais, implicados na patogênese do câncer quando mutados, o que representa quase 2% dos estimados 25.000 genes codificantes do genoma humano. O censo apresenta as classes de genes com as mutações oncogênicas e suas oncoproteínas codificadas (FUTREAL et. al., 2004; SANTARIUS et. al.; 2010).

Mutações nos genes que controlam a proliferação celular ou apoptose são responsáveis pelo câncer. Genes que são ativados por mutações são chamados *oncogenes* e os inativados são ditos *supressores tumorais*. Oncogenes codificam oncoproteínas, ambas alterações de suas versões normais, envolvidos em vias de sinalização que controlam a proliferação

celular, enquanto que a maioria dos genes supressores codificam para proteínas que atuam em pontos críticos da proliferação ou morte celular (BERTRAM, 2001).

A nível molecular, a progressão tumoral resulta do acúmulo de lesões genéticas que, em alguns casos, são favorecidas por defeitos no reparo do DNA. O princípio genético do câncer implica que a massa tumoral resulta da expansão clonal de uma única célula que sofreu lesão genética (ou mutação). Essas alterações genéticas ocorrem principalmente em algumas classes de genes envolvidos no processo de carcinogênese: os proto-oncogenes promotores do crescimento, os genes supressores dos inibidores do crescimento do câncer (antioncogenes) e genes reguladores da morte celular ou apoptose (COTRAN et. al., 2000). São comuns no genoma mutações envolvendo um único gene e alguns poucos quilobases ou vários genes e inúmeros megabases do DNA, resultando em regiões amplificadas do cromossomo provocando a superexpressão de determinados segmentos que levam à tumorigênese (FUTREAL et. al., 2004).

As células têm mecanismos bioquímicos elaborados para prevenir a entrada prematura no ciclo celular, assegurando todo o suporte nutricional para a síntese de novas cadeias de DNA e proteínas essenciais ao metabolismo. Para reduzir a probabilidade de mutações, o genoma deve estar livre de alterações para que se dê início ao processo de replicação do DNA e um ponto crítico no ciclo celular é a subfase G1, cerca de 4 horas antes da entrada em S, tempo necessário para o processo de reparo celular. As proteínas que controlam o ciclo celular em diferentes pontos são chamadas ciclinas, que se constituem em subunidades regulatórias de complexos de proteínas quinases; as subunidades quinases destes complexos são chamadas quinases ciclino-dependentes (CDKs) (BERTRAM, 2001; AMBLER, 2006).

Vias bioquímicas celulares, como a via da proteína retinoblastoma (Rb) e outras acessórias (p130, p107) controlam a expressão de genes importantes na fase S mediada por fatores transcricionais reguladores coletivamente chamados E2F. A progressão ordenada das células através das diversas fases do ciclo celular é orquestrada por CDKs reguladas sequencialmente por ciclinas A, D (1, 2, 3) e E. A atividade das CDKs requer

formação de complexo com as ciclinas, dependendo de fosforilação, mediado por proteínas CDK inibitórias (INKs). Mutações nos genes para essas proteínas desregulam a proliferação celular (BERTRAM, 2001).

Interações entre Rb e E2F exercem função central no ponto de checagem em G1 (Figura 18); em sua forma desfosforilada, Rb liga-se firmemente a E2F que forma um complexo silenciador da transcrição de genes requeridos para entrada no ciclo celular. Em resposta a um estímulo mitótico, ciclinas tipo D e enzimas associadas (CDK4 e CDK6) são sintetizadas; inicialmente, a atividade destas quinases é inibida por proteínas específicas (INK4) e a liberação destes fatores inibitórios resulta na fosforilação de Rb e, conseqüentemente, na ativação dos fatores E2F, dando início ao processo de transcrição dos genes essenciais para a síntese de DNA e de genes da ciclina-E e CDK2, cuja ação é manter o estado de fosforilação de Rb e a progressão do ciclo celular. Assim, Rb fosforilada constitui-se no ponto controle da via restrição. Em resposta a um dano, o gene supressor tumoral p53 atua como um fator de transcrição e induz a expressão de uma série de inibidores CDK, p21, p27 e p57 cuja função é manter o estado desfosfosforilado de Rb mesmo sob estímulo mitogênico. Esse controle se desfaz quando a célula corrige efetivamente o dano no DNA (ZHANG et. al., 1993; NISHIDA et. al., 1994; COTRAN et. al., 2000; BERTRAM, 2001; AMBLER, 2006).

Um importante ponto de checagem do ciclo celular é a entrada na fase S e a principal proteína que atua neste ponto é p53, cuja concentração no núcleo é controlada principalmente por sua ligação à proteína MDM2, controlando também sua transcrição. A formação do complexo p53-MDM2, que facilita a degradação e redução na concentração de p53, é regulada por vários sítios de fosforilação em p53: neste caso, a fosforilação decresce a afinidade. Uma forma de ação de p53 em parar o ciclo celular é por aumentar a transcrição de p21, proteína que se liga ao complexo ciclina E/CDK2, impedindo a fosforilação da proteína Rb inibindo, assim, a transcrição de genes E2F-1 responsáveis pela replicação do DNA. Proteínas inibitórias INK4 de CDK4 e CDK6 mantêm o ciclo em G1; p21, p27 e p57 inibem CDKs 2, 4 e 6 e podem assim parar o ciclo em G1, S ou G2. (AMBLER, 2006).

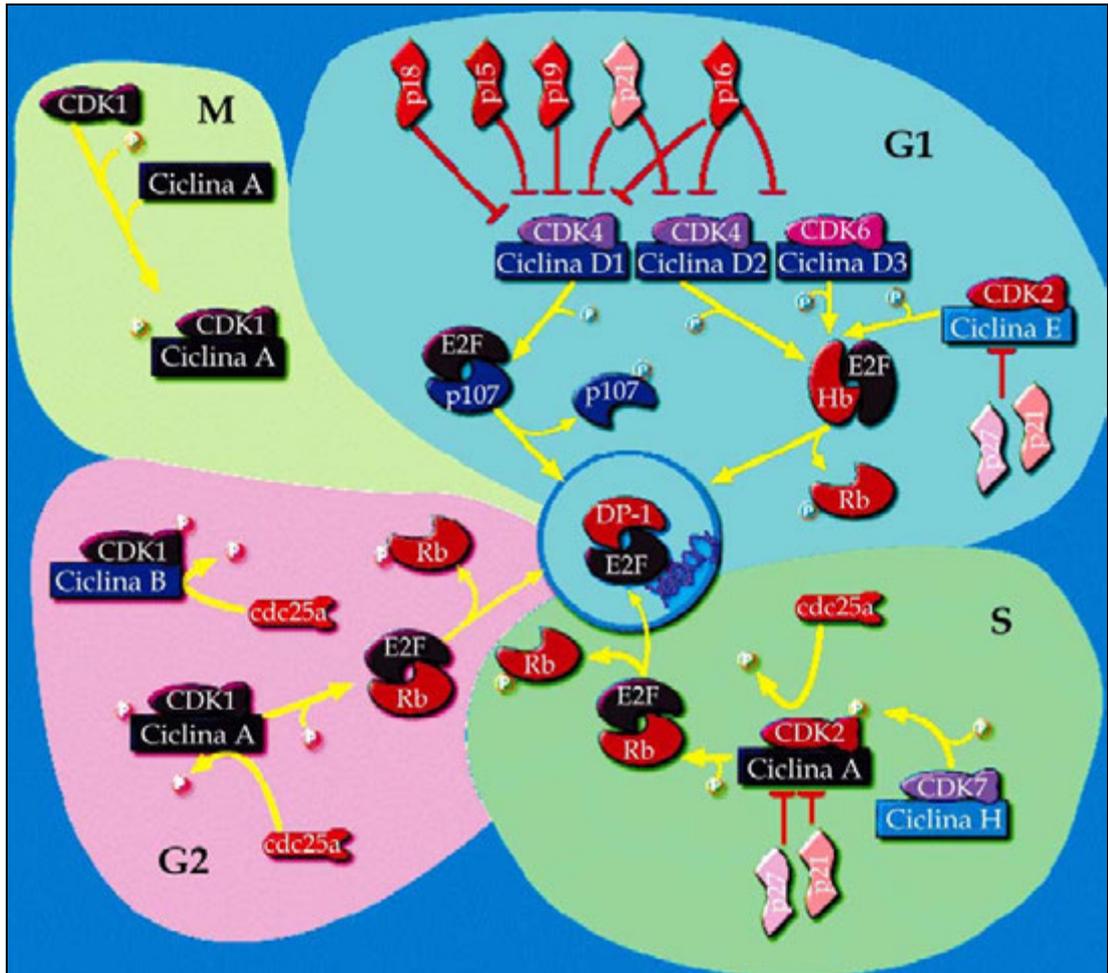


Figura 18 – Pontos regulatórios no ciclo celular em mamíferos em G1, S e G2. Múltiplos mecanismos previnem a passagem inapropriada da fase G1 para S, onde ocorre a síntese de DNA. Um ponto central é a fosforilação de membros da família RB, como o P107 pelas enzimas quinase ciclino-dependentes (CDKs). A fosforilação libera e ativa o fator de transcrição E2F que controla transcrição de um número de genes requeridos para entrada da célula na fase S e ciclinas adicionais que mantêm o estado fosforilado de RB, permitindo a continuidade do processo na fase S. Estão mostrados também outros pontos de checagem que podem ser ativados em G2 ou M do ciclo celular em resposta a danos no DNA (BERTRAM, 2001).

A hepatocarcinogênese envolve múltiplos oncogenes, fatores de crescimento e supressores tumorais. Estudos alelopáticos apontam a perda da heterozigidade para vários loci localizados nos cromossomos 1p, 4q, 6q, 7p, 8p, 9p, 10q, 13q, 16pq e 17p, que estão frequentemente envolvidos no câncer hepático. Entre os genes conhecidos, vários controlam vias

bioquímicas envolvidas na transformação maligna das células hepáticas como, por exemplo, o locus de p53 a 17p13, Rb a 13q14, perda de heterozigidade no cromossomo 1p e 16q, ampliações nos cromossomos 1q, 8q, 6p e 17q, amplificação e superexpressão de ciclina D1 em 11q13, o oncogene c-myc presente a 8q22-24 nos cromossomos 1q, 6p e 17q. Outras vias, como  $\beta$ -catenina, gankirina e ciclina D, também estão envolvidas no desenvolvimento do CHC (LÉVY et. al., 2002).

Ciclina D1 é um oncogene regulador-chave na progressão do ciclo celular cuja amplificação e superexpressão têm sido associadas a formas agressivas do CHC, sendo um alvo importante para estratégias preventivas e terapêuticas (ZHANG et. al., 1993; DEANE et. al., 2001).

Mutações amplificadoras da região cromossômica 11q13 são encontradas em células hepatocarcinogênicas HepG2 e provocam a superexpressão da proteína ciclina D1 observada em tumores hepáticos (SHERR, 1996; BERTRAM, 2001). MASAKI et. al. (2000) verificaram que o nível de proteínas e atividade quinase de ciclina A, D1, E e CDK4 aumentaram proporcionalmente durante o desenvolvimento do CHC, especialmente no estágio de transição de um fígado sadio à hepatite crônica e na transição de uma hepatite crônica ao carcinoma hepático. A atividade de CDK2 quinase aumentou apenas durante a hepatite crônica, mas não nos estágios do carcinoma; CDK6 e CDK7 permaneceram inalteradas durante o processo.

As vias de ativação oncogênica ocorrem geralmente em estágios tardios da hepatocarcinogênese como uma consequência da instabilidade cromossômica induzida pela redução dos telômeros e disfunção dos pontos de restrição das vias Rb e p53. As Figuras 19 e 20 apresentam as vias mais comuns ativadas durante o desenvolvimento do CHC, e os principais pontos, incluindo p53, Rb, p27 e fator de crescimento IGF2R afetados em carcinomas hepatocelulares, e vias embrionárias de desenvolvimento, incluindo Akt, myc,  $\beta$ -catenina *hedgehog* e met (EL-SERAG e RUDOLPH, 2007).

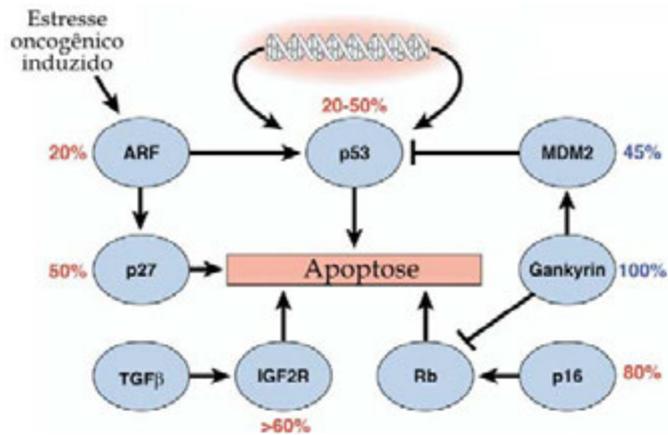


Figura 19 – Alterações mais frequentes nos pontos de restrição do ciclo celular e apoptose associados ao carcinoma hepatocelular. Quatro dos mais comuns pontos da via são afetados em 60-100% dos casos de CHC incluindo as vias p53, Rb, p27 e transformação do fator de crescimento  $\beta$ IGF2R. Os números em vermelho indicam inativação e em azul, ativação (EL-SERAG e RUDOLPH, 2007).

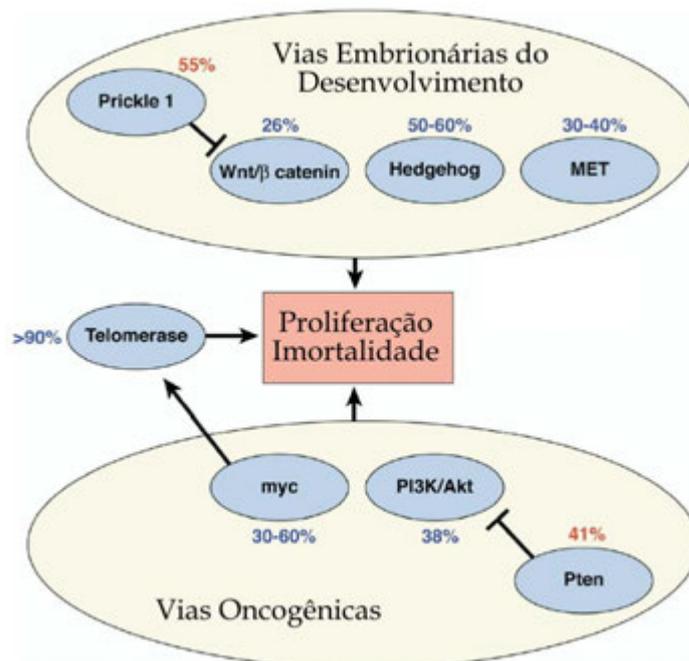


Figura 20 – Alterações nas vias de desenvolvimento embrionário associadas com a hepatocarcinogênese. As vias mais comuns são ativadas em 20-60% dos carcinomas hepatocelulares incluindo as vias Akt, myc,  $\beta$ -catenina, *hedgehog* e met. Apesar de não ser por si só um oncogene, a ativação da telomerase é muito comum e um passo essencial para a imortalização das células tumorais. Os números em vermelho indicam inativação e em azul, ativação (EL-SERAG e RUDOLPH, 2007).

O gene p53, provavelmente o alvo molecular mais comum envolvido em vários cânceres humanos, é ativado em resposta a um dano no DNA, induzindo a célula a cessar o ciclo ou à apoptose. A perda funcional de p53 ocorre principalmente por mutações ou deleções alélicas no cromossomo 17p13, onde está localizado, podendo ser causadas pela infecção do vírus da hepatite B. Em humanos, alterações em p53 ocorrem em até 60% dos tumores de CHC (NAGAI et. al., 1997). Mutações em p53 ocorrem em mais de 50% dos casos de hepatocarcinomas induzidos pela aflatoxina e em até 40% de CHC não induzidos pela aflatoxinas (BRESSAC et. al., 1991).

FARAZI et. al. (2006) relacionaram as disfunções na via p53 e a instabilidade cromossômica por encurtamento dos telômeros (que ocorre na fase crônica da doença hepática), exercendo papel crítico e cooperativo na progressão do CHC. Os autores relatam em seus estudos com ratos que o maior papel da alteração na via p53 na patogênese do CHC é ser capaz de manter a sobrevivência dos hepatócitos com disfunções nos seus telômeros cromossômicos, uma vantagem celular seletiva.

Os efeitos patológicos do excesso na ingestão de álcool, dos vírus da hepatite B e C sobre o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular provocam alterações nos genes envolvidos na via Rb1 (p16<sup>ink4a</sup>, p15<sup>ink4b</sup>, Rb1, CDK4 e ciclina D1), via p53 (p53, p<sup>14ARF</sup> e MDM2) e via Wnt ( $\beta$ -catenina, APC). Em 100% dos casos de hepatocarcinomas avaliados por EDAMOTO et. al. (2003), as alterações mais comuns foram a perda na expressão Rb1, principalmente metilação no promotor p16<sup>ink4a</sup>, e superexpressão de ciclina D1; em 48% dos pacientes, a alteração na via p53 consistiu principalmente devido à mutações em p53 ou metilação no promotor p<sup>14ARF</sup> e em 31% dos casos foram encontradas mutações de  $\beta$ -catenina.

$\beta$ -catenina é uma proteína multifuncional envolvida na via de sinalização Wntless/Wnt durante o desenvolvimento embrionário e adesão célula-célula. No núcleo, associa-se a fatores de transcrição ativando genes alvo, incluindo c-myc e ciclina D1. Mutações no gene  $\beta$ -catenina com ativação da via Wntless/Wnt foram encontradas em até 41% dos casos de CHC, com uma taxa de proliferação celular elevada e com uma prognose bem severa; em tecidos hepáticos não-tumorais, com lesões displásicas e

nódulos cirróticos, os níveis nucleares de  $\beta$ -catenina são mínimos (TERRIS et. al., 1999; LÉVY et. al., 2002).

O fator de transcrição c-myc, somente expresso na fase S do ciclo celular e altamente regulado em células normais, é afetado em muitos tumores e sua expressão alterada resulta em proliferação celular irregular. A detecção no gene c-myc no amplicon 8q24 e ciclina D1 pode ser útil no diagnóstico diferencial de CHC (TAKAHASHI et. al., 2007). A redução da expressão de c-myc através de oligonucleotídeos antissense inibiu o crescimento *in vitro* de células hepatocarcinogênicas HepG2 (SIMILE et. al., 2004). Superexpressão do gene c-myc favoreceu o desenvolvimento de CHC em camundongos e sua supressão promoveu a dormência dos tumores com queda significativa nos níveis do marcador hepático alfa-fetoproteína nos animais testados (SHACHAF et. al., 2004). A redução nos níveis de c-myc pela inibição na expressão de  $\beta$ -cateninas e ciclinas-D1 utilizando RNA de interferência também afetaram a proliferação de células hepática HepG2 (SANGKHATHAT et. al., 2006). A utilização de um inibidor de c-myc reduziu a viabilidade de células HepG2, com alterações morfológicas e redução expressiva dos níveis de c-myc, bloqueando as células nas fases G0-G1 do ciclo celular e induzindo à apoptose, além de aumentar a quimiossensibilidade das células HepG2 aos tratamentos com drogas antitumorais como doxorubicina, 5-fluorouracil e cisplatina em baixas doses (LIN et. al., 2007).

Amplificação em c-myc e alteração em p53 podem ser eventos co-participativos no progresso de CHC. Amplificação de c-myc foi mais comum em pacientes jovens e em tumores maiores e menos diferenciados e mostrou correlação positiva com atividade proliferativa e superexpressão de p53 (KAWATE et. al., 1999). Em tecidos hepáticos cirróticos, ao contrário de p53, o elevado percentual das proteínas p21<sup>ras</sup> (73%) e c-myc (53%) pode ser resultado do maior índice mitótico encontrado nos hepatócitos em regeneração e sua manutenção e interação entre as mesmas parecem ser essencial no desenvolvimento inicial de CHC; p53 (33%), por outro lado, participaria principalmente nos estágios tardios da hepatocarcinogênese (PANNAIN et. al., 2004).

Deleções alélicas no gene Rb do cromossomo 13q14 têm sido relacionado ao CHC em 48% dos casos e a sua inativação pode ocorrer por mutações, perda da responsividade ao fator de crescimento TGF- $\beta$ , inativação pela via da Gankirina, p16<sup>ink4A</sup>, p15<sup>ink4B</sup> ou CDK4. O silenciamento por metilação do promotor p16 é o mecanismo de inativação mais comum. A proteína Rb exerce papel fundamental no controle do ciclo celular e sua disfunção reflete na insensibilidade da célula aos sinais antiproliferativos que induzem a parada do crescimento na fase G1 (NAGAI et. al., 1997).

Gankirina é uma oncoproteína antiapoptótica que aumenta a degradação de Rb e p53 e é superexpressa em CHC. Apresenta ação antiapoptótica ao facilitar a formação do complexo p53-Mdm2 e favorecer a ubiquitinação e destruição de p53. Tem ação inibidora da maioria dos supressores tumorais. Rb/p16 é outro ponto da via celular interrompido em 80% dos CHC, com repressão de p16 por metilação do promotor sendo a mais frequente alteração (NAGAI et. al., 1997).

Deleção alélica no cromossomo 6q26-27 tem relacionado o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-2R) e o receptor da manose-6-P/IGFII (M6P) aos casos de CHC. Esse gene é um supressor tumoral por sua habilidade de ativar a sinalização do TGF- $\beta$  e promover a degradação de IGF-II, um potente fator de crescimento de células hepáticas. A perda da heterozigose neste locus, muito frequente nos estágios iniciais da hepatocarcinogênese, ocorre em mais de 60% dos casos de CHC. A perda de IGF-2R prejudica as vias antiproliferativa e pró-apoptótica, fatos que poderiam ser uma vantagem nos estágios da cirrose induzida pela transformação e superexpressão do fator de crescimento  $\beta$  (LÉVY et. al., 2002; HIGASHITSUJI et. al., 2005; EL-SERAG e RUDOLPH, 2007).

A atividade do complexo CSK1/SKP2 pela perda funcional da enzima DUSP1 fosfatase-1 específica tem sido associada à hepatocarcinogênese (CALVISI et. al., 2008). NEWELL et. al. (2007) também relatam atividade das vias Ras/MAPK e mTOR na hepatocarcinogênese. A associação de um inibidor multi-quinase (Sorafeniba) e um inibidor m-TOR (Rapamicina) intensifica os efeitos apoptóticos em células hepatocarcinogênicas *in vitro*.

Em 78% dos carcinomas hepatocelulares, o oncogene amplificado, presente no *amplicon* 1q21 do genoma, foi isolado e identificado como ALC1 – *Amplified in Liver Câncer 1* – e exerce papel fundamental na hepatocarcinogênese. A superexpressão de ALC1 promove a síntese de DNA e a transição G1/S, e pode ter efeito inibitório da apoptose (MA et. al., 2008). Estudos moleculares revelam que a função oncogênica de ALC1 pode estar associada à proliferação celular por desregular a via p53-p21-Ciclina E-CDK2, o fator de transcrição p53, proteína envolvida na via de supressão tumoral em seres humanos (GREEN, CHIPUK, 2006). Atua também na regulação da expressão de p21, um inibidor CDK envolvido como mediador-chave na transição G1/S através da inibição de CDK2 e regulação da atividade da Ciclina E-CDK2, um complexo essencial para entrada na fase S. A redução na expressão de p21 facilita a ativação do complexo E-CDK2 com a fosforilação e liberação de E2F do complexo Rb-E2F resultando, assim, na transcrição de genes necessários para entrada na fase S. A superexpressão de ALC1 também reduz os níveis de Bax e caspase 3 nas células tumorais, proteínas citoplasmáticas pro-apoptóticas (MA et. al., 2008).

## **2.6. Plantas como fonte de agentes antitumorais**

A maior característica do câncer é a falta de controle da proliferação celular, diferenciação e morte das células, invadindo órgãos e tecidos. Há muitas dificuldades no tratamento, mas as principais são a resistência às drogas antitumorais, toxicidade e baixa especificidade do tratamento. Produtos naturais de origem vegetal ou seus derivados sintéticos são fontes importantes no desenvolvimento de drogas antitumorais (Figura 21), o que corresponde a mais de 60% dos medicamentos utilizados no tratamento do câncer, derivados, direta ou indiretamente, de fontes naturais, incluindo plantas, organismos marinhos e microrganismos (NEWMAN et al., 2003; CRAGG, NEWMAN, 2005; NEWMAN, CRAGG, 2007; CRAGG et al., 2009).

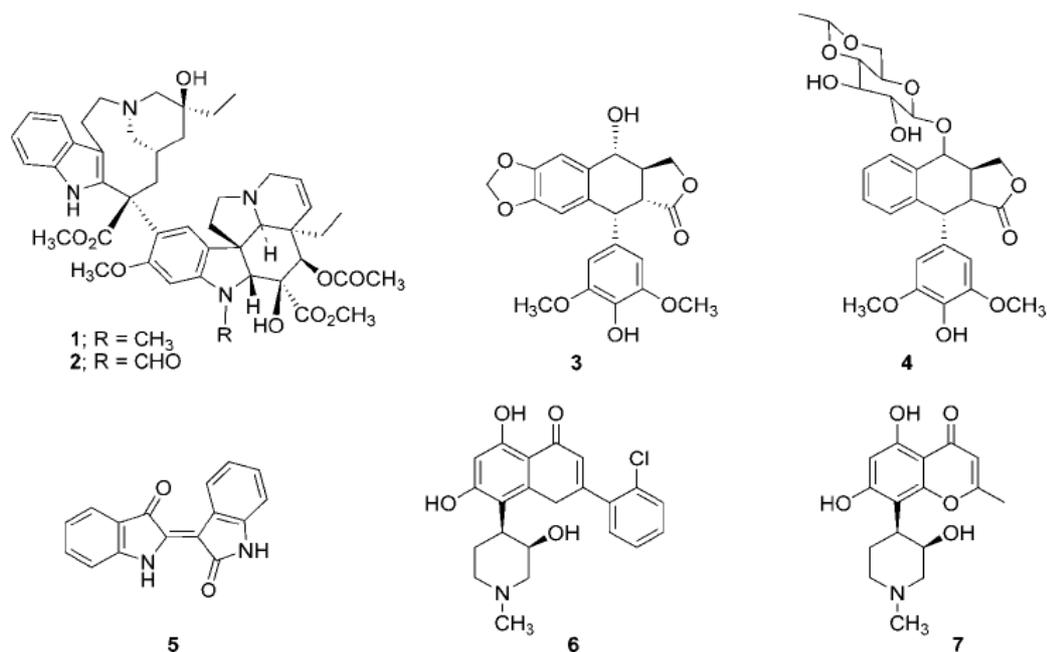


Figura 21 – Agentes antitumorais derivados de plantas utilizados pela medicina tradicional isoladas em várias partes do mundo. **1.** Vimblastina (Madagascar); **2.** Vincristina (Madagascar); **3.** Podofilotoxina (EUA); **4.** Etoposide (semi-sintético); **5.** Indirubins (China); **6.** Flavopiridol (China); **7.** Rohitukina (Índia) (CRAGG et al., 2009).

Os produtos naturais têm sido o alvo de investigação como fonte de drogas para o tratamento de muitas formas de câncer. Como novas tecnologias são desenvolvidas, muitas substâncias isoladas a partir de plantas frequentemente podem não ser eficientes drogas antitumorais, mas tornam-se protótipos para a produção sintética de novos compostos que efetivamente serão utilizados como quimioterápicos. Moléculas isoladas de plantas e outros organismos são importantes fontes para o desenvolvimento de agentes ligantes que transportem moléculas citotóxicas diretamente ao sítio tumoral específico reduzindo efeitos colaterais em tecidos saudáveis. Com as descobertas cada vez maiores de proteínas e substâncias reguladoras do ciclo celular, as investigações de fontes naturais em potencial para o desenvolvimento de novas drogas seletivas que agem sobre essas proteínas-chaves da proliferação celular são cada vez mais intensas (CLARDY, WALSH, 2004; CRAGG, NEWMAN, 2005; PISCO et al., 2006).

Entre os anos de 1981 e 2002, 5% dos mais de 1.000 novos produtos químicos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration - US*) foram compostos naturais e outros 23% foram moléculas derivadas de fontes naturais. Os produtos naturais são a maior fonte inovadora de agentes terapêuticos para doenças infecciosas, desordens lipídicas, câncer e imunomodulação (CLARDY, WALSH, 2004).

NEWMAN, CRAGG (2009) apresentaram as fontes de drogas farmacológicas desenvolvidas por todo o período de 1981 até meados de 2006 e listaram mais de 970 moléculas, naturais, semi-sintéticas ou sintéticas. Seus estudos confirmam a importância contínua e o valor da natureza, não somente como fonte de agentes com potencial quimioterapêutico, mas também fonte de modelos químicos que tornam-se base e inspiração para a semi-síntese ou síntese total de novas drogas efetivas antitumorais. A descoberta cada vez maior de novos agentes a partir das plantas para o tratamento do câncer pode ser atribuído, direta ou indiretamente, ao histórico da medicina tradicional. CRAGG e seus colaboradores (2009) ampliaram os estudos e o período de análise, agora de 1981 até outubro de 2008, e chegaram ao número de 1024 novas entidades químicas, um aumento de 50 novas moléculas em 2 anos (Figura 22). Destas, 67% são formalmente sintéticas sendo que, excluindo as drogas naturalmente derivadas ou inspiradas em modelos naturais, as formulações puramente sintéticas chegam a 37%.

Considerando as categorias de patologias para as drogas químicas registradas pela FDA, 68,3% incluem-se em anti-infecção (antivirais, antibacterianas, antifúngicas e antiparasíticas) e foram classificadas como naturalmente derivadas ou inspiradas em fontes naturais, enquanto que 79% das drogas assim classificadas são para o tratamento do câncer (CRAGG et al., 2009).

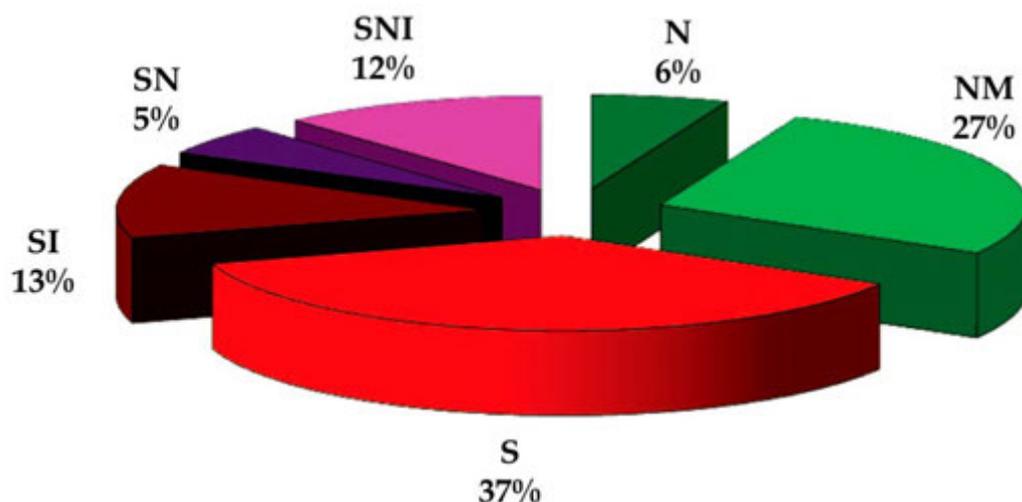


Figura 22 – Novos compostos químicos registrados pela FDA entre os anos de 1981 a outubro de 2008, num total de 1020 drogas químicas. N: produto natural sem modificação; NM: produto natural com modificação; S: produto totalmente sintético; SI: produto sintético inibidor da molécula-alvo de interesse, com inibição competitiva ao substrato do produto natural; SN: produto sintético com o farmacóforo do produto natural; SNI: produto sintético com o farmacóforo do produto natural apresentando inibição competitiva com o substrato do produto natural (CRAGG et al., 2009).

As primeiras substâncias químicas isoladas de plantas usadas para fins clínicos foram os alcaloides vimblastina e vincristina, obtidos de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), atualmente muito utilizados no tratamento do câncer. Mais recentemente, análogos semi-sintéticos destes agentes antitumorais são representadas pela vinorelbina e vindesina (Figura 23), primariamente usados em combinação com outras drogas quimioterápicas para o tratamento de uma variedade de cânceres incluindo leucemias, linfomas, sarcoma de Kaposi, cânceres de testículo, mama e pulmão (CRAGG, NEWMAN, 2005; CRAGG et al., 2009).

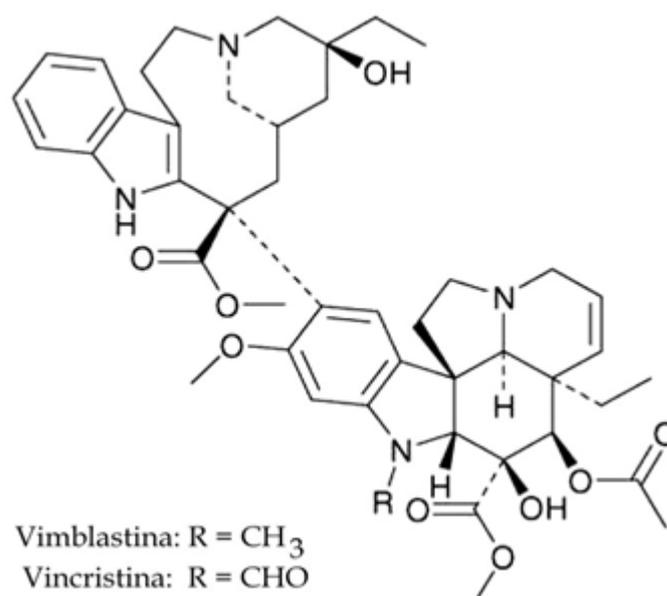


Figura 23 – Estrutura dos alcaloides *vinblastina* e *vincristina*, os primeiros agentes antitumorais derivados de plantas (CRAGG, NEWMAN, 2005).

MAZZIO e SOLIMAN (2009) investigaram as propriedades tumorílicas dose-dependentes de 374 extratos (10 µg/mL – 5 mg/mL) produzidos a partir de diferentes órgãos de plantas medicinais coletadas em várias partes do mundo. *Dioscorea villosa* (inhame selvagem ou cará) foi a planta que apresentou o mais forte efeito tumorílica (LC<sub>50</sub> = 0,019 mg/mL). De acordo com os efeitos antitumorais, os resultados permitiram ordenar as plantas na seguinte sequência: *Dioscorea villosa* (Dioscoreaceae) > *Sanguinaria canadensis* (Papaveraceae) > *Dipsacus asper* (Dipsacaceae) > *Populus balsamifera* (Salicaceae) > *Boswellia carteri* (Burseraceae) > *Cyamopsis psoralioides* (Fabaceae) > *Rhamnus cathartica* (Rhamnaceae) > *Larrea tridentate* (Zygophyllaceae) > *Dichroa febrifuga* (Hydrangeaceae) > *Batschia canescens* (Boraginaceae) > *Kochia scoparia* (Chenopodiaceae) > *Solanum xanthocarpum* (Solanaceae) > *Opoponax chironium* (Umbelliferae) > *Caulophyllum thalictroides* (Berberidaceae) > *Dryopteris crassirhizoma* (Dryopteridaceae) > *Garcinia cambogia* (Clusiaceae) > *Vitex agnus-castus* (Verbenaceae) > *Calamus draco* (Arecaceae).

