

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LIZIANE CRISTINE MALAQUIAS DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA  
EXTRAÍDA DA BERINJELA (*Solanum melongena*) EM MODELO *IN VIVO* DE  
CARCINOMA

CURITIBA

2019

LIZIANE CRISTINE MALAQUIAS DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS  
DA BERINJELA (*Solanum melongena*) EM MODELO *IN VIVO* DE CARCINOMA

Monografia apresentada como requisito parcial à  
obtenção do título de Bacharel, do Curso de  
Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Acco

CURITIBA

2019

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todas as oportunidades que me foram dadas e todas as pessoas maravilhosas que pude conhecer; todas as experiências desses anos de faculdade me impactaram profundamente e ajudaram a moldar a pessoa que sou hoje.

Agradeço a toda minha família pelo apoio que me foi dado desde sempre. Agradeço especialmente aos meus pais, Levi e Lucimar, e meu irmão Rodrigo pelos inúmeros sacrifícios que foram necessários para que esse momento fosse possível; sou extremamente grata a todo apoio que sempre recebi de vocês, e considero um privilégio poder compartilhar minha vida com essa família.

Às amigas mais antigas – Manoela, Leticia, Giovanna e Sarah – sou grata pela cumplicidade e pelos incontáveis momentos marcantes nesses dez anos de amizade; palavras não descrevem a importância de vocês na minha vida. Aos amigos de faculdade – Mariane, Alana, Gabriela, Nicole, Joyce, Leonardo – agradeço por serem uma luz durante os momentos difíceis de faculdade; especialmente Lorena e Lucas, obrigada por me aguentarem desde as primeiras semanas de curso, e espero que essa amizade só cresça. A todos, peço desculpa pela minha ausência em alguns momentos, mas ela não diminuiu meu sentimento por vocês.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná, e principalmente ao Laboratório de Farmacologia e Metabolismo, minha eterna gratidão pelos três anos em que pude aprender praticamente tudo o que sei sobre pesquisa. As parceiras do laboratório – Claudinha, Débora, Carol, MaFer, Gabi – e a outras que já terminaram sua jornada aqui – Claudia, Eliana, Natalia, Rafaela – sou grata por todos os ensinamentos, finalizações em grupo, reuniões e momentos descontraídos; vou levar um pouco de todas junto comigo. Agradeço à professora Karina Bettega (Departamento de Farmácia da UFPR), que nos cedeu às células sem as quais esse trabalho não teria sido possível.

A professora Alexandra Acco, meu eterno obrigada por em 2016 achar que era uma boa ideia acolher aquela estudante do terceiro período em seu laboratório, e me manter aqui até o final da graduação. Obrigada pela confiança, apoio e por me ensinar tudo o que sei sobre o que é ser um pesquisador no Brasil.

Foram cinco anos difíceis, mas que moldaram meu caráter e personalidade. Novamente agradeço a todos; essa conquista é de todos nós!

*“Our deepest fear is not that we are inadequate.*

*Our deepest fear is that we are powerful beyond measure.*

***It is our light, not our darkness that most frightens us.***

*We ask ourselves: ‘Who am I to be brilliant, gorgeous, talented, fabulous?’*

*Actually, who are you not to be?*

*[...]*

*As we let our own light shine*

*We unconsciously give other people permission to do the same.*

*As we are liberated from our own fear*

*Our presence automatically liberates others.”*

*- Marianne Williamson*

## RESUMO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que afetam diferentes tipos celulares, mas que possuem algo em comum: o crescimento celular incontrolável e desorganizado. Uma das principais formas de tratamento do câncer é a quimioterapia, a utilização de fármacos para destruir as células cancerosas. As drogas utilizadas na quimioterapia apresentam baixo índice terapêutico e alta citotoxicidade, exercendo seus efeitos tanto sobre as células mutadas quanto sobre as células normais, levando a inúmeros efeitos colaterais. Levando em conta esses aspectos, se faz necessária a pesquisa de compostos com atividade antitumoral e que apresentem maior seletividade e menor citotoxicidade, e nesse aspecto produtos naturais ganham muita notoriedade. Os polissacarídeos são polímeros de monossacarídeos, e diversas atividades biológicas de polissacarídeos extraídos de diferentes fontes são documentadas; porém, não existe nenhum estudo referente à atividade biológica dos polissacarídeos extraídos da berinjela. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral dos polissacarídeos extraídos da berinjela no modelo de carcinoma sólido de Ehrlich em camundongos. Após a inoculação s.c. de  $2 \times 10^6$  células tumorais de Ehrlich no membro pélvico, os animais receberam 100 ou 200 mg/kg dos polissacarídeos da berinjela ou do veículo (via oral diariamente), metotrexato 2,5 mg/kg (via i.p a cada três dias) ou uma associação da dose de 100 mg/kg dos polissacarídeos da berinjela e 1,5 mg/kg de metotrexato ao longo de 21 dias de experimento. Após este período os animais foram anestesiados e eutanasiados, e foi realizada a coleta de materiais biológicos: sangue, tumor e órgãos (fígado, baço, pulmões e rins). Os polissacarídeos extraídos da berinjela foram capazes de inibir o crescimento tumoral em todas as doses, principalmente na dose de 100 mg/kg (redução de 51% quando comparados ao grupo veículo). Apesar de apresentar atividade antitumoral significativa, a dose de 200 mg/kg causou a diminuição do peso corporal e da gordura abdominal dos animais do grupo quando comparados ao grupo veículo e naive, efeito indesejado no tratamento de neoplasias. Foram realizadas análises dos parâmetros de estresse oxidativo e processo inflamatório no tecido tumoral, para avaliar se a ação do composto se daria por alterações nesses parâmetros. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nos grupos tratados com os polissacarídeos quando comparados com o grupo veículo. *In vitro*, no teste do DPPH, os polissacarídeos apresentaram atividade antioxidante apenas em concentrações muito altas, que não seriam viáveis ao serem transpostas para experimentos *in vivo*. Análises dos parâmetros de bioquímica plasmática e hemograma também apresentaram algumas alterações entre os grupos, porém permanecendo dentro dos limites para a espécie estudada. Esses resultados demonstram que os polissacarídeos da berinjela possuem um efeito antitumoral significativo; porém, não ocorre por alterações no sistema antioxidante e processo inflamatório. São necessários mais estudos para elucidar o mecanismo de ação desses polissacarídeos.

