



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA DO
EXTRATO AQUOSO DE FRUTAS TROPICAIS

Natal-RN

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA DO
EXTRATO AQUOSO DE FRUTAS TROPICAIS

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Joanna de Ângelis da Costa Barros

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha

Colaboradora: Prof. Dr^a Ana Vlândia Moreira Bandeira

Natal/RN

2012

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde

B277a

Barros, Joanna de Angelis da Costa.

Avaliação da atividade antioxidante e antiproliferativa do extrato aquoso de frutas tropicais / Joanna de Angelis da Costa Barros. – Natal, 2012.

74f.:Il.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Antioxidante – Dissertação. 2. Frutas tropicais – Dissertação 3. Atividade antiproliferativa – Dissertação. 4. Alimentos funcionais – Dissertação. I. Rocha, Hugo Alexandre de Oliveira Rocha. II. Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU: 678.48:634.6(043.3)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA DO
EXTRATO AQUOSO DE FRUTAS TROPICAIS

Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha (UFRN)

Presidente da Banca

Prof. Dr^a Valquíria Pereira de Medeiros (UNIFESP)

Membro Externo

Prof. Dr^o Luiz Roberto Diz de Abreu (UFRN)

Membro interno

Natal/RN

2012

Dedico esta obra

Ao amigo e orientador **Hugo Alexandre de Oliveira Rocha**, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela confiança concedida, por estar sempre disposto a transmitir ensinamentos profissionais e pessoais e por me apoiar nos momentos em que precisei.

Agradecimentos

**“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”
(Fernando Sabino)**

Á **Deus**, pela minha existência e por me oferecer condições para realizar essa conquista;

A minha família, em especial à meus pais, **Helena Rita** por todo amor e incentivo dedicado a mim durante todos esses anos, estando sempre presente em todos os momentos da minha vida e por ter sempre feito o possível para que eu possa ter uma educação de qualidade e **Ronaldo Barros** por ser um excelente conselheiro e ter demonstrado apoio profissional ou pessoal. Quero que saibam que me sinto privilegiada por ter pais como vocês.

A minha irmã **Liana Barros**, por dividir preocupações e estar disposta a ajudar quando necessário.

Ao meu namorado **Íverton Rodrigo**, por ter sido paciente e ter compreendido minhas mudanças de humor e os momentos de ausência. Pelo seu amor, carinho e apoio.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Hugo Rocha, pela ajuda, dedicação e compreensão, fundamentais para a conclusão deste trabalho;

A minha orientadora de iniciação científica da graduação e coorientadora do mestrado Ana Vlândia Bandeira Moreira, por ter me incentivado e apoiado, sendo essencial para meu ingresso no mestrado;

Ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte pelas condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho;

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento desta pesquisa;

A todos os professores do Departamento de Nutrição da UFRN que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste projeto. Em especial aos professores da banca de qualificação, Clodomiro Alves Junior e Valéria Soraya de Farias Sales e aos da banca de defesa Valquíria Pereira de Medeiros e Luiz Roberto Diz de Abreu pela disponibilidade e pelas sugestões oferecidas;

À família BIOPOL: Ana Karina, Arthur, Cinthia, Daniel, Daniele, Dayanne, Diego, Fernando, Gabriel, Hugo, Ivan, Jailma, Kaline, Karol, Leandro, Leonardo, Letícia, Max, Mariana, Moacir, Nednaldo, Sara, Roni, Rafael, Raniere, Ruth e Vinícius, pelo bom convívio, por me fazerem sentir acolhida desde o início, pela compreensão nos dias ausentes e pela grande ajuda nos meus primeiros passos no laboratório. Muito obrigada mesmo por poder contar com apoio de todos vocês, seja de forma direta ou indireta. Esse laboratório me mostrou que pesquisa tem tudo haver com apoio e amizade, sem vocês seria impossível concluir esse mestrado.

A Jailma pela amizade e por ter estado ao meu lado nos momentos em que mais precisei me apoiando e me dando forças para continuar. Saiba que você foi fundamental para alcançar mais essa etapa da minha vida, pois sempre que precisava de ajuda ou tirar dúvidas você era a primeira pessoa que lembrava;

A Ruth, minha querida teacher, por me ajudar nos experimentos de atividade antiproliferativa, por me fazer rir e sempre estar disposta a me ensinar;

A Gabriel pela enorme paciência, e por ter me ajudado bastante no início dos experimentos, sendo essencial nos ensinamentos dos protocolos de experimentos que envolviam atividade antioxidante;

As minhas amigas e nutricionistas do Hospital Maria Alice Fernandes (Angélica, Gerliane, Lígia, Lorena Lima, Lorena Tinoco, Márcia, Priscila e Rita), pelas trocas de plantões e amizade. Obrigada a chefe do setor (Amélia) pela compreensão e por acatar as solicitações referentes à escala. Obrigada a todas pela amizade, pela companhia e pelos momentos de alegria;

A turma de nutrição da graduação, em especial as amigas Fernanda, Maria Verônica, Pryscila e Tathyanne. Obrigada pela amizade verdadeira e pelos bons momentos durante o curso.

As amigas do CEFET-RN, atual IFRN (Catiane, Fernanda, Larissa, Luciana, Luhane, Patrícia, Vanessa e Zaíra), por me proporcionarem até hoje momentos de satisfação e por me fazerem lembrar como é bom ter verdadeiras amigas. Espero que possamos fortalecer cada dia mais esses laços de amizade.

Ao final dessa etapa gostaria de agradecer a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

**“A vida é uma oportunidade, aproveite-a...
A vida é beleza, admire-a...
A vida é felicidade, deguste-a...
A vida é um sonho, torne-o realidade...
A vida é um desafio, enfrente-o...
A vida é um dever, cumpra-o...
A vida é um jogo, jogue-o...
A vida é preciosa, cuide dela...
A vida é uma riqueza, conserve-a...
A vida é amor, goze-o...
A vida é um mistério, descubra-o...
A vida é promessa, cumpra-a...
A vida é tristeza, supere-a...
A vida é um hino, cante-o...
A vida é uma luta, aceite-a...
A vida é aventura, arrisque-a...
A vida é alegria, mereça-a...A vida é vida, defenda-a...”**

(Madre Tereza de Calcutá)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Compostos fenólicos totais do extrato aquoso de frutas tropicais, expresso em Equivalente de Ácido Gálico (EAG) ug/ mL.....	32
Figura 2. Capacidade Antioxidante Total do extrato aquoso de frutas tropicais, expresso em Equivalente de Ácido Ascórbico (EAA) mg/mg.....	33
Figura 3. Atividade antiproliferativa de extratos aquosos de frutas tropicais com células 3T3.....	41
Figura 4. Atividade antiproliferativa de extratos aquosos de frutas tropicais com células HeLa.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

ADA American Dietetic Association

AG Ácido gálico

ANVISA Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

C-6 Células de glioma do cérebro de ratos

Caco-2 Células do câncer de cólon humano

CAT Capacidade antioxidante total

DNA Ácido desoxiribonucleico

DPPH 1,1- difenil-2-picrilhidrazila

EAA Equivalente de ácido ascórbico

EAG Equivalente de ácido gálico

EDTA Ácido etilenodiaminotetracético

ERO Espécies reativas do oxigênio molecular

FOSHU Foods for Specified Health Use

GPx Glutathione peroxidase

HCT-116 Células de carcinoma do cólon humano

HeLa Linhagem celular de adenocarcinoma cervical de colo uterino humano

HepG2 Células cancerosas do fígado humano

HL-60 Células de leucemia humana

HT-29 Células de carcinoma de cólon humano

INCA Instituto Nacional de Câncer

MCF-7 Células de câncer de mama

MDA-468 Células do câncer de mama humano

MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5 difeniltetrazolio bromídio

NBT Nitroblue tetrazolium

NO Óxido nítrico

PC-3 Células de próstata humana

SOD Superóxido dismutase

TBHQ Tert-Butilhidroquinona

TCA Ácido tricloroacético

TCA Ácido tricloroacético

TFA Ácido trifluoracético

UNESCO United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization

3T3 Células de fibroblastos de camundongo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. Antioxidante x Radicais Livres.....	18
2.2. Atividade Antiproliferativa.....	19
2.3. Alimentos Funcionais.....	21
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1. Material.....	25
4.2. Outros materiais.....	25
4.3. Equipamentos.....	26
4.4. Obtenção dos extratos aquosos das frutas.....	27
4.5. Determinação de fenólicos totais.....	27
4.6. Atividade antioxidante <i>in vitro</i> das frutas.....	27
4.6.1. Capacidade Antioxidante Total (CAT).....	27
4.6.2. Seqüestro do radical hidroxila (OH [•]).....	28
4.6.3. Seqüestro do radical superóxido (O ₂ [•]).....	28
4.6.4. Quelação de íons metais.....	29
4.6.5 Poder redutor.....	29
4.7. Atividade Antiproliferativa.....	29
5. Análise estatística.....	30
6.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
6.1. Compostos fenólicos totais	31
6.2. Atividade Antioxidante.....	32
6.2.1 Capacidade Antioxidante Total (CAT).....	33
6.2.2. Poder redutor.....	35
6.2.3. Atividade de quelação de metais.....	36
6.2.4. Sequestro do radical superóxido.....	37
6.2.5 Sequestro do radical hidroxila.....	38
6.3. Atividade antiproliferativa.....	41
7. CONCLUSÕES.....	45
8. APÊNDICE.....	47
9. REFERÊNCIAS.....	61

RESUMO

A atividade antioxidante de extratos aquosos de cinco frutas tropicais (*Spondias lutea*, *Hancornia speciosa*, *Spondias purpúrea*, *Manilkara zapota* e *Averrhoa carambola*) foi investigada por diferentes métodos. A quantidade de compostos fenólicos foi determinada pelo uso do reagente Folin-Ciocalteu. O extrato da fruta *M. zapota* apresentou Capacidade Antioxidante Total (CAT) superior aos demais extratos. As frutas estudadas não apresentaram nem poder redutor nem quelação férrica (de 0,01 a 2,0 mg/mL). A *H. speciosa* apresentou alta atividade seqüestradora do radical superóxido (80% a 0,5 mg/mL) e na concentração de 8,0 mg/mL a *A. carambola*, a *S. purpúrea* e a *S. lutea* seqüestraram 100% dos radicais formados. A *M. zapota* e a *S. purpurea* apresentaram maior teor de compostos fenólicos e maior atividade sequestradora do radical hidroxila (92 % a 2,0 mg/mL). A atividade antiproliferativa foi avaliada em células de fibroblastos de rato (3T3) e em células tumorais de colo de útero humano (HeLa). O extrato mais potente foi o de *S. purpurea* (0,5 mg/mL) que inibiu em 60% da proliferação das células HeLa. A maioria das frutas apresentaram propriedade antioxidante e antiproliferativa o que possibilita maiores investigações sobre um possível caráter funcional.

Palavras- chaves: antioxidante; atividade antiproliferativa; frutas tropicais; alimentos funcionais.

ABSTRACT

The antioxidant activity of aqueous extracts of five edible tropical fruits (*Spondias lutea*, *Hancornia speciosa*, *Spondias purpurea*, *Manilkara zapota* and *Averrhoa carambola*) was investigated using different methods. The amount of phenolic compounds was determined by the Folin-Ciocalteu reagent. The *M. zapota* had Total Antioxidant Capacity (TAC) higher than the other fruits. Extracts showed neither reducing power nor iron chelation (between 0.01 and 2.0 mg/mL). *H. speciosa* exhibited the highest superoxide scavenging activity (80%, 0.5 mg/mL). However, at high concentrations (8.0 mg/mL) only *A. carambola*, *S. purpurea* and *S. lutea* scavenging 100% of radicals formed. *M. zapota* and *S. purpurea* had higher phenolic compound levels and greater OH radical scavenging activity (92 %, 2.0 mg/mL). Antiproliferative activity was assessed with 3T3 fibroblasts and cervical tumor cells (HeLa). The most potent extract was *S. purpurea* (0.5 mg/mL), which inhibited HeLa cell proliferation by 52%. The most fruits showed antioxidant and antiproliferative properties, characterizing them as functional foods.

Keywords: antioxidant; antiproliferative; tropical fruits; functional foods

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a National Academy of Sciences (USA, 2000) “antioxidante alimentar é toda substância na dieta capaz de reduzir significativamente os efeitos adversos produzidos por espécies reativas, como aquelas de oxigênio e nitrogênio, e que possuem função normal no organismo”

Antioxidantes estão presentes naturalmente no organismo e também nos alimentos, sendo importantes para evitar o aumento na quantidade de radicais livres em células, o que poderia levar ao estresse oxidativo (NETO, 2000), este corresponde a um desequilíbrio entre a quantidade de moléculas oxidantes e antioxidantes existentes num sistema fisiológico, como exemplo o meio celular, o que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres (VASCONCELOS et al, 2007).

Assim, a nutrição e padrões dietéticos têm sido apresentados como alternativa para impactar diretamente na saúde da população, por meio dos benefícios atribuídos à redução do estresse oxidativo pela normal ou excessiva produção de radicais livres (BERGER, 2005).

É sabido que o aparecimento de mutações no DNA celular, promovidas por agentes patogênicos (radicais livres, toxinas, metais, fontes energéticas, etc), pode desencadear a perda do controle na proliferação celular, tendo como consequência um fenótipo celular oncogênico. Neste sentido, fatores da dieta podem induzir a morte de células neoplásicas desde os estágios iniciais da carcinogênese ou impedir a expansão proliferativa das células cancerígenas (FERRARI, 2000).

Vários trabalhos relatam que compostos antioxidantes, atuam de forma efetiva na indução da morte celular (HEO e LEE, 2005). Assim, diversos produtos naturais têm sido estudados no sentido de proteger as células da apoptose (FERRARI, 2001).

Evidências têm demonstrado que dietas com elevado conteúdo de frutas podem reduzir o risco de inúmeras doenças e tem efeitos significativos na redução da incidência de diversos tipos de câncer, e evidências epidemiológicas demonstram correlação inversa entre doenças cardiovasculares e consumo de alimentos funcionais (NINFALI et al, 2005 e COSTA et al, 2000).

Segundo a Resolução nº 18, de 30/04/1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), considera-se propriedade funcional “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo”. De acordo com a ANVISA, um alimento funcional além de apresentar funções nutricionais, deve produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos a saúde, tendo uso potencial na redução do risco de determinadas doenças. De acordo com lista de alegações de propriedade funcional aprovadas pela Agência, alguns compostos com propriedades funcionais, apresentam ação antioxidante.

O Brasil, em especial as regiões Norte e Nordeste, apresenta elevado potencial na produção de frutas. A UNESCO catalogou que estão localizadas no Brasil, cerca de 20% das 250 mil espécies do grupo de frutas e vegetais medicinais.

O consumo de frutas vem aumentando bastante como resultado de uma preocupação individual com a saúde. Porém, várias frutas não possuem ação comprovada cientificamente, dada a sua variedade de oferta e a quantidade de etapas de avaliações para que se tenha seu efeito comprovado (COLLI; SARDINHA; FILISETTI, 2005). Além disso, o teor de antioxidantes em alimentos, inclusive frutas, é amplamente influenciado por diversos fatores, dentre eles: variedade, fatores genéticos, estágio de maturação, condições climáticas e edáficas, o que contribui para diversidade de resultados nas pesquisas científicas.