O Brasil possui a maior diversidade vegetal do mundo e muitas pesquisas atuais estão sendo direcionadas neste sentido. MESQUITA et al. (2009) constataram o potencial efeito citotóxico contra linhagens de células tumorais do carcinoma do cólon humano (HCT-8), do melanoma (MDA-MB-435) e de cérebro (SF-295) em mais de 400 diferentes extratos preparados a partir das folhas, flores, frutos, sementes ou ramos de 50 plantas do Cerrado brasileiro.

Os metabólitos secundários das plantas são produzidos em quantidades muito pequenas e a biomassa pode ser limitante. O progresso tem acontecido na área da bioquímica e engenharia genética, desvendando as vias biossintéticas e a relação bioquímica de sua estrutura-atividade, permitindo a produção em larga escala da molécula natural em organismos nativos ou geneticamente modificados. Moléculas naturais isoladas podem servir de modelo para o desenvolvimento de análogos, gerados pela biossíntese combinatorial e/ou química combinatorial, otimizando suas propriedades biológicas (CRAGG et al., 2009).

## **2.7. Flavonoides**

Flavonoides e seus polímeros constituem uma grande classe de fitoquímicos muitos dos quais alteram os processos metabólicos com efeitos positivos na saúde humana. Constituem uma subclasse de polifenóis onde os anéis aromáticos contêm ao menos uma hidroxila. Dentro de cada subclasse dos flavonoides, compostos individuais são identificados em função de hidroxilações específicas e padrões de glicosilação. A maioria dos flavonoides está presente na natureza como glicosídeos e outros conjugados que contribuem para sua complexidade e o grande número de moléculas individuais que tem sido identificado, ultrapassando os 4.000 (BEECHER, 2003; WÄTJEN et. al., 2005; WOLFE, LIU, 2008; LEITE, 2009).

Os flavonoides apresentam grande variação estrutural, possuindo um esqueleto básico de 15 átomos de carbono, dispostos em  $C_6 - C_3 - C_6$ , na maioria das vezes em três anéis (A, B, C). Incluem os flavonóis, flavanóis, flavanonas, flavonas, isoflavonas e flavanonóis, categorizados de acordo com o nível de saturação da estrutura fenilbenzopirona comum a estes

compostos. A Figura 24 apresenta a estrutura geral dos flavonoides e na Figura 25 estão estruturas químicas da família dos flavonoides (HAVSTEEN, et. al., 2002; REN et. al., 2003; BEECHER, 2003; LEITE, 2009).

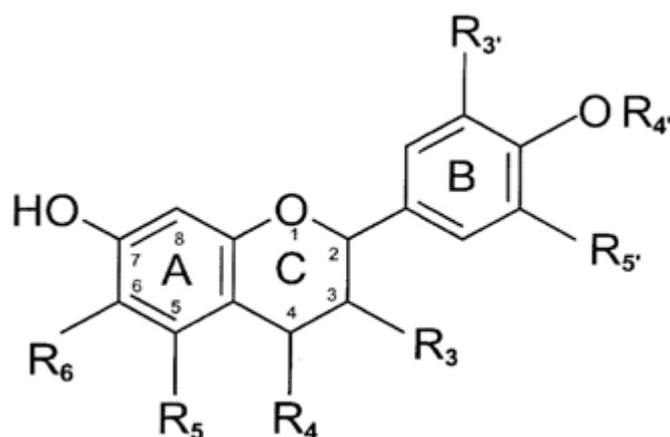


Figura 24 – Estrutura geral e padrão de numeração para os flavonoides mais comuns. Para a maioria dos flavonoides, R<sub>4</sub> = H, R<sub>5</sub> = OH e R<sub>6</sub> = H. Flavonoides individuais adicionais dentro de cada classe são caracterizados por grupos funcionais únicos de R<sub>3</sub>, R<sub>3'</sub> e R<sub>5'</sub> (BEECHER, 2003).

Os flavonoides constituem-se em produtos do metabolismo secundário sintetizados por todos os vegetais, exercendo as mais variadas funções nas plantas. Contribuem para resistência a doenças atuando como agente antimicrobiótico e antifúngico; atuam na interação planta-animal protegendo contra ataque de nematoides e herbivoria de insetos e mamíferos; nas flores, conferem coloração atrativa para agentes polinizadores e nas folhas, protegem os tecidos fotossintéticos atuando como filtros de raios ultravioletas UV-B (HARBORNE, WILLIAMS, 2000).

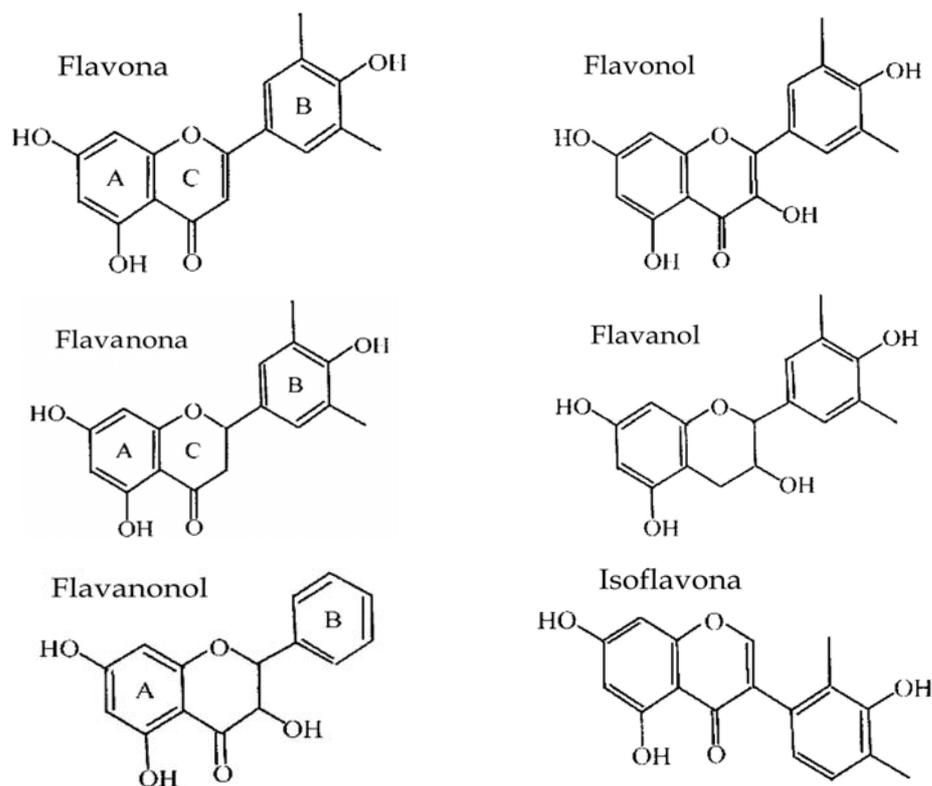


Figura 25 – Estruturas químicas da família dos flavonoides (REN et. al., 2003; LEITE, 2009).

Qualitativamente e quantitativamente, os flavonoides compõem um dos maiores grupos de produtos naturais conhecidos. Com base nas diferenças estruturais dos anéis e seu estado de oxidação/redução, nas posições dos grupos hidroxila e na substituição de grupos metil, carboidratos, isoprenoides etc. podem existir, teoricamente, mais de  $2 \times 10^6$  diferentes tipos de espécies de flavonoides, sendo que mais de 4.000 já foram identificados. A biossíntese destes compostos invariavelmente inicia-se com o aminoácido fenilalanina, tomando diferentes, mas relacionadas, rotas químicas em função do tipo do flavonoide, e envolve a combinação das vias metabólicas do chiquimato e acetato. Dependendo da sua constituição de glicosídeos, isoprenoides e ésteres alifáticos, os flavonoides podem apresentar diferentes polaridades e serem extraídos com diversos tipos de solventes em complexas misturas, como própolis, ceras, mel, xaropes e tecidos vegetais (HAVSTEEN, 2002; LEITE, 2009).

### 2.7.1. Flavonoides e câncer

Os flavonoides apresentam largo espectro de ação bioquímica e farmacológica e podem contribuir para a saúde humana. Uma grande variedade de compostos polifenóis presentes nos vegetais apresentam ação antitumoral e muitos podem afetar a progressão do câncer, o crescimento e a diferenciação celular como também apresentar efeitos antioxidantes e antiangiogênicos (BROWNSON et. al., 2002; HAVSTEEN, 2002; MARCHAND, 2002; FERGUSON et. al., 2004; SCHINDLER, MENTLEIN, 2006; RAMOS et. al., 2005; KIM et. al., 2006).

Muitos bioensaios com flavonoides encontrados em plantas, especialmente aquelas utilizadas na medicina tradicional, têm mostrado sua ação citotóxica e propriedades antitumorais em diferentes linhagens celulares. As pesquisas conduziram para o isolamento e identificação de um grande número de componentes ativos de diferentes classes de flavonoides como, por exemplo, catequinas, flavanas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, dihidro-chalconas, chalconas, biflavonoides e flavonóis são os mais abundantes na dieta, sendo a quercetina, canferol e miricetina os mais comuns (HARBORNE, WILLIAMS, 2000; MARCHAND, 2002; REN et. al., 2003). Flavonas e flavonóis possuem maior atividade antiproliferativa *in vitro* que chalconas e flavanonas (DASKIEWICZ et. al., 2005).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que dietas ricas em flavonoides através de frutas e verduras podem estar associadas à baixa incidência de câncer em humanos, comprovados por estudos *in vitro* e *in vivo*. Flavonoides podem inibir vários estágios do processo de carcinogênese (iniciação, promoção e progressão), incluindo antiproliferação, inativação carcinogênica, interrupção do ciclo celular, indução à apoptose, inibição da angiogênese, antioxidação e reversão da resistência às drogas químicas (HAVSTEEN, 2002; REN et. al., 2003; RAMOS et. al., 2005; HORINAKA et. al., 2006).

Inúmeros trabalhos conduzidos *in vitro* confirmam a atividade anticarcinogênica de diferentes grupos de flavonoides em várias linhagens de células tumorais incluindo leucemia (HL-60), adenocarcinoma do cólon (HT-29), carcinoma pulmonar (A-549, DMS114), carcinoma de mama

(MCF – 7 , MDA-MB-435), melanoma (SKMEL-5, MLM), próstata (DU145, LNCaP) e cérebro (U87) (CUSHMAN, NAGARATHANAM, 1991; HIRANO et. al., 1994; KUNTZ et. al., 1999; WANG et. al., 1999; FERGUSON et. al., 2004; DASKIEWICZ et. al., 2005; MURRAY et. al., 2006).

Estudos com modelos animais utilizando diferentes linhagens celulares sugerem a ação dos flavonoides contra o desenvolvimento de diversos tipos de câncer, incluindo câncer de intestino (AKAGI et. al., 1995), de mama (OHTA et. al., 2000) e de pulmão (KHANDUJA et. al., 1999). Outros estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram o efeito anticarcinogênico e antimetastático de flavonoides inibindo a proliferação de linhagens de células de vários tumores humanos: MDAMB-435 e MCF-7 (carcinomas de mama), HT-29 (cólon), DU145 e LNCaP (carcinomas de próstata), DMS114 (pulmão), SK-MEL-5 (melanoma) e U87 (glioma) (FERGUSON et. al., 2004).

Muitos tumores sólidos induzem a proliferação vascular pela produção de fatores angiogênicos, como o VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Foi verificada redução na liberação dos fatores da angiogênese de vários flavonoides em linhagens de células tumorais *in vitro*, na seguinte ordem de potencial inibitório antiangiogênico: naringina > rutina > lovastatina > apigenina > genisteína >  $\alpha$ -tocoferol  $\geq$  canferol; crisina e curcumina foram inativas exceto na concentração de 100 mmol/L (SCHINDLER, MENTLEIN, 2006). Em um estudo comparativo entre a estrutura química de diversos flavonóis e sua atividade biológica, verificou-se que o maior número de –OH no anel B potencializa suas propriedades antiangiogênica *in vitro*, na seguinte ordem de magnitude: miricetina > quercetina > canferol > galangina (KIM et. al., 2006).

Pacientes com carcinoma hepatocelular mantiveram por 150 dias níveis reduzidos dos marcadores tumorais alfa-fetoproteína e fosfatase alcalina durante o tratamento intravenoso com quercetina a 60 mg/m<sup>2</sup> (FERRY et. al., 1996). Animais que desenvolveram hepatocarcinoma apresentaram uma redução nos focos tumorais quando tratados com os flavonoides flavona, flavanona, tangeretina e quercetina, sendo que a flavona agiu como um anti-iniciador e antipromotor tumoral (SIESS et. al., 2000).

WÄTJEN et. al. (2005) relatam a ação hepatoprotetora dos flavonoides, em especial a quercetina; em concentrações de 10-25  $\mu\text{mol/L}$ , a quercetina protegeu linhagens de células hepáticas normais H4IIE contra citotoxicidade induzida por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , degradação do DNA e apoptose. Outros estudos com quercetina comprovam a ação apoptótica para células tumorais do carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e seu potencial efeito terapêutico e quimiopreventivo (GRANADO-SERRANO et. al., 2006; RAMOS et. al., 2005; WOLFE, LIU, 2008). Outros efeitos da quercetina incluem o bloqueio do ciclo celular por ativação da caspase-3 e caspase-9 e liberação do citocromo-C em linhagens de células do câncer hepático (RAMOS et. al. 2005) e fragmentação do DNA em outras linhagens de células do hepatocarcinoma humano (SHI et. al., 2003).

A interferência em pontos de checagem que controlam o ciclo celular de células tumorais em G1/S e G2/M tem sido feita por flavonoides como silimarina, genisteína, quercetina, daidzeína, luteolina, kampferol, apigenina, flavopiridol e epigallocatequina 3-galato (REN et. al., 2003).

BRUSSELMANS et. al. (2005) analisaram os efeitos citotóxicos de 18 compostos fenólicos de ocorrência natural sobre linhagens de células tumorais de próstata e mama. O efeito apoptótico provocado por alguns flavonoides testados foi fortemente associado com sua propriedade inibitória da enzima chave no processo lipogênico, a ácido graxo sintase, super-expressa em muitos tumores humanos. Epigallocatequina-3-galato, luteolina, quercetina, canferol, apigenina e taxifolina exibiram forte efeito antilipogênico celular, inibição do crescimento e indução à apoptose nas linhagens de células tumorais. Apigenina é um flavonoide que marcadamente induz a expressão de DR5 (*death receptor 5*) através de uma regulação p53-independente e atua sinergisticamente com o fator de necrose tumoral TRAIL (*related apoptosis-inducing ligand*) induzindo seletivamente a apoptose em células tumorais de próstata (DU-145), linfoblásticas leucêmicas e do câncer de cólon (DLD-1). Apigenina ativa também as caspases -8, -10, -9 e -3 (HORINAKA et. al., 2006).

Isoliquiritigenina (4,2',4'-trihidroxichalcona) é um flavonoide que exibe propriedade apoptótica em várias linhagens celulares tumorigênicas (IWASHITA et. al., 2000; MA et. al., 2001; HSU et. al., 2004; HSU et. al., 2005; JUNG et. al., 2006a; KIM et. al., 2008; YOSHIDA et. al., 2008). Células hepatocarcinogênicas HepG2 expostas a isoliquiritigenina apresentam interrupção do ciclo celular em G2/M e morte celular programada (20 µg/mL), com fragmentação do DNA (10 µg/mL) após 24 horas de cultivo, indicando a via p53 como um mecanismo-chave de indução à apoptose nestas células. Os tratamentos exibiram elevação na expressão de p53 (3 horas após expostas à isoliquiritigenina), elevação na atividade de p21/WAF1, de caspase-8, do receptor Fas/Apo-1, do ligante Fas, Bax e de Noxa, resultando na morte celular apoptótica; essas vias apresentaram decréscimo quando as células HepG2 foram suprimidas com inibidor da transcrição de p53 (HSU et. al., 2004).

Vários estudos apontam a propriedade supressora de vias de sinalização na progressão tumoral ErbB3, P13K/Akt e NF-κB (JUNG et. al., 2006b; KUMAR et. al., 2007b; KWON et. al., 2007) e vias ativadores apoptóticas de isoliquiritigenina (YOSHIDA et. al., 2008). A Figura 26 apresenta um mecanismo de ação de Isoliquiritigenina na via apoptótica em células tumorais. O aumento na expressão de receptores de membrana (DR5) pode ser um importante efeito quimiopreventivo de isoliquiritigenina (YOSHIDA et. al., 2008).

## **2.8. Própolis**

Nos últimos anos, a própolis de regiões tropicais, especialmente do Brasil, tem sido alvo de grande interesse econômico e científico, sendo que o Japão é um dos maiores importadores mundiais do produto brasileiro. Este fator economicamente importante levou muitos pesquisadores, principalmente japoneses, a investigar as propriedades farmacológicas da própolis brasileira. A avaliação das atividades biológicas dos constituintes químicos presentes na própolis e a elucidação de seus mecanismos funcionais constituem-se no grande interesse científico para o desenvolvimento de novas drogas (MARCUCCI, 2006).

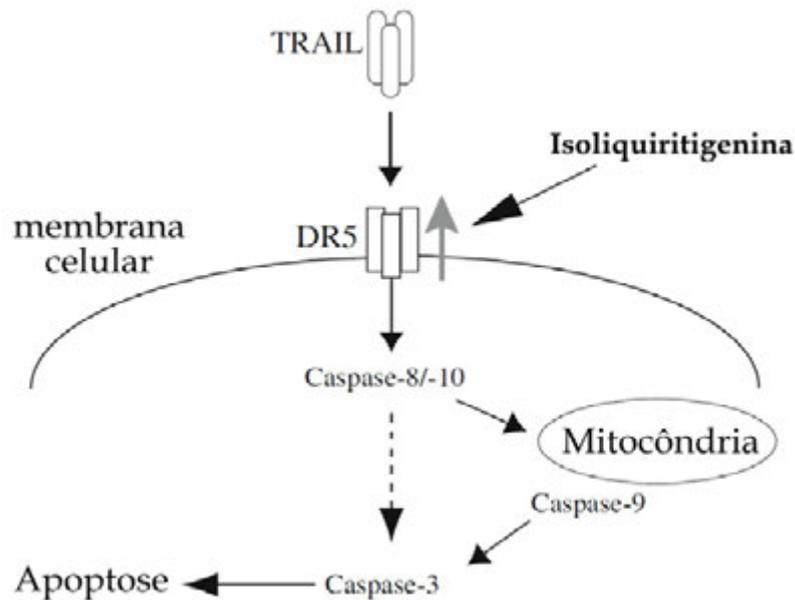


Figura 26 – Modelo esquemático do mecanismo de ação de isoliquiritigenina. A combinação de isoliquiritigenina e o fator de necrose tumoral (TRAIL) induz à apoptose. TRAIL é uma proteína endógena envolvida na resposta imune antitumoral. A regulação da expressão do receptor DR5 induzida por isoliquiritigenina é capaz de aumentar a ação do fator TRAIL, resultando na via de sinalização apoptótica através das caspases-8/10, -9 e -3 (YOSHIDA et. al., 2008).

### 2.8.1. Origem biológica da própolis

A própolis é um composto de consistência viscosa, não tóxica, uma mistura de resinas, gomas e bálsamos exsudados por órgãos vegetais (principalmente brotações) e coletado por abelhas (Figura 27). Nas colmeias, essas secreções são misturadas a outras substâncias, essencialmente ceras e a própria saliva das abelhas e enzimaticamente modificadas (JIN et. al., 2005; NAJAFI et. al., 2007). Sua cor (que varia do amarelo claro, marrom esverdeado ao negro), consistência e composição química estão intimamente relacionadas à vegetação nativa e à estação de coleta pelas abelhas (BANKOVA et. al., 2005; DAUGSH et. al., 2007; SILVA et. al., 2007). CASTRO et. al., (2007) constataram a influência da sazonalidade nas propriedades bioquímicas das própolis originadas da região sudeste e nordeste, indicando que o período de coleta ao longo da safra apícola pode interferir na concentração de compostos bioativos oriundos das fontes vegetais.

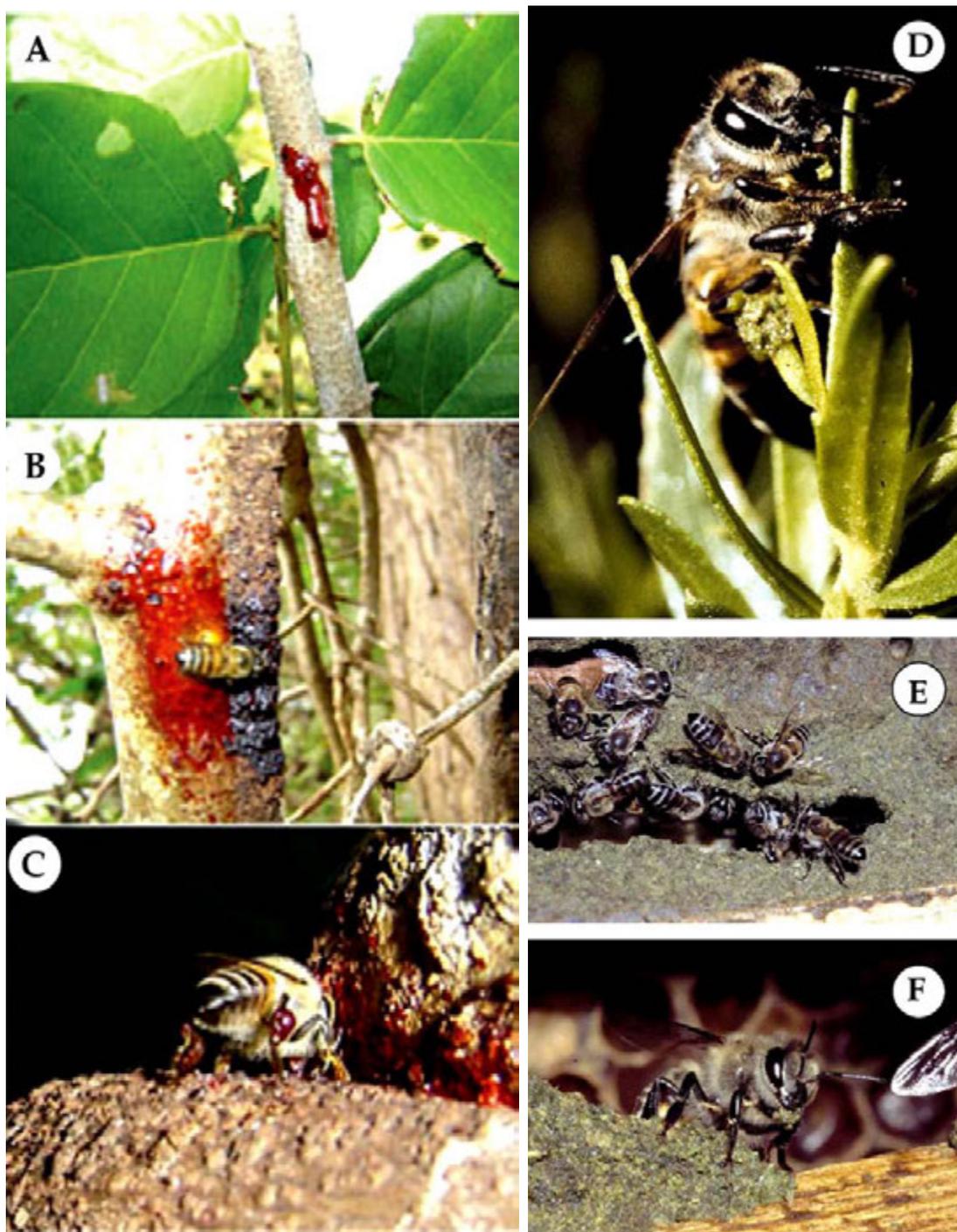


Figura 27 – Coleta de própolis por abelhas *Apis mellifera*. O exsudado resinoso presente no caule de *Dalbergia ecastophyllum* (A, B) ou nas folhas jovens de *Baccharis dracunculifolia* (D) é coletado pela abelha; o exsudado é passado para as patas posteriores (C) para ser levado à colmeia (E,F), ser processado e formar a própolis vermelha (DAUGSH et. al., 2007) ou verde (KUMASAWA et. al., 2003). O comportamento das abelhas é semelhante durante a coleta dos dois tipos de exsudados vegetais.

## 2.8.2. Características bioquímicas e propriedades biológicas da própolis

Os compostos químicos encontrados na própolis são provenientes de três fontes: exsudados vegetais coletados pelas abelhas, substâncias metabólicas secretadas pelo inseto durante o processamento da resina e materiais introduzidos durante a elaboração final. Mais de 300 compostos foram identificados como constituintes da própolis, principalmente polifenóis do grupo dos flavonoides, seguidos pelos ácidos fenólicos, ésteres, terpenoides, esteroides, aldeídos e cetonas (HAVSTEEN, 2002; CHEN et al., 2004; SALATINO et al., 2005). Própolis da região tropical contém flavonóides, di e triterpenos, lignina e outras substâncias fenólicas, ácido prenil-p-cumárico, acetofenonas, açúcares, açúcares-álcoois, ceras, vitaminas, minerais e vários compostos voláteis como monoterpenos e sesquiterpenos (BANKOVA et al., 1994; MARCUCCI, 1999).

Segundo o perfil físico-químico obtido pelas técnicas de espectrofotometria de absorção na região UV-visível, CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e CCDAE (cromatografia em camada delgada de alta eficiência), e testes padronizados de atividades antimicrobiana e antioxidante, a própolis brasileira produzida por abelhas *Apis mellifera* é classificada em 13 grupos, variáveis com aspectos geográficos do Brasil e da flora local: cinco grupos no sul do Brasil, um no sudeste e seis no nordeste brasileiro (PARK et al., 2000; 2002; DAUGSH et al., 2007). Já foi identificada a origem botânica dos grupos 3, 6 (PARK et al., 2002), 12 (PARK et al., 2004; ALENCAR et al., 2005; KUMASAWA et al., 2003), do qual faz parte a “própolis verde”, e 13 (DAUGSH et al., 2007), do qual faz parte a “própolis vermelha”.

O grupo 3 (região Sul) origina-se principalmente de exsudatos do botão floral do “álamo” ou “choupo” - *Populus* (Salicaceae), o grupo 6 (região Nordeste) e o grupo 12 (região Sudeste), originam-se botanicamente de exsudatos produzidos em folhas jovens de “alecrim” - *Hyptis divaricata* (Lamiaceae) e “alecrim-do-campo” - *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), respectivamente, e o grupo 13 (região Nordeste), provém das secreções resinosa caulinares de “rabo-de-bugio” - *Dalbergia ecastophyllum* (Leguminosae).

Análises químicas de amostras de própolis verde revelaram grande quantidade de flavonoides (ALENCAR et. al., 2007; DAUGSH et. al., 2007; KUMAZAWA et. al., 2009), além de muitos outros compostos derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, como drupanina e ácido cinâmico (*E*)-3-prenil-4-dihidrocinamoiloxi, artepilin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxi-cinâmico) e ácido felúrico como os principais ácidos fenólicos (Figura 28).

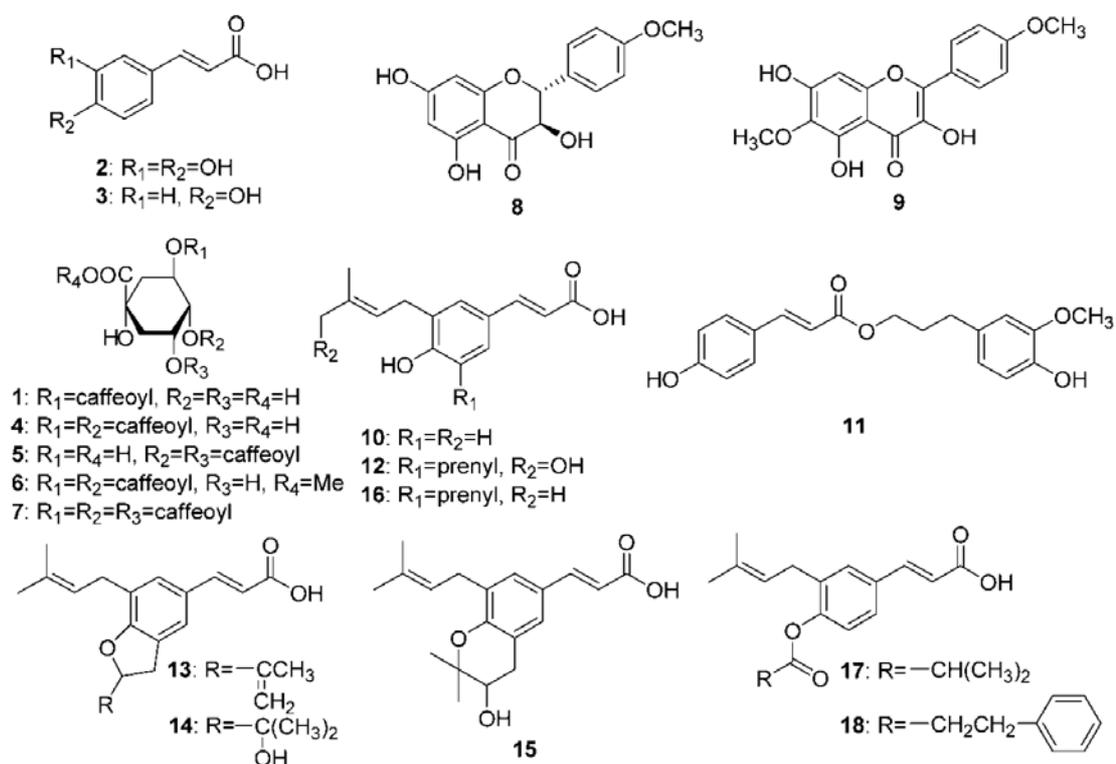


Figura 28 – Estruturas químicas de compostos identificados na própolis verde, de origem botânica do “alecrim-do-campo” - *Baccharis dracunculifolia*. **1:** ácido clorogênico; **2:** ácido cafeico; **3:** ácido *p*-cumárico; **4:** ácido 4,5-dicafeoilquínico; **5:** ácido 3,4-dicafeoilquínico; **6:** ácido 4,5-dicafeoilquínico metil ester; **7:** ácido 3,4,5-tricafeoilquínico; **8:** diidrokamferida; **9:** 6-metoxikamferol; **10:** drupanin; **11:** diidroconiferol *p*-cumarato; **12:** capillartemisina A; **13:** ácido (*E*)-3-[2,3-diidro-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-7-prenil-5-benzofuranil]-2-propenoico; **14:** ácido (*E*)-3-[2,3-diidro-2-(1-metiletil)-7-prenil-5-benzofuranil]-2-propenoico; **15:** ácido (*E*)-3-(2,2-dimetil-3,4-diidro-3-hidroxi-8-prenil-2*H*-1-benzopirano-6-il)-2-propenoico; **16:** artepillin C; **17:** ácido (*E*)-3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi)-cinâmico; **18:** ácido (*E*)-3-prenil-4-(di-idro cinamoiloxi)-cinâmico (KUMAZAWA et. al., 2009).

ALENCAR et al. (2007) identificaram 4 isoflavonas presentes na própolis vermelha, quais sejam: dihidroxiisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimetoxi-2'- isoflavona, não encontradas nas demais própolis brasileiras, com propriedades antimicrobiana, anticâncer e antioxidante. PARK et al., (2002) citam pinobaskina, quercetina, pinocembrina, canferol, isosacuretina, galangina e kanferida como os principais flavonoides mais encontrados nas amostras de própolis do Brasil.

É atribuída à própolis a propriedade de melhorar a saúde e prevenir doenças do coração, diabetes, infecções, câncer, possuir ação antiinflamatória (BANSKOTA et. al., 2001b; SANTOS et. al., 2003) e antifúngica (DOBROWOLSKI et. al., 1991; HRONEK et. al., 2005; SALOMÃO et. al., 2008; TRUSHEVA et. al., 2006), antibacteriana (DRAGO et. al., 2007; LU et. al., 2005; DAUGSH et. al., 2007; SALOMÃO et. al., 2008; TRUSHEVA et. al., 2006), antiviral (HELUIHEL, ISANU, 2002), anti-HIV (ITO et. al., 2001), imunomodulatória (BANKOVA et. al., 2000), antioxidante (NAKANISHI et. al.; 2003; AHN et. al., 2004; MARQUELE et. al., 2005; CHEN et. al., 2007a), anestésica (IBRICEVI et. al., 1981), antialérgica e antitumoral (BANKOVA et. al., 2005; GUNDUZ et. al., 2005; CHEN et. al., 2007b).

As propriedades biológicas e farmacológicas da própolis têm despertado grande interesse da comunidade científica. Amostras de própolis de várias regiões do Brasil têm mostrado diferenças significativas na sua composição química quando comparada à própolis de regiões temperadas, com inúmeras substâncias bioativas, o que tem aumentado as investigações científicas (MARCUCCI, BANKOVA, 1999; BANKOVA et. al., 2000; PARK et. al., 2002; TRUSHEVA et. al., 2006).

### **2.8.3. Própolis e câncer**

A própolis tem sido alvo de intensas pesquisas, especialmente na área de oncologia. Um grande número de compostos possuindo atividade anticarcinogênica tem sido relatado e a contribuição da própolis, como suplemento nutricional coadjuvante no tratamento do câncer é justificado pelas suas características funcionais e terapêuticas, apoiadas por muitos estudos científicos e avaliações clínicas conduzidas em todo o mundo, comprovando sua ação antitumoral, antioxidante, antirradicais livres,

protetora do DNA e estimulante do sistema imune (BURDOCK, 1998; BANSKOTA et al., 2001b; BANKOVA, 2005).

Estudos indicam propriedades hepatoprotetora e antiproliferativa em diferentes linhagens de células tumorais (BASNET et al., 1996; BANSKOTA et al., 1998, 2000b, 2001a, 2002; BANKOVA, 2005). Testes realizados com própolis originada dos diferentes continentes têm mostrado potencial efeito citotóxico, antitumoral (BANSKOTA et al., 2001b; BURDOCK, 1998; CHEN et al., 2004; LI et al., 2008) e apoptótico de diferentes linhagens celulares de câncer (YANAGIHARA, et al., 1993; CHEN et al., 2007b; ASO et al., 2004).

Alguns constituintes da própolis exibem propriedade quimiopreventiva, quimioterapêutica, hepatoprotetora, citotóxicas, citostáticas e anticâncer, com forte e seletivo efeito inibidor da proliferação e metástase de células hepatocarcinogênicas humanas (Hep3B), células tumorais de ovário, de carcinoma mamário, de fibrosarcoma humano (HT1080), de melanoma, de cólon, de sarcomas e carcinoma renal (GRUNBERGER et al., 1988; JIN et al., 2005).