Palavras-chave: câncer; polissacarídeos da berinjela; atividade antitumoral; tumor sólido de Ehrlich; estresse oxidativo; parâmetros inflamatórios.

## ABSTRACT

Cancer is the name given to a set of more than 100 diseases that affect several cell types, but all of them have something in common: the incontrollable and unorganized cell growth. One of the main forms of cancer treatment is chemotherapy, which is the use of cytotoxic drugs to destroy cancer cells. The drugs used in chemotherapy present low therapeutic index and high toxicity, exerting its effects in mutated cells and normal cells, leading to numerous side effects. Taking these aspects in account is necessary the search of compounds with antitumor activity that possess greater selectivity, and in these aspects natural products have notoriety. Polysaccharides are monosaccharides polymers, and several biological activities of polysaccharides extracted from different sources are documented; however, there are no studies about the biological activities of the polysaccharides extracted from eggplant. The aim of this project was to evaluate the antitumor activity of the polysaccharides extracted form eggplant in the Ehrlich solid carcinoma model in mice. After the s.c. inoculation of  $2 \times 10^6$  Ehrlich tumor cells in the pelvic limb, the animals received 100 or 200 mg/kg of the eggplant polysaccharides or vehicle (orally, daily), methotrexate 2.5 mg/kg (i.p. twice a week) or an association of 100 mg/kg eggplant polysaccharides and 1.5 mg/kg methotrexate throughout 21 days of experiment. After this period, the animals were anesthetized and euthanized, and the biological material were collected: blood, tumor and organs (liver, spleen, lungs and kidneys). The eggplant polysaccharides were capable of inhibits the tumor growth in both doses, especially at 100 mg/kg (51% reduction when compared to the vehicle group). Although the 200 mg/kg dosage presented a significant antitumor activity, it causes a decrease of body weight and abdominal fat when compared to the naïve and vehicle groups, an unwanted effect in the cancer treatment. Oxidative stress and inflammatory parameters were measured in tumor tissue to evaluate if the compound acts by these processes. No significant differences were observed between the groups treated with the polysaccharides and the vehicle. *In vitro*, in the DPPH test, the polysaccharides didn't show antioxidant activity. Analysis of plasma biochemistry and hematological parameters present alterations between groups, but none of them were out of the species regular standards. These results show that the eggplant polysaccharides possess a significant antitumor activity; however, it does not occur through alterations of the antioxidant system and inflammatory process. More studies are necessary to clarify the action mechanism of these polysaccharides.

Key words: cancer; eggplant polysaccharides; antitumor activity; Ehrlich solid carcinoma; oxidative stress; inflammatory parameters.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Distribuição dos tipos de câncer mais comuns do Brasil em 2018.....	11
FIGURA 2 – Estágios da carcinogênese.....	13
FIGURA 3 - Principais mecanismos de danos celulares e defesas do organismo.....	16
FIGURA 4 – Desenho esquemático da Câmara de Neubauer.....	21
FIGURA 5 – Delineamento dos experimentos <i>in vivo</i> .....	23
FIGURA 6 – Volume do tumor de Ehrlich.....	29
FIGURA 7 – Diferença dos pesos corporais e peso relativo da gordura abdominal.....	30
FIGURA 8 – Concentração de proteínas nos tecidos.....	31
FIGURA 9 – Níveis de GSH nos tecidos.....	31
FIGURA 10 – Taxa de peroxidação lipídica nos tecidos.....	32
FIGURA 11 – Atividade da enzima superóxido dismutase nos tecidos.....	33
FIGURA 12 – Atividade da enzima catalase nos tecidos.....	33
FIGURA 13 – Potencial antioxidante dos polissacarídeos <i>in vitro</i> .....	34
FIGURA 14 – Mensuração dos parâmetros inflamatórios no tecido tumoral.....	35
FIGURA 15 – Peso relativo dos órgãos.....	35

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Parâmetros hematológicos e de bioquímica plasmática.....	36
---	----