Muitas das frutas tropicais apresentam escassez de estudos que comprovem a sua eficácia como alimentos funcionais, como por exemplo: cajá (*Spondias lútea*), mangaba (*Hancornia speciosa*), carambola (*Averrhoa carambola*), siriguela (*Spondias purpúrea*), e sapoti (*Manilkara zapota*).

O cajá (*Spondias lutea*) pertencente à família Anacardiaceae, apresenta polpa sucosa, doce-acidulada, de sabor e cheiro muito agradáveis, sendo consumido ao natural ou utilizado na elaboração de geléias, compotas, refrescos e sorvetes. Essa fruta possui forma ovóide com leve achatamento na base, quando madura sua casca lisa apresenta coloração amarelo-alaranjado. Sua árvore atinge de 20 a 25m de altura com tronco revestido por casca muito grossa (LORENZI, 1992).

A mangaba (*Hancornia speciosa*), que pertence à família das Apocináceas, é uma fruta muito apreciada no Nordeste, apresenta boa digestibilidade e valor nutritivo. Seu teor de proteína (1,3 a 3,0%) é superior ao da maioria das frutas. O desenvolvimento do mercado de frutas no Brasil despertou o interesse comercial dessa fruta para a produção de sucos, sorvetes, geléias e licores. A fruta apresenta polpa acidulada e coloração amarela e um pouco avermelhada, quando madura (PINHEIRO, 2001).

A carambola (*Averrhoa carambola*), da família Oxalidaceae, pode ser consumida *in natura*, forma em que vem tendo destaque, ou usada na fabricação de compotas ou geléias, mas ainda em estágio artesanal. Apresenta sabor agri-doce, a casca é lisa e brilhante, e a cor varia do verde ao amarelo dependendo do grau de maturação. É rica em sais minerais (cálcio, fósforo e ferro), contém vitaminas A, C e do complexo B. Essa fruta apresenta formato de estrela quando cortada, e tem de cinco a seis gomos. No Brasil, sua produção anual é estimada em 3.000 T (DONADIO et al, 2001)

A sirigueleira (*Spondias purpurea*), uma Anacardiaceae, é originária da América Tropical, produz a siriguela, fruto tipo drupa de cor vermelho-escura quando maduro, que possui polpa de aroma e sabor agradáveis. Devido a sua excelente qualidade organoléptica, a siriguela é muito apreciada no Nordeste brasileiro, refletido pelo contínuo aumento do consumo do fruto *in natura* ou processado na forma de diversos produtos, normalmente disponibilizados no mercado, o que tem proporcionado crescente interesse para seu cultivo comercial (SACRAMENTO e SOUSA, 2000).

O sapoti (*Manilkara zapota*), pertencente à família Sapotaceae, é reconhecido por seu delicioso sabor adocicado e levemente adstringente, e, na maioria das vezes, é consumido *in natura* ou na forma de doces, compotas ou geléias. Apresenta casca de coloração marrom e polpa de cor clara. O sapotizeiro é uma fruteira muito bem adaptada às condições climáticas de nosso País, mais especificamente às da região Nordeste (MIRANDA et al, 2002).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Antioxidante x Radicais livres

Os radicais livres podem ser definidos como qualquer espécie química capaz de existir independentemente, que contém um ou mais elétrons não pareados ocupando orbitais atômicos ou moleculares. Em geral são instáveis e reagem com diversos compostos e estruturas celulares. No organismo humano, a atividade metabólica normal produz constantemente esses radicais (ABDALLA, 1993).

Essas espécies reativas podem causar alterações nas células, agindo diretamente sobre alguns componentes celulares. Os ácidos graxos poliinsaturados das membranas, por exemplo, são muito vulneráveis ao ataque de radicais livres. Estas moléculas podem desencadear reações de oxidação nos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, denominadas de peroxidação lipídica, que afetarão a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade (RICE-EVANS; BURDON, 1993).

Contudo, os organismos vivos apresentam um complexo sistema de defesa antioxidante para combater esses radicais livres que são continuamente produzidos por fatores endógenos (respiração aeróbica, algumas funções imunes mediadas pelas células) e exógenos (dieta, medicamentos, fumo, poluição, atividade física extenuante, etc). Este sistema envolve além de enzimas de defesa antioxidante (catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase), compostos não-enzimáticos tais como glutathione, hormônio do crescimento, ácido úrico, bilirrubina e nutrientes (DRÖGE, 2002) que protegem o organismo contra os efeitos danosos de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MAFRA; ABDALLA; COZZOLINO, 1999).

No organismo, quando ocorre estresse oxidativo, ou seja, a existência de um desequilíbrio, devido à geração excessiva de radicais livres, ou em detrimento da baixa

velocidade de remoção desses radicais, pode haver danos celulares, devido ao seu ataque às membranas, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucléicos, com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos como adiposo, vascular e cerebral, além de músculos e fígado, sendo responsável por diversas doenças (MULLER, 2007).

Como os sistemas antioxidantes muitas vezes são insuficientes para prevenir completamente os danos causados pela ação dos radicais livres, há necessidade de se utilizar antioxidantes de fontes externas, uma vez que o consumo de antioxidantes através da dieta parece ser de grande importância por diminuir a quantidade de radicais livres no organismo, e conseqüentemente, apresentar potencial redução do risco de determinadas doenças (BERGER, 2005).

Portanto, o interesse na descoberta de substâncias naturais com atividade antioxidante tem aumentado significativamente, fazendo com que a comunidade científica busque novas fontes naturais de compostos com ação antioxidante.

2.2. Atividade antiproliferativa

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos (INCA, 2012).

Estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo. Os tumores podem ter início em diferentes tipos de células, quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas. Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si

são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, conhecida como metástase (INCA, 2012).

Para manter a homeostase nos tecidos, sinais antiproliferativos são usados para induzir a saída das células normais de um estado proliferativo para um estado quiescente, ou induzir a um estado pós-mitótico, onde seu potencial proliferativo será perdido. No entanto, as células cancerígenas tornam-se insensíveis a esses sinais (WEINBERG, 1995), portanto, independente da causa, o câncer é uma doença celular caracterizada por desvio nos mecanismos de controle de proliferação e diferenciação celular (MOFFAT et al., 2000).

Diante da grande diversidade biológica do câncer, a busca de novas substâncias com atividade antitumoral tem surgido com uma perspectiva de se atingir uma grande eficácia terapêutica. Atualmente 50% dos quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer são provenientes, direta ou indiretamente, de fontes naturais, como plantas, microorganismos e organismos marinhos (MANN, 2002).

Dos tratamentos atuais, a quimioterapia é uma das principais modalidades terapêuticas utilizada no tratamento de pacientes com vários tipos de câncer. Contudo, em muitos casos, somente a quimioterapia não leva a resultados satisfatórios como a remissão de tumores e a prevenção de metástase, além de induzir muitos efeitos colaterais nas doses efetivas (SALGALLER, 2000).

Por isso, a descoberta e a identificação de novas substâncias que sejam realmente efetivas contra tumores têm se tornado uma importante área na pesquisa biomédica. O uso dos produtos naturais como agentes antitumorais tem longa história que começou com a medicina popular e através dos tempos, tem sido incorporado à medicina tradicional e alopática (COSTA-LOTUFO et al., 2002).

Vários estudos mostram que os compostos antioxidantes presentes nas frutas apresentam atividade antiproliferativa em diferentes tipos de câncer, no entanto não se conhece mecanismos de ação.

Katsube et al, 2003, avaliaram extratos etanólicos de 10 plantas comestíveis, e o extrato da fruta mirtilo foi o mais eficaz em inibir o crescimento de células HL-60 de leucemia humana do que de células HCT-116 de carcinoma do cólon humano. As linhagens de células estudadas foram incubadas com 0,5; 1; 2 e 4 mg / mL do extrato por 24 e 48 h. O crescimento das células HL-60 foi inibido em todas as concentrações. No entanto, o crescimento das células HCT-116 não foi inibido nas concentrações de 0,5 a 2mg/mL nas primeiras 24 h, apenas em 48 h nas concentrações de 1 a 4 mg / mL.

Em estudo realizado por Seeram et al, 2006, extratos de morango, framboesa e mirtilo suprimiram a proliferação de MCF-7 e HT-29, células de câncer de mama e células de carcinoma de cólon humano, respectivamente. Nesse estudo observou-se que o aumento da concentração dos extratos foi diretamente proporcional a inibição da proliferação celular. Foi verificado também que a capacidade dos extratos em estimular a apoptose foi apresentada apenas nas células HT-29.

Em outro estudo, extratos de amora apresentaram eficácia antiproliferativa para linhagens de células de câncer cervical humano (HeLa). Esses extratos foram eficazes contra células do câncer de cólon humano (Caco-2), apresentando-se mais sensíveis em baixas concentrações do que em concentrações mais elevadas (MCDOUGALL, ROSS, IKEJI, e STEWART, 2008)

2.3. Alimentos funcionais

Inúmeros fatores afetam a qualidade de vida das pessoas, de forma que a população deve conscientizar-se da importância do consumo de alimentos contendo

substâncias que auxiliam a promoção da saúde, possibilitando uma melhora no estado nutricional (MORAES e COLLA, 2006).

O termo “alimentos funcionais” foi primeiramente introduzido no Japão em meados dos anos 80. Referem-se a alimentos que auxiliam nas funções específicas do corpo, sendo estes definidos como “Alimentos para uso específico de saúde” (*Foods for Specified Health Use-FOSHU*) em 1991. Dessa forma, alimentos funcionais são todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação cotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, graças à presença de ingredientes fisiologicamente saudáveis (CÂNDIDO e CAMPOS, 2005).

Esses alimentos se caracterizam por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, demonstrando capacidade de regular funções corporais, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças (NEUMANN, et al., 2000; TAIPINA, et al., 2002), como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e coronariopatias (SOUZA, et al., 2003).

Os alimentos funcionais podem ser classificados de dois modos: quanto à fonte, de origem vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando em seis áreas do organismo: no sistema gastrointestinal; no sistema cardiovascular; no metabolismo de substratos; no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular; no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (SOUZA, et al., 2003).

Uma grande variedade de produtos tem sido caracterizada como alimentos funcionais, incluindo componentes que podem afetar inúmeras funções corpóreas, sendo relevantes para o estado de bem-estar e saúde. Esta classe de compostos pertence à nutrição e não à farmacologia, merecendo uma categoria própria. O seu

papel em relação às doenças estará, na maioria dos casos, concentrado mais na redução dos riscos do que na prevenção (MORAES e COLLA, 2006).

De acordo com a American Dietetic Association (ADA), 1999 os alimentos funcionais apresentam compostos bioativos e devem comprovar benefícios à saúde através de evidências científicas.

Segundo Anjo, 2004, muitos são os alimentos considerados funcionais descritos pela ADA, 1999, no entanto, com relação às frutas e vegetais, destacam-se apenas: as uvas, por apresentarem fenóis resveratrol com benefícios à função cardiovascular; a alcachofra, banana, alho, chicória e cebola que apresentam frutooligossacarídeo (inulina), responsável pela melhora da função imune, redução do risco de diabetes tipo 2, obesidade, osteoporose, doenças cardiovasculares e câncer; a cenoura e o brócolis que apresentam caroteno e sulforafane, respectivamente, e proporcionam redução no risco de câncer.

Portanto, tendo em vista os possíveis benefícios do consumo de frutas para a saúde humana e a ampla diversidade produzida e consumida no Brasil, bem como as características regionais favoráveis ao cultivo de determinadas espécies de frutas, o presente trabalho propõe verificar atividade antioxidante e realizar ensaios proliferativos em células normais, bem como tumorais, com frutas tropicais consumidas no Nordeste, a fim de subsidiar possíveis discussões acerca da importância dessas espécies de frutas para saúde humana, com sua utilização para fins dietoterápicos e futuras aplicações nutricionais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antioxidante e antiproliferativa de extratos aquosos de frutas tropicais.

3.2. Objetivos Específicos

- Obter extrato aquoso de cinco espécies de frutas típicas da região Nordeste que apresentam escassez de estudos científicos: cajá (*Spondias lútea*), mangaba (*Hancornia speciosa*), seriguela (*Spondias purpúrea*), sapoti (*Manilkara zapota*), carambola (*Averrhoa carambola*).
- Realizar dosagem de Fenólicos Totais;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos aquosos através de diferentes sistemas *in vitro* (capacidade antioxidante total, seqüestro do radical hidroxila, seqüestro do radical superóxido, quelação férrica, poder redutor).
- Avaliar atividade antiproliferativa dos extratos aquosos frente a linhagens de células normais e tumorais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material

Para escolha e coleta do material foram levados em consideração os seguintes critérios: serem frutas tropicais consumidas na região nordeste; serem encontradas facilmente em mercados públicos; apresentarem características organolépticas satisfatórias; e não terem sido alvos de estudos semelhantes. Observando-se esses critérios, foram escolhidas as seguintes frutas: cajá (*Spondias lutea*), mangaba (*Hancornia speciosa*), seriguela (*Spondias purpurea*), sapoti (*Manilkara zapota*), carambola (*Averrhoa carambola*).

As frutas foram coletadas de acordo com a sazonalidade, sem danos físicos aparentes, sendo selecionadas de forma semelhante quanto ao tamanho, à forma, cor e estágio de maturação, estando todas elas aptas ao consumo.

As frutas foram adquiridas no distrito de Pium/RN, acondicionadas em sacos plásticos, e posteriormente levadas ao laboratório (BIOPOL – Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais) no mesmo dia da coleta, onde foram lavadas em água corrente e estocadas a – 76 °C.

4.2. Outros materiais

- Ácido ascórbico, cloreto de sódio, ferrozina, nitroblue tetrazolium (NBT), riboflavina da Sigma- Aldrich Brasil (São Paulo, SP, Brasil);
- Ácido clorídrico e metionina da Synth (Diadema, SP, Brasil);
- Ácido gálico da CAQ Casa da Química Ind. e Com. (Diadema, SP, Brasil);
- Cloreto de ferro da Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Cloreto de ferro e reagente de folin-ciocalteu da Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Etilenodiaminotetracético (EDTA) da VETEC (Duque de Caxias, RJ, Brasil);

- Fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico da CRQ (Diadema, SP, Brasil);
- Peróxido de hidrogênio, propanol e sulfato de ferro da CRQ (Diadema, SP, Brasil);
- Salicilato de sódio da FLUKA (Steinheim, Germany);
- Solução de Molibdato de Amônio, Solução de TCA (ácido tricloroacético), Solução Ferricianeto de potássio da Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Sulfato de ferro heptahidratado da CRQ (Diadema, SP, Brasil);

4.3. Equipamentos

- Agitador de tubos mod. AP 56 da Phoenix Ltda. (Araraquara, SP, Brasil);
- Balanças da TECNAL (Piracicaba, SP, Brasil);
- Banho maria de temperatura constante da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil);
- Bomba de vácuo da Tecnal (Piracicaba, SP, Brasil);
- Câmara de fluxo laminar vertical. VECO (Campinas, SP-Brasil);
- Centrífuga refrigerada CR 21 da Hitachi Koki Co. Ltda (Tóquio, Japão);
- Espectrofotômetro da FEMTO Ltda (São Paulo, SP, Brasil);
- Estufa de secagem de material da Odontobrás Ltda. (Ribeirão Preto, SP, Brasil);
- Incubadora de CO₂ Sanyo (Tóquio, Japão);
- Leitora de placas (Elisa) Multiskan Ascent Microplate Reader (Thermo Labsystems, Franklin, MA)
- Liofilizador de Bancada Série LD (Terroni Equipamentos Científicos, São Carlos, SP, BRA)
- Medidor de pH da PHS-3B da PHTEK (Japão);

- Microscópio invertido com contraste de fase da Nikon (Tóquio, Japão);

4.4. Obtenção dos extratos aquosos das frutas

Para obtenção dos extratos aquosos, inicialmente as frutas limpas foram separadas de suas sementes, no caso do sapoti a casca também foi retirada. Logo em seguida, às polpas (400g) foram adicionadas 800 mL de água destilada (proporção 1:2) e trituradas no liquidificador por 3 minutos à temperatura ambiente. Após essa etapa, os extratos foram centrifugados, (7500 g por 30 minutos à 4°C) filtrados em funil com papel de filtro. Após a filtração, os extratos aquosos foram liofilizados.