CHEN et al. (2004) avaliaram os efeitos citotóxicos, apoptóticos e protetores contra radicais livres de diferentes tipos de própolis encontrados na região de Taiwan em células do melanoma humano. Extratos contendo altos níveis de compostos fenólicos exibiram forte potencial contra radicais livres. Tratadas com extratos de própolis em concentrações de 1,23 - 40 µg/mL, por 24 h, as células mostraram alterações morfológicas e, em concentrações de 20 µg/mL por 6 h, os extratos induziram à apoptose.

ASO et al. (2004) verificaram o efeito inibitório dose e tempo dependente do extrato da própolis do Brasil sobre o crescimento das células da leucemia (U937): na concentração de 0,5 µl/mL houve inibição do crescimento celular em 68%; ou ainda, quando cultivadas a 5 µl/mL por até 5 dias, o crescimento celular foi inibido em até 60%. Além disso, a síntese de DNA, RNA e proteínas também foram inibidas em 100, 92 e 47%, sob cultivo celular a 5 µl/mL de própolis, respectivamente, por 60 min. Segundos os autores, o efeito antitumoral deve-se à ação apoptótica do extrato da própolis sobre as células leucêmicas.

Três das mais conhecidas própolis apresentam constituição química muito diferente entre si e forte poder antitumoral conhecido. Uma é a própolis do Brasil, com abundância de artepilin C, a outra é encontrada na

Nova Zelândia, predominante em ácido cafeico fenetil éster (CAPE), e a terceira é a própolis vermelha encontrada no Brasil e China e que não contém CAPE ou Artepilin C. No entanto, cerca de 1-2% das pessoas são alérgicas ao CAPE, enquanto que não há relatos desse problema para a própolis do Brasil (AWALE et. al., 2008; MESSERLI et. al., 2009).

AWALE et. al. (2008) isolaram três novos componentes da própolis vermelha de origem brasileira, com atividade seletiva e 100% citotóxica contra células tumorais do pâncreas (10 µg/mL), cultivadas em meio privado de nutrientes. Segundo os autores, as células tumorais pancreáticas são altamente tolerantes à falta de nutrientes e oxigênio, condições características de tumores com alta capacidade proliferativa. E a busca de substâncias que eliminem essa habilidade celular seria uma nova estratégia para a descoberta de novas drogas anticâncer.

CHEN et. al. (2007) relataram efeitos dose e tempo-dependente de extratos de própolis na supressão da proliferação de células humanas da leucemia (HL-60, U937), do câncer pulmonar (CH27, A549), do câncer de fígado (HepG2, Hep3B), sendo que as duas linhagens de células da leucemia exibiram os maiores efeitos inibitórios no crescimento (11 µg/mL); a proliferação de células normais da pele (WS1) e fígado de rato (BNL) utilizadas no mesmo experimento não foram afetadas pelos extratos.

BÚFALO et. al. (2007) verificaram os efeitos citotóxicos *in vitro* da própolis em células humanas do carcinoma epidermoide da laringe (HEp-2). Após 24 h de incubação, a citotoxicidade da própolis (100 µg/mL) foi significativamente detectada, afetando a morfologia celular, o número de células viáveis e a disposição estrutural em monocamadas. Menores concentrações da própolis foram mais efetivas com o tempo.

Os diferentes compostos químicos da própolis, especialmente ácidos fenólicos e flavonoides, são capazes de controlar seletivamente o crescimento de células normais e tumorais. Foi o que observaram NAJAFI et. al. (2007) em um estudo com linhagens de células tumorais (McCoy, HeLa, SP2/0, Hep-2 e BHK21) e células normais (linfócitos humanos, células de rim, fígado e baço de ratos). Para a mesma concentração testada do extrato aquoso de própolis (2 mg/ml), houve forte efeito inibitório no crescimento das células tumorais e estímulo no crescimento das células normais a taxas superiores a 60%.

BANSKOTA et. al. (2000b) realizaram avaliações das propriedades hepatoprotetora, antirradicais livres e citotóxica de 9 amostras de própolis coletada em diferentes regiões do Brasil. Os ensaios mostram que todas as amostras apresentaram forte poder citotóxico para células do fibrosarcoma humano (HT-1080) e carcinoma de cólon (26-L5); 6 das amostras de extrato aquoso apresentaram forte poder antirradicais livres; a propriedade hepatoprotetora da própolis foi testada em hepatócitos de rato cultivadas em meio contendo compostos indutores de morte celular (D-Galactosamina + fator- $\alpha$  de necrose tumoral, D-GalN/TNF- $\alpha$ ), a 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ , por 18 h, sendo que quase todas as amostras exibiram propriedade hepatoprotetora significativa em ambas as concentrações, com taxas elevadas de sobrevivência das células.

AKAO et. al. (2003) isolaram e quantificaram três compostos da própolis brasileira e testaram suas propriedades citotóxicas em linhagens tumorais. Os compostos estudados foram artepilin C, bacarin (ácido cinâmico (E)-3-prenil-4-(2,3-dihidrocinamoiloxi) e drupanin, presentes na amostra nas quantidades de 10%, 4% e 3%, respectivamente. Esses compostos, em concentrações superiores a 30  $\mu\text{M}$ , apresentaram efeito apoptótico e inibiram fortemente o crescimento das linhagens de células tumorais do cólon (SW480, DLD-1, Colo201), do estômago (MKN1, MKN28, MUGC4) e da leucemia (HL60, NB4, K562, U937), com a seguinte ordem de intensidade na citotoxicidade celular: artepilin C > bacarin > drupanin.

A artepilin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), constituinte anticâncer característico e específico da própolis verde encontrada no Brasil (grupos 5 e 12) e CAPE, apresentam propriedade apoptótica *in vitro* e supressora do crescimento neoplásico *in vivo*. Células tumorais do sistema nervoso periférico (HEI-193 e MPNST) cultivadas a 25  $\mu\text{M}$  do extrato de própolis verde do Brasil com cerca de 8% (15  $\mu\text{g/mL}$ ) de artepilin C apresentaram forte inibição no crescimento; ratos que receberam células tumorais e foram tratados com o extrato da própolis (500 mg/kg) ou artepilin C (50 mg/kg) apresentaram supressão total do crescimento tumoral e sua regressão completa, enquanto que os animais controle apresentaram desenvolvimento normal do câncer. Análises bioquímicas revelam que artepilin C bloqueia seletivamente a via de sinalização tumoral kinase-PAK1 dependente, envolvida com a angiogênese de muitos tumores como neurofibromatose, mieloma múltiplo e cânceres pancreáticos. Além disso,

não há no mercado drogas terapêuticas efetivas aprovadas pela FDA que atuam em neoplasias PAK1-dependentes (AHN et. al., 2007). Outros testes com a própolis brasileira e artepilin C também confirmam o efeito antiangiogênico *in vitro* e *in vivo*. A própolis reduziu significativamente a proliferação de células do sarcoma (S180) de maneira dose-dependente (3,13 – 50 µg/mL). Artepilin C apresentou inibição na proliferação das células endoteliais em IC<sub>50</sub> de 37,2 µg/mL; administração oral de artepilin C reduziu drasticamente, e de forma dose-dependente, a quantidade de vasos sanguíneos em tumores em ratos em até 46% comparado ao controle.

O ácido 3-[2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)benzopirano]-6-propenoico, isolado da própolis de origem brasileira, apresenta elevado potencial inibitório do crescimento de células MCF-7 do câncer de mama humano (LUO et. al., 2001; MESSERLI et. al., 2009). Um composto diterpeno tipo clerodana PMS-1 da própolis originária do Brasil, exibe citotoxicidade contra células humanas do carcinoma de pulmão (HLC-2, HeLa e KB) e do carcinoma hepatocelular (HuH13) (BANSKOTA et al., 2001b).

LI et. al. (2008), avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de 39 flavonoides presentes na própolis originária do Brasil contra diferentes linhagens de células tumorais do carcinoma de cólon (26-L5), carcinoma de pulmão (LLC), melanoma (B16-BL6), adenocarcinoma de pulmão (A549), adenocarcinoma cervical (HeLa) e fibrosarcoma (HT-1080), comparados a medicamentos convencionais de uso clínico (5-fluorouracil e doxorubicina). As substâncias testadas mostraram potenciais distintos na atividade citotóxica em função da concentração sobre as linhagens celulares, comparáveis aos resultados obtidos pelo medicamento comercial, sendo que a flavanona 7-hidroxi-6-metoxiflavanona exibiu a mais potente atividade seguida da isoflavana mucronulatol, que exibiu potencial citotóxico contra as linhagens tumorais LL, A549 E HT-1080. Para os autores, ambos os componentes são fontes promissoras para o desenvolvimento futuro de drogas anticâncer.

A Figura 29 apresenta estruturas químicas de alguns dos constituintes presentes mais comuns presentes em extratos de própolis verde e vermelha, como artepilin C, apigenina, luteolina, quercetina, canferol, galangina, crisina e pinocembrina, muitos dos quais exibem elevado potencial inibidor da proliferação celular e da carcinogênese (KUNTZ et. al., 1999; NIJVELDET, et. al., 2001; AKO et. al., 2003. LAMBERT, et. al., 2005; CHOI et. al., 2007; HORINAKA et. al., 2006; KIM et. al., 2006).

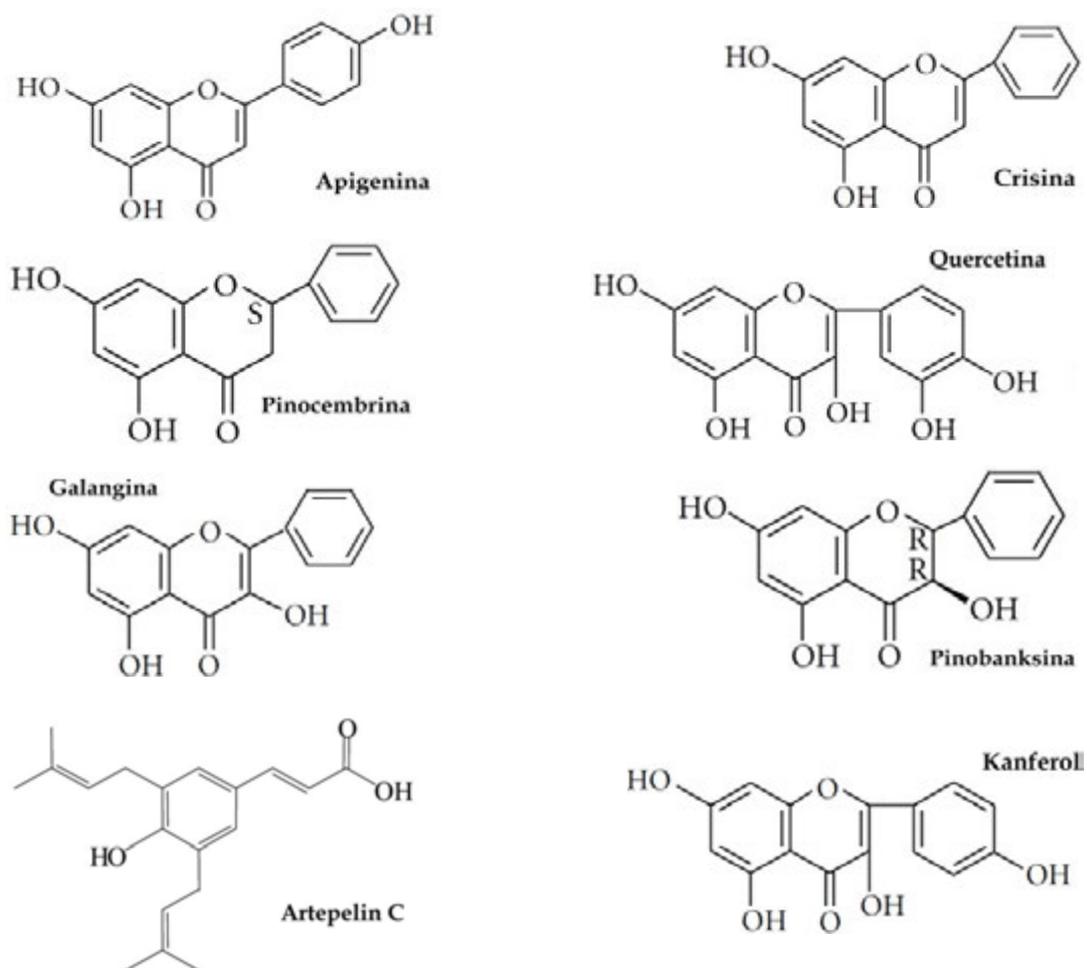


Figura 29 – Estrutura química de alguns dos flavonoides (JAGANATHAM et. al., 2009) presentes nos extratos das própolis verde e vermelha utilizados nos ensaios experimentais deste trabalho.

## 2.9. *Annona muricata* L.

### 2.9.1. Família Annonaceae e *Annona muricata*

*Annona muricata* L. (Annonaceae) é originária das Antilhas e encontrada em regiões tropicais e subtropicais conhecida pelos nomes de “graviola”, “pinha” e “guanabana” (Figuras 30 a 32). Em número de espécies, a família Annonaceae destaca-se dentro da ordem Magnoliales, as quais se encontram entre as angiospermas mais primitivas. A família abriga cerca de 2.500 espécies, sendo que 109 são nativas da América tropical e 10 da África tropical (GEURTS, 1981).



Figura 30 – A gravioleira *A. muricata* (A), com detalhe das folhas (B).  
(Fotografia: Marcelo A. Filardi).



Figura 31 – Flores (C) e o fruto de *A. muricata* (D) (Fotos: Marcelo A. Filardi).



Figura 32 – Fruto em corte (E) e sementes secas (F) de *Annona muricata* (Fotos: Marcelo A. Filardi).

*A. muricata* é uma planta decídua originária das Antilhas e pode ser encontrada em quase todos os países tropicais; no Brasil é muito difundida no Norte e Nordeste, cultivada principalmente nos Estados da Paraíba, Pernambuco, Ceará e Bahia. Bem adaptada a climas úmidos e baixa altitude, a planta pode chegar a 11 m de altura, com folhas verdes brilhantes e flores hermafroditas branco-amareladas, grandes e isoladas, que nascem no tronco e nos ramos. A floração inicia-se no terceiro ou quarto ano de plantio da semente e o fruto é conhecido como “anona-de-espinho”, “jaca-de-pobre”, “jaca-do-pará”, “coração-de-rainha”, “araticum-grande” e “araticum-manso”, uma baga composta (sincarpo), grande, de forma ovalada, com peso que pode atingir 10 kg e comprimento médio de 30 cm (Figura 33). As sementes, com 1-2 cm de comprimento e peso médio de 0,60 g, são abundantes ( $\pm 100$  sementes/fruto), marrons, envolvidas por uma polpa branca, de sabor agridoce, muito aromática e succulenta. A casca do fruto é delgada, de aparência reticulada de coloração verde-escura quando o fruto está em desenvolvimento e de cor verde clara brilhante em frutos maduros, possuindo espículas carnosas, moles e recurvadas, correspondendo cada uma a um carpelo. O fruto tem de 54 a 85,5% do seu peso em polpa, 8,8 a 36% em casca, 3 a 10% de semente e 2% de receptáculo ou talo, pode ser consumido ao natural, prestando-se bem ao processamento industrial de sucos concentrados, polpas congeladas, néctar, geleias, cremes, sucos, diuréticos e xaropes antiescorbúticos (PINTO et. al., 2005).

*A. muricata* vegeta bem em altitudes de até 1.200 m, requer temperatura média anual variável de 21 a 30 °C (sem quedas abaixo de 12 °C), chuvas acima de 1.000 mm/ano bem distribuídos (100 mm/mês), umidade relativa do ar entre 75 e 80%. A floração acontece no fim da estação seca (março a maio) e a frutificação na estação chuvosa (dezembro a janeiro). Adapta-se principalmente aos solos profundos, argilo-arenosos e bem drenados, ricos em matéria orgânica, ligeiramente ácidos (pH 6,0-6,5), não sujeitos a encharcamento. A propagação da planta é feita através de processos assexuados - alporquia, estaquia, cultivo de tecidos e enxertia, e processo sexuado - via sementes (PINTO et. al., 2005).

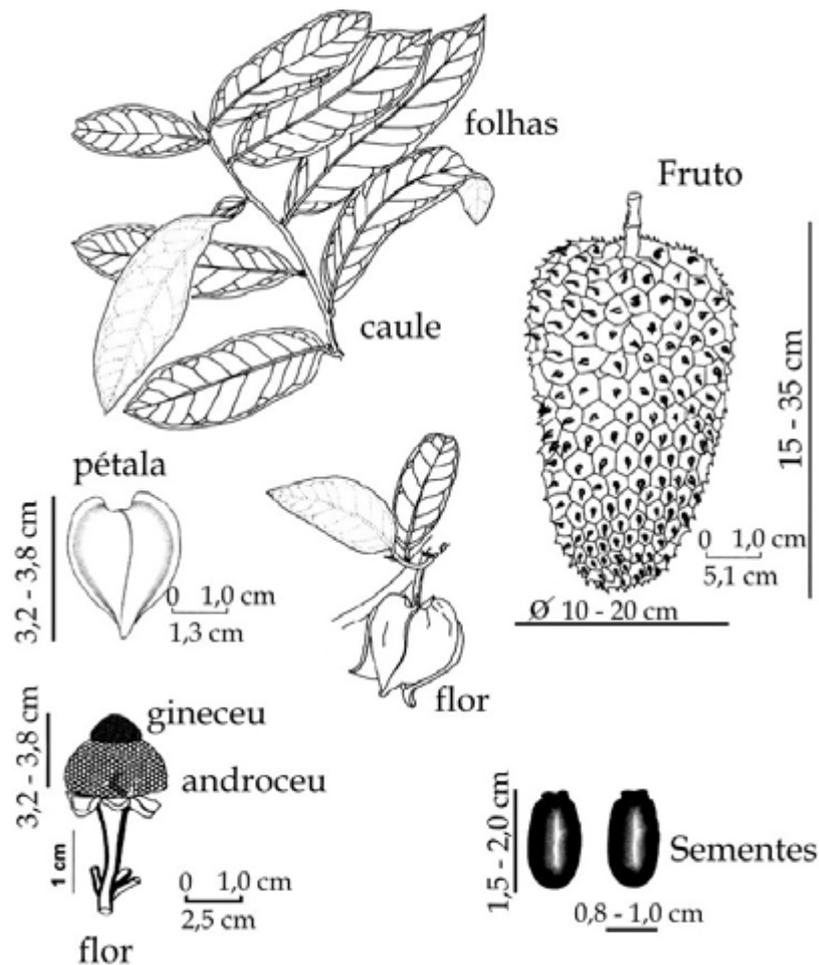


Figura 33 – Características botânicas de algumas partes da planta de *Annona muricata* (PINTO et. al., 2005).

### 2.9.2. Acetogeninas de Annonaceae

Análises fitoquímicas do extrato etanólico das folhas de *A. squamosa* revelam presença forte de alcaloides, flavanonas, triterpenoides, esteroides, concentrações moderadas de saponinas e taninos e traços de flavonas, flavonóis e xantons (BRITO et. al., 2008). No Brasil, 76 flavonoides foram isolados e identificados nas folhas de 31 espécies de anonáceas nativas, prevalecendo os flavonóis (67), dentre os quais, o canferol, ramnocitrina, 6-hidroxirhamnocitrina, quercetina, isorhamnnetina e rhamnnetina sobre as flavonas (9), dentre as quais, a apigenina, escutelareína, hispidulina e luteolina (SANTOS, SALATINO, 2000), muitos dos quais com propriedades antitumorais.

Um dos principais metabólitos secundários encontrados exclusivamente em plantas da família Annonaceae são as acetogeninas, compostos orgânicos derivados de ácidos graxos de cadeia longa exibindo expressiva atividade biológica e tem sido considerado como importantes alternativas para o desenvolvimento de drogas antitumorais. Bioquimicamente, as acetogeninas são um grande grupo de metabólitos secundários C<sub>35</sub>-C<sub>37</sub> formados pela via bioquímica policetídica do acetato e derivam-se de ácidos graxos C<sub>35</sub>-C<sub>37</sub> combinados com unidades de 2-propanol. São caracterizados por uma longa cadeia alifática com um anel terminal  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturado, às vezes rearranjado à cetolactona, com um a três anéis tetrahydrofuranos localizados ao longo da cadeia hidrocarbônica, onde podem ser encontradas também funções oxigenadas (hidroxilas, acetoxilas, cetonas, epóxidos, tetrahydrofuranos e tetrahydropiranos), podendo estar presentes ligações duplas e triplas (ALALI et. al., 1999; BERMEJO et. al., 2005, LEITE, 2009).

A primeira acetogenina a ser isolada foi a uvaricina, em 1982, com propriedades antitumorais. A partir daí, o interesse por essas substâncias vem crescendo principalmente pela variada ação biológica que apresentam e por serem candidatas promissoras para um futuro de geração de drogas contra tumores quimioterápico-resistentes (JOLAD et. al., 1982; WRIGHT, 2005).

Já foram descritas mais de 400 acetogeninas, isoladas de sementes, frutos, caules e folhas da planta e muitas delas com suas estruturas químicas já estabelecidas (ARROYO, et. al., 2005; GLEYE, et. al., 1988; ESPOSTI et. al., 1994; HOPP et. al., 1996; LANDOLT et. al., 1995; OBERLIES et. al., 1997; ALALI et. al., 1999; GLEYE, et. al., 2000; CHANG, WU, 2001; GONZÁLEZ-COLOMA et. al., 2002; LIAW et. al., 2002; CHIU et. al., 2003; BERMEJO et. al., 2005; CHIH et. al., 2001; LIAW et. al., 2005; SANTOS, et. al., 2007; BRITO et. al., 2008; DERBRÉ et. al., 2008; KOJIMA, TANAKA, 2009).

A Figura 34 apresenta a estrutura geral de acetogeninas de anonáceas. Caracteriza-se por apresentar frequentemente funções oxigenadas como acetona, acetoxil, grupos hidroxilas e duplas ligações ao longo da cadeia hidrocarbônica (Figura 30-I, III), e também 1, 2 ou 3 anéis tetrahydrofurânico (THF) 2,5-dissubstituídos no interior da molécula (Figura 30-II), além de um radical 4-metil  $\gamma$ -lactona inserido ao terminal da estrutura linear (Figura 30-IV).

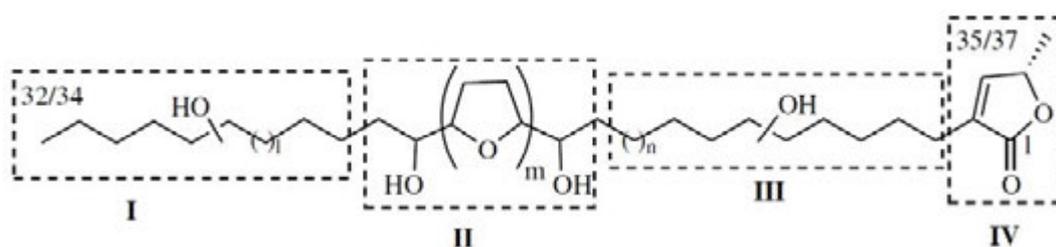


Figura 34 – Estrutura geral de Acetogeninas (BERMEJO, 2005; HU et. al., 2006).

De acordo com a posição das funções químicas e estereoquímica, que apresentam (Figura 35), as acetogeninas podem ser classificadas com base no anel THF em compostos mono-tetrahydrofurano, bis-tetrahydrofurano adjacente, bis-tetrahydrofurano não-adjacente, anel não-tetrahydrofurano, tri-tetrahydrofurano e acetogeninas não-clássicas (tetrahidropiranos e compostos tetrahydrofuranos anel-hidroxilados), seguidos pela subclassificação de  $\gamma$ -lactona,  $\gamma$ -lactona substituída ou cetolactonas variantes (ZAFRA-POLO et. al., 1996; ALALI et. al., 1999; HU et. al., 2006).

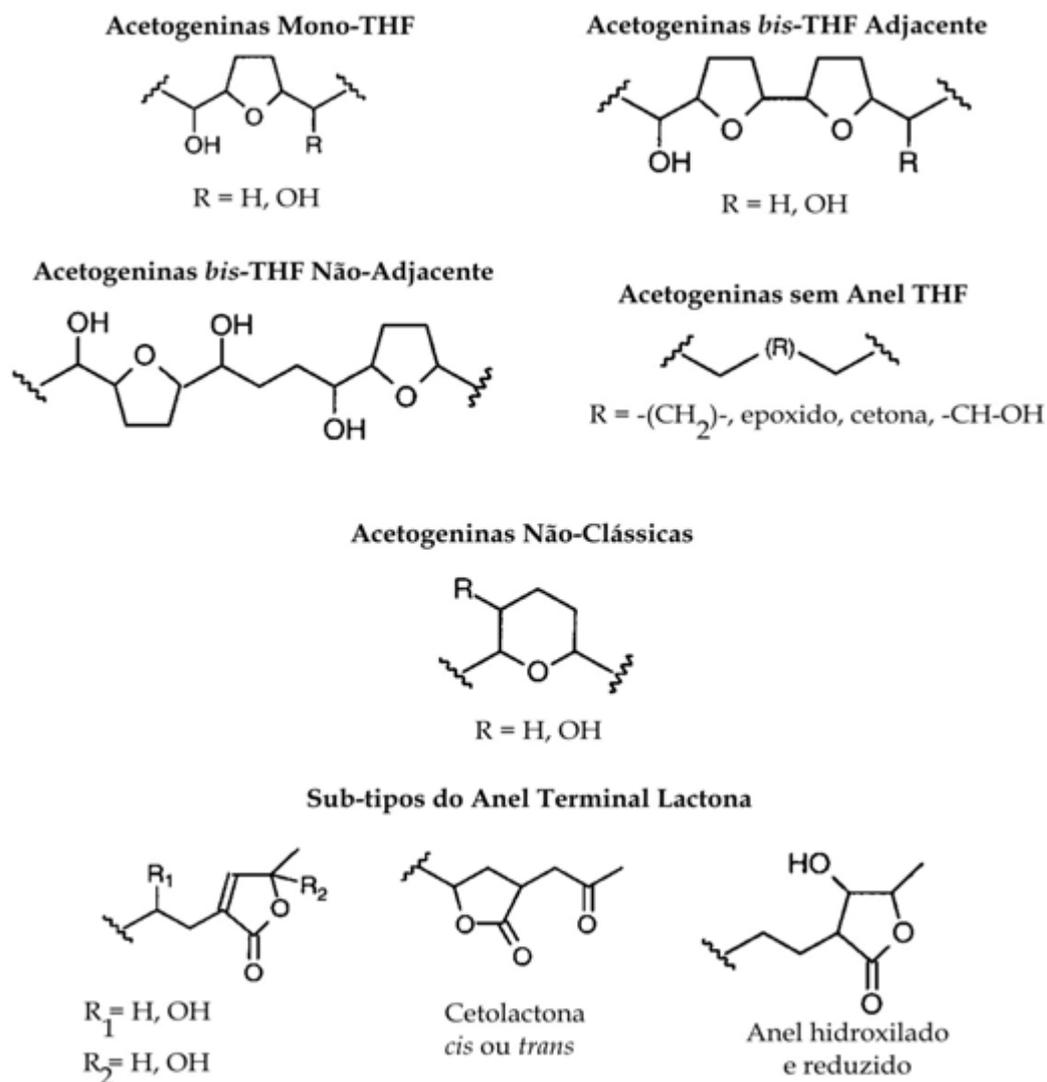


Figura 35 – Classificação de Acetogeninas Anonáceas com base no sistema tetrahydrofurano (THF), tetrahydropirano (não clássicas), epóxi e  $\gamma$ -lactona (ZAFRA-POLO et. al., 1996; ALALI et. al., 1999).

### 2.9.3. Bioatividade antitumoral de Acetogeninas

Por séculos, plantas anonáceas são utilizadas na medicina popular e por curandeiros da América do Sul, possuindo ação conhecida contra as seguintes doenças e disfunções: diarreia, câncer, infertilidade, espasmos musculares, disenteria, úlceras, malária, febre, insônia, reumatismo, artrite, hipertensão, palpitação, hipertireoidismo, vermes, escorbuto e gripe, também contra insetos-praga e fitonematoides (HSI, 2001; GONZÁLEZ-COLOMA et. al., 2002; BRITO et. al., 2008).

Já foram identificadas em espécies de anonáceas inúmeras acetogeninas como, por exemplo, bulatacina, anonacina, isoanonacina, muricatocina, anomutacina, anomuricina, goniotalamicina, anossenegalina (WU, 1995; 1995a; 1995b; CHAMPY et al., 2005; 2009; LUNA, 2006), muitas das quais também isoladas de folhas de *A. muricata* e com efeitos antitumorais conhecidos em diferentes linhagens celulares. Anonacina é a principal acetogenina presente nas folhas de *A. muricata* (CHAMPY et al., 2005; 2009).

Inúmeros estudos demonstram a ação antitumoral seletiva das acetogeninas, inibindo a proliferação e induzindo à apoptose células da linhagem PC-3 do câncer de próstata, MCF-7 do câncer de mama, A-549 do câncer de pulmão, HT-29 do câncer de cólon, A-498 do carcinoma renal e PACA-2 do carcinoma pancreático (LANDOLT et. al., 1995; HOPP et. al., 1996; ZENG et. al., 1996), linhagem H460 do câncer de pulmão (QUISPE et. al., 2006), SW-480 do câncer de cólon, SKMel-28 do melanoma, HeLa do adenoma cervical (GONZÁLEZ-COLOMA et. al., 2002), SGC-7901 de câncer gástrico, A-5408 de pulmão e SMMC-754 de câncer de fígado (YANG et. al., 2009) linhagem 2.2.15/HepG2 do hepatocarcinoma humano (CHANG, WU, 2001; CHIH et. al., 2001; CHIU et. al., 2003).

Células de linhagem tumoral do câncer de mama (MCF-7), da eritroleucemia (K-562) e do câncer do cólon (COLO-205) apresentaram fragmentação do DNA, aumento dos níveis citoplasmáticos de espécies reativas de oxigênio e morte celular por apoptose, quando cultivadas em meio contendo extratos aquoso e orgânico de sementes de anonácea (PARDHASARADHI et. al., 2005). Acetogeninas isoladas e identificadas em folhas de *A. muricata* apresentaram efeito citotóxico contra linhagens de células A-549 do câncer de pulmão e MCF-7 do câncer de mama (WU et. al., 1995; 1995a; 1995b).

Estudos da relação estrutura-atividade de 14 acetogeninas apontaram uma acetogenina cuja esteroquímica (do C<sub>15</sub> ao C<sub>24</sub>) a torna 250 vezes mais potente que drogas utilizadas no combate ao adenocarcinoma mamário, um dos cânceres mais resistentes aos tratamentos quimioterápicos (OBERLIES et. al., 1997). YANG et al. (2009) investigaram a relação estrutura-atividade de várias acetogeninas e relataram a ação citotóxica antitumoral seletiva de

12 compostos acetogênicos em função de sua configuração e estrutura estereoquímica com resultados promissores para futuras aplicações clínicas em tratamentos de câncer.

LIAW et. al. (2005) confirmaram através de estudos *in vitro* efeitos citotóxicos de acetogeninas contra alguns tipos de linhagens celulares de tumores humanos: HepG2 (carcinoma hepatocelular), Hep3B (carcinoma hepatocelular com hepatite B), A549 (câncer de pulmão), MCF-7 (câncer de pulmão), HCT-8 (câncer ileocecal), SK-MEL-2 (melanoma), KB (carcinoma epidermoide nasofaríngeo), U-87-MG (câncer glioblastoma), CAKI (câncer renal), PC-3 (câncer de próstata), 1A9 e PTX10 (câncer de ovário).

MCLAUGHLIN (2008) realizou experimentos *in vivo* e encontrou efeitos citotóxicos seletivos de acetogeninas em linhagens de células tumorais A2780 (carcinoma ovariano humano) e CCRF-CEM (leucemia humana).

Células do câncer de mama (MCF-7), câncer de pulmão (H-460) e câncer do sistema nervoso central (SF268) foram submetidas a ensaios de viabilidade com extratos etanólicos de *A. muricata* e extratos da raiz de *Krameria Lappacea* (Krameliceae) em fração 1:1 e na concentração de 1,6, 1,4, e 1,4 µg/mL, os extratos foram citotóxicos respectivamente contra as linhagens MCF-7, H-460 e SF-268 (ARROYO et. al., 2005).

Bulatacina, uma acetogenina isolada de anonáceas, interfere nos níveis citoplasmáticos de cAMP e cGMP em células HepG2 (CHIU et. al., 2003) e a inibição da síntese de DNA (CHIH et. al., 2001), eventos que podem ter relação ao efeito citotóxico apoptótico.

A bioatividade acetogênica tem se mostrado com forte potencial inibidor do complexo I (mas não dos complexos II e III) da cadeia respiratória mitocondrial, com depleção de níveis de ATP tendo como alvo a enzima NADH:ubiquinona oxirredutase das células tumorais, induzindo à apoptose (LONDERSHAUSEN et. al., 1991; ESPOSTI et. al., 1994; LANDOLT et. al., 1995; HOPP et. al., 1996; ZAFRA-POLO et. al., 1996; ALALI et. al., 1999; GONZÁLEZ-COLOMA et. al., 2002; BERMEJO et. al., 2005; DEBRÉ et. al., 2008; KOJIMA, TANAKA, 2009).

### 3. OBJETIVOS

No presente trabalho, foi investigado o efeito citotóxico *in vitro* dos extratos de própolis brasileira verde e vermelha e do extrato de folhas de graviola (*A. muricata*) em células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2.

Para isso, foram avaliados os efeitos dos extratos na proliferação celular da seguinte forma:

1. Exposição das células HepG2 a quatro concentrações distintas dos extratos das própolis verde e vermelha: 25, 50, 100 e 200 µg/mL.
2. Exposição das células HepG2 a quatro concentrações distintas do extrato da graviola: 1, 2, 4 e 8 mg/mL.
3. Exposição das células HepG2, nos diferentes tratamentos, a três períodos de tempo: 24, 48 e 72 horas.
4. Determinação do efeito inibitório dos extratos das própolis e da graviola sob a proliferação celular utilizando a técnica do vermelho neutro.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Reagentes**

Ácido acético glacial, água deionizada Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>), amido seco, antibióticos (estreptomicina, penicilina), corante vermelho neutro (Vetec Química Fina Ltda), dimetil sulfóxido (DMSO), etanol, maltodextrina, Meio de Cultura Essencial Mínimo (MEM-Gibco), Soro Fetal Bovino (Cultilab), tripsina, Tween<sup>®</sup> - 20 (Sigma).

### **4.2. Equipamentos**

Agitador de mesa Vertex Shaker<sup>®</sup> tipo VDRL modelo TS-2000, capela de fluxo laminar Telstar modelo Biolla (Terrasa, Espanha), centrífuga refrigerada Jouan modelo BR4i Multifunction Auto-Lock<sup>®</sup> (St. Herblain, França), estufa de CO<sub>2</sub> Thermo Scientific modelo HEPA Class 100 (USA), Espectrofotômetro leitor de microplacas Versa-Max modelo T 4.0 A Molecular Devices (USA), Balança de Precisão Gehara<sup>®</sup> modelo 200, Microscópio ótico invertido Leica, com PC monitor modelo DFC295 (Watzlar, Alemanha), agitador Vortex Genie<sup>®</sup> 2-Si modelo G560 (USA).