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA .....	10
1.2 OBJETIVOS .....	10
1.2.1 Objetivo Geral .....	10
1.2.2 Objetivos Específicos .....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
2.1 CANCER.....	11
2.1.1 Histórico.....	12
2.1.2 Carcinogênese.....	12
2.1.3 Tratamentos.....	14
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO .....	15
2.3 POLISSACARÍDEOS .....	17
2.4 TUMOR DE EHRLICH.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
3.1 POLISSACARÍDEOS PARA TRATAMENTO DO TUMOR .....	19
3.1.1 Extração com clorofórmio – metanol .....	19
3.1.2 Extração aquosa.....	19
3.1.3 Purificação dos polissacarídeos.....	19
3.2 ANIMAIS .....	20
3.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS TUMORAIS .....	20
3.4 REPIQUE DAS CÉLULAS TUMORAIS E INOCULAÇÃO.....	21
3.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	22
3.6 ANÁLISES DE BIOQUÍMICA PLASMÁTICA E HEMOGRAMA.....	24
3.7 ANÁLISES DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
3.7.1 Determinação dos níveis de glutatona reduzida (GSH).....	24
3.7.2 Determinação da atividade da enzima superóxido desmutase (SOD) .....	25
3.7.3 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (LPO).....	25
3.7.4 Determinação da concentração de proteínas.....	25
3.7.5 Determinação da atividade da enzima catalase (CAT) .....	26
3.7.6 Avaliação do potencial antioxidante <i>in vitro</i> .....	26
3.8 ANÁLISES DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS .....	26
3.8.1 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	27
3.8.2 Determinação da atividade da enzima N-acetil-glucosaminidase (NAG) .....	27
3.8.3 Determinação dos níveis de nitrito.....	27

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Caracterização dos polissacarídeos.....	28
4.2 Volume tumoral.....	28
4.3 Peso corporal e porcentagem de gordura abdominal.....	29
4.3 Análises dos parâmetros de estresse oxidativo.....	30
4.3.1 Concentração de proteínas.....	30
4.3.2 Níveis de glutathiona (GSH).....	31
4.3.3 Taxa de peroxidação lipídica.....	32
4.3.4 Atividade da enzima Superóxido dismutase.....	32
4.3.5 Atividade da enzima catalase.....	33
4.3.6 Potencial antioxidante dos polissacarídeos.....	34
4.4 Parâmetros do processo inflamatório no tecido tumoral.....	34
4.5 Peso relativo dos órgãos.....	35
4.6 Análise dos parâmetros de bioquímica plasmática.....	36
5 DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÃO.....	41
7. REFERÊNCIAS.....	42

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA

Câncer é o nome dado a um extenso conjunto de doenças que acometem os mais diversos tipos celulares do organismo, mas que possuem uma característica em comum: o crescimento não controlado e muitas vezes agressivo das células acometidas. O câncer é uma doença multifatorial, decorrente de diversos tipos de injúrias ao organismo, visto que tanto fatores hereditários (como a predisposição genética) quanto fatores comportamentais (como o estilo de vida, levando em conta hábitos alimentares, exercícios, entre outros) estão envolvidos, e o acúmulo de desbalanços nessas condições pode levar ao aparecimento dessa doença (INCA, 2018).

Um dos tratamentos mais utilizados para o câncer é a quimioterapia, o emprego de fármacos para eliminar as células neoplásicas. Estes medicamentos apresentam baixo índice terapêutico e efeitos citotóxicos, levando a diversos efeitos colaterais que prejudicam a qualidade de vida do paciente. Devido aos prejuízos que essa terapia traz aos usuários, existe grande interesse na busca de novos fármacos que causem menos danos ao organismo. Estudos publicados demonstram a atividade antitumoral de frações de polissacarídeos extraídos de diversas fontes (KHOTARI, 2018; ZHU, 2018; XU, 2015), porém não existem estudos que demonstram a eficácia antitumoral dos polissacarídeos extraídos da berinjela, um fruto consumido em todo o mundo.

A hipótese deste trabalho é que os polissacarídeos extraídos da berinjela têm atividade antitumoral, sem induzirem efeitos adversos. Para testar esta hipótese, criada a partir de um estudo piloto com uma única dose, um estudo não-clínico foi realizado, utilizando o tumor de Ehrlich em camundongos como ferramenta de investigação.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse projeto foi investigar a atividade antitumoral dos polissacarídeos extraídos da berinjela em modelo de carcinoma sólido de Ehrlich em camundongos.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento tumoral em camundongos tratados e não tratados com os polissacarídeos da berinjela;
- Avaliar o estresse oxidativo e suas implicações no desenvolvimento tumoral e no metabolismo hepático diante dos tratamentos;
- Avaliar parâmetros hematológicos e bioquímicos e peso de órgãos como indicativos de toxicidade do tratamento com os polissacarídeos;
- Avaliar a influência do tratamento com os polissacarídeos em parâmetros inflamatórios no tecido tumoral.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CANCER

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável por 9,6 milhões de mortes no planeta em 2018. Cerca de 70% das mortes por neoplasias ocorrem em países de baixa e média renda, onde o diagnóstico é tardio e o tratamento de qualidade muitas vezes é inacessível. No Brasil estima-se que no ano de 2018 o número de casos novos de câncer (Figura 1) chegou a mais de 580 mil casos em homens e mulheres (INCA, 2018). Segundo dados da OMS (2018), em 2017, menos de 30% dos países de baixa renda possuíam laboratórios de patologia disponíveis para o setor público, enquanto mais de 90% dos países de alta renda possuíam tais serviços disponíveis (OPAS, 2018), que são fundamentais para os diagnósticos de câncer.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1 - Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais comuns no Brasil em 2018. Fonte: INCA (2018)