4.5. Determinação de fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais do extrato aquoso das frutas tropicais foi efetuada por método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin – Ciocalteau (ATHUKORALA; KIM; JEON, 2006). Os resultados foram expressos em µg de fenólicos totais em Equivalente de Ácido Gálico (EAG) por mL do extrato.

4.6. Atividade antioxidante *in vitro* das frutas

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, a fim de se ter conhecimento das substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas.

4.6.1. Capacidade Antioxidante Total (CAT)

Esse ensaio baseia-se na redução de Molibdênio⁺⁶ a Molibdênio⁺⁵ pela amostra teste (extratos aquosos das frutas) com subsequente formação de um complexo esverdeado Fosfato/ Molibdênio⁺⁵ em pH ácido. Foi adicionado a amostra teste na solução reagente (0,6 M ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4mM de

molibdato de amônia). Essa solução foi mantida a 100°C por 90 minutos e depois resfriada. Em seguida foram realizadas as leituras a 695 nm (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). O resultado foi expresso em Equivalentes de ácido ascórbico (EAA), um composto com atividade antioxidante conhecida.

4.6.2. Seqüestro do radical hidroxila (OH[•])

A atividade de seqüestradora dos radicais hidroxila foi investigada usando a reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$), de acordo com a metodologia descrita por Smirnoff e Cumbes (1989) com pequenas modificações. Os extratos aquosos em diferentes concentrações (50-100-150µg/mL) em 3mL de tampão fosfato (150mM pH 7,4) foram incubados com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10mM), EDTA (10mM), salicilato de sódio (2mM), H_2O_2 30% (200µL). A solução foi incubada à 37°C por 1h e a reação detectada por monitoramento da absorbância à 510nm. No branco o H_2O_2 foi substituído pelo tampão fosfato.

4.6.3. Seqüestro do radical superóxido ($\text{O}_2^\bullet$)

Este método baseia-se na capacidade da amostra teste (extrato aquoso das frutas) em inibir a redução fotoquímica do nitroblue tetrazolium (NBT) em um sistema riboflavina-luz-NBT de 3mL da solução reagente contendo: tampão fosfato (50mM, pH 7,8), metionina (13mM), riboflavina (2µM), EDTA (100µM), NBT (75µM) (DASGUPTAA, 2007) e 1mL de solução contendo os extratos das frutas. A produção do azul de formazan foi monitorada pelo aumento da absorbância a 560 nm após iluminação com lâmpada fluorescente por 10 min.

4.6.4. Quelação de íons metais

A habilidade de quelar o íon ferro dos compostos presentes nas frutas foi determinada pelo método descrito por Decker e Welch (1990), com modificações de WANG et al. (2008). A ferrozina, reagente utilizado neste ensaio, forma complexo com o íon Fe^{2+} (coloração rosa), na presença de agentes quelantes este complexo não é formado, resultando na diminuição da coloração. A redução da coloração permite, assim, estimar a atividade quelante do íon ferro dos compostos presentes nas frutas. A mistura de reação contendo diferentes concentrações (50-100-150mg/mL), FeCl_2 (0.05mL, 2mM) e ferrozina (0.2mL, 5mM) foi agitada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. A absorbância da solução foi medida a 562nm. A habilidade, das frações, em quelar o íon ferro foi calculada usando a equação abaixo:

$$\text{Habilidade de quelação (\%)} = ((A_0 - A_1)/A_0) \times 100$$

Onde: A_0 absorbância do controle e A_1 absorbância da amostra teste.

4.6.5. Poder redutor

O poder redutor das amostras foi quantificado de acordo com metodologia previamente descrita por Athukorala et al., 2006 4 mL da reação contendo diferentes concentrações dos extratos das frutas em tampão fosfato (0.2 M, pH 6.6) e ferricianeto de potássio (1%) foram incubados por 20 min. à 50°C. A reação foi terminada pela adição da solução de TCA (10%), e posteriormente misturada com água destilada e cloreto de ferro (0,1%). A absorbância foi medida a 700 nm.

4.7. Atividade Antiproliferativa

A atividade antiproliferativa dos extratos de frutas frente a linhagens celulares foi medida indiretamente pela redução enzimática de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5 difeniltetrazolio bromídio (MTT) para cristais de formazona.

Para determinar a citotoxicidade pelo ensaio de MTT (MOSMANN, 1983), as células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade inicial de 5×10^3 células por poço. Após a incubação por 24 horas a 37°C, as células foram tratadas com diferentes concentrações de 125, 250 a 500 ug / mL e incubados por 48h. Após a incubação, foi adicionado a cada poço a solução de MTT (5 mg / mL) e incubadas por mais 4 h, a 37 ° C. Após este período, o meio foi aspirado, e adicionou-se 100 µL de HCl 0,04N em álcool isopropílico para dissolver os cristais de formazona formados e precipitados.

A quantificação da absorbância foi feita em leitor de placa de 96 poços em comprimento de onda de 562 nm (MOSMANN, 1983). A densidade óptica foi lida com um leitor de ELISA a 570 nm.

O percentual de inibição da proliferação celular por cento foi calculado da seguinte forma:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{Abs: 570nm Controle} - \text{Abs: 570nm amostra}}{\text{Abs: 570nm Controle}} \times 100$$

5. Análise estatística

Todos os dados dos experimentos realizados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para testar diferenças entre as amostras, bem como diferentes tratamentos da mesma amostra, foi utilizado o teste de análise paramétrica de análise de variância (ANOVA), usando o GraphPad InStat. O teste de Student–Newman–Keuls foi aplicado para se comprovar algumas similaridades encontradas pela ANOVA.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Compostos fenólicos totais

As quantidades de compostos fenólicos existentes nos extratos aquosos das frutas em estudo são mostradas na Figura 01. Os valores variaram de 441,0 µg EAG/mL a 199,6 µg EAG/mL para *S. purpurea* e *S. lutea* respectivamente. Uma análise dos dados leva a separação das frutas em dois grupos, aquele constituído por frutos com maior quantidade de compostos fenólicos (*M. zapota*, *H. speciosa* e *S. purpurea*) e aquele constituído por frutos com menor quantidade de compostos fenólicos (*A. carambola* e *S. lutea*).

A quantidade de compostos fenólicos encontradas nas frutas estudadas aqui foram menores do que aquelas encontradas em sucos de algumas variedades de uvas, que apresentaram cerca de 535,0 µg EAG/mL. Por outro lado *M. zapota*, *H. speciosa* e *S. purpurea* apresentaram valores superiores àqueles encontrados em extratos aquosos de frutas consumidas mundialmente como maçã (339,0 µg EAG/mL) e abacaxi (358,0 µg EAG/mL) (Gardner *et al* 1999). Indicando o grande potencial destas frutas como alimentos funcionais, já que compostos fenólicos de plantas são tidos como seus principais compostos antioxidantes (Lopez-Velez, Martinez- Martinez, Del Valle-ribes, 2003). Além disso, a indústria de alimentos vem demonstrando grande interesse em extratos de plantas ricos em compostos fenólicos, pois estes compostos retardam a degradação de vários nutrientes encontrados em alimentos industrializados, aumentando assim a qualidade e o valor nutricional destes alimentos (Pan *et al.*, 2010).

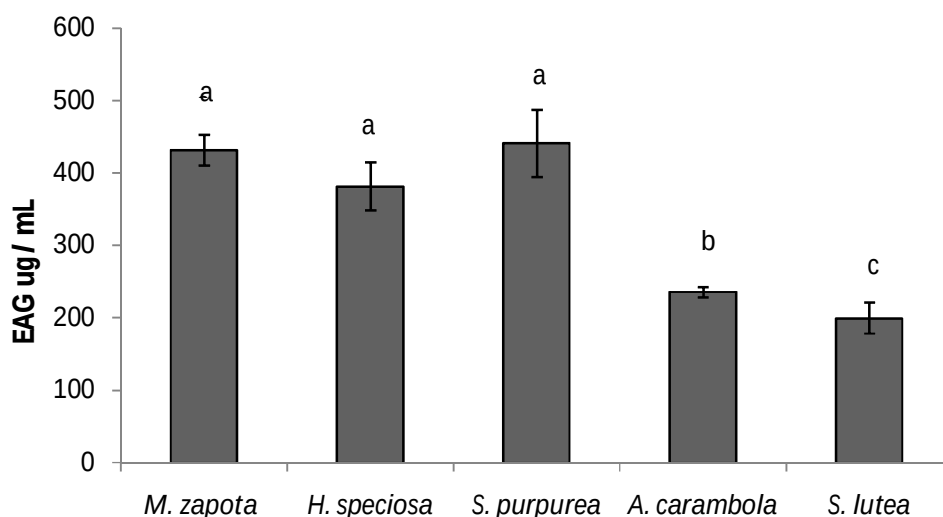


Figura 1. Compostos fenólicos totais de extrato aquoso de frutas tropicais, expresso em Equivalente de Ácido Gálico (EAG) ug/ mL.

Diferentes letras indicam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de cada extrato aquoso das frutas, usando ANOVA, através do teste Student-Newman-Keuls ($p < 0.05$).

6.2. Atividade Antioxidante

Nem sempre esta atividade se correlaciona com a presença de grandes quantidades de compostos fenólicos. Porém, alguns autores encontraram correlações positivas entre a quantidade total de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de frutas (Wang e Lin, 2000). Assim, devido à presença de compostos fenólicos encontrados nos extratos das frutas estudadas, foi avaliado o potencial antioxidante dos extratos, utilizando diferentes testes.

Antioxidantes são compostos que podem evitar que substâncias químicas e biológicas dos radicais livres causem danos oxidativos. Essa oxidação de substratos ocorre através de uma reação em cadeia que inclui três etapas (iniciação, propagação e terminação). Assim, utilizamos diferentes métodos que permitam avaliar os extratos das frutas nas etapas de iniciação (capacidade antioxidante total e poder redutor),

propagação (quelção férrica) e terminação (sequestro do radical superóxido e hidroxila).

6.2.1. Capacidade Antioxidante Total (CAT)

Esse teste avalia a capacidade de uma amostra doar elétrons em um ambiente fracamente ácido e assim neutralizar espécies reativas, como as espécies reativas do oxigênio. Os resultados obtidos neste trabalho são mostrados na Figura 2. Não foi encontrada uma correlação entre a quantidade de compostos fenólicos e os valores de CAT dos extratos. Das cinco espécies analisadas, *M. zapota* apresentou um valor de CAT que foi o dobro do valor observado com os extratos das outras frutas.

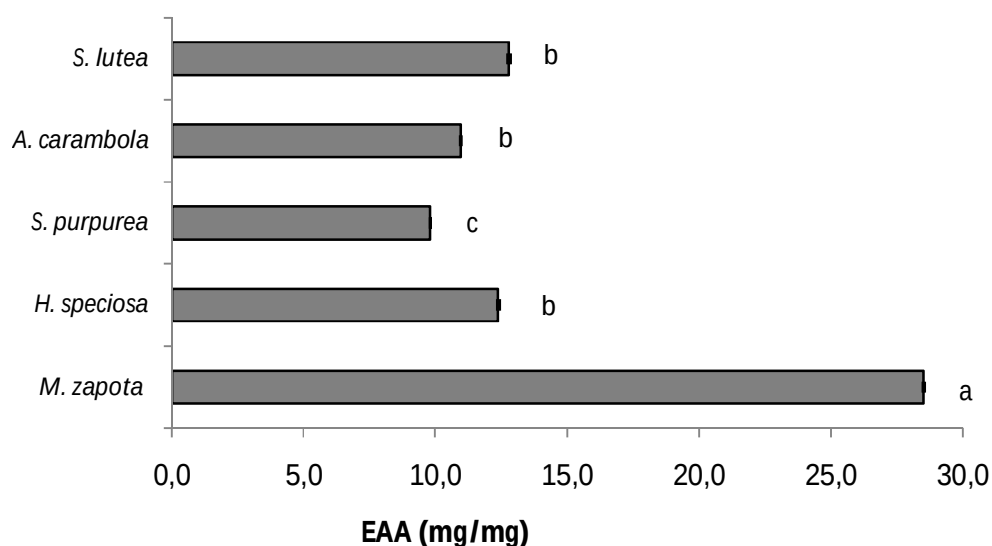


Figura 2: Capacidade Antioxidante Total do extrato aquoso de frutas tropicais, expresso em Equivalente de Ácido Ascórbico (EAA) mg/mg.

Diferentes letras indicam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de cada extrato aquoso das frutas, usando ANOVA, através do teste Student-Newman-Keuls ($p < 0.05$).

Das frutas avaliadas, a *M. Zapota* é a única fruta que apresenta estudo referente a CAT para fins comparativos. O valor em torno de 30.0 EAA mg/mg para o extrato aquoso de *M. zapota* verificado neste trabalho foi semelhante ao descrito por Shui,

Wong and Leong, 2004 que também avaliou a CAT do extrato aquoso de *M. zapota*. Por outro lado, em estudo realizado em Singapura, extratos de *M. Zapota* apresentaram resultados superiores aos do presente trabalho, em torno de 101.4 EAA mg/mg (Isabelle et al, 2010). Estas variações encontradas nos valores referentes a CAT de *M. zapota* pode ser devido à variação dos estágios na colheita, grau de amadurecimento da fruta e das condições de cultivo, como descrito por alguns autores.

Em estudo realizado por Morgado et al, 2010, goiabas colhidas em estágio não maduro, apresentaram a maior vida útil, maiores teores de sólidos solúveis e de acidez titulável, bem como maiores teores de polifenóis extraíveis totais, atividade antioxidante total e teores de ácido ascórbico do que as frutas maduras.

Lima, Mélo e Lima, 2002, realizaram estudo com pitanga roxa e observaram que existe quantidade significativa de antocianina nesta fruta, cujo teor foi mais elevado no fruto maduro do que no semi-maduro.

Segundo Pires e Pommer, 2003, na fase de maturação das uvas ocorrem mudanças nos teores de açúcares, acidez, compostos fenólicos, amolecimento e síntese de cor e aroma, que definirão a qualidade da uva. Abe et al, 2007, referem-se que o acúmulo de açúcar é o fenômeno mais importante da maturação por servir de origem a compostos como os polifenóis, as antocianinas ou outros compostos relacionados ao aroma.