### **4.3. Linhagem celular HepG2**

As células que originaram a linhagem do carcinoma hepatocelular HepG2 (HB 8065 - ATCC, USA) foram isoladas de um adolescente argentino em 1979. Essa linhagem apresenta morfologia semelhante ao parênquima hepático, além de manter a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das proteínas plasmáticas características das células normais do fígado humano, além de marcadores tumorais (KNOWLES et. al., 1980; ATCC). A linhagem foi gentilmente cedida pela Professora Dra. Danielle Palma de Oliveira da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto.

### **4.4. Cultivo celular**

- **SOLUÇÕES:**

- **Tripsina:**

Tripsina (10%) em PBS (pH 7), estéril (filtro 0,22 µm), armazenada em frasco estéril em geladeira.

- **Meio de Cultura:**

9,61 g de Meio Essencial Mínimo (MEM-Gibco), suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino; L-glutamina (2 mM); penicilina (100 UI/mL), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) e NaHCO<sub>3</sub>, (2,2 g/L), pH 7,2, armazenado em frasco esterilizado em geladeira. Antes de cada uso para as repicagens celulares, os meios de cultivo foram aquecidos a 37 °C para evitar o choque térmico celular. Os meios de cultura foram esterilizados através de filtro de membrana 0,22 µm.

As células hepatocarcinogênicas humanas, linhagem HepG2 (ATCC HB-8065), de morfologia epitelial, foram mantidas sob cultivo em meio de cultura MEM suplementado e incubadas em estufa a 37 °C, sob atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub>. Para isso foram utilizados frascos de cultivo estéreis (25 cm<sup>2</sup> - 50 mL ou 75 cm<sup>2</sup> - 250 mL), de poliestireno com tampa rosqueável (Sarstedt, USA), onde as células cresceram aderidas em monocamada.

O repique de células ocorreu a cada dois ou três dias, quando o crescimento celular atingia cerca de 80-90% de confluência. Para isso, sob câmara de fluxo laminar, após o descarte do meio de cultura em um béquer esterilizado, foi adicionado ao frasco a ser repicado 1 mL de tripsina (para o frasco de 50 mL, ou 2 mL para o frasco de 250 mL) e, depois de cerca de 3 minutos na estufa a 37 °C, as células desaderiam-se do fundo do frasco. Após homogeneização rápida com uma pipeta (para evitar formação de grumos de células) sob o fluxo da capela, a suspensão contida no frasco foi redistribuída igualmente ( $\pm 0,3$  ml) para três frascos de cultivo (1:3), contendo meio de cultura (5 mL para o frasco de 50 mL ou 15 mL para o frasco de 250 mL). Novamente, as células permaneciam de dois a três dias em estufa antes da próxima repicagem. Não mais do que 4-5 repicagens, as células eram congeladas em nitrogênio líquido após esse período, mantendo-se um número adequado de frascos para se obter a quantidade de células suficiente para os ensaios.

Para o congelamento do excedente de células, e garantir um estoque de células para ensaios posteriores, após o procedimento de tripsinização de um frasco de 50 mL (1 mL tripsina), à suspensão de células foram adicionados 3 mL de meio de cultura e, então, transferida para um tubo falco estéril para centrifugação (5 minutos, 1500 rpm); sob fluxo laminar, o sobrenadante então foi descartado e o *pellet* ressuspendido com o meio de congelamento (SFB + 10% DMSO), colocado em tubos criogênicos (1 mL) e mantidos por uma semana a -80 °C. Após este tempo, os criotubos foram transferidos para recipientes de crioarmazenamento em nitrogênio líquido.

Todos os procedimentos com as células foram realizados em fluxo laminar, com esterilização prévia do ambiente de trabalho com álcool 70% e radiação ultravioleta por 30 minutos.

#### 4.5. Curva de crescimento celular

Com o objetivo de ajustar a melhor quantidade de células a ser utilizada durante o período experimental, foi realizada uma curva de crescimento celular relativa aos períodos de coleta de dados: 24, 48 e 72 horas. As células em cultura mantidas em frascos (50 mL ou 250 mL) foram tripsinadas. A tripsina foi, então, inativada pela adição de uma determinada quantidade de meio de cultura no frasco; com auxílio de um hemocitômetro ou câmara de Neubauer (Labor Optick, modelo CE-111020), as células foram contadas de modo a estimar a quantidade total aproximada de células presentes no frasco de origem em um volume de meio conhecido. A partir daí, alíquotas da suspensão do frasco foram coletadas de modo a conter, para cada poço de uma placa/96 poços (Sarstedt, USA), a seguinte quantidade de células, em sextuplicatas:  $1 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1,5 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3,5 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $4,5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  células. As células plaqueadas em 100  $\mu$ L de meio de cultura suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, o meio de cultivo dos poços foi substituído por um novo meio (5% SFB) e as células permaneceram em incubação pelos três dias seguintes. Diariamente, a avaliação da confluência celular foi realizada sob microscópio ótico invertido e a quantidade definida de células para condução dos ensaios foi de  $1 \times 10^4$ /poço. As células cultivadas nesta quantidade apresentaram confluência de 70-80% após 24 horas de emplacamento, momento em que os tratamentos experimentais darão início, e a monocamada e a viabilidade celular se mantiveram pelas 24, 48 e 72 horas seguintes, sem haver desprendimentos e morte de células ou superposição de camadas celulares nos poços, o que poderia interferir nos resultados finais pelas mortes de células provocadas por uma superpopulação no poço, e não devido ao tratamento.

#### **4.6. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio do Vermelho Neutro (*Neutral Red*)**

- **SOLUÇÃO:**

- **Corante Vermelho Neutro (VN):**

250 µmol/mL de solução estéril de VN (filtro Millipore® 0,22 µm) preparada a partir de 3 mg de VN em 1 mL de água destilada; diluição posterior de 240 µL do corante em 9,76 ml de meio de cultura;

- **Solução de lise:** 1% Ácido Acético Glacial, 50% Etanol e 49% de água destilada (v/v).

O teste do vermelho neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina hidrocloreto) baseia-se na capacidade das células viáveis de incorporarem em lisossomos. As células vivas, com a utilização continuada de ATP, mantêm um gradiente de pH entre o lisossomo e o citoplasma, mantendo um pH menor no interior da organela em relação ao citoplasma circundante. Não tóxico e de natureza catiônica fraca, o corante VN penetra passivamente nas células. Incorporado livremente pelos lisossomos, torna-se protonado na matriz ácida da organela e assim não retorna mais livremente pela membrana lisossomal de volta ao citosol. A perda do gradiente de pH lisossômico, devido a danos em membranas e organelas ou lise celular, resultará em uma não retenção do corante. A integridade da membrana lisossomal está estreitamente relacionada com a viabilidade celular e a retenção diferencial do VN entre as células viáveis (que incorporam o corante conferindo maior sinal de leitura espectrofotométrico) e as células inviáveis (que não incorporam o VN conferindo menor sinal espectrofotométrico) fornecerá uma medida qualitativa e quantitativa da viabilidade celular (HARBELL et. al., 1997).

O teste do VN foi realizado com base no descrito por BORENFREUND, PUERNER (1984), com algumas modificações. Após 24 horas de cultivo das células HepG2 em sextuplicatas, nas placas de 96 poços, em procedimentos variáveis de acordo com os tratamentos, o sobrenadante foi removido e adicionado a seguir 100 µL de solução estéril

do corante VN (250 µmol/mL). Após cerca de duas horas de incubação em estufa a 37 °C para incorporação do corante, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e a seguir foi adicionado nos poços 100 µL da solução de lise celular para extração do VN de dentro dos lisossomos. A placa foi mantida em mesa de agitação (Vertex Shaker®) por 10 minutos e a leitura da absorvância realizada em leitor de microplacas a 540 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevivência relativa ao grupos controles, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{DO_{AM} - \Sigma DO_{C+}}{\Sigma DO_{C-} - \Sigma DO_{C+}}$$

Onde: **DO<sub>AM</sub>**: densidade ótica da amostra;

**Σ DO<sub>C+</sub>**: média das leituras óticas do controle positivo;

**Σ DO<sub>C-</sub>**: média das leituras óticas do controle negativo.

#### 4.7. Extrato de *A. muricata*

As folhas da gravioleira foram obtidas em maio de 2009, por Santos Flora Comércio de Ervas Ltda, São Paulo – SP.

O extrato seco das folhas foi formulado e gentilmente fornecido por João Paulo Borges Lisboa, da Indústria Farmacêutica Catedral Ltda, Belo Horizonte – Minas Gerais, Brasil. Para 20 L de extrato obtidos a partir da percolação de 5 kg de folhas da planta, submetidos à secagem por *spray-dried*, incorporando 4 kg do excipiente maltodextrina como agente dessecante. Ao final, obteve-se um extrato padronizado na proporção 5:1. O certificado de análise físico-química e biológica fornecido pela empresa está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 – Certificado de análise físico-química e biológica do extrato seco de folhas de *A. muricata*

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO
<b>Cor</b>	Levemente esverdeado a esverdeado	Levemente esverdeado
<b>Aroma</b>	Aromático	Aromático
<b>Umidade</b>	Máximo 5,00%	1,78%
<b>Densidade Aparente</b>	0,150 a 0,45 g/mL	0,247 g/mL
<b>pH (solução 10% em água)</b>	4,00 a 6,00	4,70
<b>Bactérias</b>	Máximo 1000 UFC/g	710 FC/g
<b>Fungos</b>	Máximo 100 UFC/g	20 UFC/g
<b><i>Escherichia coli</i></b>	Ausente em 1 g	Ausente
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	Ausente em 1 g	Ausente
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	Ausente em 1 g	Ausente
<b><i>Salmonella sp.</i></b>	Ausente em 10 g	Ausente

#### 4.7.1. Preparo das soluções com o extrato de *A. muricata*

Soluções estoque de *A. muricata* e do excipiente maltodextrina foram preparadas inicialmente na concentração máxima testada nos experimentos. Para isso, 80 mg do extrato foram dissolvidos em 10 mL de meio de cultivo (MEM + 5% SFB), quantidade de meio suficiente para o número de placas de cultivo (96 poços) utilizado. Com agitação (Vortex Genie<sup>®</sup>), o material foi totalmente dissolvido e posteriormente filtrado (filtro Millipore<sup>®</sup> 0,22 µm), sob capela de fluxo laminar.

Para o excipiente (maltodextrina), foram pesadas quantidades equivalentes de acordo com as concentrações experimentais. Assim, em 10 mL de meio de cultivo (MEM), foram pesados 80 mg de maltodextrina. Diluições posteriores da solução-estoque (8 mg/mL) foram realizadas para obtenção das outras soluções-teste (1, 2 e 4 mg/mL). A maltodextrina foi adquirida de Rhoster Indústria e Comércio Ltda, Vargem Grande Paulista, Brasil.

#### **4.7.2. Tratamentos das células HepG2 com o extrato de *A. muricata***

As células HepG2 foram incubadas na densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço, em três placas 96 poços, em 100  $\mu$ L de meio de cultura (MEM + 5% SFB), em atmosfera umedificada a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por 100  $\mu$ L de um novo meio, em sextuplicata, contendo diferentes concentrações finais do extrato da graviola (1, 2, 4 e 8 mg/mL); sextuplicatas de poços controles possuíam células cultivadas em Tween<sup>®</sup> 20 (controle positivo), meio de cultura (MEM + 5% SFB) (controle negativo) e o excipiente do extrato (1, 2, 4 e 8 mg/mL de maltodextrina + meio de cultura + 5% SFB). Após 24, 48 e 72 horas, uma placa foi utilizada em cada período de tempo para os ensaios de viabilidade celular como descrito no item 3.6.

Todos os procedimentos foram realizados com pipetas automáticas PZHTL multicanal Multimate<sup>®</sup> modelo ME200.

#### **4.8. Extrato das própolis verde e vermelha**

As amostras dos extratos secos da fração alcoólica da Própolis Verde (LOT# ESAL-270309) e Vermelha (Lot# PADE-0109-SR) e os perfis químicos correspondentes (Anexo) foram obtidos da empresa Pharma Nectar Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil, gentilmente cedidos por José Alexandre Silva de Abreu e Sheila Rago Lemos Abreu.

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica dos Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG-EM) e por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) de acordo com o método de SILVA (2007). Os dados obtidos na identificação dos flavonoides e outros constituintes químicos foram comparados diretamente com os padrões autênticos baseando-se no tempo de retenção, cromatografia e na identidade do espectro de absorção.

#### **4.8.1. Preparo das soluções com os extratos de própolis**

Soluções estoques de própolis verde e vermelha e do veículo amido foram preparadas inicialmente na concentração máxima testada de cada amostra nos experimentos. Para isso, 8 mg de cada tipo de própolis foram dissolvidos em 10 mL de meio de cultivo (MEM) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB), quantidade de meio suficiente para o número de placas de cultivo (96 poços) utilizadas. Com um bastão de vidro e agitação (Vortex® Genie), o material foi totalmente dissolvido e posteriormente filtrado (filtro Millipore® 0,22 µm), sob capela de fluxo laminar.

Diluições posteriores a partir das soluções-estoque (200 e 400 µg/mL referentes à própolis vermelha e verde, respectivamente) foram realizadas para obtenção das outras soluções-teste (25, 50 e 100 µg/mL para a própolis vermelha, e 100, 200 e 400 µg/mL para a própolis verde). Todos os procedimentos foram realizados com pipetas automáticas PZHTL multicanal Multimate® modelo ME200.

Para o excipiente (amido), foram pesadas quantidades equivalentes de acordo com a concentração original de cada um dos extratos (25% da própolis vermelha e 50% da verde). Assim, em 10 mL de meio de cultivo (MEM + 5% SFB), foram pesados 6 mg (referentes ao extrato da própolis vermelha) e 4 mg de amido (referentes ao extrato da própolis verde). Após totalmente dissolvido, os meios contendo o amido também foram filtrados (Millipore® 0,22 µm).

#### **4.8.2. Tratamento das células HepG2 com os extratos das própolis**

Na densidade de  $1 \times 10^4$  por poço, as células foram cultivadas em três placas 96 poços, com 100 µL de meio de cultura (MEM + 5% de SFB), mantidas em estufa (37 °C e 5% CO<sub>2</sub>) por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura de todas as placas foi substituído por 100 µL de um novo meio, em sextuplicata, contendo agora diferentes concentrações finais do extrato seco da própolis vermelha (25, 50, 100 e 200 µg/mL) e verde (50, 100, 200, 400 µg/mL); poços controles em sextuplicatas possuíam células HepG2 cultivadas em 1% de Tween®-20 (controle positivo), MEM + SFB 5%

(controle negativo) e o adjuvante (1, 2, 4 e 8 mg/mL de amido + MEM + SFB). O amido seco (lote FK110 #3) foi obtido da empresa DEG importação de Produtos Químicos Ltda, São Paulo, Brasil. Todos os procedimentos foram realizados com pipetas automáticas PZHTL multicanal Miltimate<sup>®</sup> modelo ME200.

#### **4.9. Análise estatística**

Os resultados foram analisados utilizando-se o *software* estatístico SAEG-UFV (2007), com as repetições (n = 6), desvios e tratamentos avaliados pela análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os tratamentos e o controle, e entre os tratamentos, foram comparadas pelo teste de Tukey, e consideradas estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Efeitos dos extratos das própolis e de *A. muricata***

Ao longo do período de cultivo (24, 48 e 72 horas), as células expostas às diferentes concentrações dos extratos das própolis vermelha (25, 50, 100 e 200 µg/mL) e verde (50, 100, 200 e 400 µg/mL) e do extrato de *A. muricata* (1, 2, 4 e 8 mg/mL) apresentaram redução da viabilidade celular de modo dose e tempo-dependente em alguns tratamentos, enquanto outros não exibiram efeito citotóxico e, neste caso, as células tumorais proliferaram normalmente.

#### **5.1.1. Efeito do excipiente das própolis sobre as células HepG2**

Com o objetivo de avaliar os efeitos dos excipientes contidos nos extratos das própolis (amido) e da graviola (maltodextrina), foram realizados cultivos celulares paralelos. Em nenhum dos tratamentos, houve efeito inibitório do excipiente dos extratos sobre o crescimento das células HepG2 em relação aos cultivos-controles, destituídos de amido ou maltodextrina.

Foram conduzidos cultivos paralelos somente com o excipiente amido, nas maiores concentrações equivalentes da própolis vermelha, ou seja, 75, 150, 300 e 600 µg/mL, e os resultados estão mostrados na Figura 36. Os dados confirmam o efeito não citotóxico do amido sobre as células do carcinoma hepatocelular; em relação ao controle, não houve interferência inibitória no crescimento das células HepG2 pelo amido em nenhuma das concentrações testadas, nos períodos avaliados (24, 48 e 72 horas).

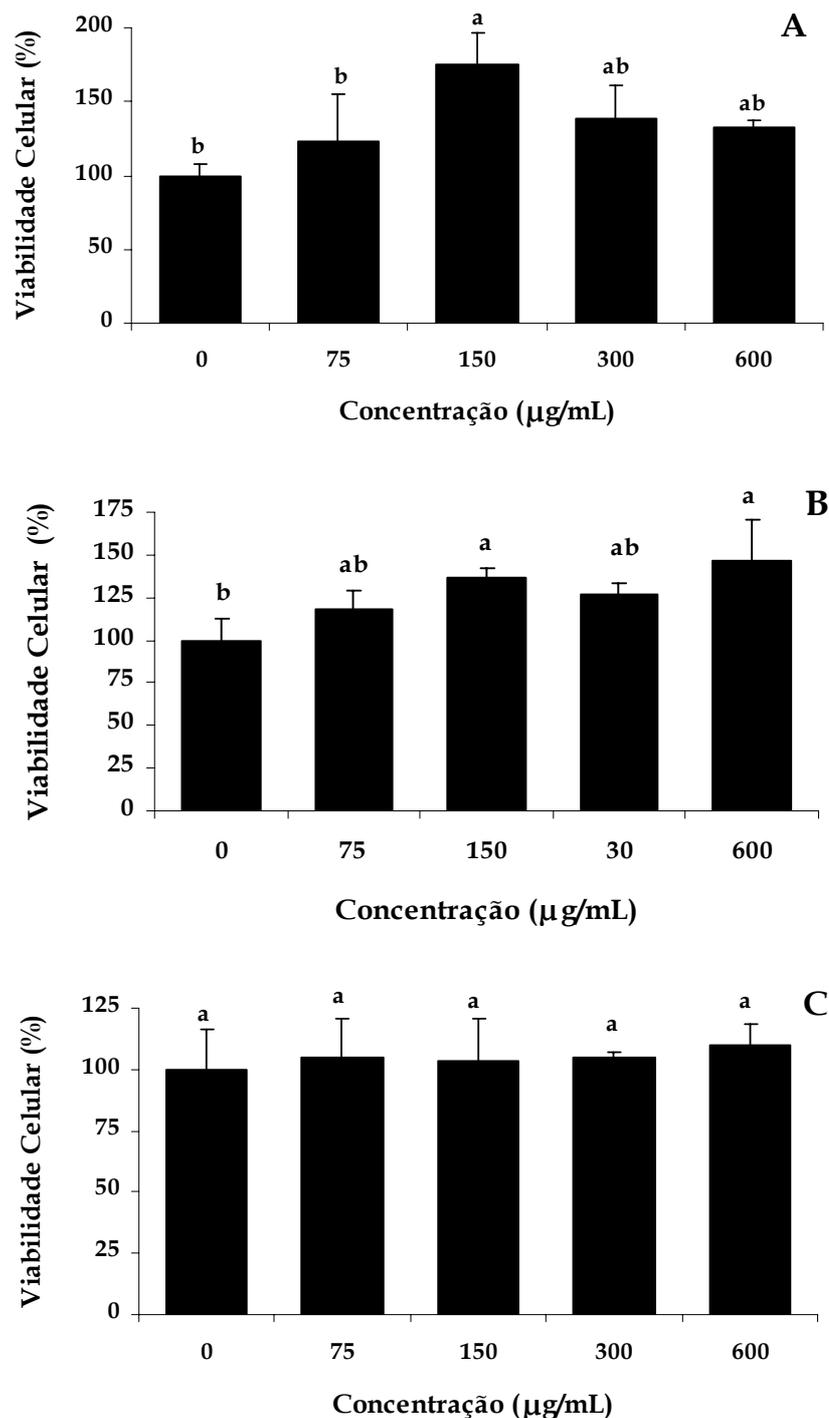


Figura 36 – Efeito do excipiente amido contido nos extratos das própolis vermelha e verde sobre a viabilidade de células HepG2. Concentrações específicas do excipiente (75, 150, 300 e 600 µg/mL) foram analisadas em relação ao controle (0 µg/mL), pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de 1 x 10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24 (A), 48 (B) e 72 h (C). Os dados são de experimentos conduzidos em sextuplicatas, e barras com letras comuns não diferem estatisticamente (p < 0,05) pelo teste Tukey.

### 5.1.2. Efeito da própolis vermelha sobre as células HepG2

No presente estudo, foi avaliada a exposição das células do carcinoma hepatocelular da linhagem HepG2 a diferentes concentrações finais do extrato de própolis vermelha (25, 50, 100 e 200 µg/mL) durante três períodos de tempo (24, 48 e 72 horas). Houve inibição significativa ( $p < 0,05$ ) da proliferação celular de modo dose e tempo-dependente para alguns grupos como mostrado na Figura 37.

Em 24 horas de cultivo (Figura 37A), todos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle (0 µg/mL). As células da linhagem HepG2 cultivadas em meio contendo extrato da própolis na concentração de 25 µg/mL, apresentaram comportamento inibitório da proliferação em até 48 horas, mas não em 72 horas, quando houve retomada na proliferação com aumento do número de células, fato que não foi observado para a concentração de 50 µg/mL. Nesta concentração, a citotoxicidade do extrato de própolis vermelha variou de 50% (24 horas) a 80% (72 horas). O tratamento com 100 µg/mL do extrato inibiu as divisões celulares em 55% no período de 24 e 92% em 72 horas de cultivo (Figura 37A, C).

Uma forte evidência do efeito citotóxico tempo-dependente foi observado quando as células tumorais foram expostas à 100 µg/mL do extrato de própolis vermelha, com percentagem de viabilidade decrescente de 46, 34 e 8% após 24, 48 e 72 horas. Na concentração de 400 µg/mL, o extrato exibiu o maior efeito citotóxico, com 92% de inibição já em 24 horas e praticamente 100% após 48 horas de cultivo.

Os valores encontrados para os cultivos das células hepatocarcinogênicas com o extrato de própolis vermelha indicam efeito anti-proliferativo para todos os tratamentos já nas primeiras 24 horas (Figura 37A), com a viabilidade celular menor que 61%. O ensaio com a concentração de 25 µg/mL do extrato não teve efeito inibitório sobre a multiplicação das células após 48 horas (Figura 37B), resultando em um aumento do número de células viáveis alcançando 80% após 72 de cultivo. Em relação aos outros tratamentos, houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) da viabilidade celular quando se utilizou concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL do extrato de própolis vermelha, sendo que o ensaio a 200 µg/mL apresentou o maior potencial citotóxico, acima de 90%, em relação ao controle (0 µg/mL), em todos os períodos de tempo analisados (Figura 38).

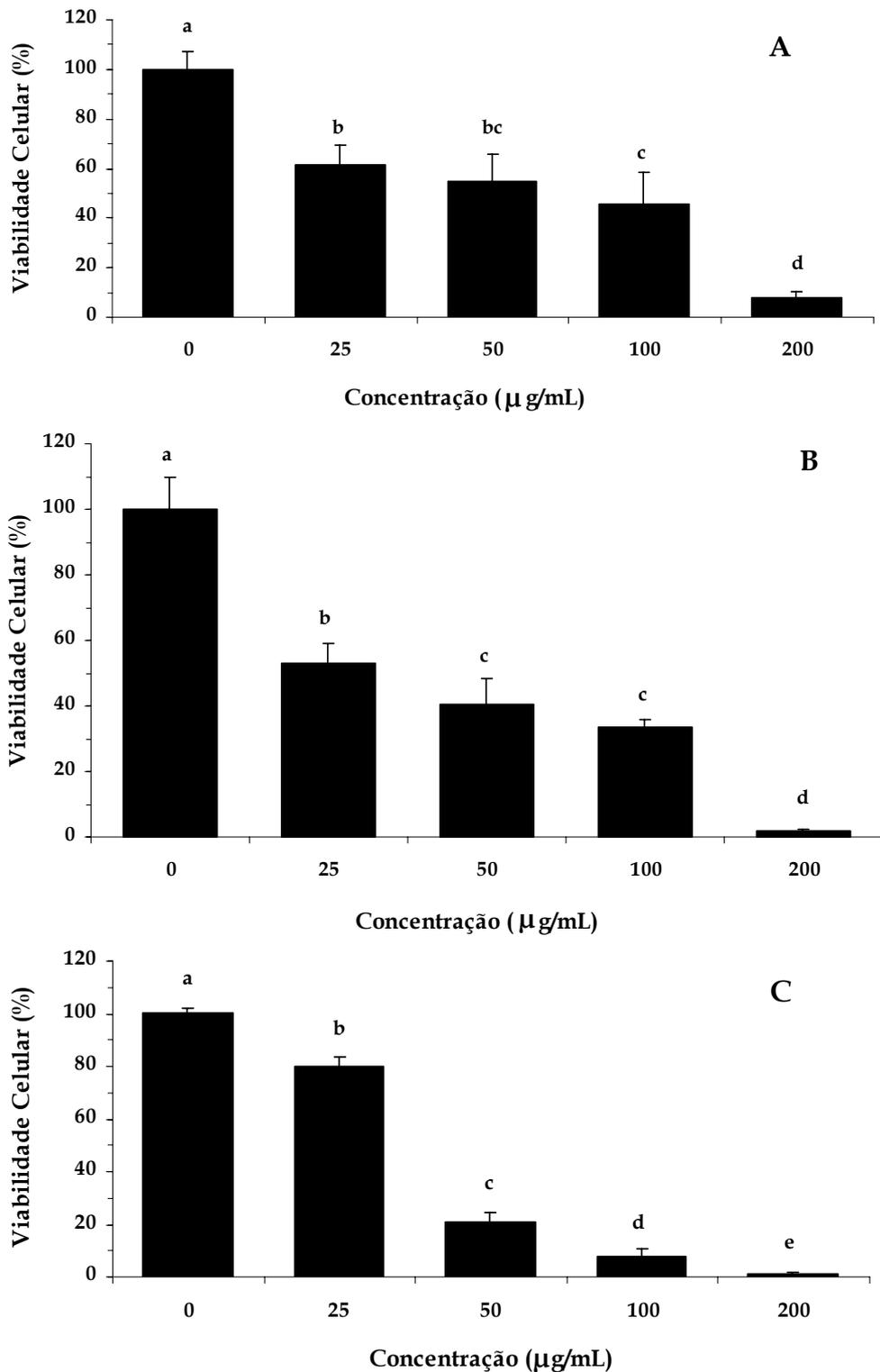


Figura 37 – Efeito do extrato de própolis vermelha sobre a viabilidade de células HepG2. Concentrações específicas do extrato (25, 50, 100 e 200 µg/mL) foram analisadas em relação ao controle (0 µg/mL), pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de 1 x 10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C). As barras com letras comuns não diferem estatisticamente (p < 0,05) pelo teste Tukey.

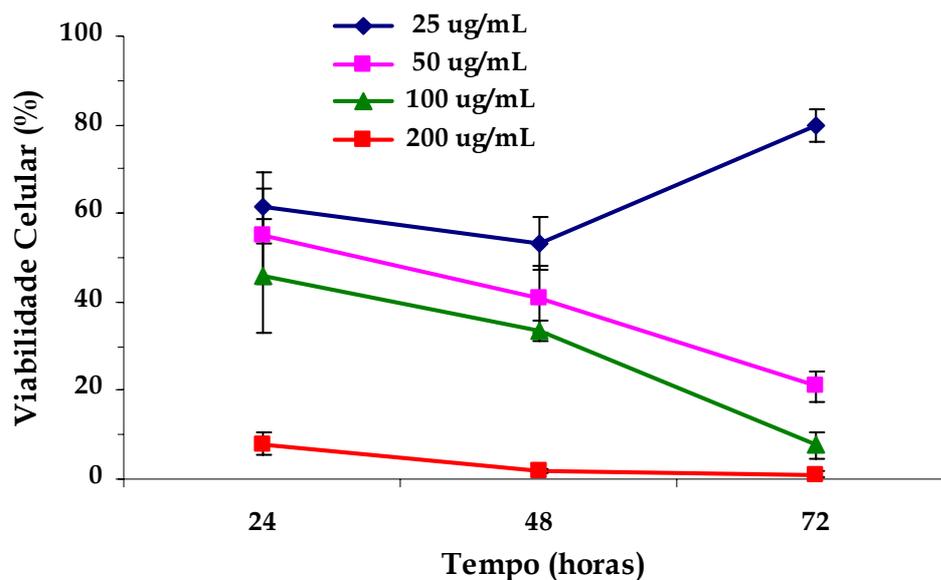


Figura 38 – Efeito do extrato de própolis vermelha sobre a viabilidade de células HepG2. Concentrações específicas do extrato (25, 50, 100 e 200 µg/mL) foram analisadas em relação ao controle (0 µg/mL), pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de  $1 \times 10^4$  células em placas de 96 poços, no período de 24, 48 e 72 horas.

### 5.1.3. Efeito da própolis verde sobre as células HepG2

A exposição das células do carcinoma hepatocelular da linhagem HepG2 às diferentes concentrações do extrato de própolis verde (50, 100, 200 e 400 µg/mL) durante os períodos de tempo avaliados (24, 48 e 72 horas) resultou em inibição da proliferação celular de modo dose e tempo-dependente, ou mesmo um aumento do número de células, para alguns grupos como mostrado na Figura 39.

Em relação ao controle, não houve diferença estatística entre os ensaios realizados nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL do extrato de própolis verde nas primeiras 24 horas de cultivo (Figura 39A), sendo que, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, houve proliferação e aumento do número de células observado após 72 horas de cultivo (Figura 39C). Apenas a exposição das células à 400 µg/mL do extrato apresentou inibição do crescimento celular de 52, 80 e 92% após 24, 48 e 72 horas, respectivamente.

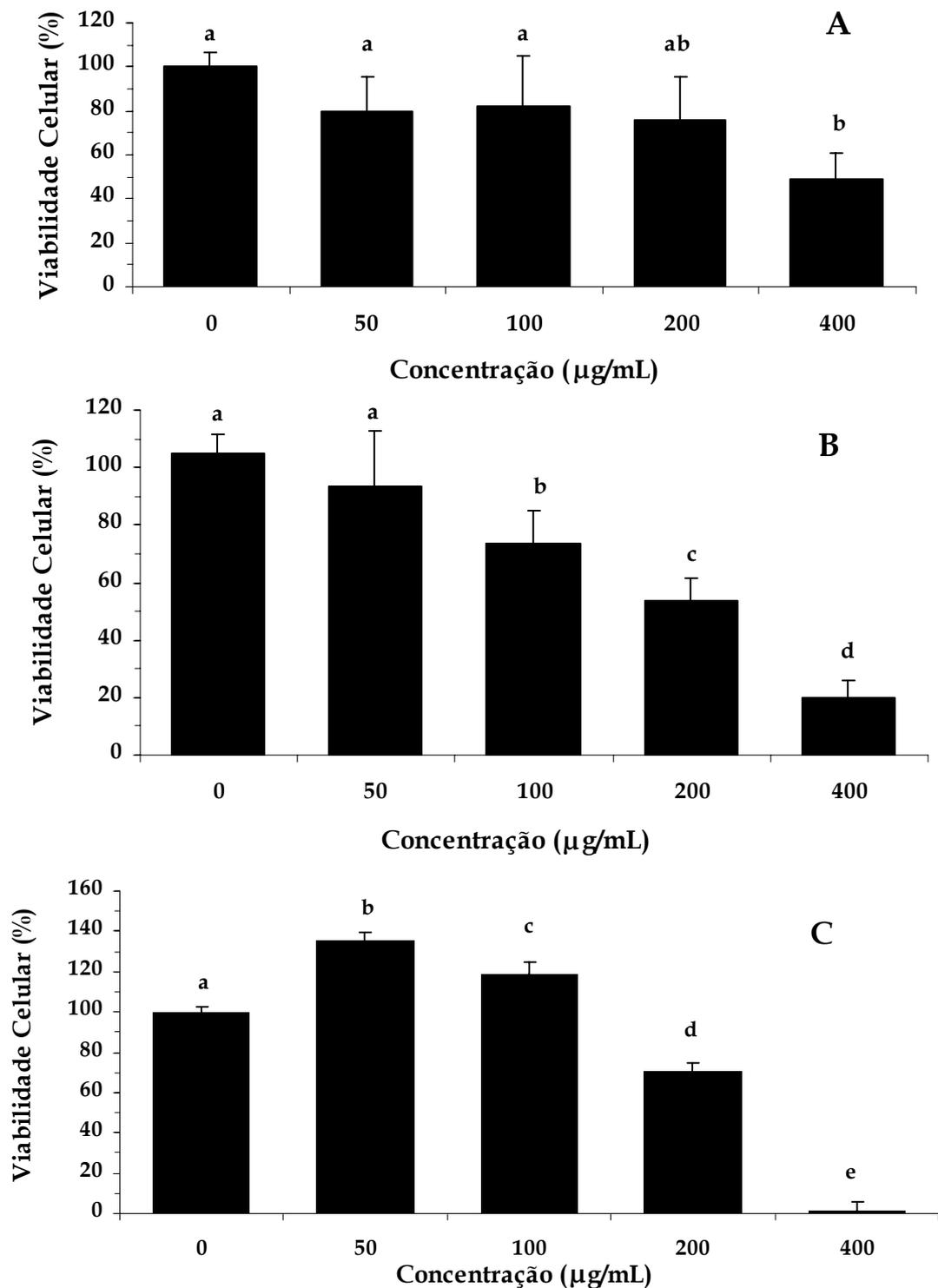


Figura 39 – Efeito do extrato de própolis verde sobre a viabilidade de células HepG2. Concentrações específicas do extrato (50, 100, 200 e 400 µg/mL) foram analisadas em relação ao controle (0 µg/mL), pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de 1 x 10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24 (A), 48 (B) e 72 h (C). Os dados são de experimentos conduzidos em sextuplicatas, e barras com letras comuns não diferem estatisticamente (p < 0,05) pelo teste Tukey.

Houve efeito citotóxico apenas para a maior concentração do extrato de própolis verde testada (400 µg/mL), após 48 horas de cultivo (Figura 40). Tratadas, as células HepG2 não exibiram inibição proliferativa nas demais concentrações após 48 horas, resultando em um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da viabilidade celular de 20 (100 µg/mL) e 35% (50 µg/mL) superiores ao controle (0 µg/mL).