### 2.1.1 Histórico

O câncer é uma doença conhecida há milênios; relatam-se casos desde civilizações anteriores a Cristo, em populações como a egípcia e a persa. As definições mais antigas dessa enfermidade foram dadas por Hipócrates, na Grécia por volta do século IV (A.C.), descrevendo a presença de tecidos duros, que muitas vezes reapareciam depois de eliminados e que eram capazes de espalhar-se pelo corpo, levando à morte dos pacientes. Nessa época, acreditava-se na teoria humoral, segundo a qual a saúde era definida pelo equilíbrio dos quatro fluidos corporais (humores): sangue, fleuma, bile amarela e bile negra, e o câncer era derivado do desequilíbrio entre esses líquidos (TEIXIERA, 2007).

No século XV, com a descoberta do sistema linfático, o câncer passou a ser relacionado com o desequilíbrio específico da linfa no organismo; as sangrias eram tidas como o tratamento mais adequado. Apenas no século XVIII, com os avanços dos estudos de anatomia patológica e biologia celular, o câncer passou a ser visto como uma doença local (TEIXIERA, 2007). Atualmente, o câncer é tido como um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que podem invadir tecidos e órgãos e espalhar-se para diferentes regiões do organismo (INCA, 2018).

A proliferação celular é um processo necessário para o organismo; as células normais do organismo têm a capacidade de se multiplicar de maneira contínua e natural, de acordo com estímulos fisiológicos ou patológicos que incidam sobre elas, tendo esse crescimento controlado pelo ciclo celular. No entanto, as células cancerosas não tem seu crescimento controlado por este ciclo, e continuam se dividindo de maneira descontrolada, levando à formação de outras células anormais. Esse crescimento não depende de estímulos fisiológicos ou patológicos, ou então persiste mesmo depois da finalização dos estímulos (INCA, 2018).

### 2.1.2 Carcinogênese

A carcinogênese é um processo que, em geral, ocorre lentamente, podendo levar até vários anos para que um tumor se torne detectável. Carcinógenos são fatores responsáveis pelo desenvolvimento de cânceres, e podem ser classificados como endógenos e exógenos. Os fatores comportamentais são relacionados ao estilo de vida, como socioeconômicos, alimentação, radiação ionizante e não-ionizante, xenobióticos, diversos vírus (Epstein-Barr, papiloma humano, hepatite), consumo de etanol e cigarro,

entre outros (TANAKA, 2013). A carcinogênese ocorre quando as células são expostas a esses agentes por períodos de tempo e frequência determinados. Os agentes carcinógenos possuem a capacidade de alterar a estrutura do DNA das células sob quais eles incidem; também podem induzir a erros na duplicação do material genético durante a divisão celular. Existem mecanismos de reparo celular para corrigir esses erros, porém alguns erros escapam dos sistemas de reparação e se tornam pequenas mutações no DNA, que se acumulam e são passadas para as células filhas durante a divisão (INCA, 2018). As mutações que contribuem para o aparecimento do câncer atuam principalmente em alguns genes específicos: proto-oncogenes, que codificam proteínas que regulam a diferenciação e proliferação celular (e quando mutados são chamados de oncogenes, e são responsáveis pela malignização das células), genes supressores de tumor, que regulam a divisão celular, e genes de reparo, que identificam e corrigem erros no DNA (NCI, 2017).

A carcinogênese é composta de três estágios (Figura 2): iniciação, promoção e progressão. No estágio de iniciação, os genes sofrem a ação de agentes carcinógenos e escampam dos mecanismos de reparo a cada ciclo da divisão celular. A promoção tumoral é caracterizada pelos estímulos mitóticos incidentes sobre as células iniciadas, aumentando o número de divisões celulares e/ou diminuindo a apoptose celular. A progressão tumoral é irreversível, pois as células apresentam instabilidade genética, aumento da produção de fatores de crescimento, alteração no metabolismo e morfologia celulares, angiogênese, além da capacidade de invasão tecidual e metástase (TANAKA, 2013).

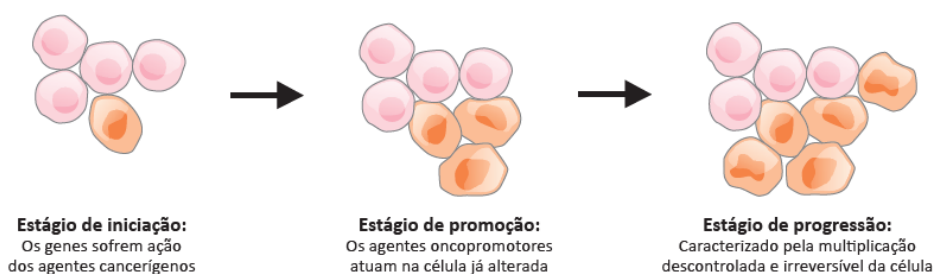


Figura 2 - Estágios da carcinogênese. Fonte: INCA (2017)

### 2.1.3 Tratamentos

A seleção do tratamento depende do tipo de câncer, estágio, progressão e localização. Cirurgia, quimioterapia e radioterapia são alguns dos tratamentos tradicionais mais utilizados mundialmente. Algumas das modalidades mais modernas são a hormonioterapia, imunoterapia, utilizações de células tronco, entre outras. A cirurgia é um dos tratamentos de escolha de tumores malignos e benignos, pois leva a menos dano aos tecidos adjacentes quando comparados a outras modalidades; a radioterapia tem como princípio a ionização de células, o que pode matar as células diretamente ou alterá-las geneticamente, levando-as à apoptose (ABBAS, 2018).