Arbos, et al, 2010, analisaram a atividade antioxidante dos extratos metanólicos das hortaliças orgânicas e convencionais através do ensaio do DPPH. Os melhores resultados da atividade antioxidante e o teor de fenólicos totais foram superiores nos vegetais orgânicos em relação aos convencionais. O sistema de produção convencional, baseia-se na utilização intensiva de insumos químicos (agrotóxicos), mecanização

pesada e melhoramento genético voltado para a produtividade física (BOURN, PRESCOTT, 2002).

Portanto, vários fatores podem levar a variações no conteúdo de metabólitos secundários, o que possibilita o direcionamento na condução de estudos que priorizem determinados fatores que viabilizem concentrações desejáveis de princípios ativos.

6.2.2. Poder redutor

O poder redutor está relacionado à capacidade de transferência de elétrons, podendo, dessa forma, reduzir a formação de radicais livres. Os agentes redutores participam da finalização de reações em cadeia dos radicais livres com a doação de um átomo de hidrogênio (COSTA et al, 2010).

Alguns compostos antioxidantes apresentam capacidade redutora do íon ferro, transformando Fe^{3+} em Fe^{2+} . *In vitro*, essa capacidade redutora é avaliada pela formação de um complexo entre o Fe^{2+} e o cloreto de ferro, sendo a atividade mensurada pelo aumento da absorbância gerada pela formação desse complexo. Nos extratos de frutas avaliados não houve o aumento da absorbância durante a leitura, não apresentando portanto, propriedade de redução nas concentrações entre 0,01 mg a 2,0 mg /mL.

O presente estudo não corrobora com outros estudos, tendo em vista que apresentaram poder redutor, apesar de alguns de seus resultados serem pouco expressivos.

Os resultados apresentados por Chu, Chang e Hsu, 2000 indicam que cebolinha e batata doce apresentam maior poder redutor (2,18 e 2,29 ug/ml, respectivamente) em comparação a repolho (0,17 ug /ml), espinafre (0,16 ug /ml) e batata (0,11 ug /ml).

Zou, Lu, Wei, 2004, avaliaram atividade antioxidante dos extratos de *Hypericum perforatum*, utilizando também o método do poder redutor. Os autores compararam os

extratos estudados aos flavonóides quercetina, rutina e hiperosídeo, além do ácido ascórbico e polifenóis de chá. Todas as amostras apresentaram certo grau de redução, no entanto, o extrato estudado apresentou o menor poder redutor avaliado, com exceção da rutina.

Duan et al, 2007, verificaram que antocianinas de extratos de lichia apresentaram maior poder redutor que o BHT e ácido ascórbico, sugerindo que as antocianinas apresentam forte capacidade de doar elétrons. O poder redutor de antocianinas da lichia, ácido ascórbico e BHT a 100 ug /ml, foram 3,70; 0,427 e 0,148 ug /ml, respectivamente.

6.2.3. Atividade de quelação de metais

O íon Fe^{2+} é o mais poderoso pró-oxidante dentre as várias espécies de íons de metal. A atividade de quelação de íons de metal de uma molécula antioxidante evita a geração da oxidação e o conseqüente dano oxidativo. O teste baseia-se na medida da quelação do ferro disponível pelo antioxidante (quanto maior a quantidade de ferro quelado, menor o número de íons disponíveis e maior a absorbância).

Os extratos das frutas foram avaliados a partir de 0,01 mg até 2,0 mg / mL, e não participaram na formação de complexos de ferro, sugerindo que eles não têm atividade quelante.

Entretanto, estudos com outros extratos de plantas mostram atividade de quelação de íons metais. Jiménez-Escrig et al, 2001, avaliaram extratos da casca de goiaba e observaram boa atividade antioxidante utilizando o método de quelação de metais. Segundo os autores houve uma notável correlação entre o conteúdo extraível de fenóis totais estimado pelo método de Folin-Ciocalteu e valores de quelação nos extratos estudados ($r=0,818$; $p<0,01$). Alta correlação também foi relatada em extratos de chá, de acordo com estudos de Benzie e Zseto, 1999.

Em estudo realizado por George et al, 2004, extratos aquosos de tomate obtiveram boa quelação férrica, com resultados que variaram entre 0,64-2,3 mM em duas variedades de tomates.

Jang et al, 2007 avaliaram o poder redutor do ferro em extratos de *C. Cassia*, obtendo resultados significativos nas concentrações entre 17–33 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

Lim, Lim e Tee, 2007 avaliaram extratos de diversas frutas e verificaram que a banana tem o melhor poder quelante, seguida da carambola, jambo, e mamão que obtiveram poder quelante moderado e de outras frutas como a goiaba e laranja, que obtiveram poder quelante muito baixo.

6.2.4. Sequestro do radical superóxido

O radical superóxido é uma espécie altamente tóxica que é produzida por inúmeras reações biológicas e fotoquímicas. Esse radical é uma espécie de oxigênio reativo que pode causar danos a várias moléculas, inclusive proteínas, lipídeos e DNA celulares levando a dano celulares, teciduais e a várias doenças (SAHREEN, KHAN, KHAN, 2010). Ele é conhecido por levar a formação de H_2O_2 via reação de dismutação, que é outro agente oxidante também muito danoso às células (LI; LI; ZHOU, 2007).

Os resultados sobre o efeito de diferentes concentrações dos extratos são apresentados na Tabela 1. Todos os extratos avaliados mostram capacidade de sequestrar o radical superóxido, e três extratos (*S. purpurea*, *S. lutea*, *A. carambola*) foram capazes sequestrar 100% dos radicais formados. O extrato de *M. zapota* foi o menos potente, não conseguindo sequestrar mais do que 60% dos radicais formados. O extrato de *H. speciosa* em baixa concentração (0,5 mg/mL) foi o que apresentou maior capacidade sequestradora de superóxido (~80%), o que foi um valor semelhante ao observado com ácido gálico (controle positivo) na mesma concentração. Valores semelhantes de sequestro de superóxido foram encontrados com extratos de *Arbutus*

unedo L. nas concentrações que variaram de 0.5 a 1.0 mg/mL (Oliveira *et al*, 2009). Por outro lado, os valores obtidos com o extrato de *H. speciosa* (0.5 mg/mL) foram maiores do que aqueles obtidos com extratos de *Choerospondias axillaris* (WANG ET AL, 2008) e de *Psidium guajava* (CHEN; YEN, 2007) que na concentração de 0.5 mg/mL sequestraram cerca de 38% e 60% dos radicais superóxidos formados, respectivamente.

O seqüestro do radical superóxido de extratos de frutas tem sido relacionado com a presença de compostos fenólicos (VASCO; RUALES, 2008). Acredita-se que parte da atividade sequestradora apresentada pelos extratos seja proveniente de seus compostos fenólicos. Porém, como não se identificou uma correlação direta entre a quantidade de fenólicos nos extratos e a atividade seqüestradora de superóxido, acredita-se que há outros compostos a serem identificados que estariam se somando aos polifenóis e fornecendo, em parte, esta potente atividade seqüestradora de superóxido observado pelos dados apresentados.

6.2.5. Sequestro do radical hidroxila

Entre as espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxila é o mais reativo e causa danos graves às biomoléculas (BANERJEE; DASGUPTA, 2005). Sua eliminação é algo muito desejado, pois este radical está associado a várias doenças por possuir um grande poder danoso as células devido a sua alta reatividade (OLIVEIRA *et al*, 2009).

Na Tabela 1 pode-se observar que todos os extratos apresentaram atividade sequestradora do radical hidroxila e que esta atividade é dose dependente (de 0,1 a 2,0 mg/mL). Os extratos das frutas *M. zapota*, *S. purpúrea* e *A. Carambola* foram os que apresentaram o melhor percentual de seqüestro do radical hidroxila, em torno de 92% (2.0 mg/mL), interessante, duas dessas três frutas apresentaram maior

quantidade compostos fenólicos (Figura 1). Outro fato interessante é que três extratos (*M. zapota*, *S. purpúrea* e *S. lútea*) a uma concentração de 0,1 mg/mL foram capazes de seqüestrar 50% dos radicais hidroxila numa concentração menor do que o ácido gálico (controle positivo).

A atividade sequestradora de OH dos extratos aqui analisados não foi tão potente como aquela descrita para o extrato da *Phyllanthus emblica*, que na concentração de 25.0 µg/mL sequestrou cerca de 80% dos radicais formados (NIWANO et al., 2011). Porém, a atividade aqui observada foi bem mais potente do que aquela relatada para extratos de outras frutas, como a *Momordica charantia*, conhecida no Brasil como melão de São Caetano, que apresentou baixa capacidade de seqüestrar radicais hidroxila, pois com 1,6 mg/mL este extrato foi capaz de seqüestrar apenas 37.1% dos radicais hidroxilas (KUBOLA; SIRIAMORNPUN, 2008). Extratos das frutas *Hylocereus undatus* e *Hylocereus costaricensis* a uma concentração de 2.0 mg/mL apresentaram uma atividade sequestradora de apenas 64,0 e 58,0%, respectivamente (KIM et al., 2011). A atividade sequestradora das frutas avaliadas neste trabalho foi maior do que a observada para extratos de outras fontes como os fungos *Agrocybe cylindracea* (TSAI et al., 2006) e *Ganoderma tsugae* (MAU et al., 2005) e as algas marinhas (COSTA et al., 2010; CAMARA et al, 2011; MAGALHAES et al., 2011), que mesmo em concentrações elevadas (> 5,0 mg/mL) não foram capazes de seqüestrar mais do que 30 % dos radicais hidroxila.

Os resultados mostram que os extratos de frutas aqui avaliados apresentam uma grande capacidade sequestradora de radicais hidroxila e poderiam ser utilizados para ajudar a prevenir ou amenizar os danos provocados por estresse oxidativo.

Tabela 1. Atividade do sequestro de radicais hidroxila e superóxido em extratos aquosos de frutas tropicais.

Frutas	mg/mL	Inibição (%)	
		Sequestro do radical hidroxila	Sequestro do radical superóxido
<i>Manilkara zapota</i>	0.10	50.9 ± 2.6 ^a	nd
	0.25	52.8 ± 4.3 ^a	Nd
	0.50	66.5 ± 2.0 ^b	41.6 ± 1.5 ^a
	1.00	87.4 ± 1.4 ^c	45.3 ± 3.5 ^a
	2.00	92.2 ± 0.5 ^c	45.2 ± 0.0 ^a
	4.00	Nd	61.1 ± 3.3 ^b
	8.00	Nd	62.0 ± 0.9 ^b
<i>Hancornia speciosa</i>	0.10	26.7 ± 4.7 ^a	Nd
	0.25	50.3 ± 1.6 ^b	Nd
	0.50	58.9 ± 0.2 ^b	80.1 ± 7.7 ^a
	1.00	73.2 ± 3.6 ^c	81.5 ± 10.6 ^a
	2.00	76.0 ± 1.2 ^c	86.3 ± 8.3 ^b
	4.00	Nd	88.3 ± 5.0 ^b
	8.00	Nd	89.9 ± 1.5 ^b
<i>Spondias purpurea</i>	0.10	58.3 ± 5.0 ^a	Nd
	0.25	65.9 ± 0.4 ^a	Nd
	0.50	79.5 ± 1.8 ^b	33.5 ± 3.9 ^a
	1.00	88.4 ± 2.2 ^b	44.8 ± 6.3 ^b
	2.00	92.6 ± 0.3 ^b	47.1 ± 0.5 ^b
	4.00	Nd	81.6 ± 8.9 ^c
	8.00	Nd	101.5 ± 2.0 ^d
<i>Averrhoa carambola</i>	0.10	17.9 ± 0.3 ^a	Nd
	0.25	27.4 ± 1.7 ^b	Nd
	0.50	49.6 ± 2.3 ^c	43.4 ± 4.5 ^a
	1.00	82.1 ± 2.2 ^d	49.8 ± 2.5 ^a
	2.00	92.0 ± 0.7 ^e	68.3 ± 3.8 ^b
	4.00	Nd	92.5 ± 0.8 ^c
	8.00	Nd	102.1 ± 0.7 ^c
<i>Spondias lutea</i>	0.10	63.1 ± 1.1 ^a	Nd
	0.25	60.6 ± 2.3 ^a	Nd
	0.50	74.1 ± 2.2 ^b	36.3 ± 3.1 ^a
	1.00	76.3 ± 3.2 ^b	46.9 ± 10.5 ^a
	2.00	79.9 ± 1.1 ^b	56.4 ± 0.2 ^a
	4.00	Nd	101.4 ± 8.1 ^b
	8.00	Nd	101.7 ± 3.4 ^b
Ácido gálico	0.10	40.5 ± 1.3 ^a	41.0 ± 3.1 ^a
	0.25	63.3 ± 2.1 ^a	73.1 ± 2.6 ^a
	0.50	92.0 ± 1.2 ^b	81.1 ± 3.2 ^b
	1.00	98.4 ± 2.3 ^b	90.1 ± 3.5 ^a

Os dados são expressos como médias + - desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as frutas tropicais, utilizando-se ANOVA seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (p <0,05). Nd - Não determinado.

6.3. Atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa dos extratos aquosos de frutas tropicais foi verificada com duas linhagens de células: HeLa (célula tumoral de colo uterino humano) e 3T3 (célula de fibroblastos de ratos) por 24h e 48 h utilizando-se o método colorimétrico MTT. Este ensaio é uma técnica simples e confiável, que mede a atividade metabólica de células viáveis e tem sido amplamente utilizado para quantificar a proliferação celular (Mosmann, 1983).

As células 3T3 são comumente utilizadas para se avaliar a toxicidade de compostos frente a células normais. Os dados mostraram que os extratos apresentam baixa toxicidade frente a essas células. Os extratos interferiram muito pouco na proliferação das células 3T3. A inibição da proliferação variou em torno de 0 a 20% na máxima concentração utilizada, nas primeiras 24 horas. Essa taxa de inibição não obteve mudanças significativas após 48 horas, como mostra a Figura 3.

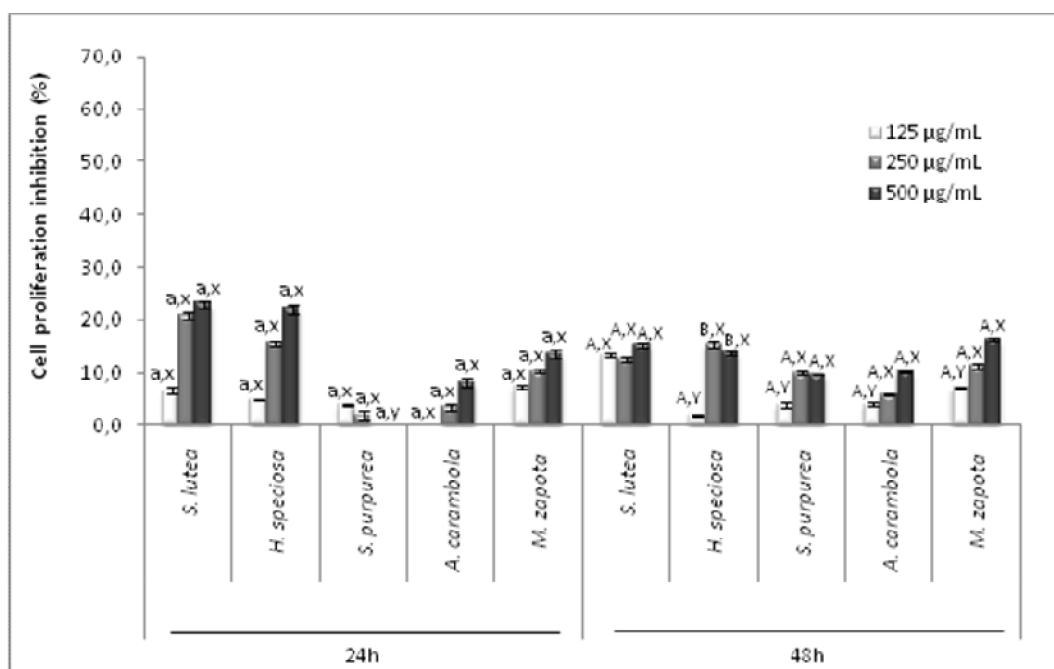


Figura 3. Atividade antiproliferativa de extratos aquosos de frutas tropicais com células 3T3. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. ^{a/A,B} indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

entre as concentrações diferentes da mesma fruta. $^{xy} / ^{x,y}$ indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações iguais de diferentes frutas. Análise estatística foi realizada separadamente em 24 e 48 horas, utilizando-se ANOVA seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Avaliou-se também o efeito dos extratos frente a células tumorais HeLa. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4. Nas condições testadas o extrato de *H. speciosa* não apresentou atividade antiproliferativa, com aproximadamente 10% da inibição da proliferação celular em todas as concentrações. Os demais extratos apresentaram essa atividade, com destaque para os extratos de *S. purpurea* e *M. zapota* (500 $\mu\text{g/mL}$, 48 h) que inibiram cerca de 58% e 40% da proliferação celular, respectivamente.