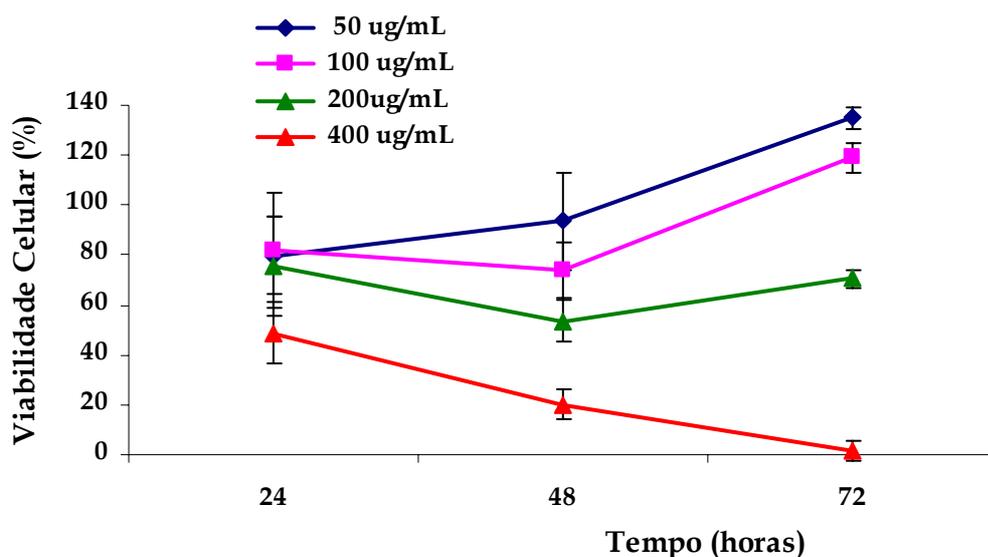


Figura 40 – Efeito dos extratos de própolis verde sobre a viabilidade de células HepG2. O cultivo foi realizado em concentrações específicas (50, 100, 200 e 400 µg/mL), avaliado pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de 1 x 10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24, 48 e 72 horas.

A exposição das células HepG2 após 72 horas de cultivo em concentrações de 50 e 100 µg/mL do extrato de própolis verde não só não exibiu efeito citotóxico como também estimulou a proliferação celular em valores superiores ao controle (135 e 119%, respectivamente).

A Figura 41 apresenta as células da linhagem HepG2 cultivadas em tratamentos-controle (sem extratos de própolis ou graviola) e em amido, e a Figura 42 apresenta as células durante o teste com o vermelho neutro.

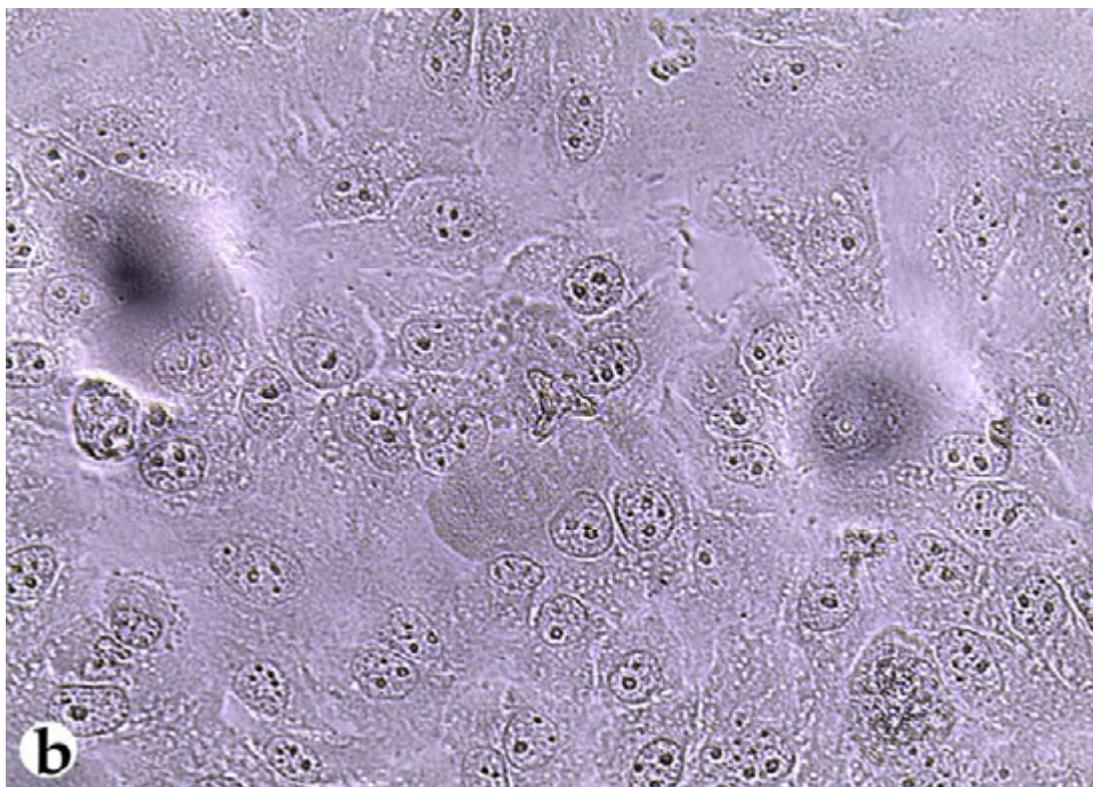
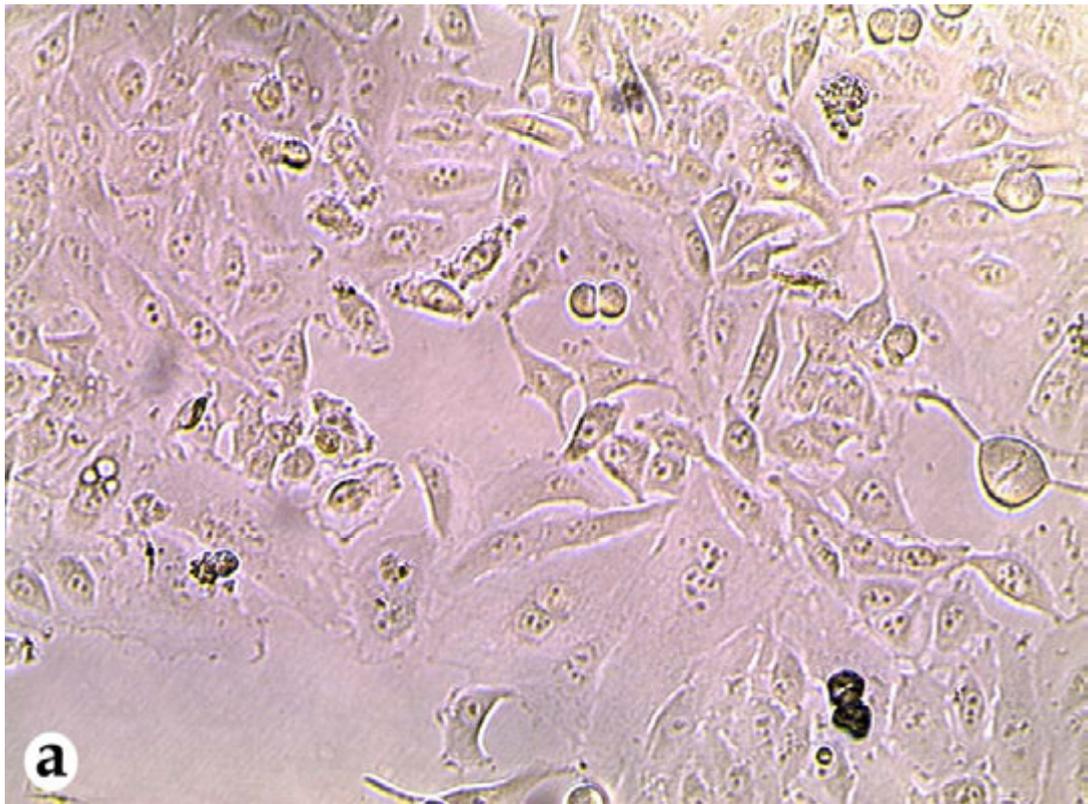


Figura 41 – Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 em um cultivo controle (a) e em cultivo com amido (b). Aumento de 200x (a) e 400x (b).

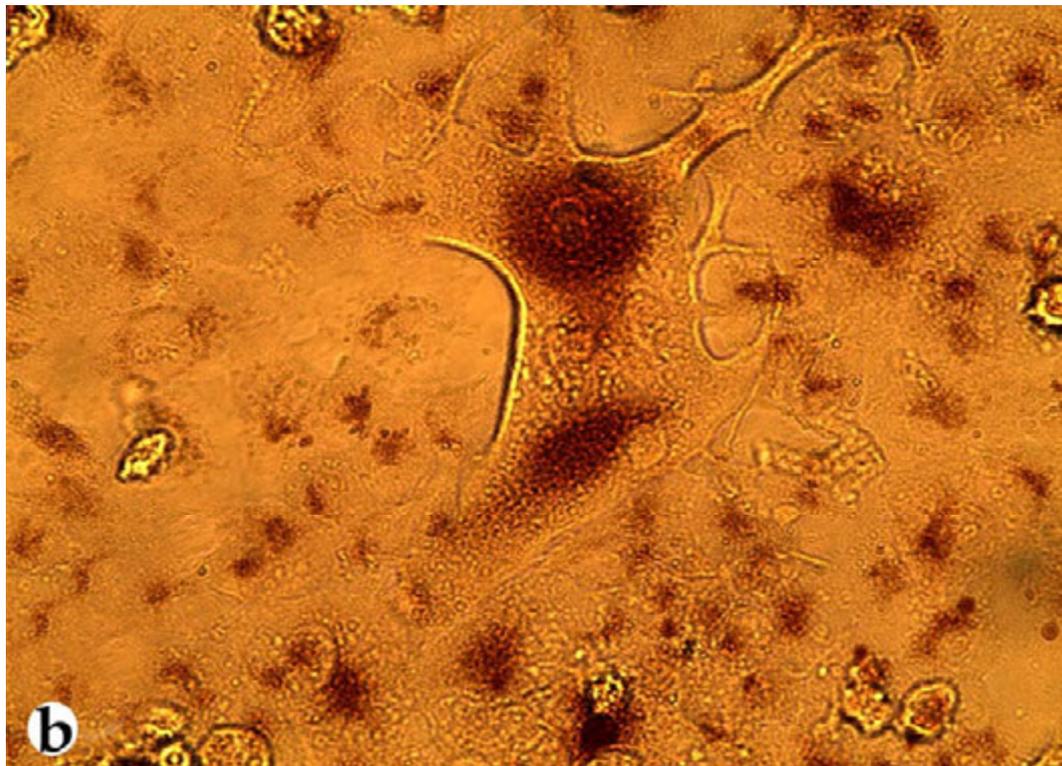
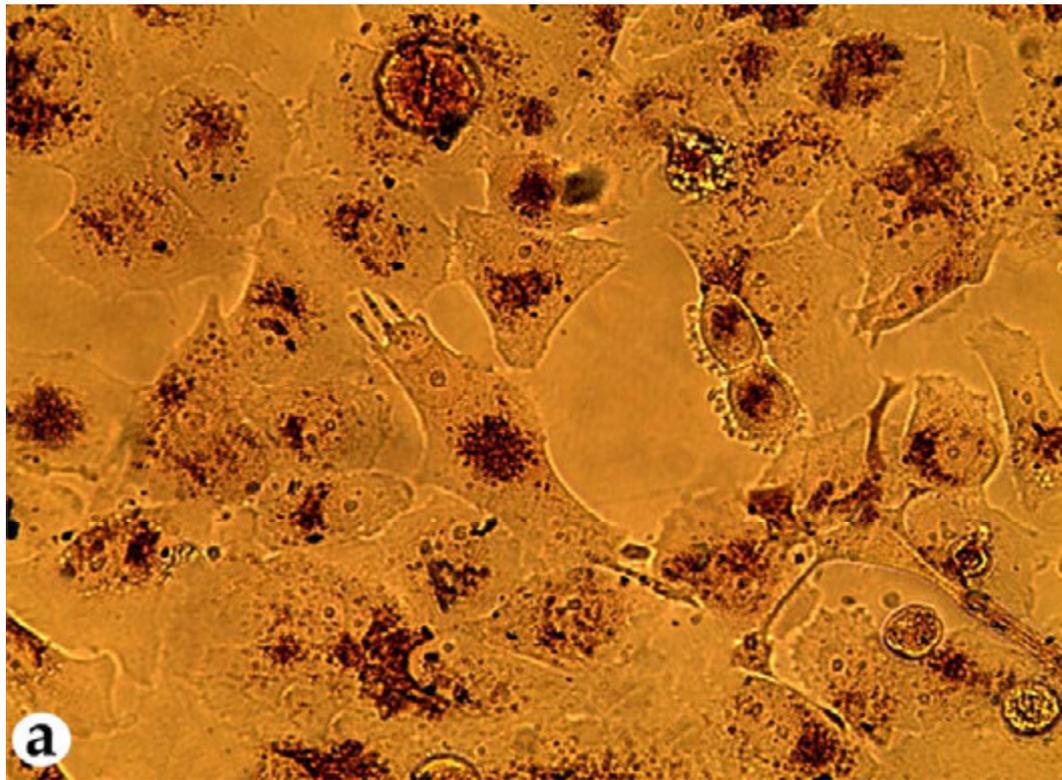


Figura 42 – Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 em cultivo após tratamento com vermelho neutro. Nota-se o acúmulo do vermelho neutro no interior das células. Aumento de 200x (a) e 400x (b).

A exposição das células do carcinoma hepatocelular aos extratos das própolis vermelha e verde provocou danos indicativos de apoptose da linhagem de células HepG2, com alterações visíveis na arquitetura celular e na organização da monocamada. As células apresentaram núcleo adensado, citoplasma recolhido e formas apoptóticas abundantes.

As imagens representadas nas Figuras 43 a 45 referem-se às células HepG2 expostas às diferentes concentrações do extrato de própolis vermelha em três períodos sequenciais dos experimentos.

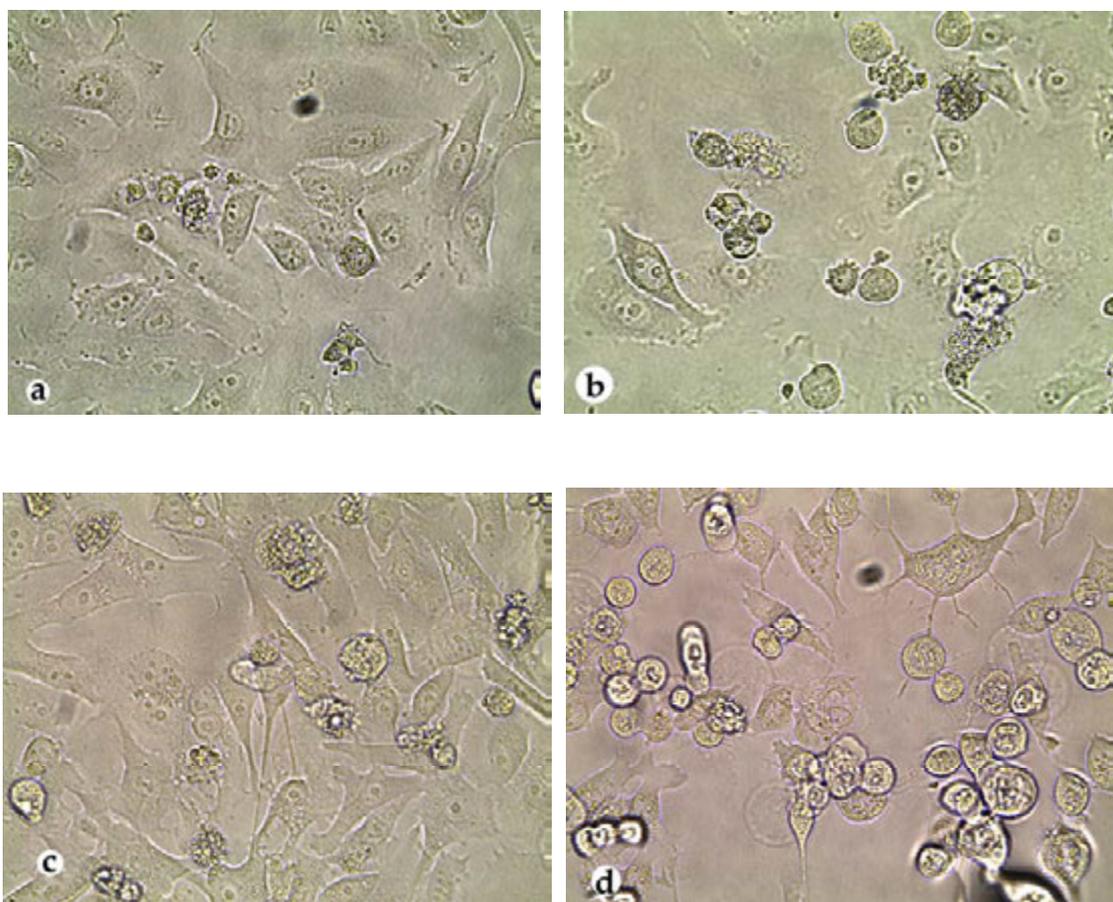


Figura 43 – Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 expostas ao extrato de própolis vermelha. As células foram cultivadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 25 (a), 50 (b), 100 (c) e 200 µg/mL (d), após 24 horas de exposição. Aumento de 400x.

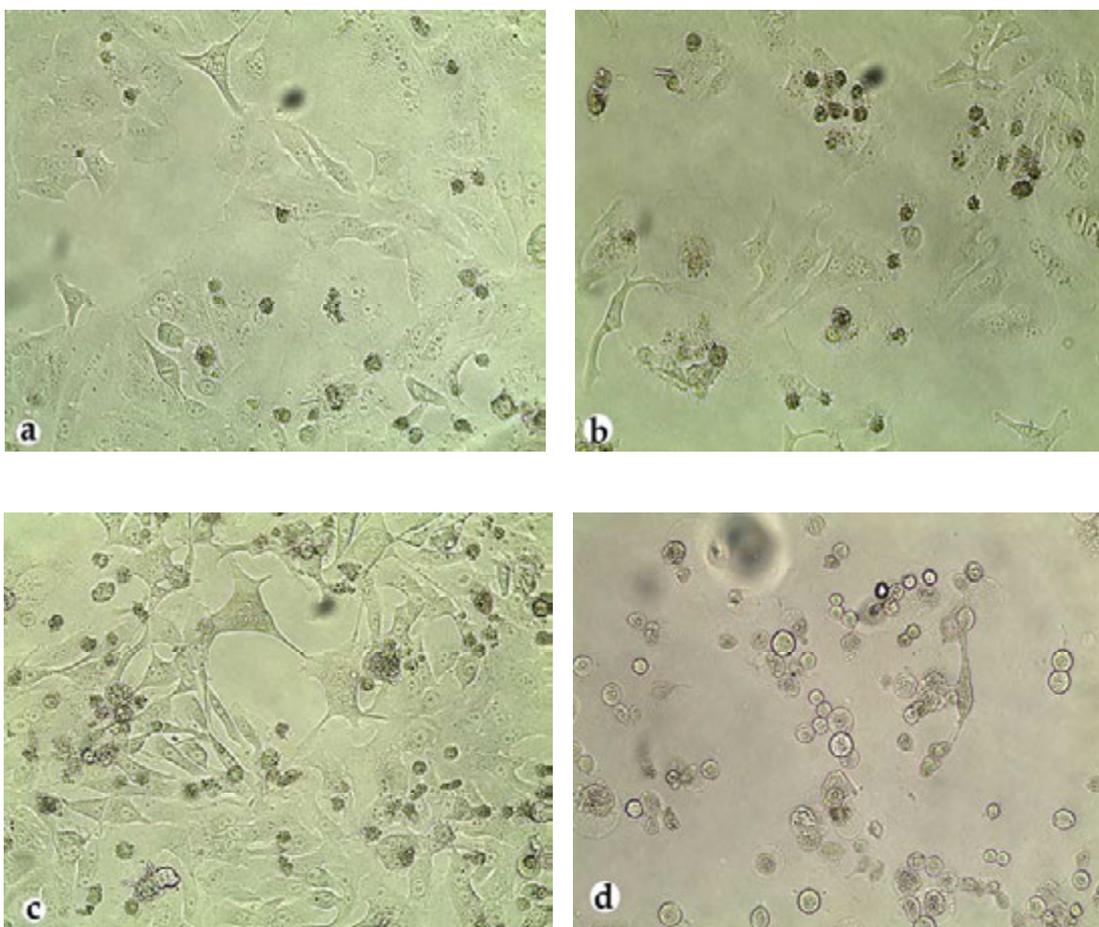


Figura 44 – Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 expostas ao extrato de própolis vermelha. As células foram cultivadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 25 (a), 50 (b), 100 (c) e 200 µg/mL (d), após 48 horas de exposição. Aumento de 200x.

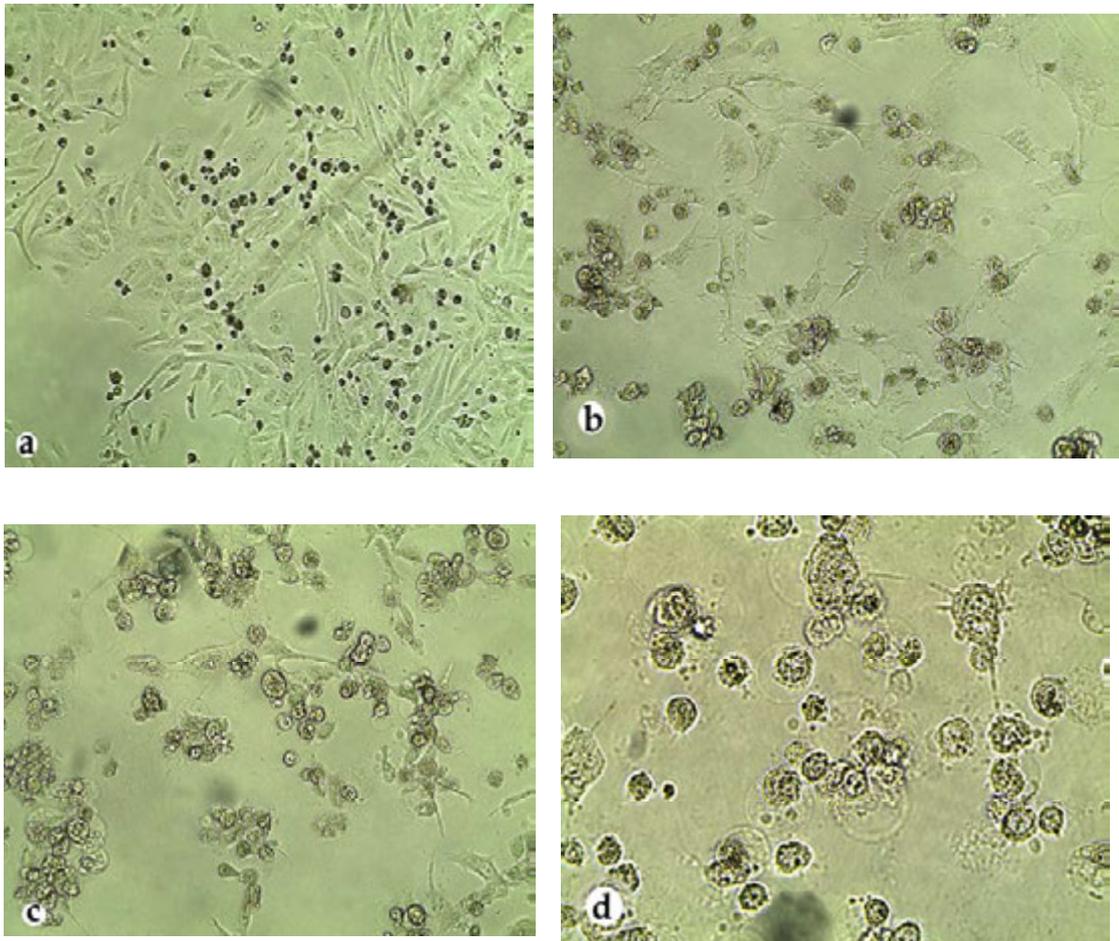


Figura 45 – Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 expostas ao extrato de própolis vermelha. As células foram cultivadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 25 (a), 50 (b), 100 (c) e 200 µg/mL (d), após 72 horas de exposição. Aumento de 200x (a, b, c) e 400x (d).

As imagens representadas nas Figuras 46 a 48 são de células HepG2 expostas às diferentes concentrações do extrato de própolis verde em três períodos sequenciais dos experimentos.

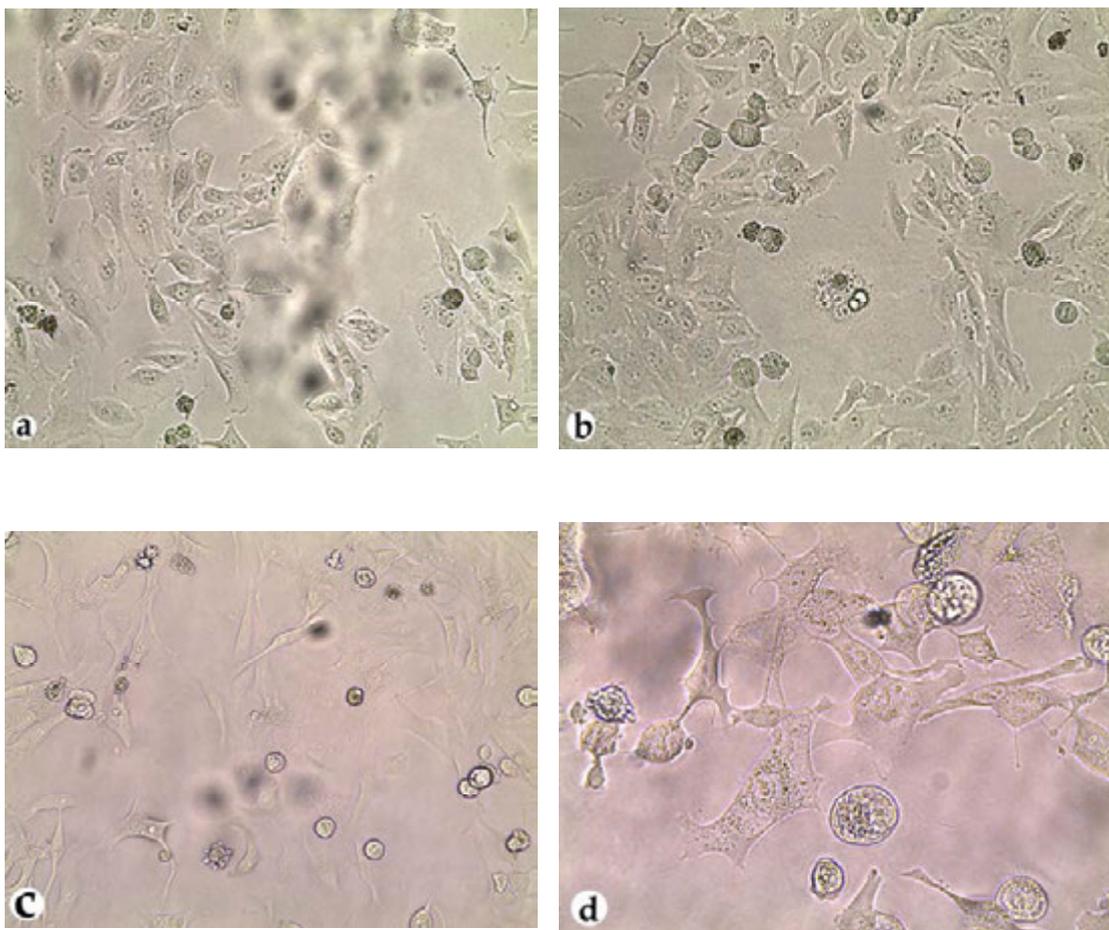


Figura 46 – Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 expostas ao extrato de própolis verde. As células foram cultivadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 50 (a), 100 (b), 200 (c) e 400 µg/mL (d), após 24 horas de exposição. Aumento de 200x (a, b, c) e 400x (d).

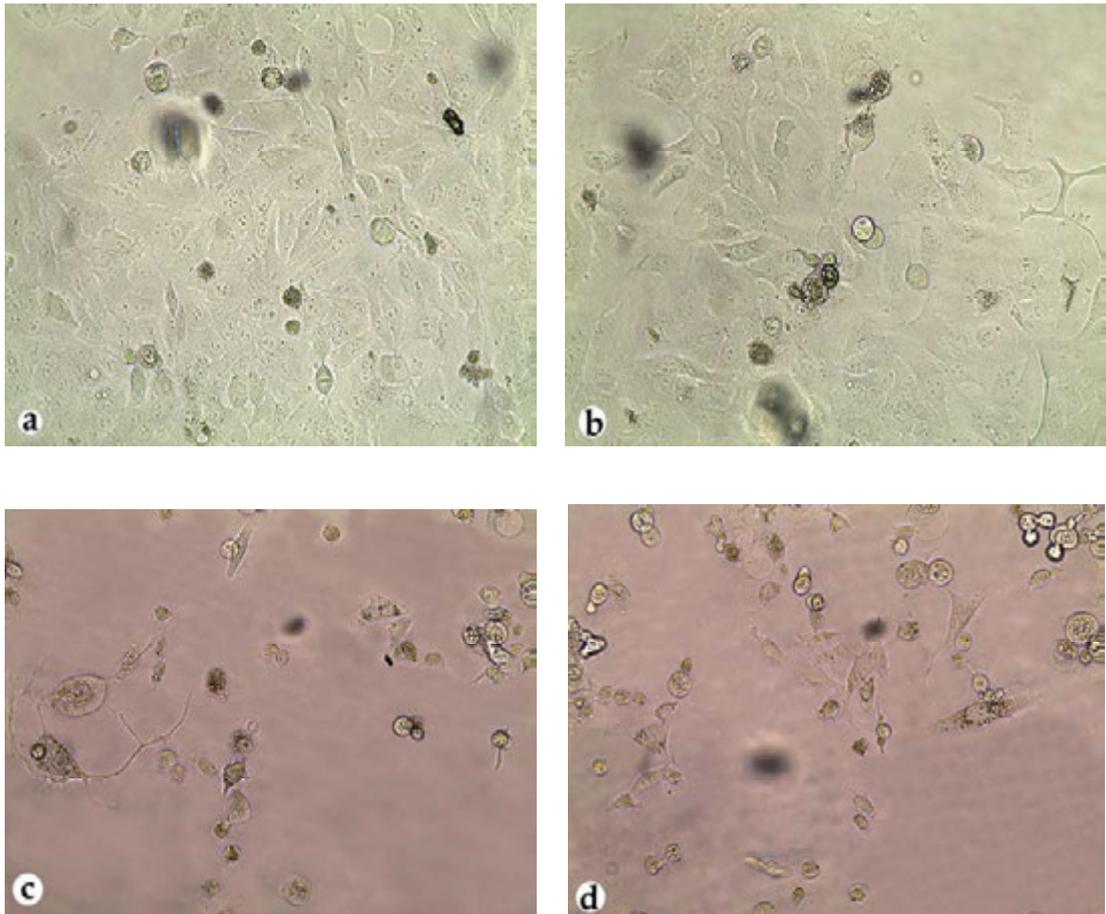


Figura 47 – Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 expostas ao extrato de própolis verde. As células foram cultivadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 50 (a), 100 (b), 200 (c) e 400 µg/mL (d), após 48 horas de exposição. Aumento de 200x.

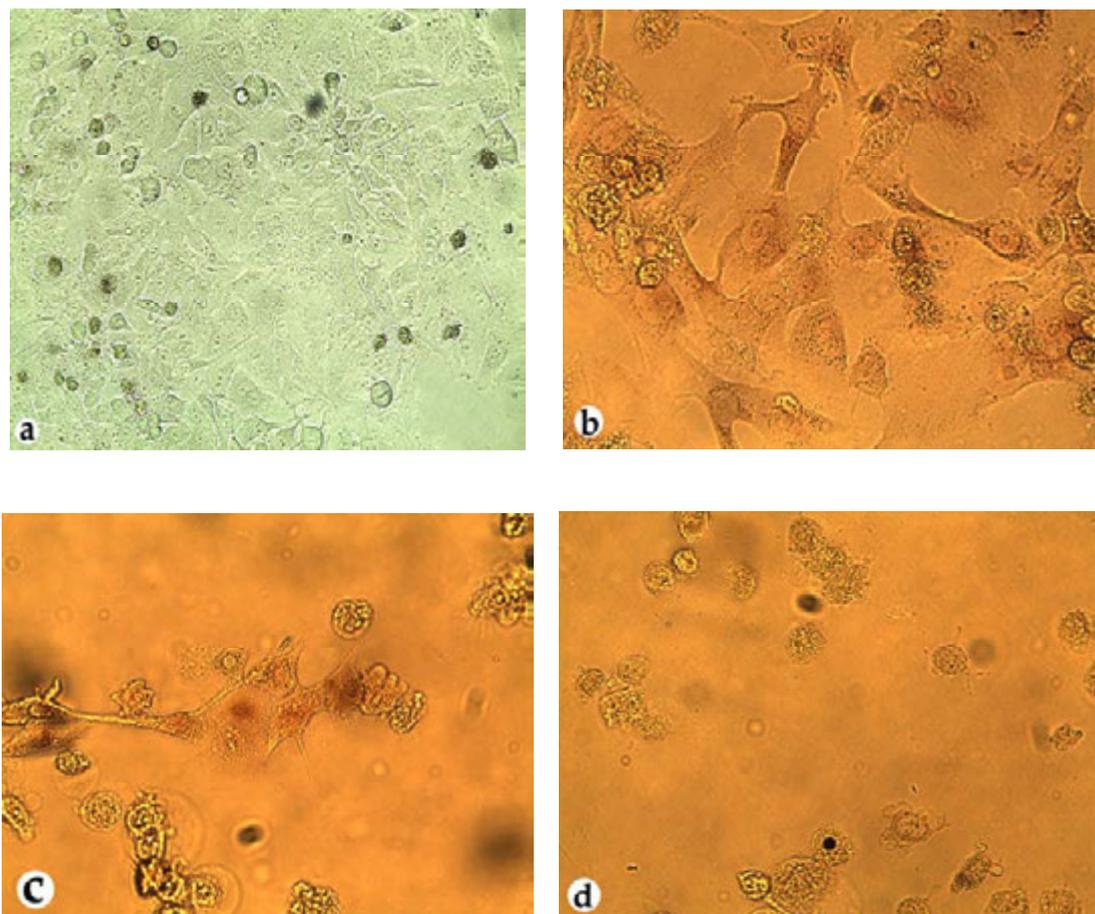


Figura 48 – Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 expostas ao extrato de própolis verde. As células foram cultivadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 50 (a), 100 (b), 200 (c) e 400 µg/mL (d), após 72 horas de exposição; imagens (b), (c) e (d) em vermelho neutro. Aumento de 200x.

O extrato da própolis verde utilizado nos ensaios experimentais do presente trabalho pertence ao “Grupo 12” na Classificação Brasileira de Própolis (Apêndice), cuja origem botânica é identificada como *Baccharis dracunculifolia*, e o extrato da própolis vermelha, pertencente ao “grupo 13”, cuja origem botânica é identificada como *Dalbergia ecastophyllum*.

A própolis verde apresentou em seu perfil químico (Apêndice), dentre outros componentes, concentrações elevadas de artepilin C, composto fenólico terpênico com forte atividade antitumoral comprovada (AKO et. al., 2003; ORSOLIC et. al., 2005; AHN et. al., 2007; MESSERLI et. al., 2009), também baccarina e pinocembrina, flavonoides com atividade

anticarcinogênica também conhecida (KUPCHAN et. al., 1976; KUMAR et. al., 2007a).