A quimioterapia utiliza-se de diferentes classes de fármacos que atuam por mecanismos de ação distintos, porém todos tem o objetivo em comum de frear a progressão tumoral, acabando com sua capacidade de divisão celular e levando à morte celular (ABBAS, 2018). Algumas classes de quimioterápicos são antimetabólitos, antimicrotúbulos, agentes alquilantes, inibidores de topoisomerase, entre outras; uma das classes de medicamentos utilizados na quimioterapia é a dos antimetabólitos, substâncias que possuem a estrutura química semelhante a de um metabólito fundamental para a síntese de DNA. O metotrexato (MTX) é um antimetabólito muito utilizado, que atua como análogo do ácido fólico, necessário para a formação de tetrahidrofolato, componente da síntese das purinas e pirimidinas, e assim impede a divisão celular e a multiplicação das células tumorais (ACS, 2017). No presente trabalho o MTX foi utilizado como controle positivo.

O lado negativo das drogas quimioterápicas consiste no fato de que são pouco seletivas e altamente citotóxicas, exercendo seus efeitos tanto sobre as células neoplásicas quanto sobre as células normais, levando aos diversos efeitos colaterais decorrentes da morte de células saudáveis, e conhecidos nessas terapias, como cefaleia, fraqueza, fadiga, vômito, náusea, perda de cabelo, diarreia, mucosite, neuropatia, boca seca, entre outros (ASLAM, 2014). Aproximadamente 60% dos ensaios clínicos de alta qualidade ao redor do mundo estão concentrados na área de pesquisa do câncer, pois se buscam fármacos que sejam mais seletivos e menos citotóxicos, exercendo seus efeitos apenas nas células mutadas, diminuindo os efeitos colaterais e aumentando a qualidade de vida dos pacientes (ABBAS, 2018).

## 2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

A respiração aeróbica é o processo de obtenção de energia pelo organismo, e como resultado desse processo são gerados diversos compostos secundários. Estes compostos são necessários para certos eventos celulares como transdução de sinal, ativação enzimática, expressão gênica e controle de atividade de caspase durante a apoptose. Menos de 5% dos compostos gerados na respiração aeróbica podem ser tóxico para a célula se suas concentrações aumentarem, podendo levar a um quadro conhecido como estresse oxidativo (SOSA, 2012).

O estresse oxidativo pode ser descrito como o desbalanço entre a ação tóxica de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e a capacidade do sistema antioxidante de detoxificar os produtos reativos ou de reparar os danos causados por essas espécies (GULBAS, 2013). As espécies reativas são fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons não pareados, o que geralmente os faz altamente reativos, podendo levar a danos a macromoléculas, resultando em instabilidade cromossomal, mutações e modulação do crescimento celular (POPRAC, 2017). A principal fonte de estresse oxidativo no organismo são as mitocôndrias, onde se localizam as enzimas da cadeia respiratória; fontes externas incluem radiação UV e compostos químicos – como poluentes, cigarro e álcool (SOSA, 2012).

O sistema antioxidante é composto de moléculas e enzimas antioxidantes, mencionadas na Figura 3. As moléculas incluem substâncias endógenas (glutathiona) e obtidas pela alimentação (vitaminas C e E), e os antioxidantes enzimáticos principais incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona-S-transferase (GST), entre outras (MATSCHE, 2018). A glutathiona reduzida (GSH) é a molécula antioxidante mais importante do organismo. Ela pode atuar diretamente em reações não-enzimáticas com radicais oxidantes, ou como doador de elétrons na redução de NADPH em NADP, catalisada pela enzima glutathiona redutase. A enzima superóxido dismutase (SOD), catalisa a reação de dismutação do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em oxigênio e peróxido de hidrogênio, para sua posterior eliminação do organismo. A peroxidação lipídica ocorre nos ácidos graxos poli-insaturados, que estão presentes em altas concentrações nas membranas celulares. O ataque de radica livre a esses lipídeos causa danos na membrana, podendo levar à destruição das células e dar origem a compostos com propriedades citotóxicas e mutagênicas (MATSCHE, 2018).