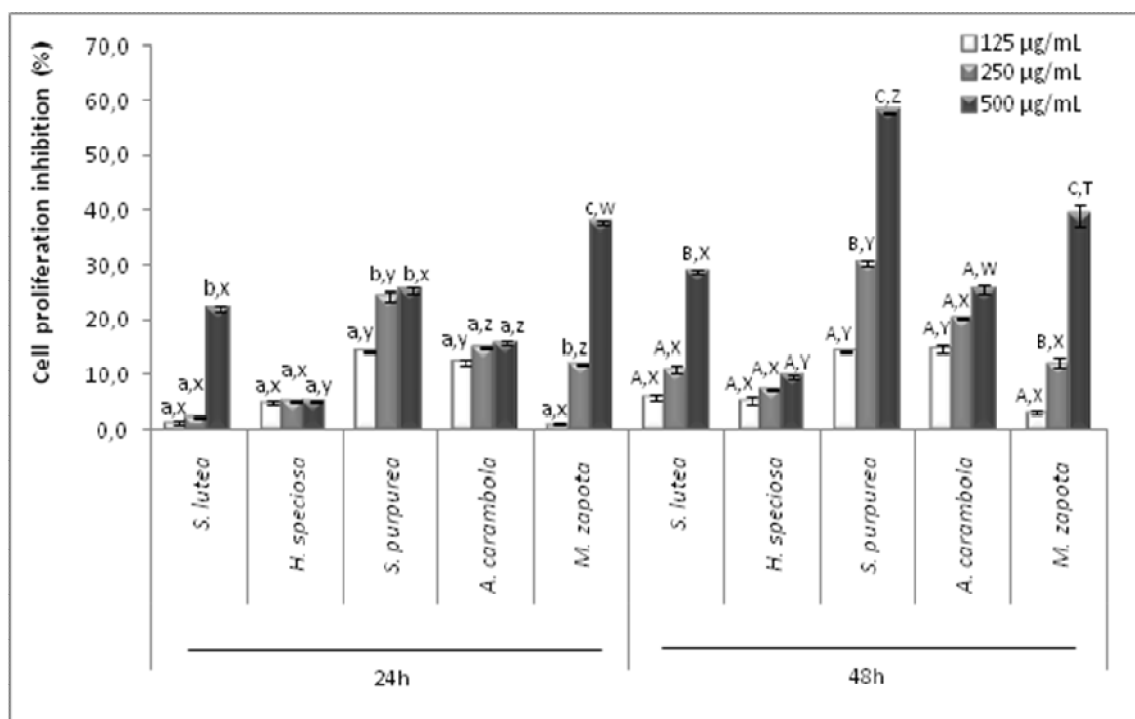


Figura 4. Atividade antiproliferativa de extratos aquosos de frutas tropicais com células HeLa. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. $^{a,b,c} / ^{A,B,C}$ indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações diferentes da mesma fruta. $^{x,y,z,w} / ^{X,Y,Z,W,T}$ indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações iguais de diferentes frutas. Análise estatística foi realizada separadamente em 24 e 48 horas, utilizando-se ANOVA seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

A avaliação da atividade antiproliferativa de extratos de frutas frente as células tumorais vem aumentando nos últimos anos.

Hogan et al, 2010, avaliaram propriedades antioxidantes e atividade antiproliferativa de extratos de açaí, e verificaram que houve supressão da proliferação de C-6, células de glioma do cérebro de ratos, e não houve nenhum efeito sobre o crescimento de MDA-468, células do câncer de mama humano. Os resultados referentes a fragmentação de DNA, indicaram que houve apoptose das células C-6. No mesmo estudo, comparou-se o extrato de açaí com outros ricos em antocianinas, incluindo mirtilo, morango, framboesa e amora, no entanto, nenhum deles mostrou efeito supressor das células tumorais. Os autores sugerem que os resultados positivos quanto a atividade antiproliferativa não sejam devido as antocianinas e sim a outros compostos presentes no extrato inicialmente estudado.

Shun et al, 2002, avaliaram a atividade antiproliferativa de extratos de limão, maçã, morango, uva, banana e pêssigo e verificaram que houve relativa inibição da atividade antiproliferativa de HepG2, células cancerosas do fígado humano, de maneira dose-dependente, com EC₅₀ de 14,5 mg/mL.

Em estudo feito com extrato da fruta *Terminalia chebula* e células de próstata humana (PC-3) mostraram que este extrato apresenta atividade antiproliferativa de forma dose dependente, chegando ao máximo em torno de 0.4 mg/mL. Os dados também mostraram que havia uma correlação positiva entre a atividade antiproliferativa e o teor de compostos fenólicos, o que levou os autores a sugerirem que estes seriam responsáveis pela atividade antiproliferativa dos extratos (SALEEM et al 2002).

Correlações positivas também entre a quantidade de compostos fenólicos e atividade antiproliferativa foram observadas com extratos de *Rosa canina* e *Prunus virginiana* contra células de câncer de cólon (HT-29) e células de câncer de mama

(MCF-7). Os autores propoem que a atividade antiproliferativa dos extratos seja devido a presença dos compostos fenólicos (OLSSON et al 2004).

Não foi identificado uma correlação positiva entre a quantidade de compostos fenólicos nos extratos e suas atividades antiproliferativas. Apesar de que os extratos das frutas *S. purpurea* e *M. zapota* que apresentaram maiores quantidades de compostos fenólicos também apresentam maior atividade antiproliferativa. É provável que atividade antiproliferativa seja dependente de diferentes tipos de compostos fenólicos, e que alguns são mais tóxicos para as células do que outros. Portanto, pretende-se no futuro purificar os diferentes compostos fenólicos presentes nos extratos das frutas aqui estudadas e avaliá-los como compostos antiproliferativos “in vitro” e “in vivo”, bem como identificar os mecanismos de ação.

Os dados obtidos mostraram que as frutas tropicais, em especial *S. purpurea* e *M. zapota*, aqui avaliadas podem inibir os danos oxidativos por agir tanto na fase de iniciação como na fase de terminação do processo de formação de agentes oxidantes e em paralelo podem inibir a proliferação de células tumorais, o que possibilita dizer que as mesmas apresentam um grande potencial para sua utilização para fins dietoterápicos e aplicações nutricionais.

No entanto pesquisas adicionais são necessárias para investigar quais os mecanismos e estruturas químicas que proporcionam uma melhor capacidade antiproliferativa de células tumorais.

7. CONCLUSÕES

- Todos os extratos avaliados apresentaram compostos fenólicos, no entanto, a *M. zapota*, *H. speciosa* e *S. purpúrea*, apresentam maior quantidade de compostos fenólicos e *A. carambola* e *S. lútea* menor quantidade;
- A *M. zapota* apresentou um valor de CAT que foi o dobro do valor observado com os extratos das outras frutas, não sendo encontrada uma correlação entre a quantidade de compostos fenólicos e os valores de CAT dos extratos.
- Os extratos não apresentaram atividade de quelação de metais e poder redutor;
- Todos os extratos avaliados mostram capacidade de sequestrar o radical superóxido, e três extratos (*S. purpúrea*, *S. lútea*, *A. Carambola*) foram capazes seqüestrar 100% dos radicais formados, no entanto, não se identificou uma correlação direta entre a quantidade de fenólicos nos extratos e a atividade seqüestradora de superóxido.
- Todos os extratos apresentaram atividade sequestradora do radical hidroxila com atividade dose dependente. Os extratos das frutas *M. zapota* e *S. purpurea* foram os que apresentaram o melhor percentual de seqüestro do radical hidroxila, em torno de 92%.
- Os extratos interferiram muito pouco na proliferação das células 3t3, o que significa que apresentam baixa toxicidade frente a essas células.
- A única fruta que não apresentou atividade antiproliferativa foi *H. speciosa*, com apenas aproximadamente 10% da inibição da proliferação celular em todas as concentrações. Os demais extratos

apresentaram essa atividade, com destaque para os extratos de *S. purpurea* e *M. zapota*.

APÊNDICE

Assessment of antioxidant and antiproliferative activity of tropical fruit aqueous extract

Joanna A. C. Barros⁽¹⁻²⁾ ; Jailma Almeida-Lima⁽¹⁻²⁾; Ruth M. Oliveira⁽¹⁾; Gabriel P. Fidelis⁽¹⁾; Dayanne L. Gomes⁽¹⁾; Cinthia B. S. Telles⁽¹⁻²⁾; Mariana S. S. P. Costa⁽¹⁾; Raniere F. Melo-Silveira⁽¹⁾; Nednaldo Dantas-Santos⁽¹⁻²⁾; Leandro S. Costa⁽¹⁾; Ana Vlândia B. Moreira⁽³⁾; Hugo A. O. Rocha^{(1)*}.

1. UFRN, Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais-Biopol, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Av. Sen. Salgado Filho, 3000, 59072970, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil
2. UFRN, Centro de Ciências da Saúde (CCS), R. General Gustavo Cordeiro de Farias, S/N , 59010 180 Natal (RN) Brazil.
3. UFV, Universidade Federal de Viçosa. Av. Ph Rolfs, S\N, Departamento de Nutrição. Campus Universitário, 36570-000, Viçosa (MG) Brazil.

*Corresponding author: e-mail addresses: hugo@cb.ufrn.br (H.A.O. Rocha).

ABSTRACT

The antioxidant activity of aqueous extracts of five edible tropical fruits (*Spondias lutea*, *Hancornia speciosa*, *Spondias purpurea*, *Manilkara zapota* and *Averrhoa carambola*) was investigated using different methods. The amount of phenolic compounds was determined by the Folin-Ciocalteu reagent. Extracts showed neither reducing power nor iron chelation (between 0.01 and 2.0 mg/mL). *H. speciosa* exhibited the highest superoxide scavenging activity (80%, 0.5 mg/mL). However, at high concentrations (8.0 mg/mL) only *A. carambola*, *S. purpurea* and *S. lutea* scavenging 100% of radicals formed. *M. zapota* and *S. purpurea* had higher phenolic compound levels and greater OH radical scavenging activity (92 %, 2 mg/mL). Antiproliferative activity was assessed with 3T3 fibroblasts and cervical tumor cells (HeLa). The most potent extract was *S. purpurea* (0.5 mg/mL), which inhibited HeLa cell proliferation by 52%. All fruits showed antioxidant and antiproliferative properties, characterizing them as functional foods.

Keywords: antioxidant; antiproliferative; tropical fruits; functional foods

1.0 INTRODUCTION

A functional food exhibits nutritional, metabolic, and therapeutic functions and has potential use in preventing and controlling certain diseases. In addition to preventing cardiovascular diseases [1], these foods have immunological, anticarcinogenic and antioxidant properties.

According to the ADA, 1995 (American Dietetic Association) [2], fruits are one of the most basic forms of functional foods. In addition to their delicious flavor and aroma, they are important sources of vitamins, minerals and other essential antioxidants in human diet.

Due to the presence of antioxidants, fruit consumption has been associated with reduced risk of chronic diseases related to the oxidative stress induced by the production of free radicals in the human body [3]. However, although fruits are considered sources of natural antioxidants, their effectiveness depends on the chemical structure and concentration of these compounds. Total antioxidant content varies due to several factors such as plant variety, environment, climatic and soil conditions, genetic factors, degree of ripeness, storage and processing, among others [4].

Therefore, a fruit cannot be simply identified as functional food, without first knowing the antioxidant potential of the fruit in question.

Northeast Brazil is known for its beautiful beaches and the low income of its inhabitants. On the other hand, this region shows a wide diversity of fruits, which have been widely consumed for many generations. However, little is known about their functional properties. In order to bridge this information gap, the present study aimed to determine the antioxidant and antiproliferative activity of the aqueous extract from five tropical fruit species consumed in Northeast Brazil: Caja fruit (*Spondias lutea*), Mangaba (*Hancornia speciosa*), Siriguela (*Spondias purpurea*), Sapoti (*Manilkara zapota*) and Carambola (*Averrhoa carambola*).

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. Materials

Iron sulfate, potassium ferricyanide, sulfuric acid and acetonitrile were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Nitro Blue Tetrazolium (NBT), ferrozine, FeCl₂, EDTA, methionine, riboflavin, gallic acid, trichloroacetic acid (TCA) and ammonium molybdate were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). All other solvents and chemicals were of analytical grade.

2.2. Fruit samples

Fresh fruit samples with no apparent physical or microbial damage were collected separately. Samples included caja (*Spondias lutea*), mangaba (*Hancornia speciosa*), siriguela (*Spondias purpurea*), sapoti (*Manilkara zapota*), and carambola (*Averrhoa carambola*) (Table 1). All fruits were of eating quality, and were identically selected in terms of shape, size, color, and ripening stage.

Fruits were acquired in Pium, Brazil, packed in plastic bags and taken to the laboratory (BIOPOL – Laboratory of Natural Polymer Biotechnology) on the same day as collection, where they were washed under running water and stored at – 76 °C.

2.1 Extraction

The clean fruits were seeded to obtain aqueous extracts and, in the case of the sapoti, the skin was removed. Pulps (400g) were then added to 800 mL of distilled water (1:2) and ground in a blender for 3 minutes at ambient temperature. Extracts were then centrifuged (8000 x g for 30 minutes at 40°C) and filtered in a funnel with filter paper. After filtration, the aqueous extracts were lyophilized.

2.3. Determination of total phenolic content

Total phenolic content of tropical fruit aqueous extract was determined by the spectrophotometric method using the Folin – Ciocalteu reagent [10]. Results were expressed as µg of total phenolics in gallic acid equivalent (GAE) per mL of extract.

2.4 Determination of total antioxidant capacity (TAC)

The assay is based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by the fruit extract and subsequent formation of a green phosphate/Mo (V) complex at acid pH [10]. Tubes containing aqueous fruit extract and reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate) were incubated at 95 °C for 90 min.