A própolis vermelha testada apresentou em seu perfil químico (Apêndice), dentre outros componentes, e além de pinocembrina, concentração razoável de pinobanksina-3-acetato, flavonol com atividade antitumoral conhecida (KUMAR et. al., 2007a; SANTOS et. al., 1998).

A própolis vermelha exibiu melhores resultados de citotoxicidade em relação à própolis verde, mesmo sendo as concentrações experimentais metade daquelas utilizadas para a própolis verde. Curiosamente, a própolis verde possui teores muito maiores de determinados compostos, como rutina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, quercetina e pinocembrina, também presentes na própolis vermelha. Essa constatação sugere uma menor participação destes flavonoides específicos no efeito antiproliferativo das células HepG2 para ambos os extratos, resultado que pode ser atribuído, portanto, a outros flavonoides presentes nas amostras.

Embora os extratos das própolis utilizados apresentassem concentrações relativas de seus constituintes químicos muito diferentes, as propriedades biológicas que exibiram durante os ensaios experimentais *in vitro* podem ser atribuídas aos princípios bioativos individuais de seus componentes e ao sinergismo bioquímico entre eles, resultando no efeito antitumoral verificado na linhagem de células hepatocarcinogênica HepG2 utilizada nos tratamentos.

Os mecanismos bioquímicos que resultaram na inibição da proliferação e morte celular podem ser explicados através de algumas vias intracelulares já conhecidas e atribuídas a alguns dos constituintes dos extratos testados, e que serão descritos a seguir.

Inúmeras pesquisas confirmam os efeitos antitumorais da própolis verde (BANSKOTA et. al., 1988; 2000; AKO et. al., 2003; BÚFALO et. al., 2007; MESSERLI et. al., 2009) e vermelha (ALENCAR et. al., 2007; AWALE et. al., 2008) originadas de várias partes do mundo e especialmente do Brasil, apresentando efeitos antiproliferativo e apoptótico (BANSKOTA et. al., 2002; CHEN et. al., 2004; 2007a; 2007b; ASO et. al., 2004; KUNIMASA et. al., 2009; SZLISZKA et. al., 2009).

Apigenina, daidzeina, biocanina A, canferol, kanferida, quercetina, rutina, luteolina, crisina e bacarina, flavonoides presentes nos extratos das própolis vermelha e verde, exibem propriedades anticâncer confirmadas em diferentes linhagens de células (KUNTZ et. al., 1999; WANG et. al., 1999; AKAO et. al., 2003; JAGANATHAM et. al., 2009).

Dentre os flavonoides presentes nos extratos das própolis vermelha e verde, aqueles que exibem conhecidamente a mais elevada ação antitumoral, envolvem o mecanismo bioquímico da via das caspases e apoptose como as principais formas de ação: a indução intracelular da atividade de caspase-3 foi o evento inicial da via apoptótica, precursor da fragmentação do DNA. Além da ativação da caspase-3, flavonoides como apigenina, quercetina e canferol afetaram o potencial transmembrana mitocondrial, com liberação do citocromo c ao citoplasma e ativação da procaspase-9, resultando em apoptose, na seguinte ordem de potencialidade: apigenina > quercetina > canferol em linhagens de células da leucemia (HL-60) tratadas com 60 µM destes flavonoides (KUNTZ et. al., 1999).

Há claras correlações entre a estrutura química do flavonoide e sua interação com a membrana mitocondrial, sendo os flavonoides pinocembrina e a quercetina os mais potentes inibidores da respiração celular e desacoplador mitocondrial, respectivamente (SANTOS et. al., 1988).

Artepilin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), o maior constituinte químico do extrato da própolis verde (153,48 mg/g) utilizada nos ensaios, apresenta marcadamente propriedades antitumorais *in vitro* e *in vivo* (AKO et. al., 2003; AHN et. al., 2007). A exposição de células da linhagem do câncer de cólon (WiDr) provocou interrupção do ciclo celular nas fases G0/G1, envolvendo decréscimo na atividade cinase do complexo ciclina D/kinase 4 ciclino-dependente e nos níveis da proteína retinoblastoma (Rb) fosforilada, com estímulo da expressão de Cip1/p21, relacionado à inibição da progressão do ciclo celular em G0/G1 (SHIMIZU et. al., 2005).

Bacarina (ácido 3-prenil-4-(2,3-dihidrocinnamoiloxi) cinâmico), o segundo constituinte químico mais abundante do extrato da própolis verde (64,96 mg/g), exibe atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, e o efeito citotóxico resulta na apoptose celular (AKAO et. al., 2003; MISHIMA et. al.,

2005a; 2005b). Bacarina, isolada da própolis verde de Minas Gerais, exibiu efeito inibitório do crescimento, genotoxicidade e citotoxicidade *in vitro* em várias linhagens de células tumorais (sarcoma S-180; leucemia HL-60 e U-937). Ensaio *in vivo* mostraram o potencial antitumoral de bacarina, com supressão significativa do crescimento da massa tumoral em ratos tratados via oral (MISHIMA et. al., 2005a). Células da leucemia mieloide humana (HL-60) foram expostas a extratos aquosos e etanólicos de própolis verde de Minas Gerais (contendo, dentre outros, bacarina e artepilin C como os principais constituintes) e a citotoxicidade resultou em apoptose celular; houve aumento ou supressão da expressão de alguns genes (MISHIMA et. al., 2005b).

Pinocembrina (5,7-Dihidroxi-flavanona), um dos constituintes químicos abundante nos extratos de própolis verde (50,82 mg/g) e vermelha (6,9 mg/g), exibe propriedade citotóxica contra células tumorais. Sua ação está na indução da perda do potencial de membrana mitocondrial e subsequente liberação do citocromo C com ativação das caspases-9 e -3, efeitos apoptóticos verificados em células tumorais de cólon HCT-116 (KUMAR et. al., 2007a).

Pinobanksina (3,5,7-trihidroxi-flavavona) interfere no processo de oxidação de lipídios na membrana mitocondrial de hepatócitos (SANTOS et. al., 1998) e exibe atividade antitumoral em linhagens do carcinoma do cólon (26-L5), fibrosarcoma (HT-1080), melanoma (B16-L16) e adenocarcinoma de pulmão (A549) quando expostas a extrato de própolis contendo, dentre outros constituintes, pinobanskina (BANSKOTA et. al., 2002).

Apigenina (4',5,7-trihidroxi-flavona) é um flavonoide com propriedades antitumorais conhecidas (LEPLEY et. al., 1999), também presente no extrato de própolis verde utilizada nas experimentações. Células hepatocarcinogênicas HepG2 cultivadas com apigenina (4',5,7-trihidroxi-flavona) na concentração de 7  $\mu$ M exibem redução de 50% da viabilidade e morte celular por apoptose, além de elevar o nível intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) mediado pela enzima NADPH oxidase (CHOI et. al., 2007).

Rutina é um flavonol com um elevado potencial angiopreventivo em tumores sólidos e, juntamente com Canferol, inibiu a liberação de fatores angiogênicos como foi verificado em células tumorais de mama (MDA) e cérebro (U-118, U-343) (SCHINDLER, MENTLEIN, 2006).

Quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) é um flavonol que apresenta forte poder inibitório em células HepG2, com redução da viabilidade celular acima de 80%, com mudanças morfológicas apoptóticas evidentes: condensação da cromatina, encolhimento da célula, superfície celular irregular por alterações no núcleo e na membrana plasmática, forma celular ovalada ou arredondada, formando corpos apoptóticos. Expostas por 4 horas a 100  $\mu$ M de quercetina, as células da linhagem HepG2 apresentaram fragmentação do DNA, e após 18 horas, a maioria das células interrompeu o ciclo celular em G1 (RAMOS et. al., 2005); à morte celular ocorreu de forma dose-dependente, por ativação da cascata de caspases (caspases-3 e -9) com maiores efeitos na concentração de 50  $\mu$ mol/L de quercetina (GRANADO-SERRANO et. al., 2006). Quercetina também interfere nos níveis de ATP nas mitocôndrias de células HepG2, com substancial inibição da cadeia respiratória, indicando seu alto potencial de indução à apoptose ou necrose celular (SANTOS et. al., 1988; DORTA et. al., 2005).

Galangina (3,5,7-trihidroxi-flavona) exibe efeito antiproliferativo em linhagens de células leucêmicas (HL-60) com acúmulo de células estagnadas na fase G1 (100  $\mu$ M) e redução na viabilidade após exposição em 100  $\mu$ M por 24 horas, apresentando evidente fragmentação do DNA. O efeito apoptótico evidente e ativação de caspase-3 foi verificado após 24 horas de cultivo das células em 50  $\mu$ M de galangina. O mecanismo-chave da citotoxicidade está no estresse oxidativo intracelular provocado por espécies reativas de oxigênio induzido pelo flavonoide (BESTWICK, MILNE, 2006). Galangina também interfere nos níveis de ATP nas mitocôndrias atuando como desacoplador mitocondrial, indicando seu alto potencial de indução à apoptose ou necrose celular (SANTOS et. al., 1988; DORTA et. al., 2005).

Crisina (5,7-dihidroxi-flavona), um flavonoide presente no extrato da própolis verde utilizada nos ensaios, também exibe efeito antiproliferativo sobre células tumorais da linhagem C6-Glioma. Após 72 h de cultivo em 50  $\mu$ M de crisina, 90% da proliferação de células C6-Glioma foi inibida. O nível de fosforilação da proteína retinoblastoma Rb sob efeito da crisina (30  $\mu$ M) e o nível do inibidor quinase ciclino-dependente ( $p21^{waf1/cip1}$ ) decresceram significativamente, sem alteração nos níveis da proteína p53. Houve inibição também da atividade das enzimas ciclino-dependentes 2 (CDK2) e 4 (CDK4) em células tumorais do cérebro (C6-Glioma) tratadas com crisina, com parada na fase G1 do ciclo celular (WENG et. al., 2005). Crisina também exibiu efeito apoptótico com fragmentação do DNA de células tumorais da leucemia (U937) através da ativação da via das caspases com decréscimo no nível de caspase-3 e inativação da via Akt. A inibição da fosforilação de Akt pelo inibidor P13K aumentou sensivelmente o processo apoptótico. Quando tratadas, as células estacionaram o ciclo celular na fase G1 após 12 horas (WOO et. al., 2004). ZHANG et. al. (2004) potencializaram os efeitos apoptóticos celulares da crisina sintetizando derivados fosforilados que exibiram maior redução na viabilidade de células (HeLa) do câncer cervical humano quando comparados à forma não modificada do flavonoide. Outros derivados da crisina, modificados por alquilação, halogenação, nitração, metilação, acetilação e trifluorometilação também apresentaram efeito anticarcinogênico mais elevado contra linhagens de células do adenocarcinoma gástrico (SGC-7901) e colorretal (HT-29) (ZHENG et. al., 2003).

Isoliquiritigenina (4,2',4'-trihidroxichalcona), um flavonoide presente em quantidades relativas no extrato da própolis vermelha (3,2 mg/g), exibe propriedade antiproliferativa em linhagens celulares hepatocarcinogênicas HepG2 e induz apoptose de várias linhagens celulares tumorigênicas (IWASHITA et. al., 2000; MA et. al., 2001; HSU et. al., 2004; HSU et. al., 2005; JUNG et. al., 2006a; KIM et. al., 2008; YOSHIDA et. al., 2008).

## **5.2. Efeitos do extrato de folhas de *A. muricata* sobre a linhagem HepG2**

### **5.2.1. Efeito do excipiente do extrato de *A. muricata* sobre as células HepG2**

Com o objetivo de avaliar o efeito celular do veículo maltodextrina contido no extrato de *A. muricata*, foram realizados cultivos paralelos somente com o excipiente, nas concentrações equivalentes (1, 2, 4 e 8 mg/mL), e os resultados estão mostrados na Figura 51.

Observou-se que, em relação ao controle, não houve interferência inibitória no crescimento das células HepG2 pela maltodextrina em nenhuma das concentrações testadas nos períodos avaliados (24, 48 e 72 horas), o que confirma seu efeito não citotóxico sobre as células, em relação ao controle, destituído de maltodextrina (Figura 49).

Sendo a maltodextrina um carboidrato energético, derivado do amido de milho, a maior oferta de energia disponível explica a intensa proliferação celular nos tratamentos em relação ao controle, onde apenas os nutrientes do meio de cultura (MEM + SFB) estavam disponibilizados para a mesma quantidade de células.

### **5.2.2. Efeito do extrato de *A. muricata* sobre as células HepG2**

A exposição das células tumorais do carcinoma hepatocelular às diferentes concentrações do extrato das folhas de *A. muricata* (1, 2, 4 e 8 mg/mL) durante os períodos de tempo avaliados (24, 48 e 72 horas) resultou em decréscimo da viabilidade celular de modo dose e tempo-dependente em todos os tratamentos (< 45%) quando comparados ao cultivo controle (0 mg/mL), como mostrado na Figura 50.

Foi observada redução na viabilidade celular em 18% quando as células hepatocarcinogênicas foram expostas a concentrações de 4 e 8 mg/mL do extrato de graviola em todos os períodos de tempo analisados (Figura 50A, B, C). O maior potencial citotóxico foi verificado para a concentração de 8 mg/mL, com inibição de 86% após 24 horas (Figura 50A) e aproximadamente 95% após 48 horas de cultivo (Figura 50B).

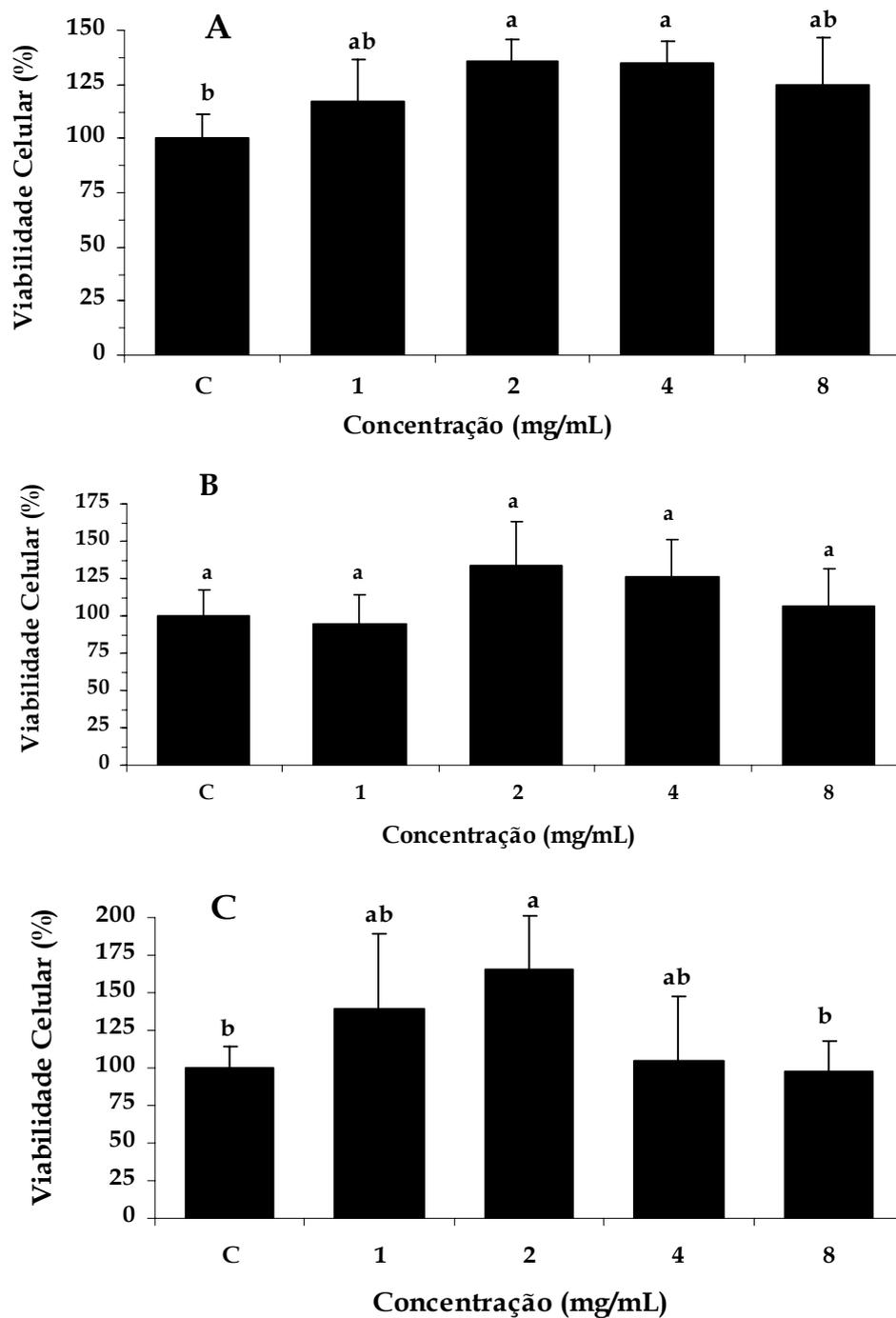


Figura 49 – Efeito do excipiente maltodextrina do extrato de *A. muricata* sobre a viabilidade de células HepG2. Concentrações específicas (1, 2, 4 e 8 mg/mL) foram analisadas em relação ao controle (C), pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de 1 x 10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C). Os dados são de experimentos conduzidos em sextuplicatas, e barras com letras comuns não diferem estatisticamente (p < 0,05) pelo teste Tukey.

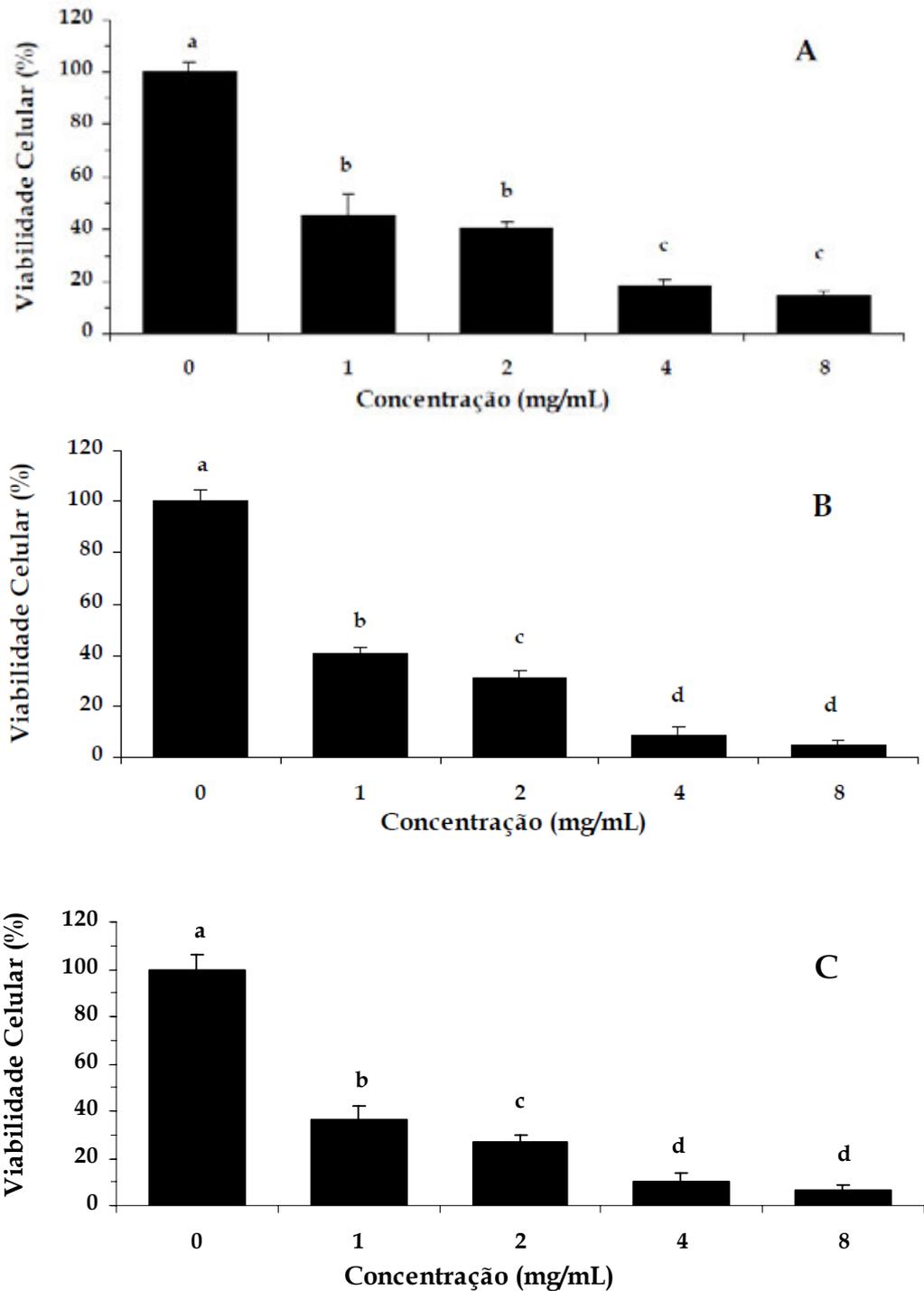


Figura 50 – Efeito do extrato de *A. muricata* sobre a viabilidade de células HepG2. Concentrações específicas (1, 2, 4 e 8 mg/mL) foram analisadas em relação ao controle (0 mg/), pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de 1 x 10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C). Os dados são de experimentos conduzidos em sextuplicatas, e barras com letras comuns não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste Tukey.

Os tratamentos com o extrato de folhas de *A. muricata* (Figura 51) forneceram resultados indicativos do efeito citotóxico sobre as células tumorais HepG2, em todos os períodos de tempo analisados, com um decréscimo da viabilidade celular de até 45% logo nas primeiras 24 h de cultivo. Para as doses do extrato de 1 e 2 mg/mL, o percentual de viabilidade celular foi estatisticamente diferente após 48 e 72 de cultivo, com os maiores valores inibitórios para a concentração de 2 mg/ml, alcançando até 75% no fim do período de cultivo, em relação à menor dose do extrato. Os maiores efeitos antiproliferativos foram verificados nos ensaios a 4 e 8 mg/mL do extrato, não havendo diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, durante as 24, 48 e 72 h, com potencial de inibição variando de 82 a 96%.

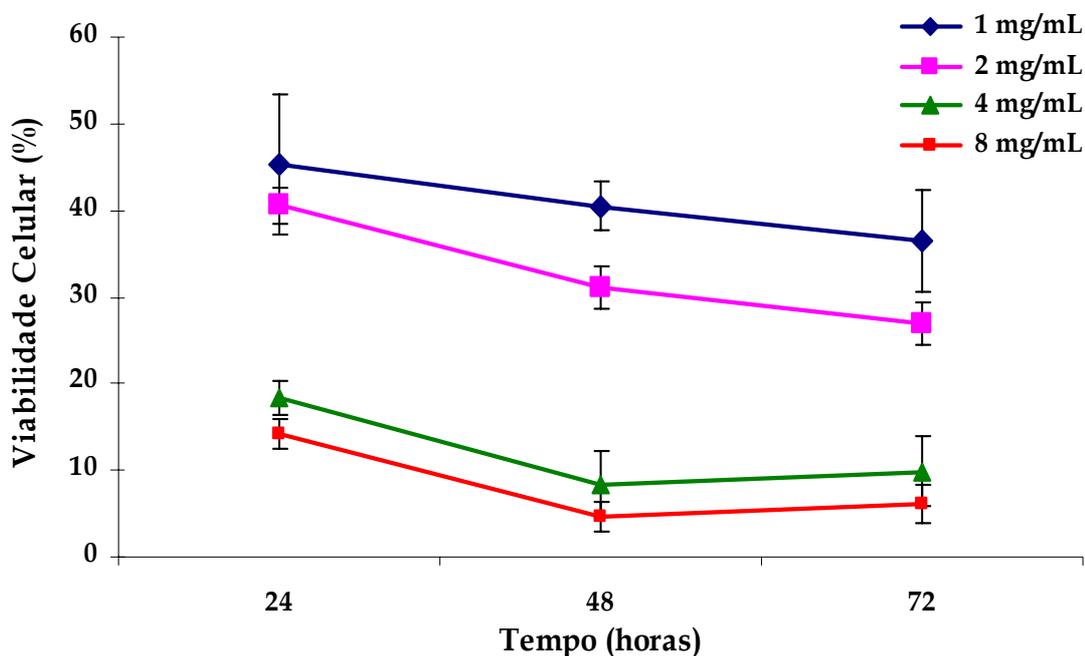


Figura 51 – Efeito dos extratos de *A. muricata* sobre a viabilidade de células HepG2. O cultivo foi realizado em concentrações específicas (1, 2, 4 e 8 mg/mL) e avaliado pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de  $1 \times 10^4$  células em placas de 96 poços, no período de 24, 48 e 72 horas.

A exposição das células do carcinoma hepatocelular ao extrato da *A. muricata* provocou danos indicativos de apoptose da linhagem de células HepG2, com alterações visíveis na arquitetura celular e na organização da monocamada. As células apresentaram núcleo adensado, citoplasma recolhido e formas apoptóticas abundantes.

A Figura 52 apresenta células HepG2 cultivada em meio contendo o excipiente do extrato de *A. muricata*, maltodextrina.

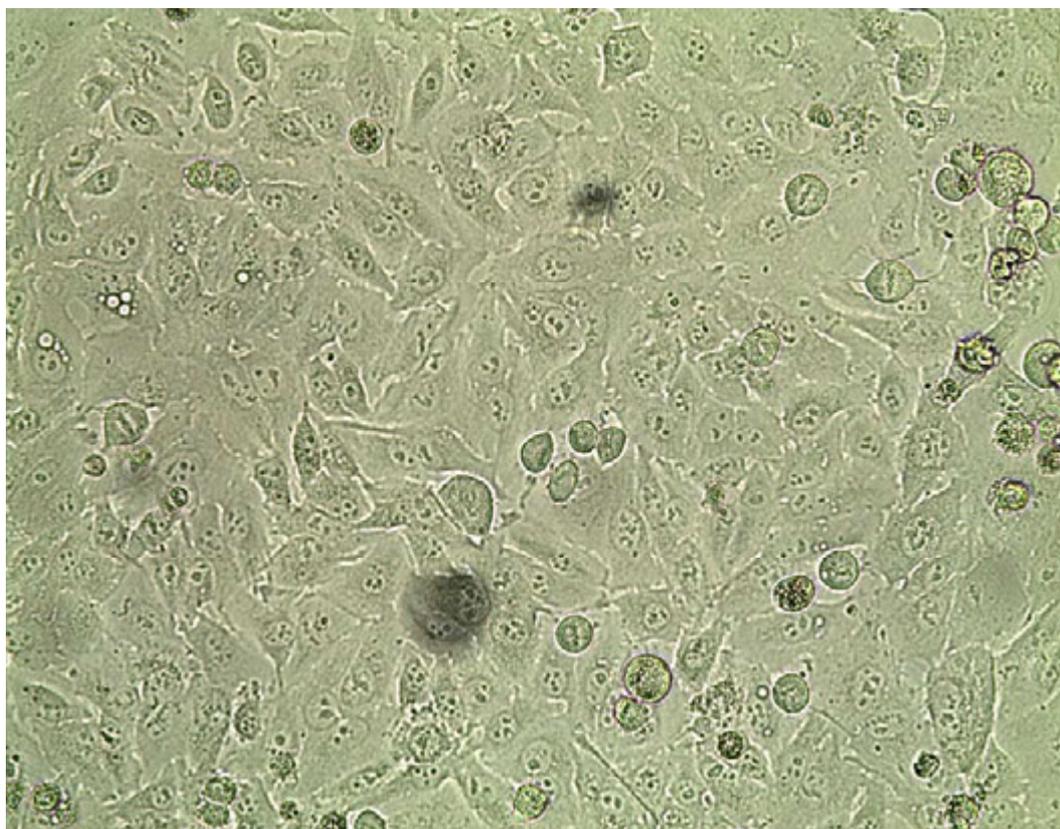


Figura 52 – Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 cultivadas em meio contendo maltodextrina. Os cultivos foram mantidos a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, na concentração 400 µg/mL de maltodextrina, após 72 horas de exposição. Aumento de 200x.

As imagens representadas nas Figuras de 53 a 55 referem-se às células HepG2 expostas às diferentes concentrações do extrato de *Annona muricata* em três períodos sequenciais dos experimentos.

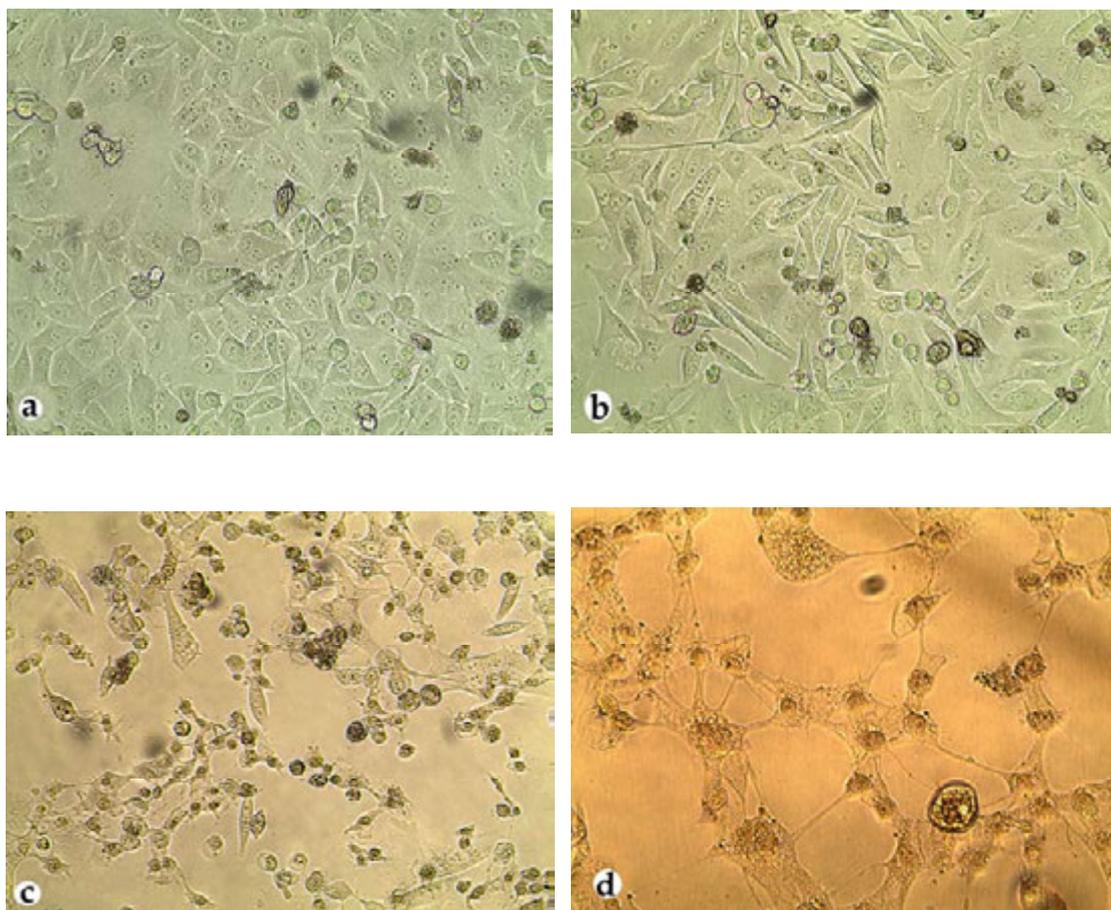


Figura 53 – Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 cultivadas em meio contendo extrato de *A. muricata*. O cultivo foi mantido a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 1 (a), 2 (b), 4 (c) e 8 mg/mL (d), após 24 horas de exposição. Aumento de 200x (a, b, c) e 400x (d).

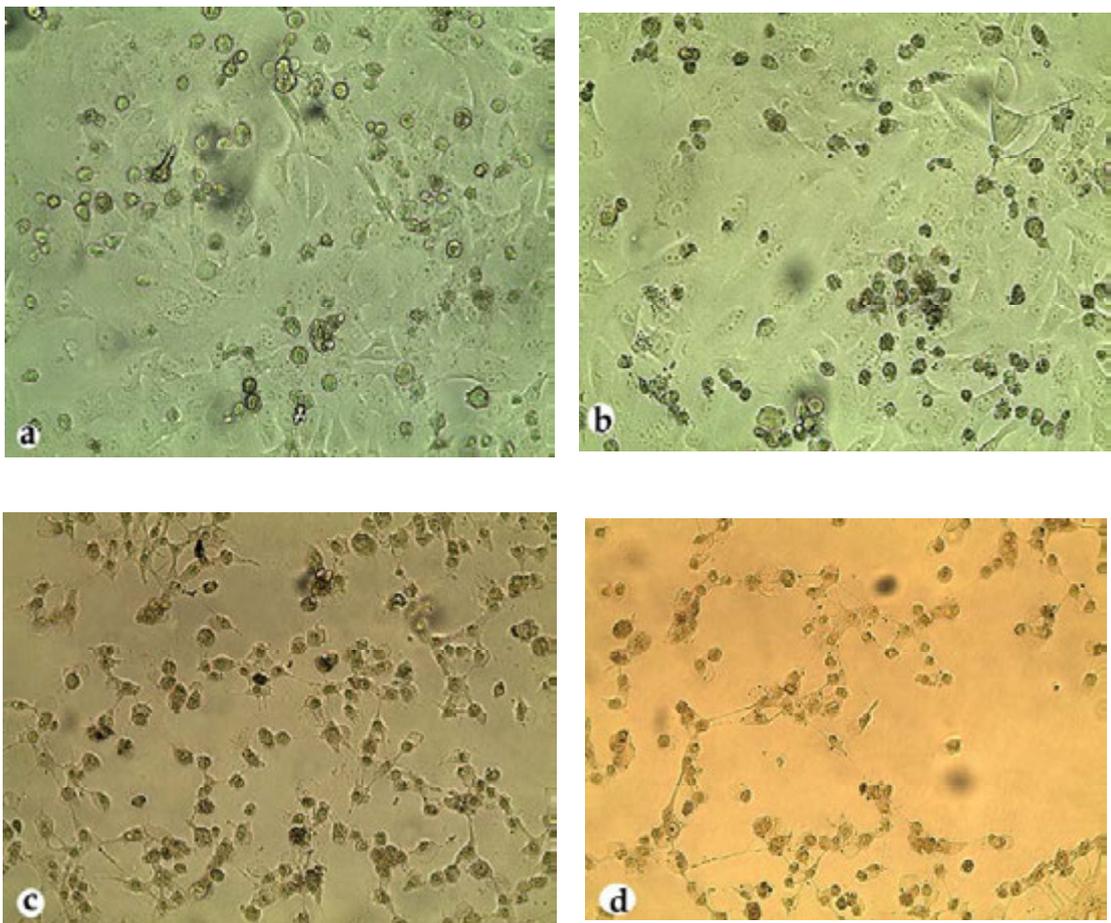


Figura 54 – Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 cultivadas em meio contendo extrato de *A. muricata*. O cultivo foi mantido a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 1 (a), 2 (b), 4 (c) e 8 mg/mL (d), após 48 horas de exposição. Aumento de 200x (c, d) e 400x (a, b).