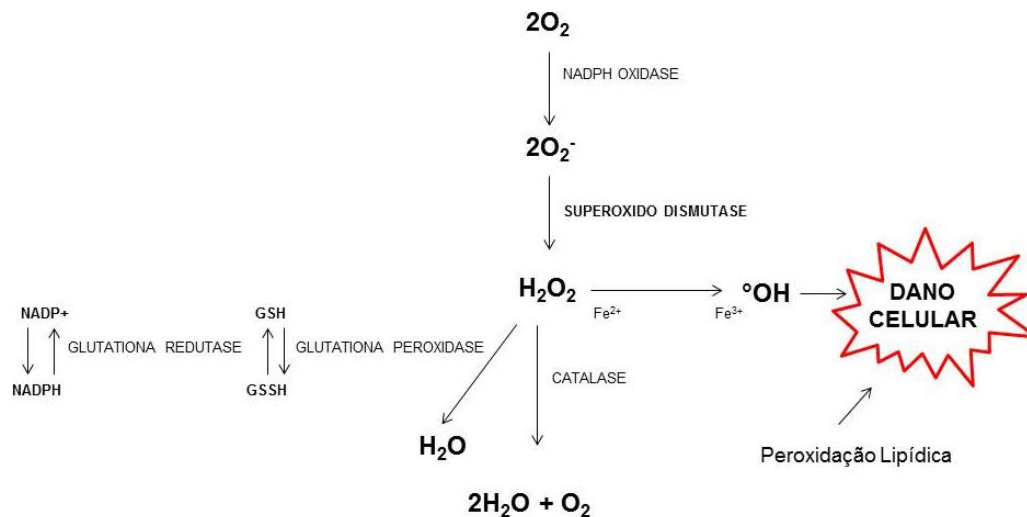


Figura 3 - Principais mecanismos de dano celular via estresse oxidativo e principais defesas antioxidantes do organismo. FONTE: o autor (2019). Legenda: GSH, glutatona reduzida; GSSH, glutatona oxidada; NADP, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrogênio;  $O_2^{\cdot -}$  ânion superóxido;  $\cdot OH$ , radical hidroxila;  $Fe^{2+}$  composto ferroso;  $Fe^{3+}$  composto férrico.

O estresse oxidativo pode levar a mudanças irreversíveis no material genético, caracterizando um dos primeiros passos de eventos como a mutagênese, carcinogênese e envelhecimento. É descrita na literatura uma relação entre o aumento das espécies reativas intracelulares e a patogênese do câncer: estresse oxidativo está envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo danos no DNA que podem iniciar a carcinogênese (GULBAS, 2013). Células cancerosas são capazes de se adaptar no início do desbalanço, aumentando a produção das defesas antioxidantes do tecido tumoral, tornando o tecido protegido de futuros indutores de estresse oxidativo, como radio e quimioterapia (POPRAC, 2017).

Os radicais livres podem estar envolvidas na iniciação e progressão tumoral, e novas abordagens terapêutico-preventivas são o uso de antioxidantes para impedir vias de sinalização de sobrevivência tumoral induzidas por ROS (GULBAS, 2013). Assim, buscam-se substâncias que tenham efeito antioxidante e tenham como características: reatividade perante radicais oxidantes, disponibilidade e cuja ação resulte em um produto menos danoso (MATSCHE, 2018). Para tanto, podem ser utilizados compostos capazes de interagir com espécies reativas de oxigênio, minimizando sua ação no organismo, reparando moléculas danificadas ou substituindo as moléculas alvo nas reações (POPRAC, 2017). Por outro lado, quando o tumor está instalado, substâncias que possam aumentar o estresse oxidativo de células tumorais, levando-as à morte, são desejadas.

Vários compostos naturais têm atividade antioxidante, como extratos e compostos isolados de plantas, e alguns polissacarídeos, como os extraídos do jambo (dados não publicados do nosso laboratório). Uma substância ideal para atuar neste contexto deveria induzir estresse no tecido tumoral, mas ter efeito antioxidante nos tecidos saudáveis. O presente trabalho avaliou tais efeitos dos polissacarídeos extraídos da berinjela no modelo tumoral de Ehrlich.

### 2.3 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são carboidratos formados pela polimerização de mais de dez monossacarídeos (como glicose, frutose e manose) através de ligações glicosídicas; alguns dos polissacarídeos mais conhecidos são o amido, a celulose e quitina. São compostos encontrados naturalmente na dieta, pois são abundantes em plantas, algas e animais. Nos animais, são muito bem distribuídos e encontrados em quase todos os tecidos e órgãos (MACIEL, 2019).

Os polissacarídeos possuem um amplo espectro de efeitos biológicos, como antitumoral, anticoagulante e modulador do sistema imune. Muitos polissacarídeos são reconhecidamente não tóxicos e seguros para atuarem como adjuvantes no tratamento de câncer (LIU, 2019). A atividade antitumoral de alguns polissacarídeos já é documentada: Kothari e colaboradores (2018) demonstraram a atividade antitumoral de polissacarídeos extraídos de cogumelos em células de carcinoma de pulmão; Zhu e colaboradores (2018) relataram a atividade antitumoral dos polissacarídeos da *Laminaria japonica*, uma alga japonesa, em camundongos com tumor hepático de células hepatoma-22. Xu e colaboradores (2015) mostraram que os polissacarídeos extraídos de brócolis possuem atividade antitumoral diante de células cancerosas das linhagens HepG2 (câncer hepático) e MDA-MB-231 (tumor de mama triplo negativo). Nosso grupo de pesquisa, no Laboratório de Farmacologia e Metabolismo da Universidade Federal do Paraná, possui publicações da atividade antitumoral de polissacarídeos *in vivo* e *in vitro*: Adami e colaboradores (2018) e Tamiello e colaboradores (2018) demonstraram, respectivamente, a atividade antitumoral dos polissacarídeos extraídos do pimentão verde e do jambo no modelo de carcinoma de Ehrlich; enquanto Stipp e colaboradores (2017) mostraram que a fração solúvel de polissacarídeos do vinho tinto inibiu o crescimento do tumor Walker-256 em ratos. Mesmo que inúmeros estudos demonstrem a atividade antitumoral de diferentes polissacarídeos em diversos modelos *in vitro* e *in vivo*, existem raros ensaios clínicos

humanos finalizados utilizando polissacarídeos, devido ao amplo espectro de interações com estruturas celulares que os polissacarídeos exercem (LIU, 2019).