After the mixture had cooled to room temperature, absorbance of each solution was measured at 695 nm against a blank. Antioxidant capacity was expressed as ascorbic acid equivalent (AAE).

2.5. Hydroxyl radical scavenging activity assay

The scavenging activity of fruit extract against the hydroxyl radical was investigated using Fenton's reaction ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}$). These results were expressed as inhibition rate. Hydroxyl radicals were generated using a modified method [11] in 3 mL sodium phosphate buffer (150 mM, pH 7.4), containing 10 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mM EDTA, 2 mM sodium salicylate, 30% H_2O_2 (200 μL) and varying concentrations of aqueous fruit extracts. In the control group, sodium phosphate buffer replaced H_2O_2 . Solutions were incubated at 37 °C for 1 h, and the presence of the hydroxyl radical was detected by monitoring absorbance at 510 nm.

2.5. Superoxide radical scavenging activity assay

The assay was based on the capacity of aqueous fruit extract to inhibit photochemical reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) in the riboflavin–light–NBT system [10]. Each 3 mL reaction mixture contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.8), 13 mM methionine, 2 μM riboflavin, 100 μM EDTA, NBT (75 μM) and 1 mL of sample solution. After blue formazan production, the increase in absorbance at 560 nm after 10 min illumination from a fluorescent lamp was monitored. The entire reaction assembly was enclosed in a box lined with aluminum foil. Identical tubes with the reaction mixture were kept in the dark and served as blanks.

2.6. Iron Chelation

The ferrous ion chelating ability of samples was investigated according to earlier studies [10]. Briefly, the reaction mixture, containing samples of FeCl_2 (0.05 mL, 2 mM) and ferrozine (0.2 mL, 5 mM), was shaken well and incubated for 10 min at room temperature. Absorbance of the mixture was measured at 562 nm against a blank.

2.7. Reducing power

Reducing power of the samples was quantified as described further on [10]. Briefly, 4 mL of reaction mixture, containing different sample concentrations in phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6), was incubated with potassium ferricyanide (1% w/v) at 50 °C for 20 min. The reaction was terminated by TCA solution (10% w/v). The solution was then mixed with distilled water and ferric chloride (0.1% w/v) solution and absorbance was measured at 700 nm. The result was expressed as a percentage of the activity shown by 0.2 mg/mL of vitamin C.

2.8. Cell proliferation studies

Cytotoxicity was determined by the MTT assay [12]. Cells were plated in 96-well plates at an initial density of 5×10^3 cells per well. After incubation for 24 h at 37 °C, cells were treated with concentrations of 0, 125, 250, 500, 1000 and 2000 µg/mL and incubated for 48 h. The MTT solution (5 mg/mL) was then added to each well and further incubated for 4 h at 37 °C. To solubilize the product of MTT reduction, 100 µL of isopropanol containing 0.04 N HCl was added to each well and thoroughly mixed using a multichannel pipette. Optical density was read with an ELISA reader at 570 nm.

The percent inhibition of cell proliferation was calculated as follows:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Abs: 570nm Control} - \text{Abs: 570nm sample}}{\text{Abs: 570nm Control}} \times 100$$

Abs: 570nmControl

1.9. Statistical analysis

All data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA using GraphPad InStat software. Student-Newman-Keuls post-tests were performed for multiple group comparison. In all cases statistical significance was set at $p < 0.05$.

3.0. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Total phenolic compounds (TPC)

The amount of phenolic compounds in the aqueous extracts of the fruits under study is shown in Figure 1. Values ranged from 441.0 µg GAE/mL to 199.6 µg GAE/mL for *S. purpurea* and *S. lutea* respectively. Data analysis resulted in 2 groups, fruits with a large amount of phenolic compounds (*M. zapota*, *H. speciosa* and *S. purpurea*) and those with a small amount (*A. carambola* and *S. lutea*).

The amount of phenolic compounds observed was lower than that found in some varieties of grapefruit juices, which showed around 535.0 µg GAE/mL. On the other hand, *M. zapota*, *H. speciosa* and *S. purpurea* exhibited higher values than those recorded in aqueous extracts of fruits consumed worldwide, such as apples (339.0 µg GAE/mL) and pineapples (358.0 µg GAE/mL) [13]. This demonstrates the great potential of these fruits as functional foods, given that plant phenolic compounds are considered the main antioxidant compounds of fruits [14]. Furthermore, the food industry has shown considerable interest in plant extracts rich in phenolic

compounds, since they retard degradation of various nutrients found in industrialized foods, thereby increasing their quality and nutritional value [15].

3.2. Antioxidant activity

Some authors have found positive correlations between total phenolic compound content and antioxidant activity in fruits [16]. However, this activity is not always correlated with the presence of large amounts of these compounds. Thus, due to the presence of phenolic compounds in the fruit extracts studied here, the antioxidant potential of the extracts was assessed using different antioxidant tests.

Antioxidants are compounds that can prevent biological and chemical substances from radical-induced oxidation damage. Because radical oxidation of substrates occurs through a chain reaction involving three stages (i.e. initiation, propagation and termination), antioxidants show their effects through various mechanisms. Thus, we used different methods to evaluate the effect of fruit extracts on initiation (total antioxidant capacity and power reducing), propagation (iron chelating) and termination (superoxide and hydroxyl radical scavenging activities) stages.

3.2.1 Total Antioxidant Capacity (TAC)

The TAC test evaluates the capacity of a sample to donate electrons into a slightly acidic environment, thereby neutralizing reactive species, such as oxygen reactive species. Results obtained in the present study are shown in Figure 2. We found no correlation between the amount of phenolic compounds and TAC values of the extracts. Of the five species analyzed, *M. zapota* exhibited double the TAC value observed in the other fruit extracts.

We were unable to compare our TAC values with those obtained by other researchers, since this is the first literature study to assess the TAC of *H. speciosa*, *S. purpurea*, *A. carambola* and *S. lutea*. An exception was *M. zapota*. The approximate value of 30.0 AAE for aqueous extract of *M. zapota* found in the present study was similar to that described in an earlier study assessing the same extract [17]. On the other hand, extract of *M. zapota* from Singapore exhibited higher values than ours, around 101.4 AAE [18]. This difference could be due to natural variations, especially when cultivation conditions and stages at harvest are difficult to determine.

3.2.2. Reducing power capacity

Reducing power is linked to electron transfer ability; thus, reducing activities were usually related to the development of reductones. Reductones terminate free radical chain reactions by donating a hydrogen atom. In most cases, irrespective of the stage in the oxidative chain in which antioxidant action is assessed, predominance of non-enzymatic antioxidative activity is mediated by redox reactions [10]. Thus, several studies have reported that antioxidant activity was concomitant with reducing power. However, our fruit extracts did not show any reducing property (from 0.01mg to 2.0 mg/mL).

3.2.3. Metal chelating activity

Fe²⁺ ion is the most powerful pro-oxidant among various species of metal ions. It is known to generate ROS by Fenton and Haber-Weiss reactions. Metal ion chelating activity of an antioxidant molecule prevents oxyradical generation and consequent oxidative damage. The iron-chelating capacity test gauges the ability of antioxidants to compete with ferrozine in chelating ferrous ions. Activity is measured as the decrease in absorbance of the red Fe²⁺/ferrozine complex.

In this assay fruit extracts (from 0.01mg to 2.0 mg/mL) did not interfere with the formation of the ferrous complex using the ferrozine reagent, suggesting they had no chelating activity.

3.2.4. Superoxide radical scavenging

The superoxide radical is a highly toxic species produced by innumerable biological and photochemical reactions. This radical is a reactive oxygen species that can damage various molecules, including proteins, lipids and cellular DNA, causing cell and tissue damage as well as a number of diseases [19]. It is produced in vivo and leads to the formation of H₂O₂ via a dismutation reaction, which is another oxidant agent very harmful to cells.

The effect of different extract concentrations on superoxide anions is shown in Table 2. All extracts assessed are capable of sequestering the superoxide radical, and three extracts (*S. purpurea*, *S. lutea*, *A. carambola*) were capable of scavenging 100% of radicals formed. Extract of *M. zapota* was the least potent, unable to sequester more than 60% of radicals formed. A low concentration (0.5 mg/mL) of *H. speciosa* showed the greatest superoxide scavenging capacity (~80%), a similar value to that observed with gallic acid (positive control) at the same concentration. Similar superoxide scavenging values were found with extracts (from 0.5 to 1.0

mg/mL) of the strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) [20]. On the other hand, values obtained with *H. speciosa* extract (0.5 mg/mL) were higher than those observed in extracts of *Choerospondias axillaris* [21] and *Psidium guajava* [22] which sequestered around 38 and 60% of superoxide radicals formed, respectively, at a concentration of 0.5 mg/mL.

The scavenging action of fruit extracts has been related with the presence of phenolic compounds [23]. We believe that some of the scavenging activity exhibited by the extracts originates in their phenolic compounds. However, since no correlation between amount of phenolics in the extracts and superoxide scavenging activity was identified, we hypothesize that other compounds not yet identified are being added to polyphenols and contributing to the potent superoxide scavenging activity observed in our study.

3.2.4 Hydroxyl radical scavenging

The hydroxyl radical is the most reactive of oxygen reactive species, causing serious damage to biomolecules. Its elimination is highly desirable, since the elevated reactivity of this radical is associated to cell damage, leading to several diseases [21].

Table 2 shows that all extracts exhibited dose-dependent hydroxyl radical scavenging activity (from 0.1 to 2.0 mg/mL). Extracts of *M. zapota* and *S. purpurea* displayed the highest hydroxyl radical scavenging percentage, around 92% (2.0 mg/mL). Interestingly, these two fruits had the largest amount of phenolic compounds (Figure 1). Another remarkable finding is that three extracts (*M. Zapota*, *S. purpurea*, and *S. lutea*) at a concentration of 0.1 mg/mL were capable of scavenging 50% of hydroxyl radicals at a lower concentration than gallic acid (positive control).

Hydroxide scavenging activity of extracts analyzed here was not as potent as that described for extract of the Indian gooseberry (*Phyllanthus emblica*), which scavenging around 80% of radicals formed, at a concentration of 25.0 µg/mL [24]. However, the activity observed here was much more potent than that reported for extracts of other fruits, such as bitter melon (*Momordica charantia*), known in Brazil as “melão de São Caetano”. This fruit exhibited low hydroxyl radical scavenging capacity, since with 1.6 mg/mL the extract was capable of scavenging only 37.1% of hydroxyl radicals [25]. Extracts of red pitaya peel (*Hylocereus undatus*) and white pitaya peel (*H. costaricensis*), at a concentration of 2.0 mg/mL, showed scavenging activity of only 64.0 and 58.0%, respectively [26]. The scavenging activity of fruits

studied here was also greater than that observed for extracts from other sources such as the fungi *Agrocybe cylindracea* [27] and *Ganoderma tsugae* [28] and seaweeds [10] which, even at high concentrations (> 5.0 mg/mL), were unable to sequester more than 30% of hydroxyl radicals.

Results show that the fruit extracts investigated in the present study exhibited substantial hydroxyl radical sequestering capacity and could be used to help prevent or reduce damage provoked by oxidative stress.

3.5. Cell proliferation studies

The antiproliferative activity of tropical fruit aqueous extracts was determined with two cell lines: HeLa (human cervical cancer cells) and 3T3 (rat fibroblast cells) for 24h and 48 h using the MTT colorimetric method. This simple and reliable technique, which measures the metabolic activity of viable cells, has been widely used to quantify cell proliferation [12].

3T3 cells are commonly used to assess compound toxicity against normal cells. Our data showed that the extracts had low toxicity against these cells and interfered very little in 3T3 cell proliferation. Proliferation inhibition ranged from 0 to 20% in the first 24 hours, at the maximum concentration used. However, this did not increase after 48 hours of experiment (Figure 3).

We also assessed the effect of extracts against Hela tumor cells. Results are shown in Figure 4. Under conditions tested, *H. speciosa* extract showed no antiproliferative activity (around 10% at the highest concentrations). The other extracts displayed antiproliferative activity, highlighted by extracts of *Spondias purpurea* and *Manilkara zapota* (500 µg/mL, 48 h), which inhibited around 58 and 40% of cell proliferation, respectively.

Assessment of the antiproliferative activity of fruit extracts against tumor cells has been increasing in recent years. A study with extract of haritaki fruit (*Terminalia chebula*) and human prostate cells (PC-3) showed dose-dependent antiproliferative activity, reaching a maximum of around 0.4 mg/mL. Data also show a positive correlation between antiproliferative activity and phenolic compound content, which led the authors to suggest the latter are responsible for the antiproliferative activity of extracts [29]. Positive correlations were also observed between the amount of phenolic compounds and antiproliferative activity with extracts of rosehips and black chokeberries against colon cancer cells (HT-29) and breast cancer cells (MCF-7). The authors proposed that the antiproliferative activity of extracts is due to the presence of phenolic compounds [30]. We found no positive correlation between the amount of phenolic compounds

in the extracts and their antiproliferative activity. Although extracts of *Spondias purpurea* and *Manilkara zapota* showed higher amounts of phenolic compounds, they also exhibited greater antiproliferative activity. Antiproliferative activity is likely dependent on different types of phenolic compounds, some being more toxic to cells than others. In the future, we intend to purify the different phenolic compounds present in fruit extracts studied here, assess them as “in vitro” and “in vivo” antiproliferative compounds, and identify their action mechanisms.

Data obtained demonstrated that tropical fruits, especially *Spondias purpurea* and *Manilkara zapota*, can inhibit oxidative damage by acting in both the initiation and termination phase of the oxidant agent formation process, as well as inhibiting tumor cell proliferation. These characteristics show their great potential for dietotherapeutic and nutritional applications.

4. ACKNOWLEDGEMENT

Research was supported by CAPES, MCT and CNPq, Brazil. J. Almeida-Lima.; R. M. Oliveira; G. P. Fidelis; D. L. Gomes; C. B. S. Telles; R. F. Melo-Silveira; N. Dantas-Santos.; L. S. Costa; H. A. O. Rocha thank CNPq and CAPES for fellowship support.

5. REFERENCES

1. Hasler CM (1998) Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. Food Tech 52:57–62.
2. ADA (1995) Position of the American Dietetic Association: Phytochemicals and functional foods. J. Am. Diet. Assoc 95:493-496.
3. He FJ, Nowson CA, Lucas M, MacGregor GA (2007) Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies. J Hum Hypertens 21:717–728.
4. Kim D-O, Jeong, SW, Lee, CY (2003) Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chem 81:231-326.