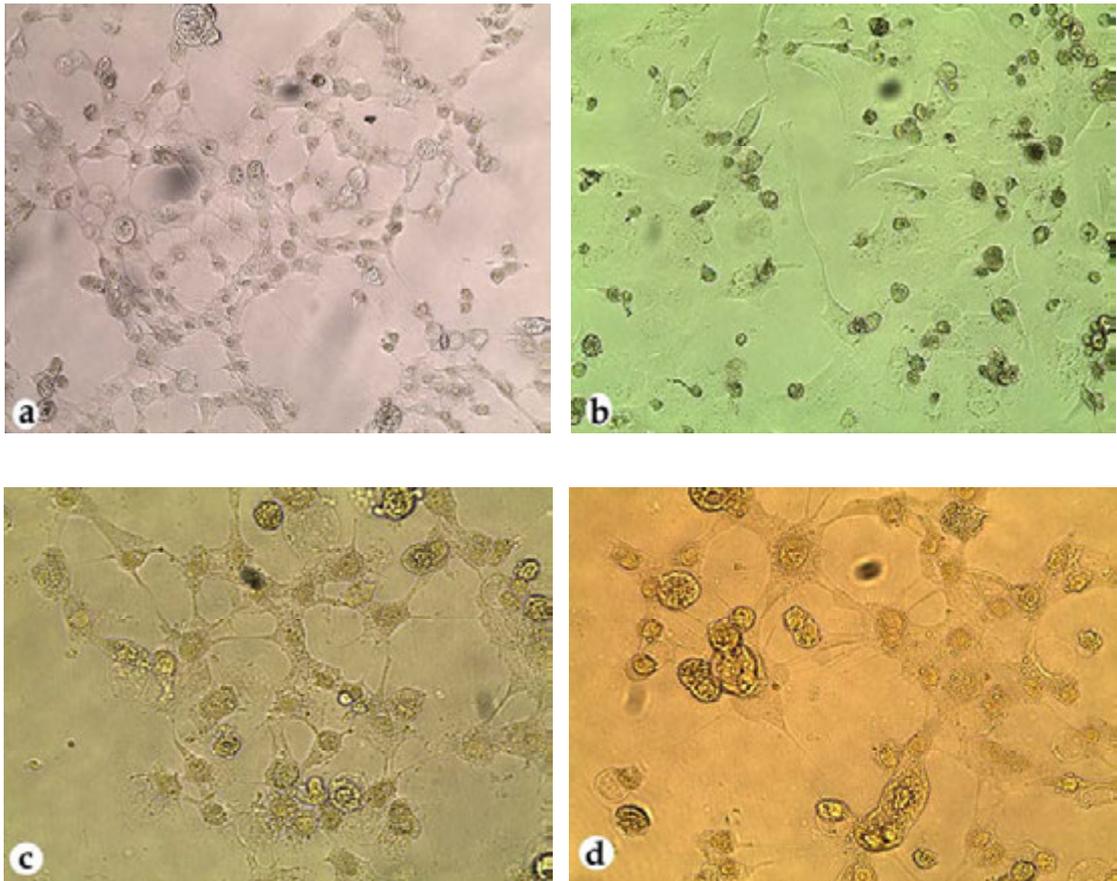


Figura 55 – Células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2 cultivadas em meio contendo extrato de *A. muricata*. O cultivo foi mantido a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nas concentrações de 1 (a), 2 (b), 4 (c) e 8 mg/mL (d), após 72 horas de exposição. Aumento de 200x (a) e 400x (b, c, d).

A análise fitoquímica das folhas de anonáceas nativas do Brasil revela, além de acetogeninas, presença de alcaloides, flavonoides, flavonas, triterpenoides, esteroides e outras substâncias, muitas das quais com efeitos antitumorais comprovados (SANTOS, SALATINO, 2000; BRITO et al., 2008). Já foram identificados inúmeras flavonas (apigenina, luteolina, escutelareina, hispidulina) e flavonóis (canferol, ramocitrina, 6-hidroxi-ramocitrina, quercetina, ramnetina, isoramnetina), com prevalência dos flavonóis (88%) em relação às flavonas, todos variantes quanto à posição de radicais açúcares (mono-, di- e tri-glicosídeos) na estrutura original do flavonoide (SANTOS, SALATINO, 2000), muitos dos quais com atividade antitumoral conhecida.

O efeito citotóxico verificado no extrato das folhas de *A. muricata* nos ensaios pode ser atribuído às altas concentrações de acetogeninas, compostos exclusivos de plantas anonáceas e marcadamente inibidores da proliferação de células tumorigênicas e inúmeros estudos demonstram a ação antitumoral seletiva das acetogeninas e induzindo à apoptose de várias linhagens celulares (LANDOLT et. al., 1995; WU et. al., 1995; 1995a; 1995b; HOPP et. al., 1996; ZENG et. al., 1996; CHANG, WU, 2001; CHIH et. al., 2001; GONZÁLEZ-COLOMA et. al., 2002; CHIU et. al., 2003; PARDHASARADHI et. al., 2005; QUISPE et. al., 2006; YANG et. al., 2009).

Várias acetogeninas isoladas de *A. muricata*, principalmente Anonacina, exibem efeitos antitumorais em diferentes linhagens de células carcinogênicas (CHAMPY et. al., 2001). Estudos confirmam a ação citotóxica de diferentes acetogeninas em células hepatocarcinogênicas HepG2 (CHIH et. al., 2001; CHIU et. al., 2003; ARROYO et. al., 2005; LIAW et. al., 2005; QUISPE et. al., 2006).

A bioatividade acetogênica tem se mostrado com forte potencial inibidor do complexo I, também chamado NADH:ubiquinona oxidoreductase, da cadeia respiratória mitocondrial, com depleção de níveis de ATP tendo como alvo a enzima NADH:ubiquinona oxirredutase das células tumorais, induzindo à apoptose (LONDERSHAUSEN et. al., 1991; ESPOSTI et. al., 1994; LANDOLT et. al., 1995; HOPP et. al., 1996; ZAFRA-POLO et. al., 1996; ALALI et. al., 1999; GONZÁLEZ-COLOMA et. al., 2002; BERMEJO et. al., 2005; DEBRÉ et. al., 2008; KOJIMA, TANAKA, 2009). É o maior e mais complexo sistema proteico da membrana interna da mitocôndria e tem sido alvo das novas gerações de drogas antitumorais (NELSON, COX, 2004; ZAFRA-POLO et al., 1996).

A redução drástica nos níveis de cAMP e cGMP em células apoptóticas do carcinoma hepatocelular expostas a bulatacina, uma acetogenina presente em anonáceas, pode indicar um importante mecanismo inibitório da progressão do câncer (CHIU et. al., 2003). Outros estudos apontam a interrupção do ciclo celular em G1, intensificação na expressão de vias apoptóticas como Bax e Bad e elevação nos níveis de p21 em células tumorais expostas às acetogeninas (YUAN et al., 2003). Inibição de caspases-6 e -9, mas não em caspase-3, também foi verificado

em células HepG2 expostas a extratos de folhas de *Annona reticulata* (MONDAL et al., 2007).

Outros estudos sugerem que o mecanismo primário indutor de apoptose verificado por acetogeninas (anonacina) encontradas em *Annona muricata* está na inibição da atividade da enzima topoisomerase (LÓPEZ-LÁZARO et al., 2001).

### **5.3. Própolis x *Annona muricata* x Células HepG2**

Uma análise comparativa entre os efeitos dos extratos das própolis e da *A. muricata* está apresentada na Figura 56. Os dados referem-se à melhor concentração inibitória dos extratos de graviola (8 mg/mL) e das própolis vermelha (200 µg/mL) e verde (400 µg/mL).

Após 24 horas de exposição aos extratos das folhas de *A. muricata* e de própolis vermelha, as células hepatocarcinogênicas já exibiram forte redução da viabilidade, praticamente para menos de 15%. Após 48 horas de tratamento, esse valor cai ainda mais para menos de 5% para o extrato de graviola e 2% para o extrato da própolis vermelha.

Observa-se ainda que, todos os tratamentos, após 72 horas de exposição, praticamente reduziram a viabilidade de células hepatocarcinogênicas para menos de 5%, indicando forte poder inibitório no crescimento de células do carcinoma hepatocelular.

De acordo com os dados obtidos nesse trabalho, a própolis verde e vermelha do Brasil e a *A. muricata* podem ser fontes promissoras de compostos bioativos exclusivos, com efeitos quimiopreventivos contra o câncer, e especialmente o carcinoma hepatocelular.

A expectativa para continuidade dos trabalhos científicos nessa linha de pesquisa é investigar os efeitos intracelulares do mecanismo antitumoral da própolis e da graviola em células hepatocarcinogênicas da linhagem HepG2. Estudos futuros *in vivo* serão conduzidos ainda para explorar o potencial anticarcinogênico da própolis e da graviola em modelos animais.

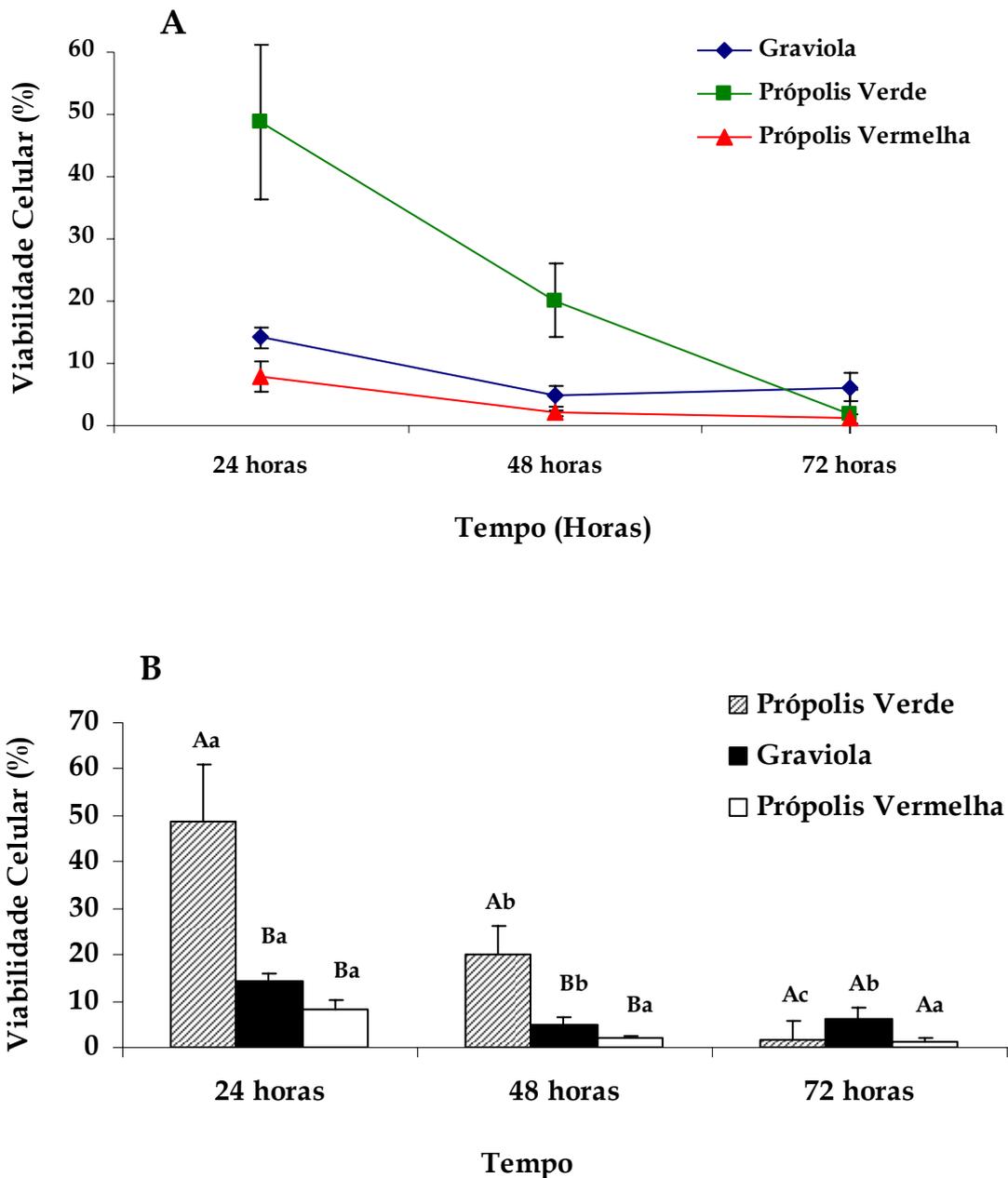


Figura 56 – Efeito comparativo dos extratos de *A. muricata* e própolis sobre a viabilidade de células HepG2. Concentrações mais eficazes dos extratos de graviola (8 mg/mL) e própolis vermelha (200 µg/mL) e verde (400 µg/mL), foram avaliadas pela absorvância a 540 nm do vermelho neutro, cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, na quantidade de 1 x 10<sup>4</sup> células em placas de 96 poços, no período de 24, 48 e 72 horas. Os dados são de experimentos conduzidos em sextuplicatas, e barras com letras comuns não diferem estatisticamente (p < 0,05) pelo teste Tukey.

## 6. CONCLUSÕES

Em relação aos resultados obtidos por meio dos ensaios sobre a toxicidade celular, pode-se concluir que:

- Células da linhagem hepatocarcinogênica HepG2 apresentaram maior efeito inibitório na viabilidade celular quando expostas aos extratos de própolis vermelha, em relação às mesmas concentrações da própolis verde.
- O extrato da própolis verde apresenta efeito citotóxico significativo principalmente em concentrações de 400 µg/mL; concentrações mais baixas (50, 100 e 200 µg/mL), não foram suficientes para inibir a proliferação das células tumorais.
- O extrato da própolis vermelha apresenta maior potencial citotóxico principalmente nas concentrações 50, 100 e 200 µg/mL.
- A quantidade relativa dos constituintes dos extratos das própolis parece não estar diretamente relacionada ao efeito citotóxico, visto que alguns deles, em relação ao extrato da própolis verde, estão em menores quantidades na própolis vermelha, extrato que promoveu os efeitos citotóxicos mais significativos.

- O extrato de *A. muricata* exibiu forte potencial inibitório da viabilidade celular: acima de 50% já nas primeiras 24 horas de exposição para as concentrações 1 e 2 mg/mL e acima de 80% para 4 e 8 mg/mL.
- O maior potencial citotóxico dose-tempo dependente foi exibido nas maiores concentrações utilizadas nos tratamentos: 200 µg/mL para o extrato da própolis vermelha, 400 µg/mL para a própolis verde e 8 mg/mL para o extrato de folhas de *A. muricata*, com inibição da viabilidade celular acima de 90% após 72 horas de cultivo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABTO, Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **Registro Brasileiro de Transplantes**, RBT, 10 anos. Análise Qualitativa, Dezembro, 2007, 99 p.

AHMED, I.; LOBO, D.N. Malignant tumours of the liver. **Surgery**, v. 25, n. 1, p. 34-41, 2006.

AHN, M.R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T. et. al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 7286-7292, 2004.

AHN, M.R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y. et. al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China, **J. Agric. Food Chem.** v. 52, p. 7286-7292, 2007.

AKAGI, K.; HIROSE, M.; HOSHIYA, T.; et. al. Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model. **Cancer Lett** , v. 94, n. 113-121, 1995.

AKAO, Y.; MARUYAMA, H.; MATSUMOTO, K. et. al. Cell Growth Inhibitory Effect of Cinnamic Acid Derivatives from Propolis on Human Tumor Cell Lines Kenji MATSUMOTO. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, n. 7, p. 1057-1059, 2003.

ALALI, F.Q.; LIU, X.; MCLAUGHLIN, J.L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 504-540, 1999.

ALENCAR, S.M., AGUIAR, C.L.; PAREDES, G.L.; PARK, Y.K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.

ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L. et. al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **J. Ethnopharmacol.**, v. 5, n. 113, p. 278-83, 2007.

AMBLER, G.K. Cancer molecular biology. 2006. Disponível em: <<http://www.ambler.me.uk/Cancer.pdf>> Acesso em 13 de Jan 2010.

ARROYO, J.; PRASHAD, M.; VÁSQUEZ, Y. et. al. Actividad citotóxica *in vitro* de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. **Rev. Per. Med. Exp. Salud. Pública**, v. 22, n. 4, p. 247-253, 2005.

ASO, K.; KANNO, S.; TADANO, T. et. al. Inhibitory Effect of Propolis on the Growth of Human Leukemia U937. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 5, p. 727-730, 2004.

ATCC<sup>®</sup>, The Global Bioresource Center<sup>™</sup>. <<https://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx>>. Acesso em 25 Abr 2009.

AWALE, S.; Li, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H. et. al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorg. and Med. Chem.**, v. 16, p. 181-189, 2008.

AWALE, S.; SHRESTHA, S. P.; TEZUKA, Y. et. al. Neoflavonoids and Related Constituents from Nepalese Propolis and Their Nitric Oxide Production Inhibitory Activity. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 858-864, 2005.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evid. Based Compl. Alternat. Med.**, v. 2, p. 29-32, 2005.

BANKOVA, V., CHRISTOV, R., POPOV, S. et. al. Volatile constituents of propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 49, p. 6-10, 1994.

BANKOVA, V.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.

BANSKOTA, A. H.; NAGAOKA, T.; SUMIOKA, L. Y. et. al. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **J. Ethnopharmacol.**, v. 80, p. 67-73, 2002.

BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., ADNYANA, I.K. et. al. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v. 8, p. 16-23, 2001a.

BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., MIDORIKAWA, K. et. al. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1277-1279, 2000a.

BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., PRASAIN, J.K. et. al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activity. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 896-900, 1998.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, K. et. al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **J. Ethnopharmacol.**, v. 72, p. 239-246, 2000b.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent process in pharmacological research of propolis. **Phytother. Res.**, v. 12, p. 561-571, 2001b.

BARROS, M.P.; SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 567-571, 2007.

BASNET, P., MATSUSHIGE, K., HASE, K. et. al. Four di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. **Biolog. and Pharmac. Bulletin**, v. 19, p. 1479-1484, 1996.

BEECHER, G.R. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. 2003. American Society for Nutritional Sciences. **J. Nutr.**, v. 133, p. 3248S-3254S, 2003.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M.C. et. al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Nat. Prod. Rep.**, v. 22, n. 2, p. 269-303, 2005.

BERTRAM, J.S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, p. 167-223, 2001.

BESTWICK, C.S.; MILNE, L. Influence of galangin on HL-60 cell proliferation and survival, **Cancer Letters**, v. 243, n. 1, p. 80-89, 2006.

BISCEGLIE, A., RUSTGI, V., HOOFNAGLE, J., et al. NIH conference on hepatocellular carcinoma. **Ann. Intern. Med.**, v. 108, p. 390-401, 1988.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays. **J. Tissue Cult. Methods**, v. 9, p. 7-9, 1984.

BRECHOT, C. Pathogenesis of hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma: Old and new paradigms. **Gastroent.**, v. 127, p. S56-S61, 2004.

BRESSAC, B.; KEW, M.; WANDS, J.; OZTURK, M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. **Nature**, v. 350, p. 429-431, 1991.

BRITO, H.O.; NORONHA, E.P.; MARTINS, L.M. França. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (ATA). **Rev. Bras. Farm.**, v. 89, n. 3, p. 180-184, 2008.

BROWNSON, D.M.; AZIOS, N.G.; FUQUA, B.K. et. al. Flavonoid Effects Relevant to Cancer. **J. Nutr.**, v. 132, p. 3482S-3489S, 2002.

BRUIX, J.; SHERMAN, M.; LLOVET, J.M. et. al. Clinical Management of Hepatocellular Carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. **J. Hepat.**, v. 35, p. 421-430, 2001.

BRUSSELMANS, K.; VROLIX, R.; VERHOEVEN, G.; SWINNEN, J.V. Induction of Cancer Cell Apoptosis by Flavonoids Is Associated with Their Ability to Inhibit Fatty Acid Synthase Activity. **J. Biolog. Chem.**, vol. 280, n. 7, p. 5636-5645, 2005.

BÚFALO, M.C.; CANDEIAS, J.M.G.; SFORCIN, J.M. In vitro Cytotoxic Effect of Brazilian Green Propolis on Human Laryngeal Epidermoid Carcinoma (HEp-2). **Cells Evid. Based Complement. Altern. Med.**, v. 6, n. 4, p. 483-487, 2007.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food Chem. Toxicol.**, v. 36, p. 347-63, 1998.

CALVISI, D.F.; PINNA, F.; MELONI, F. et. al. Dualspecificity phosphatase 1 ubiquitination in extracellular signal-regulated kinasemediated control of growth in human hepatocellular carcinoma. **Cancer Res.**, v. 68, n. 11, p. 4192-4200, 2008.

CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. Própolis do sudeste e nordeste do brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Quimica Nova**, v. 30, n. 7, p.1512-1516, 2007.

CHAMPY, P.; GUÉRINEAU, V.; LAPRÉVOTE, O. Maldil-Tof MS Profiling of Annonaceous Acetogenins in *Annona muricata* Products for Human Consumption. **Molecules**, v. 14, p. 5235-5246, 2009.

CHAMPY, P.; MELOT, A.; GUÉRINEAU, V. et. al. Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in Guadeloupe. **Mov. Disord.**, v. 20, p. 1629-1633, 2005.

CHANG, F.R., WU, Y.C. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 925-31, 2001.

CHEN, C.N.; WENG, M.S.; WU, C.L.; LIN, J.K. Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources. **Evid Based Complement Alternat. Med.**, v. 1, n. 2, p. 175-185, 2004.

CHEN, C.N.; WU, C.L.; LIN, J.K. Apoptosis of human melanoma cells induced by the novel compounds propolin A and propolin B from Taiwanese propolis. **Cancer Letters**, v. 245, p. 18-231, 2007a.

CHEN, C.R.; LEE, Y.N.; CHANG, C.M.J. et. al. Hot-pressurized fluid extraction of flavonoids and phenolic acids from Brazilian propolis and their cytotoxic assay in vitro. **J. Chin. Inst. Chem. Eng**, v. 38, p. 191-196, 2007b.

CHIESA, R.; DONATO, F.; TAGGER, A. et. al. Etiology of Hepatocellular Carcinoma in Italian Patients with and without Cirrhosis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.**, v. 9, p. 213-216, 2000.

CHIH, H., CHIU, H.F.; TANG, K.S. et. al. Bullatacin, a potent antitumour annonaceous acetogenin, inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cell line 2.2.15 by apoptosis induction. **Life Sci.**, v. 69, p. 1321-31, 2001.

CHIU, H.F.; CHIH, T.T.; HSIAN, Y.M. et. al. Bullatacin, a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2.15 cells. **Bioch. Pharm.** , v. 65, n. 3, p. 319-327, 2003.

CHOI, S.I.; JEONG, C.S.; CHO, S.Y. Mechanism of apoptosis induced by Apigenin in HepG2 human hepatoma cells: involvement of reactive oxygen species generated by NADPH Oxidase. **Arch. Pharm. Res.**, v. 30, n. 10, p. 1328-1335, 2007

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.

CONTE, V.P. Carcinoma Hepatocelular. Parte 1. Considerações gerais e diagnóstico. **Arq Gastroenterol.**, v. 37, n. 1, p. 58-68, 2000.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V; COLLINS, T. Neoplasia. In: **Patologia Estrutural e Funcional**, Guanabara Koogan. 6a. Ed., cap. 6, p. 233-295, 2000, 1251 p.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J. Impact of natural products on developing new antiCancer agents. **Chem. Rev.**, v. 109, p. 3012-3043, 2009.

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

CUSHMAN, M.; NAGARATHNAM, D. Cytotoxicities of some flavonoid analogues. **J. Nat. Prod.**, v. 54, p. 656-1660, 1991.

DASKIEWICZ, J.B.; DEPEINT, F.; VIORNERY, L. et. al. Effects of flavonoids on cell proliferation and caspase activation in a human colonic cell line HT29: an SAR study. **J. Med. Chem.**, v. 48, p. 2790-2804, 2005.

DAUGSH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian red propolis: chemical composition and botanical origin. **Evid. Based Complement. Altern. Med.**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2007.

DEANE, N.G; PARKER, M.A; ARAMANDLA, R. et. al. Hepatocellular Carcinoma results from chronic Cyclin D1 overexpression in transgenic mice. **Cancer Research**, v. 61, p. 5389-5395, 2001.

DERBRÉ, S.; GIL, S.; TAVERNA, M. et. al. Highly cytotoxic and neurotoxic acetogenins of the Annonaceae: New putative biological targets of squamocin detected by activity-based protein profiling. **Bioorg. and Med. Chem. Letters**, v. 18, p. 5741-5744, 2008.

DOBROWOLSKI, J.W.; VOHORA, S.B.; SHARMA, K. et. al. Antibacterial, antifungal, antiamebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products, **J. Ethnopharmacol.**, v. 35, p. 77-82, 1991.

DONATO, F.; TAGGER, A.; GELATTI, U. et. al. Alcohol and Hepatocellular Carcinoma: The effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. **Am. J. Epidemiol.**, v. 155, n. 4, p. 323-331, 2002.

DORTA, D.J.; PIGOSO, A.A.; MINGATTO, F.E. et. al. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 152, p. 67-78, 2005.

DRAGO, L.; VECCHI, E.; NICOLA, L. GISMONDO MR. In vitro antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelated propolis). **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, p.1914-21, 2007.

EDAMOTO, Y.; HARA, A.; BIERNAT, W. et. al. Alterations of rb1, p53 and wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis c, hepatitis b and alcoholic liver cirrhosis **Int. J. Câncer**, p. 334-41, 2003.

EL-SERAG, H.B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. **Clin. Liver Dis.**, v. 5, p. 87-107, 2001.

EL-SERAG, H.B.; MARRERO, J.A. RUDOLPH, L.; REDDY, K.R. Diagnosis and treatment of Hepatocellular Carcinoma. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1752-1763, 2008.

EL-SERAG, H.B.; RUDOLPH, K.L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 132, n. 7, p. 2557-76, 2007.

ESPOSTI, M.D.; GHELLI, A.; RATTA, M. et. al. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I), **Biochem. J.**, v. 301, p. 161-167, 1994.

FARAZI, P.A.; GLICKMAN, J.; HORNER, J.; PINHO, R.A. Cooperative interactions of p53 mutation, telomere dysfunction, and chronic liver damage in Hepatocellular Carcinoma progression. **Cancer Res**, v. 66, n. 9, p. 4766-73, 2006.

FERGUSON, P.J.; KUROWSKA, E.; FREEMAN, D.J. et. al. A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines. **J. Nutr.**, v. 134, p. 1529-1535, 2004.

FERRARI, C.K.B.; TORRES, E.A.F.S. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. **Biomed. Pharmacother.**, v. 57, p. 251-260, 2003.

FERRY, D.R.; SMITH, A.; MALKHANDI, J. et. al. Clinical trial of the flavonoid quercetin: Pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. **Clin. Cancer Res.**, v. 2, p. 659-668, 1996.

FREITAS, A.C.T.; PAROLIN, M.B.; STADNIK, L.; COELHO, J.C.U. Carcinoma hepatocelular: impacto do tempo em lista e das formas de tratamento pré-operatório na sobrevida do transplante de fígado cadavérico na era pré-MELD em um centro no Brasil. **Arq. Gastroenterol.**; v. 44, n. 3, p. 189-94, 2007.

FUTREAL, P.A.; COIN, L.; MARSHALL, M. et. al. A census of human cancer genes. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 177-183, 2004.

GALVÃO, J.; ABREU, J.A.; CRUZ, T. et. al. Biological therapy using própolis as nutritional supplement in câncer treatment. **Int. J. of Cancer Res.**, v. 3, n. 1, p. 43-53, 2007.

GEURTS, F. **Annonaceous Fruits**. Royal Tropical Institute, Amsterdam, the Netherlands. 1981. 16 p.

GLEYE, C.; DURET, P.; LAURENS, A. et. al. *cis*-Monotetrahydrofuran Acetogenins from the roots of *Annona muricata*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 576-579, 1988.

GLEYE, C.; RAYNAUD, S.; FOURNEAU, C. et. al. Cohibins C and D, two important metabolites in the biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and *Annona nutans*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, 1192-1196, 2000.

GOMAA, A.I.; KHAN, S.A.; TOLEDANO, M.B. et. al. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 27, p. 4300-4308, 2008.

GONZÁLEZ-COLOMA, A.; GUADAN, A.; INÉS, C. Selective action of acetogenin mitochondrial complex I inhibitors **Z. Naturforsch.**, v. 57c, p. 1028-1034, 2002.

GRANADO-SERRANO, A.B.; MARTIN, M.A.; BRAVO, L. et. al. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2 and inhibition of PI-3-Kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). **J. Nutr.**, v. 136, p. 2715-2721, 2006.

GREEN, D.R.; CHIPUK, J.E. p53 and metabolism: inside the TIGAR. **Cell**, v. 126, p. 30-32, 2006.

GRUNBERGER, D., BANERJEE, R., EISINGER, K. et. al. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Experientia**, v. 44, p. 230-232, 1988.

GUNDUZ, C.; BIRAY, C.; KOSOVA, B. et al. Evaluation of Manisa propolis effect on leukemia cell line by telomerase activity, **Leuk. Res.**, v. 29, p. 1343-1346, 2005.

HARBELL, J.W.; KNOOTZ, S.W.; LEWIS, R. W.; LOVELL, D. Irag working group: cell cytotoxic assays. **Food Chem. Toxicol.**, 35, 79-126, 1997.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HASSAN, M.M; HWANG, L.; HATTEN, C.J. et. al. Risk factors for Hepatocellular Carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. **Hepatology**, v. 36, p. 206-213, 2002.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoides. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HEBER, D. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. **J. Postgrad. Med.**, v. 50; p. 145-149, 2004.

HELUIHEL, M.; ISANU, V. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. **Isr. Med. Assoc. J.**, v. 4, p. 923-927, 2002.

HIGASHITSUJI, H.; HIGASHITSUJI, H.; ITOH, K. et al. The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53. **Cancer Cell**, v. 8, p. 75-87, 2005.

HILLEMANN, M.R. Critical overview and outlook: pathogenesis, prevention, and treatment of hepatitis and hepatocarcinoma caused by hepatitis B virus. **Vaccine**, v. 21, p. 4626-4649, 2003.

HIRANO, T.; GOTOH, M.; OKA, K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. **Life Sci.**, v. 55, p. 1061-1069, 1994.

HOPP, D.C.; ZENG, L.; GU, Z.; MCLAUGHLIN, J.L. Squamotacin: an annonaceous acetogenin with cytotoxic selectivity for the human prostate tumor cell line (PC-3). **J. Nat. Prod.**, v. 59, n. 2, 1996.

HORINAKA, M.; YOSHIDA, T.; SHIRAISHI, T. et. al. The dietary flavonoid apigenin sensitizes malignant tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. **Mol. Cancer Ther.**, v. 5, n. 4, p. 945-51, 2006.

HRONEK, M.; VACHTLOVA, D.; KUDLACKOVA, Z.; JILEK, P. Antifungal effects in selected natural compounds and probiotics and their possible use in prophylaxis of vulvovaginitis. **Ceska Gynkol.**, v. 70, p. 395-9, 2005.

HSI, Health Sciences Institute. Billion-dollar drug company nearly squashes astounding research on natural cancer killer. **Graviola Project**. Health Sciences Institute, Charles St., Baltimore, v. 5, n. 7, 2001.

HSU, Y.L.; KUO, P.L.; LIN, C.C. Isoliquiritigenin induces apoptosis and cell cycle arrest through p53-dependent pathway in Hep G2 cells. **Life Sci.**, v. 77, p. 279-92, 2005.

HSU, Y.L.; KUO, P.L.; CHIANG, L.C.; LIN, C.C. Isoliquiritigenin inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 cells. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 31, p. 414-8, 2004.

HU, T.S.; WU, Y.L.; YAO, Z.J. Recent progress on the chemical synthesis of Annonaceous acetogenins and their structurally Modified mimics. In: Liang, X.T.; Fang, W.S. (Edts.) **Med. Chem. Bioactive Nat. Prod.**, cap. 10, p. 399-441, 2006. 477 p.

IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **World Cancer Report 2008**, World Health Organization, Lyon, 2009.

IBRICEVI, H.; KOSTIC, A.; GAON, I.D. The examination of propolis as a potential local anesthesia. **Stomatol. Vjesn.**, v. 10, p. 125-128, 1981.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. **Câncer de Fígado**. Brasil, Ministério da Saúde, INCA. 2009b. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=330](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=330)>. Acesso em 2 Jan 2010.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. **Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil**, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2009a.

ITO, J., CHANG, F.R.; WANG, H.K. et al. AntiAIDS activity of moronic acid derivatives and the new mellifore-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 1278-81, 2001.

IWASHITA, K.; KOBORI, M.; YAMAKI, K.; TSUSHIDA, T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, p. 1813-20, 2000.

JAGANATHAN, S.K.; MANDAL, M. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. **J. Biom. and Biotech.**, p. 1-13, 2009 (doi:10.1155/2009/830616).

JEPSEN, P.; VILSTRUP, H.; TARONE, R.E. et. al. Incidence rates of hepatocellular carcinoma in the U.S. and Denmark: Recent trends. **Int. J. Cancer**, v. 121, p. 1624-1626, 2007.

JIN, U.H.; CHUNGA, T.W.; KANGA, S.K. et. al. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: Isolation and identification. **Clinica Chimica Acta**, v. 362, p. 57-64, 2005.

JOLAD, S.D.; HOFFMANN, J.J.; SCHRAM, K.H.; COLE, J.R. Uvaricin, a New Antitumor Agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **J. Org. Chem.**, v. 47, p. 3151-3153, 1982.

JUNG, J.I.; LIM, S.S.; CHOI, H.J. et. al. et al. Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells. **J. Nutr. Biochem.**, v. 17, p. 689-96, 2006a.

JUNG, J.I.; CHUNG, E.; SEON, M.R. et. al. Isoliquiritigenin (ISL) inhibits ErbB3 signaling in prostate cancer cells. **Biofactors**, v. 28, p. 159-68, 2006b.

KAWATE, S.; FUKUSATO, T.; OHWADA, S. et. al. Amplification of *c-myc* in Hepatocellular Carcinoma: Correlation with Clinicopathologic Features, Proliferative Activity and p53 Overexpression. **Oncology**, v. 57, p. 57-163, 1999.

KHANDUJA, K.L.; GANDHI, R.K.; PATHANIA, V.; SYAL, N. Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. **Food Chem. Toxicol.**, v. 37, p. 313-318, 1999.

KIM, J.D.; LIUB, L.; GUOB, W.; MEYDANIB, M. Chemical structure of flavonóis in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. **J. Nutr. Bioch.**, v. 17, p. 165-176, 2006.

KIM, D.C.; RAMACHANDRAN, S.H.; BAEK, S.H. et al. Induction of Growth Inhibition and Apoptosis in Human Uterine Leiomyoma Cells by isoliquiritigenin. **Reproductive Sciences**, v. 15, p. 552-558, 2008.

KNOWLES, B.B.; HOWE, C.C.; ADEN, D.P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. **Science**, v. 209, p. 497-499, 1980.

KOJIMA, N.; TANAKA, T. Medicinal Chemistry of Annonaceous Acetogenins: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Analogues. **Molecules**, v. 14, p. 3621-3661, 2009.