A berinjela, fruto da planta *Solanum melongena*, possui documentada a utilização de seus extratos na terapêutica para o tratamento de queimaduras, doenças inflamatórias (gastrite, estomatite e artrite), e seus metabólitos secundários demonstram atividade antioxidante, anti-inflamatória, cardioprotetora e hipoglicemiante (GÜRBUZ, 2018). Apesar de diferentes extratos da berinjela terem atividades biológicas demonstradas, não existem estudos que demonstrem a atividade de seus polissacarídeos, especialmente a atividade antitumoral, razão pela qual este foi o objeto de estudo do presente trabalho. Para tanto, o tumor murino de Ehrlich foi utilizado como modelo.

## 2.4 TUMOR DE EHRLICH

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia observada pela primeira vez em 1886 por Paul Ehrlich, como um tumor de tecido mamário em camundongos fêmeas. Em 1905, Paul Ehrlich e Hugo Apolant utilizaram essas células de maneira experimental, transplantando os tecidos tumorais por via subcutânea de camundongo para camundongo (FRANJACOMO, 2016). Em 1932, Hans Loewenthal e Gertrud Jahn inocularam as células de Ehrlich na cavidade peritoneal de camundongos e obtiveram um líquido ascítico contendo um grande número de células tumorais, e esse líquido era facilmente transmissível para outros animais. Essa variante de tumor foi mais tarde batizada de tumor ascítico de Ehrlich (ALDUBAYAN, 2018).

Estudos demonstram que após a inoculação subcutânea no membro posterior de camundongos foi possível observar o desenvolvimento do tumor sólido nos animais em até 14 dias após a inoculação (BASSIONY, 2014), enquanto nos trabalhos desenvolvidos em nosso Laboratório (ADAMI, 2018; TAMIELLO, 2018) foi observado o desenvolvimento do tumor sólido no sétimo dia após a inoculação. Após a inoculação de células tumorais, ocorrem alterações orgânicas como diminuição da síntese proteica, diminuição da concentração de ATP intracelular, diminuição do número de mitocôndrias, aumento dos triglicerídeos, entre outras (OZASLAN, 2011).

O tumor de Ehrlich é utilizado e aceito mundialmente como modelo experimental de câncer devido a alguns fatores: fácil cultivo e transferência, altos níveis de malignidade e proliferação rápida, permitindo uma avaliação *in vivo* mais curta. O carcinoma de Ehrlich

se assemelha a tumores humanos devido a sua sensibilidade à quimioterapia (presente em alguns tipos de tumores de mama), por se tratar de tecido indiferenciado e devido a sua taxa de crescimento rápida (OZASLAN, 2011). Por estas razões este tumor foi escolhido como modelo de neoplasia para este estudo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 POLISSACARÍDEOS PARA TRATAMENTO DO TUMOR

Os polissacarídeos extraídos da berinjela foram preparados, analisados, caracterizados (dados não publicados) e fornecidos pela Profa. Dra. Lucimara Mach Côrtes Cordeiro, do Departamento de Bioquímica da UFPR. Os frutos orgânicos de berinjela (*Solanum melongena*) limpos, secos e moídos foram pesados e submetidos a três processos de extração, como descrito a seguir, e depois purificados:

##### 3.1.1 Extração com clorofórmio – metanol

Os frutos moídos foram deslipidificados seis vezes com clorofórmio-metanol (1:1, v/v), em aparelho extrator Soxhlet, a 60°C, 500 ml, por 8 horas. Os extratos foram reunidos e evaporados até a secura.

##### 3.1.2 Extração aquosa

O material deslipidificado foi submetido a quatro extrações aquosas seqüenciais. Cada extração foi realizada sob refluxo, à 100°C, 500 ml, por 4 horas. Os extratos foram reunidos, precipitados em excesso de etanol, centrifugados e liofilizados.

##### 3.1.3 Purificação dos polissacarídeos

As frações foram solubilizadas em água destilada e submetidas à digestão enzimática sob agitação para retirada do amido. Foi utilizada a enzima  $\alpha$ -amilase termoestável (SIGMA) dentro das condições recomendadas pelo fabricante. O acompanhamento da degradação do amido foi realizado pelo teste do lugol. Posteriormente, com a fração solúvel obtida da extração aquosa foi realizada a separação dos polissacarídeos por congelamento e degelo, segundo GORIN e IACOMINI (1984).

### 3.2 ANIMAIS

Para os experimentos, foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, pesando entre 25-30 g, cedidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todos os animais utilizados foram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ), iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e umidade, com livre acesso à água e ração. Os protocolos experimentais utilizados durante o projeto seguiram as normas internacionais de experimentação em animal, sendo aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (certificado 1063).