5. Miranda MRA, Silva FS, Alves RE, Filgueiras HAC, Araújo NCCA (2002) Armazenamento de dois tipos de sapoti sob condição de ambiente. Rev Bras Frutic 24:644-646.
6. Pinheiro CSR, Medeiros DN, Macêdo C.E.C, Alloufa MAI (2001) Geminação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. Rev Bras Frutic 23:413-416.
7. Martins LP, Silva SM, Alves RE, Filgueira HAC (2003) Desenvolvimento de frutos de ciriguleira (*Spondias purpurea* L.) Rev Bras Frutic 25:11-14.
8. Teixeira GHA, Durigan JF, Donadio LC, Silva JAA (2001) Caracterização pós-colheita de seis cultivares de carambola (*Averrhoa carambola* L.). Rev Bras Frutic 23:546-550.
9. Firmino JL, Almeida MC, Torres SB (1997) Efeito da escarificação e da embebição sobre a emergência e desenvolvimento de plântulas de cajá (*Spondias lutea* L.). Rev. Bras Sementes 19:125-128.
10. Costa LS, Fidelis GP, Cordeiro SL, Oliveira RM, Sabry DA, Câmara RBG, Nobre LTDB, Costa MSSP, Almeida-Lima J, Farias EHC, Leite EL, Rocha HAO (2010) Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. Biomed Pharmacother 64:21-28.
11. Dasgupta N, De B (2007) Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: a comparative study. Food Chem 4:101-471.
12. Mosmann, T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. J. Immunol Methods 65:55-63.
13. Gardner PT, White TAC, McPhail DB, Duthie GG (2000) The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. Food Chem 68:471-474.
14. Lopez-Velez M, Martínez-Martínez F, Del Valle-Ribes, C (2003) The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine - critical reviews. Food Sci and Nutr 43:233-244.
15. Pan Y, He C, Wang H, Ji X, Wang K, Liu P (2010) Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component. Food Chem 121:497-502

16. Wang, S. Y.; Lin, H. S (2000) Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J Agric Food Chem* 48:140-146.
17. Shui G, Wong SP, Leong LP (2004) Characterization of antioxidants and change of antioxidant levels during storage of *Manilkara zapota* L. *J Agric Food Chem* 52:7834-7841.
18. Isabelle M, Lee BL, Lim MT, Koh W-P, Huang D, Ong, CN (2010) Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. *Food Chem* 123:77-84.
19. Sahreen S, Khan, MR, Khan RA (2010) Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chem* 122:1205-1211.
20. Oliveira I, Coelho V, Baltasar R, Pereira JA, Baptista P (2009) Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food and Chem Toxic* 47:1507-1511.
21. Wang H, Gao XD, Zhou GC, Cai L, Yao WB (2008) In vitro and in vivo antioxidant activity of *Choerospondias axillaris* aqueous extract from fruit. *Food Chem* 106:888-895.
22. Chen HY, Yen GC (2007) Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chem* 101:686-694.
23. Vasco C, Ruales J, Kamal-Eldin A (2008) Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem* 111:816-823.
24. Niwano Y, Saito K, Yoshizaki F, Kohno M, Ozawa, T (2011) Extensive screening for herbal extracts with potent antioxidant properties. *Journal of Clinical Biochem and Nutr* 48:78-84.
25. Kubola J, Siriamornpun S (2008) Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chem* 110: 881-890.
26. Kim H, Choi H-K, Moon JY, Kim YS, Mosaddik A, Cho SK (2011) Comparative antioxidant and antiproliferative activities of red and white pitayas and their correlation with flavonoid and polyphenol content. *Journal of Food Sci* 76:38-45.

27. Tsai S-Y, Huang S-J, Mau J-L (2006) Antioxidant properties of hot water extracts from *Agrocybe cylindracea*. Food Chem, 98:670-677.
28. Mau J-L, Tsai S-Y, Tseng Y-H, Huang S-J (2005) Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. Food Sci and Technol, 38:589-597.
29. Saleem A, Husheem M, Härkönen P, Pihlaja K (2002) Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. fruit. Journal of Ethnopharmacol 81:327-336.
30. Olsson ME, Gustavsson KE, Andersson S, Nilsson A, Duan RD (2004) Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. J Agric Food Chem 52:7264-7271.

TABLES

Table 1. Common and scientific names of selected fruits

Common name	Scientific name	Some characteristics
Sapoti	<i>Manilkara zapota</i>	Belongs to the family Sapotaceae; it is recognized for its delicious, slightly astringent, sweet taste. The sapoti tree is well adapted to the climatic conditions of Brazil, more specifically to the Northeast region ⁽⁵⁾ . Its skin is brown and the pulp is cream-colored.
Mangaba	<i>Hancornia speciosa</i>	Belongs to the family Apocynaceae, is very popular in the Northeast, has good digestibility and nutritional value ⁽⁶⁾ . Its sweet pulp is yellow and reddish-yellow when ripe.
Siriguela	<i>Spondias purpurea</i>	Belongs to the family Anacardiaceae, is a dark red drupe when ripe, and has a pleasant-tasting and smelling pulp. It is very popular in Northeast Brazil due to its excellent organoleptic qualities ⁽⁷⁾ .
Carambola	<i>Averrhoa carambola</i>	Belongs to the family Oxalidaceae, its fruits exhibit 4 or 5 longitudinal grooves, corresponding to the carpels ⁽⁸⁾ . The skin is translucent, smooth and shiny, and its color varies from green to yellow.
Caja	<i>Spondias lutea</i>	Belongs to the family Anacardiaceae. Its pulp is juicy, sweet and acidulate, with a very pleasant taste and smell. This fruit is egg-shaped and slightly flat on the bottom; when ripe its smooth skin is yellowish-orange ⁽⁹⁾ .

Table 2. Hydroxyl and superoxide radical scavenging activity of tropical fruits

Fruits	mg/mL	Inibition (%)	
		Hidroxil radical scavenging	Superoxide radical scavenging
<i>Manilkara zapota</i>	0.10	50.9 ± 2.6 ^a	nd
	0.25	52.8 ± 4.3 ^a	nd
	0.50	66.5 ± 2.0 ^b	41.6 ± 1.5 ^a
	1.00	87.4 ± 1.4 ^c	45.3 ± 3.5 ^a
	2.00	92.2 ± 0.5 ^c	45.2 ± 0.0 ^a
	4.00	nd	61.1 ± 3.3 ^b
	8.00	nd	62.0 ± 0.9 ^b
<i>Hancornia speciosa</i>	0.10	26.7 ± 4.7 ^a	nd
	0.25	50.3 ± 1.6 ^b	nd
	0.50	58.9 ± 0.2 ^b	80.1 ± 7.7 ^a
	1.00	73.2 ± 3.6 ^c	81.5 ± 10.6 ^a
	2.00	76.0 ± 1.2 ^c	86.3 ± 8.3 ^b
	4.00	nd	88.3 ± 5.0 ^b
	8.00	nd	89.9 ± 1.5 ^b
<i>Spondias purpurea</i>	0.10	58.3 ± 5.0 ^a	nd
	0.25	65.9 ± 0.4 ^a	nd
	0.50	79.5 ± 1.8 ^b	33.5 ± 3.9 ^a
	1.00	88.4 ± 2.2 ^b	44.8 ± 6.3 ^b
	2.00	92.6 ± 0.3 ^b	47.1 ± 0.5 ^b
	4.00	nd	81.6 ± 8.9 ^c
	8.00	nd	101.5 ± 2.0 ^d
<i>Averrhoa carambola</i>	0.10	17.9 ± 0.3 ^a	nd
	0.25	27.4 ± 1.7 ^b	nd
	0.50	49.6 ± 2.3 ^c	43.4 ± 4.5 ^a
	1.00	82.1 ± 2.2 ^d	49.8 ± 2.5 ^a
	2.00	92.0 ± 0.7 ^e	68.3 ± 3.8 ^b
	4.00	nd	92.5 ± 0.8 ^c
	8.00	nd	102.1 ± 0.7 ^c
<i>Spondias lutea</i>	0.10	63.1 ± 1.1 ^a	nd
	0.25	60.6 ± 2.3 ^a	nd
	0.50	74.1 ± 2.2 ^b	36.3 ± 3.1 ^a
	1.00	76.3 ± 3.2 ^b	46.9 ± 10.5 ^a
	2.00	79.9 ± 1.1 ^b	56.4 ± 0.2 ^a
	4.00	nd	101.4 ± 8.1 ^b
	8.00	nd	101.7 ± 3.4 ^b
Ácido gálico	0.10	40.5 ± 1.3 ^a	41.0 ± 3.1 ^a
	0.25	63.3 ± 2.1 ^a	73.1 ± 2.6 ^a
	0.50	92.0 ± 1.2 ^b	81.1 ± 3.2 ^b
	1.00	98.4 ± 2.3 ^b	90.1 ± 3.5 ^a

Data are expressed as means +- standard deviation. Different letters indicate a significant difference between tropical fruits using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). nd – not determined.

FIGURES AND LEGENDS

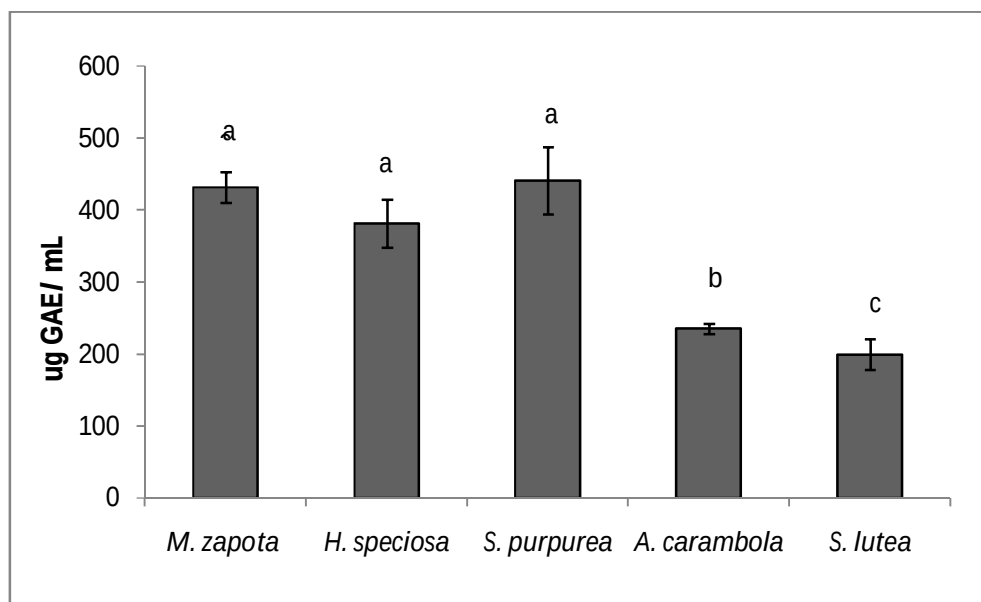


Fig 1 Total phenolic compounds of tropical fruit aqueous extract, expressed in gallic acid equivalents (GAE) ug/ mL. Different letters indicate a significant difference between concentrations of individual fruit aqueous extract using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$)

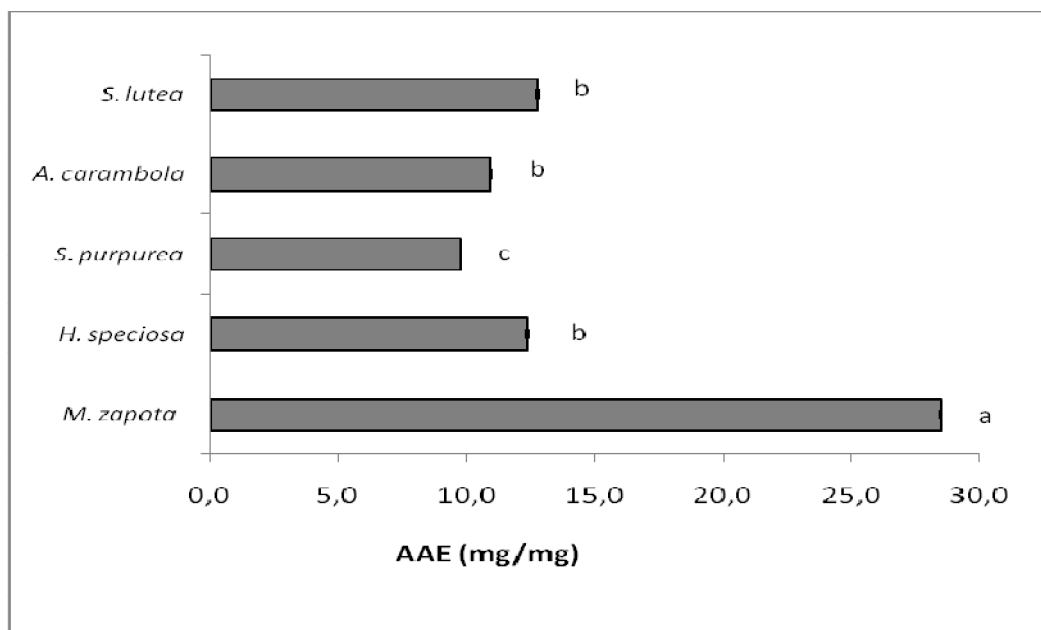


Fig 2 Total antioxidant capacity (TAC) of tropical fruit aqueous extract, expressed in ascorbic acid equivalents (AAE) mg/mg. Different letters indicate a significant difference between concentrations of individual fruit aqueous extract using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$)

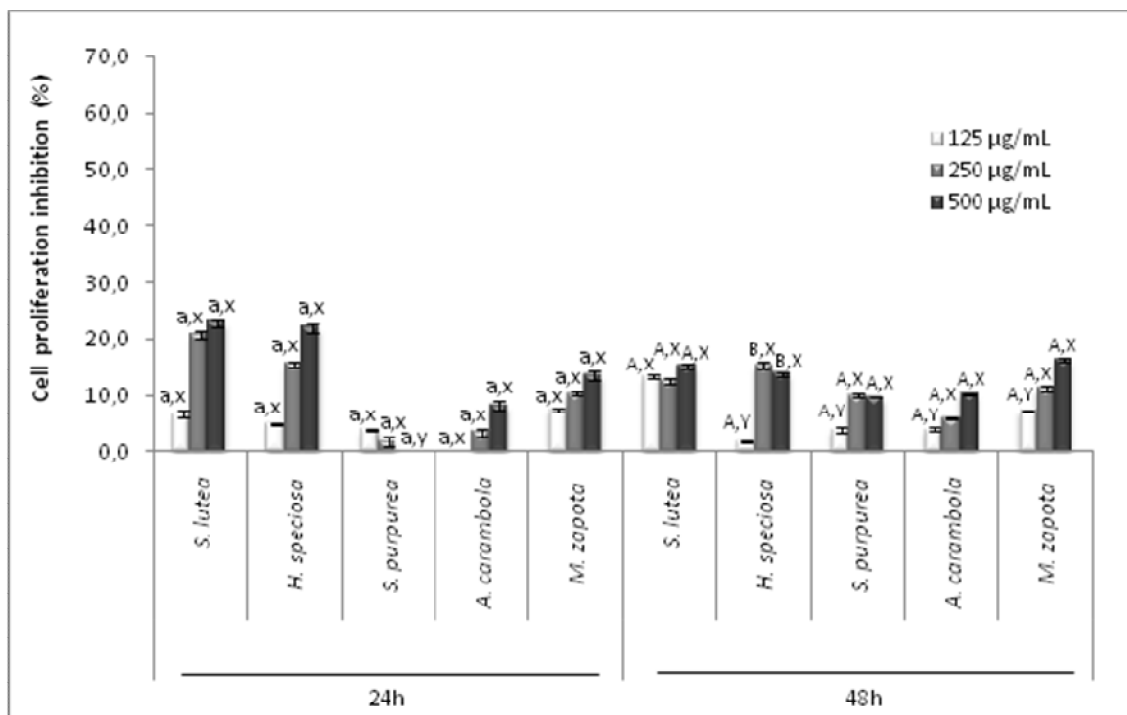


Fig 3 Antiproliferative activity of tropical fruit aqueous extracts with 3t3 cells. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. ^{a/A,B} indicate a significant difference ($p < 0.05$) between different concentrations of the same fruit. ^{x,y / X,Y} indicate a significant difference ($p < 0.05$) between similar concentrations of different fruits. Statistical analysis was conducted separately at 24 and 48 hours using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$).