KOJIRO, M. **Pathology of Hepatocellular Carcinoma**, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2006, 184 p.

KUMAR, M.A.S.; NAIR, M.; HEMA, P.S. et. al. Pinocebrin Triggers Bax-Dependent Mitochondrial Apoptosis in Colon Cancer Cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 46, p. 231-241, 2007a.

KUMAR, S.; SHARMA, A.; MADAN, B. et. al. Isoliquiritigenin inhibits I $\kappa$ B kinase activity and ROS generation to block TNF- $\alpha$  induced expression of cell adhesion molecules on human endothelial cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 73, p. 1602-12, 2007b.

KUMAZAWA, S., YONEDA, M., SHIBATA, I. et. al. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chem. and Pharm. Bulletin**, v. 51, p. 740-742, 2003.

KUNIMASA, K.; AHN, M.R.; KOBAYASHI, T. et. al. Brazilian Propolis Suppresses Angiogenesis by Inducing Apoptosis in Tube-forming Endothelial Cells through Inactivation of Survival Signal ERK1/2. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** p. 1-7, 2009 (doi:10.1093/ecam/nep024)

KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **Eur. J. Nutr.**, v. 38, p. 133-142, 1999.

KUPCHAN, S.M.; JARVIS, B.B.; DAILEY, R.G. et. al. Baccharin, a Novel Potent Antileukemic Trichothecene Triepoxide from *Baccharis megacotarnica*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 98, n. 22, p. 7092-7093, 1976.

KWON, H.M.; CHOI, Y.J.; CHOI, J.S. et al. Blockade of cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression by licorice isoliquiritigenin through NF- $\kappa$ B signal disruption. **Exp. Biol. Med.**, v. 232, p. 235-5, 2007.

LAINO, C. Multi-Targeted Therapies Show Promise for HCC., **Oncology Times**, v. 30, n. 10, p. 9-13, 2008.

LAMBERT, J.K.; HONG, J.; YANG, G.Y. et. al. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 81 (suppl), p. 284S–91S, 2005.

LANDOLT, J.L.; AHAMMADSAHIB, K.I.; HOLLINGWORTH, R.M. et. al. Determination of structure-activity relationships of *Annonaceous acetogenins* by inhibition of oxygen uptake in rat liver mitochondria. **Chemico-Biological Interactions**, v. 98, p.1-13, 1995.

LEITE, J.P.V. Química dos Produtos Naturais: Uma Abordagem Biossintética. In: \_\_\_\_\_ (Ed.) **Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas**. Cap. 3, p. 47-97. Ed. Atheneu. 2009.

LENCIONI, R.; ALLGAIER, H.P.; CIONI, D. et al: Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Randomized controlled trial of radiofrequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection. **Radiology**, v. 228, p. 235-240, 2003.

LEPLEY, D.M.; LI, B.; BIRT, D.F. et. al. The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 11, p. 2367-2375, 1996.

LÉVY, L.; RENARD, C.A.; WEI, Y.; BUENDIA, M.A. Genetic Alterations and Oncogenic Pathways in Hepatocellular Carcinoma. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 963, p. 21-36, 2002.

LI, F.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5434-5440, 2008.

LIAW, C.; CHANG, F.; CHEN, S. et. al. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona Montana*. **Bioorg. & Med. Chem.**, v. 13, p. 4767-4776, 2005.

LIAW, C.C.; CHANG, F.R.; LIN, C.Y. et. al. New Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona Muricata*. **J. Nat. Prod.**, 65, 470-475, 2002.

LIN, C.P.; LIU, J.D.; CHOW, J.M. et. al. Small-molecule c-Myc inhibitor 10058-F4, inhibits proliferation, downregulates human telomerase reverse transcriptase and enhances chemosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells. **Anticancer Drugs**, v. 18, n.2, p. 161-170, 2007.

LIN, S.M.; LIN, C.J.; LIN, C.C. et. al. Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma  $\leq 4$  cm. **Gastroenter.**, v. 127, p. 1714-1723, 2004.

LIVRAGHI, T.; GIORGIO, A.; MARIN, G. et. al. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: Long-term results of percutaneous ethanol injections. **Radiology**, v. 197, p. 101-8, 1995.

LLOVET, J.M.; BURROUGHS, A.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 362, p. 1907-1917, 2003.

LOCK, A.S; SEEFF, L.B.; MORGAN, T.R. et al. Incidence rates and risk factors associated with hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with advanced liver disease due to hepatitis C: results of the HALT-C trial. **43rd annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL 2008)**. Milan, Italy, p. 23-27, 2008.

LONDERSHAUSEN, M., LEICHT, W., LIEB, F. et. al. Molecular mode of action of annonins. **Pestic. Sci.**, v. 33, p. 427-438, 1991.

LÓPEZ-LÁZARO, M., MARTÍN-CORDERO, C., BERMEJO, A. et. al. Cytotoxic compounds from annonaceous species as DNA topoisomerase I poisons. **Anticancer research**, v. 21, n. 5, p. 3493-3497, 2001.

LU, L.C.; CHEN, Y.W.; CHOU, C.C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*, **Int. J. Food Microbiol.**, v. 102, p. 213-220, 2005.

LUNA, J.S. **Estudo de Plantas Bioativas**. 2006. 233 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2006.

LUO, J.; SOH, J. W.; XING, W. Q. et. al. PM-3, a benzo-gamma-pyran derivative isolated from propolis, inhibits growth of MCF-7 human breast cancer cells. **Anticancer Res.**, v. 21, p. 1665-1671, 2001.

MA, J.; FU, N.Y.; PANG, D.B. et. al. Apoptosis induced by isoliquiritigenin in human gastric cancer MGC-803 cells. **Planta Med.**, v. 67, p. 754-7, 2001.

MA, N.F.; HU, L.; FUNG, J.M. et. al. Isolation and characterization of a novel oncogene, amplified in liver cancer within a commonly amplified region at 1q21 in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 47, n. 2, p. 503-510, 2008.

MARCHAND, L.L. Cancer preventive effects of flavonoids – a review. Dossier: Polyphenols: diversity and bioavailability. **Biomed Pharmacother**, v. 56, p. 296-301, 2002.

MARCUCCI, M.C. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural contendo este produto apícola. **Fitos.**, v. 1, n. 3, p. 36-46, 2006.

MARCUCCI, M.C.; BANKOVA, V.S. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Curr. Top. Phytochem.**, v. 2, p. 115 – 23 , 1999.

MARQUELE, F.D.; DI MAMBRO, V.M.; GEORGETTI, S.R. et. al. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal**, v. 39, p. 455-62, 2005.

MASAKI, T.; SHIRATORI, Y.; RENGIFO, W. et. al. Hepatocellular Carcinoma Cell Cycle: Study of Long-Evans Cinnamon Rats. **Hepatology**, v. 32, n. 4, p. 711-720, 2000.

MATHERS, C.D; LONCAR, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. **PloS Med.**, v. 3. n. 11, 2006 (e442. doi:10.1371/journal.pmed.0030442).

MAZZAFERRO, V.; REGALIA, E.; DOCI, R. *et al*: Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, p. 693-699, 1996.

MAZZIO, E.A; SOLIMAN, K.F.A. In Vitro Screening for the Tumoricidal Properties of International Medicinal Herbs. **Phytother. Res.**, v. 23, p. 385-398, 2009.

MCLAUGHLIN, J.L. Paw Paw and Cancer: Annonaceous Acetogenins from Discovery to Commercial Products. **J. Nat. Prod.**, v. 71, n. 7, p. 1311-1321, 2008.

MESQUITA, M.L.; PAULA, J.E.; PESSOA, C. et. al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **J. Ethnopharm.**, v. 123, p. 439-445, 2009.

MESSERLI, S.M.; AHN, M.R.; KUNIMASA, K. et. AL. Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. **Phytother. Res.**, v. 23, n. 3, p. 423-7, 2009.

MISHIMA, S.; NARITA, Y.; CHIKAMATSU, S. et. al. Effects of propolis on cell growth and gene expression in HL-60 cells. **J. Ethnopharm.**, v. 99, p. 5-11, 2005a.

MISHIMA, S.; ONO, Y.; ARAKI, Y. et. al. Two Related Cinnamic Acid Derivatives from Brazilian Honey Bee Propolis, Baccharin and Drupanin, Induce Growth Inhibition in Allografted Sarcoma S-180 in Mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 6, p. 1025-1030, 2005b.

MONDAL, S.K.; MONDAL, N.B.; MAZUMDER, U.K. In vitro cytotoxic and human recombinant caspase inhibitory effect of *Annona reticulata* leaves. **Indian J. Pharmacol.**, v. 39, n. 5, p. 252-254, 2007.

MURRAY, T.J.; YANG, X.; SHERR, D.H. Growth of a human mammary tumor cell line is blocked by galangin, a naturally occurring bioflavonoid, and is accompanied by down-regulation of cyclins D3, E, and A. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 2, 2006.

NAGAI, H., P. PINEAU, P. TIOLLAIS, *et al.* Comprehensive allelotyping of human hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 14, p. 2927-2933. 1997.

NAJAFI, M.F.; VAHEDY, F.; SEYYEDIN, M. et. al. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. **Cytotechnology**, v. 54, p. 49-56, 2007.

NAKANISHI, I., UTO, Y., OHKUBO, K. et. al. Efficient radical scavenging ability of artepillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Org. Biom. Chem.**, v. 1, p. 1452-1454, 2003.

NCI, NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Snapshot of Liver and Bile Duct Cancers**, 2008. Disponível em: <<http://planning.cancer.gov/disease/snapshots.shtml>>. Acesso em 2 Jan 2010.

NCI, NATIONAL CANCER INSTITUTE. U.S. National Institutes of Health, US, **Liver (Hepatocellular) Cancer Screening**, 2009a. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/screening/hepatocellular/HealthProfessional/page1>> Acesso em 8 Jan 2010.

NCI, NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What You Need to Know About™ Liver Cancer**. U.S. Department Of Health And Human Services, N.I.H., 2009b. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/liver.pdf>>. Acesso em 2 Jan 2010.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger's Principles Of Biochemistry. In: \_\_\_\_\_ (Ed.) **Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation**, cap. 19, p. 690-750. H. Freeman, Fourth Edition, 1.100p, 2004.

NEWELL, P.; VILLANUEVA, A.; PEIX, M. et. al. Activation of Ras/MAPK and mTOR pathways in hepatocellular carcinoma: Tumor growth inhibition with Ras/mTOR pathway abrogation by a novel combination of Sorafenib and rapamycin. Surgical Forum Abstracts. **J. Am. Coll. Surg.**, v. 205, n. 3, p. S93-S94. 2007.

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

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NIJVELDT, R.J., VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E. et. al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 74, p. 418-425, 2001.

NISHIDA, N.; FUKUDA, Y.; KOMEDA, T. et. al. Amplification and Overexpression of the Cyclin D1 Gene in Aggressive Human Hepatocellular Carcinoma. **Cancer Research**, v. 54, p. 3107-3110, 1994.

OBERLIES, N.H.; CHANG, C.; MCLAUGHLIN, J.L. Structure-Activity Relationships of Diverse Annonaceous Acetogenins against Multidrug Resistant Human Mammary Adenocarcinoma (MCF-7/Adr) Cells. **J. Med. Chem.**, v. 40, p. 2102-2106, 1997.

OHTA, T.; NAKATSUGI, S.; WATANABE, K. et. al. Inhibitory effects of bifidobacterium-fermented soy milk on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidaz[4,5-b]pyridine-induced rat mammary carcinogenesis, with a partial contribution of its component isoflavones. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 937-941, 2000.

ORSOLIC, N.; TERZIC, S.; MIHALJEVIC, Z. et. al. Effects of Local Administration of Propolis and Its Polyphenolic Compounds on Tumor Formation and Growth. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 10, 1928-1933, 2005.

PAIXÃO, J.B.A. Aspectos Epidemiológicos das Hepatites Virais. In: Coelho H.S.M., editor. **Hepatites**. 1<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Rubio, p. 1-10, 2001.

PANNAIN, V.L.N.; BOTTINO, A.C.; SANTOS, R.T.M. et. al. Detecção imunistoquímica das oncoproteínas p21ras, c-myc e p53 no carcinoma hepatocelular e no tecido hepático não-neoplásico. **Arq. Gastroenterol.**, v. 41, n. 4, 2004.

PARDHASARADHI, B.V.V.; REDDY, M.; ALI, A.M. et. al. Differential cytotoxic effects of *Annona squamosa* seed extracts on human tumour cell lines: Role of reactive oxygen species and glutathione. **J. Biosci**, v. 30, p. 237-244, 2005.

PARK, K.Y.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 50, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F. AGUIAR, C. L. et. al. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v. 58, n.9, p. 2-7, 2000.

PARK, Y.K; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L. et. al. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian Propolis. **J. Agric. and Food Chem.**, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.

PINTO, A.C.Q. Taxonomy and Botany. In: PINTO, A.C.Q.; CORDEIRO, M.C.R.; ANDRADE, S.R.M.; et. al. (Org.). **Annona Species**. International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, UK, p. 3-27, 2005.

PISCO, L.; KORDIAN, M.; PESEKE, K. et. al. Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian própolis. **J. Eur. J. Med. Chem.**, v. 41, p. 401-407, 2006.

QUISPE, A.; ZAVALA, D.; ROJAS, J. et. al. Efecto citotóxico selectivo in vitro de muricin h (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. **Rev. Peru Med. Exp. Salud. Publica**, v. 23; n. 4, p. 265-269, 2006.

RAMOS, S.; ALIA, M.; BRAVO, L.; GOYA, L. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). **J Agric Food Chem.**, v. 53, p. 1271-80, 2005.

RAOUL, J.L. Natural History of Hepatocellular Carcinoma and Current Treatment Options, **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 38, n. 2, p. 13-18, 2008.

RBT, Registro Brasileiro de Transplantes, **Associação Brasileira de Transplante de Órgãos** - ABTO. Ano XV, n. 1, 2008, 25p. Disponível em: <<http://www.abto.org.br>> Acesso em 13 Jan 2010.

REN, W., QIAO, Z.; WANG, H.; ZHU, L.; ZHANG, L. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. **Inc. Med. Res. Rev.**, v. 23, n. 4, p. 519-534, 2003.

RODRIGUEZ-DIAZ, J.L.; ROSAS-CAMARGO, V.; VEGA-VEGAZ, M.E.D. et. al. Clinical and pathological factors associated with the development of Hepatocellular Carcinoma in patients with hepatitis virus-related cirrhosis: A Long-term Follow-up Study. **Clinical Oncology**, v. 19, p. 197-203, 2007.

SAEG-UFV, **Sistema para Análises Estatísticas**. Version 9.1, Fundação Arthur Bernardes, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Brasil. 2007.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G. MESSAGE D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 2, p. 33-8, 2005.

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P.R.S.; CAMPOS, L.C. et. al. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 5, n. 3, p. 317-324, 2008.

SANGKHATHAT, S., KUSAFUKA, T., MIAO, J. et al. In vitro RNA interference against beta-catenin inhibits the proliferation of pediatric hepatic tumors. **Int. J. Oncol.**, v. 28, n. 3, p. 715-722, 2006.

SANTARIUS, T.; SHIPLEY, J.; BREWER, D. et. al. Supplementary Information of a survey of amplified and overexpressed genes in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 59-64 (January 2010). Disponível em: <<http://www.nature.com/nrc/journal/v10/n1/suppinfo/nrc2771.html>>. Acesso em 12 Jan. 2010.

SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.; MAIA, A.B. et. al. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. **Phytother. Res.**, v. 17, p. 285-289, 2003.

SANTOS, L.A.R.; PIMENTA, L.P.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Acetogeninas de anonáceas bioativas isoladas das sementes de *Annona cornifolia* A. St - Hil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 9, n. 3, p. 48-51, 2007.

SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567-573, 2000.

SANTOS, A.C.; UYEMURA, S.A.; LOPES, J.L.C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability Transition in mitochondria. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1455-1461, 1988.

SARKAR, F.; BANERJEE, S.; LI, Y. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Prevention and Treatment. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 224, n. 3, p. 326-336, 2007.

SATIR, A.A.; PATH, F.R.C. An Update on the Pathogenesis and Pathology of Hepatocellular Carcinoma. **Bahrain Medical Bulletin**, vol. 29, n. 2, p. 1-8, 2007.

SCHINDLER, R.; MENTLEIN, R. Flavonoids and Vitamin E Reduce the Release of the Angiogenic Peptide Vascular Endothelial Growth Factor from Human Tumor Cells. **J. Nutr.**, v. 136, p. 1477-1482, 2006.

SHACHAF, C.M.; KOPELMAN, A.M.; ARVANITIS, C. et. al. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. **Nature**, v. 431, n. 7012, p. 1112-1117, 2004.

SHERR, C.J. Cancer Cell Cycles. **Science**, v. 274, p. 1672-1677, 1996.

SHI, M., WANG, F., WU, Z. Synergetic anticancer effect of combined quercetin and recombinant adenoviral vector expressing human wildtype p53, GM-CSF and B7-1 genes on hepatocellular carcinoma cells in vitro. **World J. Gastroenterol.**, v. 9, p. 73-78, 2003.

SHIMIZU, K.; DAS, S.K.; HASHIMOTO, T. et. al. Artepillin C in Brazilian propolis induces G0/G1 arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 44, p. 293-299, 2005.

SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y. et. al. Cancer Statistics, **CA Cancer J. Clin.**, v. 58, p. 71-96, 2008.

SIESS, M.H., LE BON, A.M.; CANIVENC-LAVIER, M.C.; SUSCHETET, M. Mechanisms involved in the chemoprevention of flavonoids. **Biofactors**, v. 12, p. 193-199, 2000.

SILVA, B.B.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A. et. al. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2007.

SÍMILE, M.M.; DE MIGLIO, M.R.; MURONI, M.R. et. al. Downregulation of c-myc and Cyclin D1 genes by antisense oligodeoxy nucleotides inhibits the expression of E2F1 and in vitro growth of HepG2 and Morris 5123 liver cancer cells. **Carcinogenesis**, 25, n. 3, p. 333-341, 2004.

SONG, T.J.; IP, E.W.K.; FONG, Y. Hepatocellular carcinoma: Current surgical management. **Gastroenterology**, v. 127, p. S248-S260, 2004.

STEWART, B.W.; KLEIHUES, P. (Eds): World Cancer Report. **Human Cancer by Organ Site**, Cap. 5, p. 181-269. IARC Press, Lyon, 231 p. 2003.

STEWART, B.W.; KLEIHUES, P. (Eds): World Cancer Report. **The Global Burden of Cancer**, Cap. 1, p. 12-19. IARC Press, Lyon, 231p. 2003a.

SZLISZKA, E.; CZUBA, Z.P.; DOMINO, M. et. al. Ethanolic extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells. **Molecules**, v. 14, p. 738-754, 2009.

TAKAHASHI, Y.; KAWATE, S.; WATANABE, M. et. al. Amplification of *c-myc* and cyclin D1 genes in primary and metastatic carcinomas of the liver **Pathology International**, v. 57, p. 437-442, 2007.

TERRIS, B., PINEAU, P.; BREGEAUD, L. et al. Close correlation between beta-catenin gene alterations and nuclear accumulation of the protein in human hepatocellular carcinomas. **Oncogene**, v. 18, p. 6583-6588, 1999.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, P.; BANKOVA, V. et. al. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis **Evid. Based Complement. Altern. Med.**, v. 3, p. 249-254, 2006.

VELAZQUEZ, R.; RODRIGUEZ, M., NAVASCUES, C.A., et al. Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. **Hepatology**, v. 37, p. 520-527, 2003.

WANG, I.K.; LIN-SHIAU, S.Y.; LIN, J.K. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. **Eur. J. Cancer**, v. 35, p. 1517, 1999.

WASLEY, A.; ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C: geografic differences and temporal trends. **Semin. Liver Dis.**, v. 20, p. 1-16, 2000.

WÄTJEN, W.; MICHELS, G.; STEFFAN, B. et. al. Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. **J. Nutr.**, v. 135, p. 525-531, 2005.

WENG, M.S.; HO, Y.S.; LIN, J.K. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogenactivated protein kinase, **Bioch. Pharm.**, vol. 69, n. 12, p. 1815-1827, 2005.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer Facts and Figures**. American Cancer Society. Geneva, 2009a.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global cancer rates could increase by 50% to 15 million by 2020. **World Cancer Report**, Geneva, 2003. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/print.html>>. Acesso em 05 Jan 2010.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Health Risks. **Mortality and burden of disease attributable to selected major risks**. Geneva, 2009b. Disponível em: <[http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/global\\_health\\_risks/en/index.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/global_health_risks/en/index.html)> Acesso em 05 Jan 2010.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Cancer Report, 2008**. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2008a.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics 2008**. Department of Measurement and Health Information Systems, Geneva, 2008.

WOLFE, K.L.; LIU, R.H. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, n. 18, p. 8404-8411, 2008.

WOO, K.J.; JEONG, Y.J.; PARK, J.W.; KWON, T.K. Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells. **Biochem, Biophys, Res, Commun.**, v. 325, 1215-22, 2004.

WRIGHT, K.M. Groundbreaking plant from the Amazon takes on cancer, skeptics, and controversy. **Members Alert**, Health Sciences Institute, v. 5, n. 7, p. 3-6, 2005.

WU, F.; ZENG, L.; GU, Z.M. et. al. Muricatocins a and b, two new bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. **J. Nat. Prod.**, v. 58, n. 6, p. 902-908, 1995.

WU, F.; ZENG, L.; GU, Z.M. et. al. New bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, anomuricin c and muricatocin c, from the leaves of *Annona muricata*. **J. Nat. Prod.**, v. 58, n. 6, p. 909-915, 1995a.

WU, F.; ZHAO, G.X.; ZENG, L. et. al. Additional bioactive acetogenins, anomutacin from the leaves of *Annona muricata* and (2,*d-trans* and *cis*)-l-or-annonacin-a-ones. **J. Nat. Prod.**, v. 58, n. 9, p. 1430-1437, 1995b.

YANAGIHARA, K.; ITO, A.; TOGE, T.; NUMOTO, M. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract, **Cancer Res.**, v. 53, p. 5815-5821, 1993.

YANG, H.; ZHANG, N.; Li, X. et. al. Structure-activity relationships of diverse annonaceous acetogenins against human tumor cells. **Bioorganic & Medicina Chemistry Letters**, v. 19, p. 2199-2202, 2009.

YOSHIDA, T.; HORINAKA, M.; TAKARA, M. et. al. Combination of isoliquiritigenin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in colon cancer HT29 cells. **Environ. Health Prev. Med.**, v. 13, p. 281-287, 2008.

YUAN, S.S.F.; CHANG, H.L.C.; CHEN, H.W. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. **Life Sciences**, v. 72, p. 2853-2861, 2003.

ZAFRA-POLO, M.C.; GONZALEZ, M.C.; ESTORNELL, E. et. al. Acetogenins from annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. **Phytochem.**, v. 42, n. 2, p. 253-271, 1996.

ZENG, L.; WU, F.; OBERLIES, N.H.; MCLAUGHLIN., J.L. Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. **J. Nat. Prod.**, v. 59, p. 1035-1042, 1996.

ZHANG, T.; CHEN, X.; QU, L. et. al. Chrysin and its phosphate ester inhibit cell proliferation and induce apoptosis in Hela cells. **Bioorg. & Med. Chem.**, v. 12, n. 23, p. 6097-6105, 2004.

ZHANG, Y.J., WEI, J., CHEN, C.J., et. al. Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma. **Biochem. Biop. Res. Commun.**, v. 196, p. 1010-16, 1993.

ZHENG, X.; MENG, W.D.; XU, Y.Y. et al., Synthesis and Anticancer Effect of Chrysin Derivatives, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 13, p. 881-884, 2003.

**ANEXOS**

## ANEXOS

### 1. Caracterização e identificação botânica da própolis verde

Análises cromatográficas da fração alcoólica da própolis verde forneceram os resultados apresentados na Figura 1A e Tabela 1A.

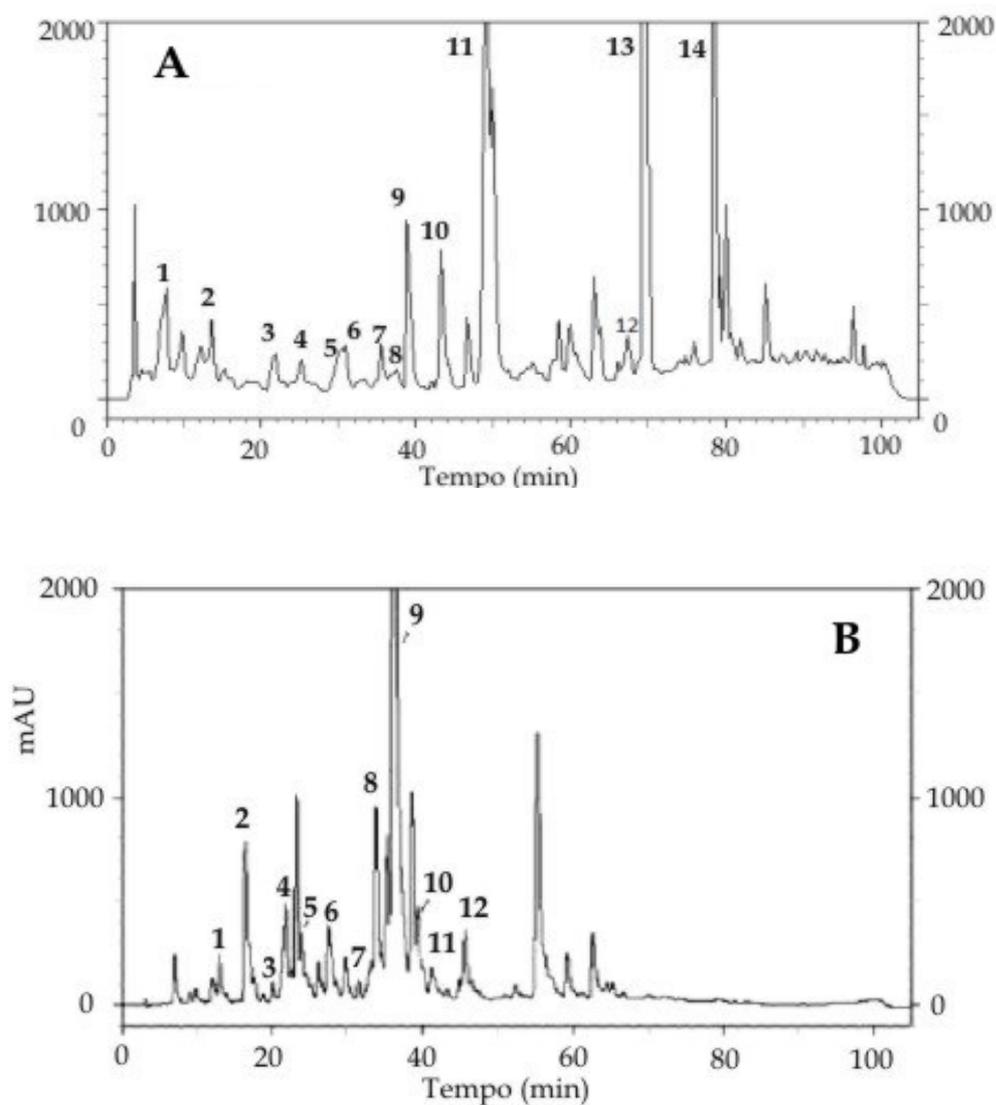


Figura 1A – CLAE-FR de extrato etanólico da própolis (Lot# ESAL-270309) e da resina exsudata de *Baccharis dracunculifolia*. Os respectivos números dos picos representando os constituintes químicos estão descritos na Tabela 8.

Tabela 1A – Flavonoides e outros constituintes químicos da própolis (Lot# ESAL-270309) de *Baccharis dracunculifolia*

PICO	COMPOSTOS	TEMPO DE RETENÇÃO (MINUTOS)	CONSTITUINTES <i>B. dracunculifolia</i> (mg/g)	CONSTITUINTES PRÓPOLIS (mg/g)
1	ÁCIDO CUMÁRICO	8.165	2.49	7.46
2	RUTINA	13.972	24.49	10.16
3	PINO BANKSINA	23.672	7.19	16.89
4	QUERCETINA	25.556	3.78	3.28
5	KAMPFEROL	31.926	0.91	2.83
6	APIGENINA	32.638	2.51	2.66
7	PINOCEMBRINA	35.329	27.07	50.82
8	PINO BANKSIN-3-ACETATO	38.170	6.59	6.45
9	CRISINA	40.915	1.13	9.50
10	GALANGINA	41.987	2.30	6.33
11	KAMPFERIDE	46.974	7.11	18.08
12	TECTOCRISINA	67.394	2.93	5.24
13	ARTEPILIN C	72.899	56.09	153.48
14	BACHARIN	81.381	19.86	64.96

De acordo com o sistema de classificação brasileira, o resultado das análises da amostra Lot# ESAL-270309 permite incluí-la ao “Grupo 12” (Própolis Verde) cuja origem botânica é identificada como sendo de *Baccharis dracunculifolia* (ALENCAR et al., 2005; PARK et al., 2004), já que seus perfis químicos foram muito semelhantes.

## 2. Caracterização e identificação botânica da própolis vermelha

Análises cromatográficas da fração alcoólica da própolis vermelha forneceram os resultados apresentados na Figura 2A e Tabela 2A.

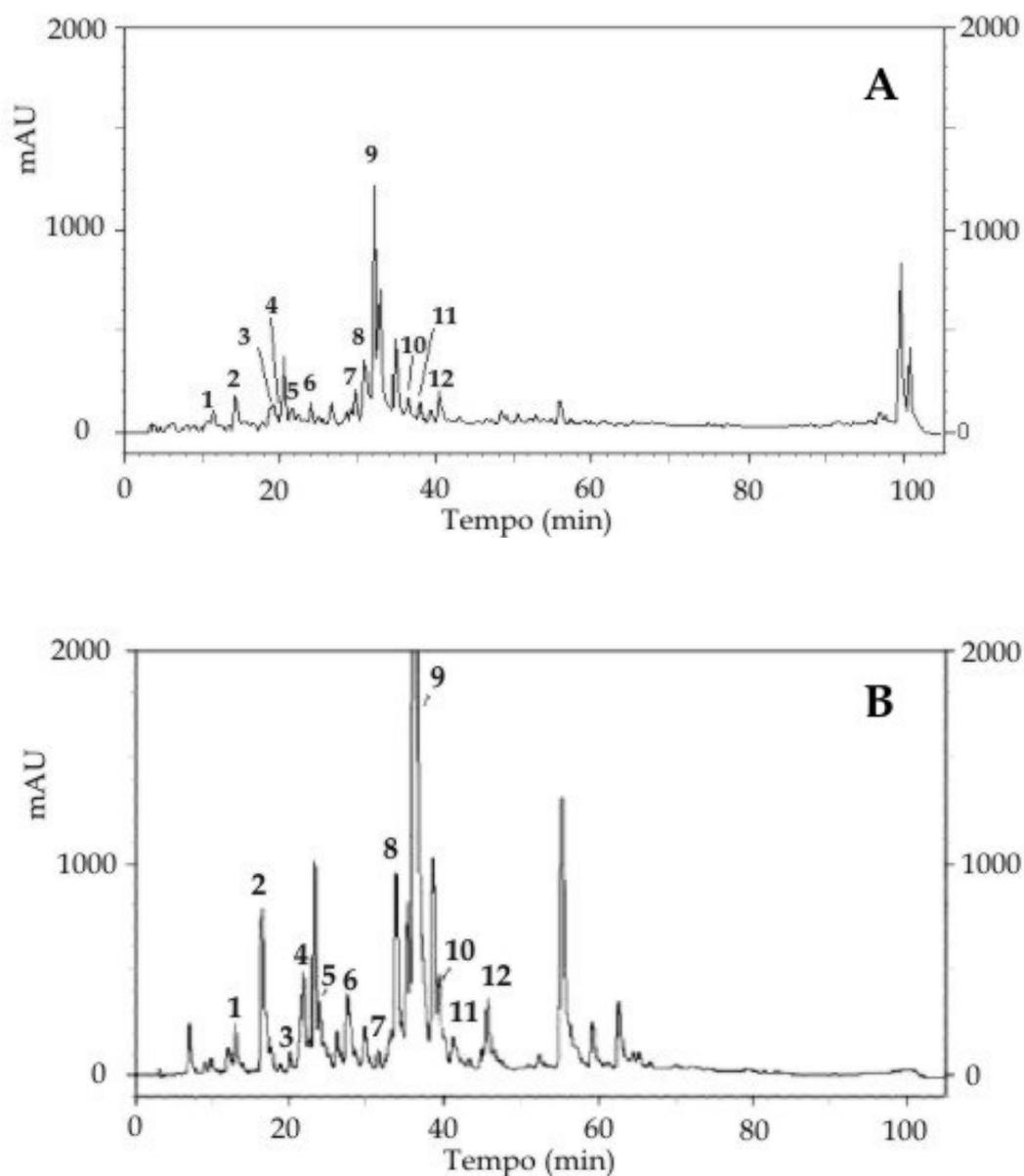


Figura 2A – CLAE-FR de extrato etanólico da própolis (Lot# PADE-0109-SR) e da resina exsudata de *Dalbergia ecastophyllum*. Os respectivos números dos picos representando os constituintes químicos estão descritos na Tabela 2A.

Tabela 2A – Flavonoides e outros constituintes químicos da própolis (Lot# PADE-0109-SR) de *Dalbergia ecastophyllum*

<b>PICO</b>	<b>COMPOSTOS</b>	<b>TEMPO DE RETENÇÃO (MINUTOS)</b>	<b>CONTEÚDO PRÓPOLIS (mg/g)</b>	<b>CONTEÚDO <i>DALBERGIA ECASTOPHYLLUM</i> (mg/g)</b>
1	RUTINA	13.423	<b>0.6</b>	<b>1.3</b>
2	LIQUIRITIGENINA	16.991	<b>2.0</b>	<b>7.1</b>
3	DAIDZEINA	22.347	<b>0.4</b>	<b>4.3</b>
4	PINOBANKSINA	23.199	<b>1.3</b>	<b>6.0</b>
5	QUERCETINA	24.593	<b>0.8</b>	<b>1.9</b>
6	LUTEOLINA	28.395	<b>0.5</b>	<b>2.1</b>
7	DALBERGINA	32.154	<b>0.4</b>	<b>0.9</b>
8	ISOLIQUIRITIGENINA	34.619	<b>3.2</b>	<b>12.1</b>
9	FORMONONETINA	36.967	<b>3.8</b>	<b>19.5</b>
10	PINOCEMBRINA	42.296	<b>6.9</b>	<b>7.1</b>
11	PINOBANKSINA-3-ACETATO	42.950	<b>3.6</b>	<b>2.6</b>
12	BIOCHANINA A	46.446	<b>0.8</b>	<b>1.5</b>

De acordo com o sistema de classificação brasileira, os resultados das análises da amostra Lot# PADE-0109-SR permite incluí-la ao “Grupo 13” (Própolis Vermelha) cuja origem botânica é identificada como sendo de *Dalbergia ecastophyllum* (DAUGSH et. al., 2007), já que seus perfis químicos foram muito semelhantes.