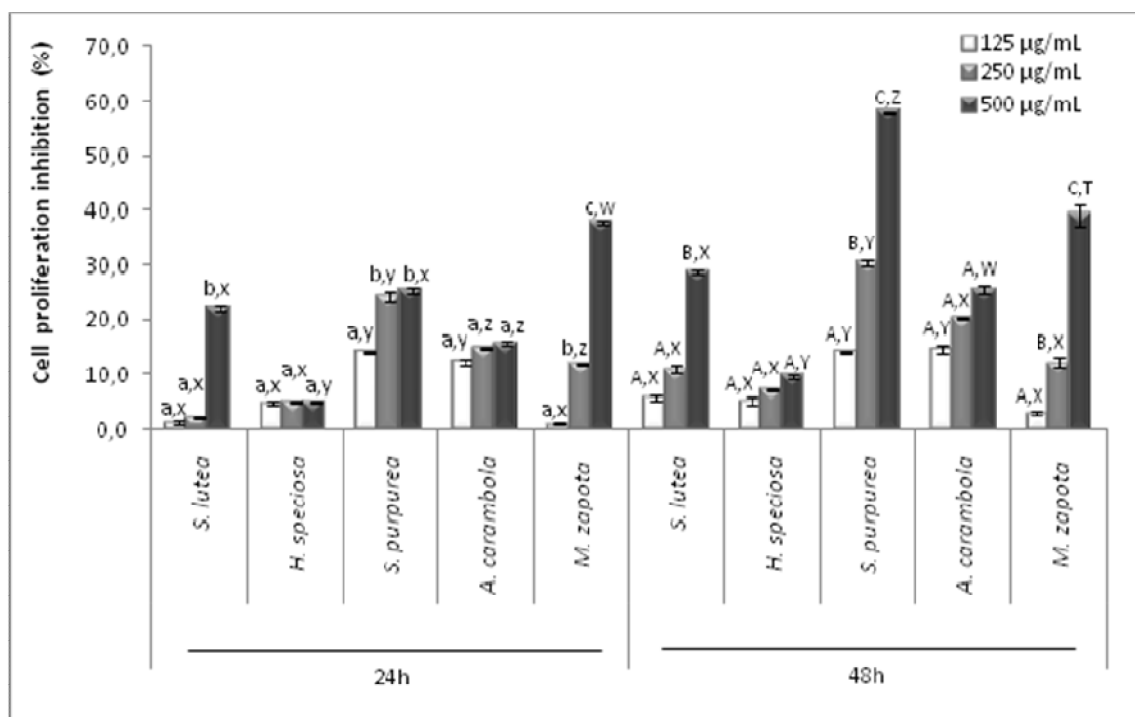


Fig 4 Antiproliferative activity of tropical fruit aqueous extracts with Hela cells. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. ^{a / A,B} indicate a significant difference ($p < 0.05$) between different concentrations of the same fruit. ^{x,y / X,Y} indicate a significant difference ($p < 0.05$) between similar concentrations of different fruits. Statistical analysis was conducted separately at 24 and 48 hours using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$)

REFERENCIAS

ABDALLA, D. S. P. Antioxidantes: conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **A revista da clínica médica**. v. 26, p. 141-164, 1993.

ADA REPORTS. 1999. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. **Journal of the American Dietetic Association** 99: 1278-1285

ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. Functional foods in angiology and vascular surgery. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.3, p.145-54, 2004.

ARBOS, KA; FREITAS, RJS; STERTZ, SC; DORNAS, MF. Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 30, p. 501-506, 2010

ATHUKORALA, Y.; KIM, K. N.; JEON, Y. J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. **Food Chem Toxicol**. v. 44, p. 1065-1074, 2006.

BANERJEE, A; DASGUPTA, N; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruti. **Food Chemistry**, v. 90, p. 727–733, 2005.

BENZIE, IFF; ZSETO, Y T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 47,p. 633-636, 1999.

BERGER, M. M. Can oxidative damage be treated nutritionally? **Clinical Nutrition**. v. 4, p. 172-183, 2005.

BOURN, D.; PRESCOTT, J. A comparasion of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, p. 1-34, 2002.

BRASIL – Ministério da Saúde. INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 12 jan 2012.

BRASIL, Resolução nº 18, de 30/04/1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe de Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/18_99.htm > Acesso em: 12 dez 2011.

CAMARA, RBG; COSTA, LS; FIDELIS, GP; NOBRE, LTDB; DANTAS-SANTOS, N; CORDEIRO, SL; COSTA, MSSP; ALVES, LG; ROCHA, HAO. Heterofucans from the Brown Seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with Anticoagulant and Antioxidant Activities. CANDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Alimentos funcionais. Uma revisão. **Boletim da SBCTA**, v. 29, p. 193- 203, 2005.

CHEN, H.Y; YEN, G.C. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. **Food Chemisry**. v. 101, p.686-694, 2007.

CHU, Y-H; CHANG, CL; HSU, HF. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [v. 80](#), p. 561–566, 2000.

COLLI, C.; SARDINHA, F.; FILISETTI, T. M. C. C. Alimentos Funcionais. In: CUPPARI, Lílian. Guia de Nutrição: Nutrição clínica no adulto. 2ª ed. São Paulo: Ed. Manole, 2005. cap.5, p.71 - 87.

COSTA R.P, MENENDEZ G., BRICARELLO L.P, ELIAS M.C., ITO M. Óleo de peixe, fitosteróis, soja e antioxidantes: impactos nos lipídios e aterosclerose. **Revista Brasileira de Cardiologia Vascular**, v.10, p.819-32, 2000.

COSTA, LS; FIDELIS, GP; CORDEIRO, SL; OLIVEIRA, RM; SABRY, DA; CÂMARA, RBG; NOBRE, LTDB; COSTA, MSSP; ALMEIDA-LIMA, J; FARIAS, EHC; LEITE, EL; ROCHA, HAO. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 64, p. 21-28, 2010.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G.M.; FARIAS, P.A.; VIANA, G.S.; CUNHA, K.M.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V.; RAO, V.S. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 40, p. 1231-1234, 2002.

DASGUPTAA, N.; DE, B. Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. **Food Chemistry**. v. 101, p. 4, 2007.

DECKER, E. A.; WELCH, B. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food?. **Journal of agricultural food chemistry**. v. 38, p. 4, 1990.

DONADIO, L.C.; SILVA, J.A.A.; ARAÚJO, P.R.S.; PRADO, R.M. Caramboleira (*Averrhoa carambola* L.). Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2001. 81p. (Série Frutas Potenciais).

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUAN, X; JIANG, Y; SU, X; ZHANG, Z; SHI, J. Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. **Food Chemistry**, v.101, p. 1365–1371, 2007.

FERRARI, C.K.B. Apoptose: a importância da maquinaria de morte celular no controle e na patogênese de doenças. **Revista de Ciências Médicas**, v. 9, p. 21-31, 2000

FERRARI, C.K.B. Oxidative stress pathophysiology: Searching for an effective antioxidant protection. **International Medicine**, v. 8, p. 175-184, 2001.

GARDNER, PT; WHITE, TAC; MCPHAIL, DB; DUTHIE, GG. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chemistry**, v.68, p. 471-474, 2000.

GEORGE,B; KAUR, C; KHURDIYA, D.S; KAPOOR, HC. Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. **Food Chemistry**, v. 84, p. 45–51, 2004.

HEO.J.; LEE, C.Y. Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induce apoptosis in PC12 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1984–1989, 2005.

HOGAN, S; CHUNG, H; ZHANG, L; LI, J; LEE, Y; DAI, Y; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v. 118, p. 208–214, 2010.

ISABELLE, M; LEE, BL; LIM, MT; KOH, W-P; HUANG, D; ONG, CN. Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. **Food Chemistry**, v. 123, p.77-84, 2010.

JANG, H-D; CHANG, K-S; HUANG, Y-S; HSU, C-L; LEE, S-H; SU, M-S. Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three Chinese medicinal plants. **Food Chemistry**, v.103, p.749–756, 2007.

JIME'NEZ-ESCRIG, A; RINCO'N, M; PULIDO R; SAURA-CALIXTO, F. Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) as a New Source of Antioxidant Dietary Fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5489-5493, 2001.

KATSUBE, N., IWASHITA, K., TSUSHIDA, T., YAMAKI, K., e KOBORI, M. Induction of apoptosis in cancer Cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 68–75, 2003.

KIM, H; CHOI, H-K; MOON, JY; KIM, YS; MOSADDIK, A; CHO, SK. Comparative antioxidant and antiproliferative activities of red and white pitayas and their correlation with flavonoid and polyphenol content. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 38-45, 2011.

KUBOLA, J; SIRIAMORNPUN, S. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. **Food Chemistry**, v. 110, p. 881-890, 2008.

LI, X.M.; LI, X.L.; ZHOU, A.G. Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from *Lycium barbarum* fruits in vitro. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 488-497, 2007.

LIM, Y.Y.; LIM, T.T.; TEE, J.J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. **Food Chemistry**, v. 103, p.1003–1008, 2007.

LIMA, VLAG; MÉLO EA; SILVA; LIMA, DE. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agricola**, v.59, p.447-450, 2002.

LOPEZ-VELEZ, M; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, F; DEL VALLE-RIBES, C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine - critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 233-244, 2003.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992. 352p.

MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P. e COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista de Nutrição**, v.12, p.205-212, 1999.

MAGALHAES, K.D; COSTA, LS; FIDELIS, GP; OLIVEIRA, RM; NOBRE, LTDB; DANTAS-SANTOS, N; CAMARA, RBG; ALBUQUERQUE IRL; CORDEIRO, SL; SABRY DA; COSTA, MSSP; ALVES, LG; ROCHA, HAO. Anticoagulant, Antioxidant and Antitumor Activities of Heterofucans from the Seaweed *Dictyopteris delicatula*. **International Journal of Molecular Science**. v. 12, p. 3352–3365, 2011.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews**, v.2, p. 143-148, 2002.

MAU, J-L; TSAI, S-Y; TSENG, Y-H; HUANG, S-J. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 589-597, 2005.

MCDUGALL, G. J., ROSS, H. A., IKEJI, M.; STEWART, D. Berry extracts exert different antiproliferative effects against cervical and colon cancer cells grown in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3016–3023, 2008.

MIRANDA, M. R. A. et al. Armazenamento de dois tipos de sapoti sob condições ambiente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 644-646, 2002.

MOFFATT, J; HASHIMOTO, M.; KOJIMA, A.; KENNEDY, D.O.; MURAKAMI, A.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H.; MATSUI-YUASA, I. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumor cells is associated with polyamine metabolism and caspase-3 activation. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 2151-2157, 2000.

MORAES F. P; L. M. COLLA. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios a saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p.109-122, 2006.

MORGADO, CMA, DURIGAN, JF; LOPES, VG; SANTOS, LO. Conservação pós-colheita de goiabas 'Kumagai': Efeito do Estádio de Maturação e da Temperatura de armazenamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 1001-1008, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MULLER, F. L.; LUSTGARTEN, M.; JANG, Y.; RICHARDSON, A.; VAN, R.H. Free Radical. **Biology and Medicine Journal**, n. 43, p. 477, 2007.

NETO, WMG. Antioxidantes. Livro Anabolismo Total, Phorte Editora - Ltda. Brasília, 2000.

NEUMANN, P; CRUZ, A.I; ABREU, E. S; TORRES, E A F S. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco alimentos, nutraceuticos....você já ouviu falar? **Higiene Alimentar**. v. 14, p. 19-23, 2000.

NINFALI, P; MEA, G; GIORGINI, S; ROCCHI, M; BACCHIOCCA, M. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. **British Journal Nutrition**, v. 93, p. 257-66, 2005

OLIVEIRA, I; COELHO, V; BALTASAR, R; PEREIRA, JA; BAPTISTA, P. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. **Food and Chemistry Toxicology**. v. 47, p.1507-1511, 2009.

OLSSON, ME; GUSTAVSSON, KE; ANDERSSON, S; NILSSON, A; DUAN, RD. Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7264-7271, 2004.

PAN, Y; HE, C; WANG, H; JI, X; WANG, K; LIU, P. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component. **Food Chemistry**, v.121, p.497–502, 2010.

PINHEIRO, C.S.R.; MEDEIROS, D.N.; MACÊDO, C.E.C. de ; ALLOUFA, M.A.I. Germinação de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 85 – 90, 2001

PIRES, EJP; POMMER, CV. Fisiologia da Videira. In: POMMER, C. V. (ed.) **UVA – Tecnologia de Produção, Pós-colheita, Mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, Cap. 4, p. 250-294, 2003.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

RICE-EVANS, C., BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in Lipid Research**, v.32, p.71-110, 1993.

SACRAMENTO, C.K.; SOUSA, F.X. Cajá (*Spondias mombin* L.). FUNEP, Jaboticabal. 2000. 52p. (Série Frutas Nativas).

SAHREEN, S; KHAN, MR; KHAN, RA. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1205-1211, 2010.

SALEEM, A; HUSHEEM, M; HÄRKÖNEN, P; PIHLAJA, K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 327-336, 2002.

SALGALLER, M.L. Prostate cancer immunotherapy at the dawn of the new

SEERAM, N. P. Berry Fruits for cancer prevention: Current status and future prospects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 630–635, 2008.

SHUI, G; WONG, SP; LEONG, LP. Characterization of antioxidants and change of antioxidant levels during storage of *Manilkara zapota* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.7834-7841, 2004.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v.28, p. 1057-1060, 1989.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**. v. 37, p. 127-135, 2003.

SUN,J; CHU, Y-F; WU, X; LIU, RH. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, 7449-7454, 2002.

TAIPINA, M. S.; FONTS, M. A. S.; COHEN, V. H. Alimentos funcionais – nutraceuticos. **Higiene Alimentar**. v. 16, p 28-29, 2002.

TSAI, S-Y; HUANG, S-J; MAU, J-L. Antioxidant properties of hot water extracts from *Agrocybe cylindracea*. **Food Chemistry**, v. 98, p. 670-677, 2006.

UNESCO. Organização das Nações Unidas para a educação, a ciência e a cultura. Disponível em: <http://www.unesco.org/new/pt/brasil/natural-sciences/> Acesso em: 12 nov 2011

UNESCO/ US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (USA). *Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids*. Washington DC: **National Academy Press**, 2000, 506p. (A report on the antioxidants and related compounds. Subcommittees on Upper Reference Intake Levels of Nutrients and Interpretation of Uses of Dietary Reference Intakes and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Food and Nutrition Board)

VASCO, C; RUALES, J; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v.111, p. 816-823, 2008.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S. ; KUBOTA, L. T. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

WANG, H; GAO, XD; ZHOU, GC; CAI, L; YAO, WB. In vitro and in vivo antioxidant activity of *Choerospondias axillaris* aqueous extract from fruit. **Food Chemistry**, v. 106, p.888-895, 2008.

WANG, J; ZHANG, Q, ZHANG, Z; LI, Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 127-132, 2008.

WANG, SY; LIN, HS. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p.140-146, 2000.

WEINBERG, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, p. 323-330, 1995.

ZOU, Y; LU, Y; WEI, D. Antioxidant Activity of a Flavonoid-Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5032-5039, 2004.