### 3.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS TUMORAIS

Antes que as células de Ehrlich fossem utilizadas para induzir o tumor sólido, foi necessária a verificação da sua viabilidade. Para isso, as células de Ehrlich, armazenadas em freezer  $-80^\circ\text{C}$ , foram descongeladas e passaram por um processo de contagem e verificação de viabilidade pelo método direto do azul de tripan.

O protocolo estabelecido no Laboratório de Farmacologia e Metabolismo da UFPR primeiramente utiliza uma diluição 1:10, contendo 100  $\mu\text{L}$  do líquido ascítico congelado e 900  $\mu\text{L}$  de PBS ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Dessa solução, são retirados 100  $\mu\text{L}$ , que misturados com 900  $\mu\text{L}$  de PBS dão origem à diluição 1:100. Para o preparo da solução corante são utilizados 10  $\mu\text{L}$  da diluição 1:100 e 10  $\mu\text{L}$  do corante azul de tripan 0,4%; em seguida 10  $\mu\text{L}$  da solução corante foram inseridos na câmara de Neubauer, que foi levada ao microscópio.

Na câmara de Neubauer (Figura 4) foi realizada a contagem das células viáveis e não-viáveis nos quatro quadrantes externos. O azul de tripan não é capaz de atravessar membranas celulares quando as mesmas estão intactas; assim sendo, não é capaz de corar as células viáveis, que ficam transparentes quando observadas. As células não-viáveis, devido a danos em sua membrana, são coradas em azul.

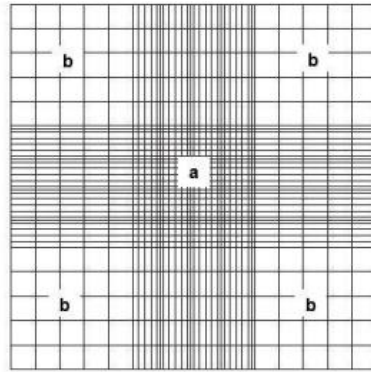


Figura 4 - Desenho esquemático da Câmara de Neubauer e seus quadrantes utilizados para a contagem celular (b). Fonte: LIMA (2017).

Para o ajuste do número de células, tem-se o cálculo:

$$N = \frac{\text{células}}{4 \times 10^4} * 100 * 2$$

Onde:

$10^4$  = Valor de correção da câmara de Neubauer

100 = Fator de diluição (1:100)

2 = azul de tripan (10  $\mu$ L da diluição 1:100 e 10  $\mu$ L de corante)

### 3.4 REPIQUE DAS CÉLULAS TUMORAIS E INOCULAÇÃO

Para aumentar a viabilidade e a malignidade, as células de Ehrlich passaram por um processo de “cultivo celular” *in vivo*, denominado repique. Nesse processo, camundongos foram inoculados com 0,2 mL de uma suspensão contendo  $2 \times 10^6$  células de Ehrlich (obtidas após procedimentos do item 3.3) no quadrante inferior da cavidade peritoneal. Esses animais foram mantidos por aproximadamente 10 dias, até desenvolverem um volume considerável de ascite no peritônio. Os animais foram anestesiados e eutanasiados, e foi realizada a coleta do líquido ascítico. O procedimento de avaliação da viabilidade descrito no item 3.3 e o repique das células tumorais foram realizados novamente, até que as células tumorais apresentassem alta contagem e viabilidade. Quando as células alcançaram viabilidade superior a 95%, 0,2 mL da

suspensão contendo  $2 \times 10^6$  de células foram inoculados no membro pélvico direito, via subcutânea, de cada animal para o desenvolvimento do tumor sólido.

### 3.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

De acordo com trabalhos do nosso grupo de pesquisa (CORSO et al., 2019; ADAMI et al., 2018), no modelo de tumor sólido de Ehrlich, o tumor se torna palpável a partir do 7º dia de tratamento, quando a massa já é perceptível. No dia seguinte após a inoculação (dia 1) foram iniciados os tratamentos, diariamente por 21 dias consecutivos, via oral, ou intraperitoneal a cada três dias. As doses foram definidas de acordo com estudos prévios do grupo de pesquisa e pela realização de um estudo piloto; os grupos experimentais, com  $n = 8$  camundongos, foram:

**Grupo I:** animais sem tumor e tratados com água destilada (grupo *NAIVE*)

**Grupo II:** animais com tumor e tratados com água destilada (grupo *VEÍCULO*)

**Grupo III:** animais com tumor e tratados com a dose I (100 mg/kg) de polissacarídeos extraídos da berinjela oral (grupo *POLI 100*)

**Grupo IV:** animais com tumor e tratados com a dose II (200 mg/kg) de polissacarídeos extraídos da berinjela (grupo *POLI 200*)

**Grupo V:** animais com tumor e tratados com a dose I (100 mg/kg) de polissacarídeos extraídos da berinjela, associados com 0,3 mL (1,5 mg/kg) de metotrexato (grupo *ASSOCIAÇÃO*)

**Grupo VI:** animais com tumor e tratados com a dose de 2,5 mg/kg de metotrexato intraperitoneal duas vezes por semana (grupo *CONTROLE POSITIVO*)

Em todos os dias do tratamento foi avaliado o peso corporal de cada animal, assim como o volume tumoral a partir de quando o tumor tornou-se palpável (Figura 5).

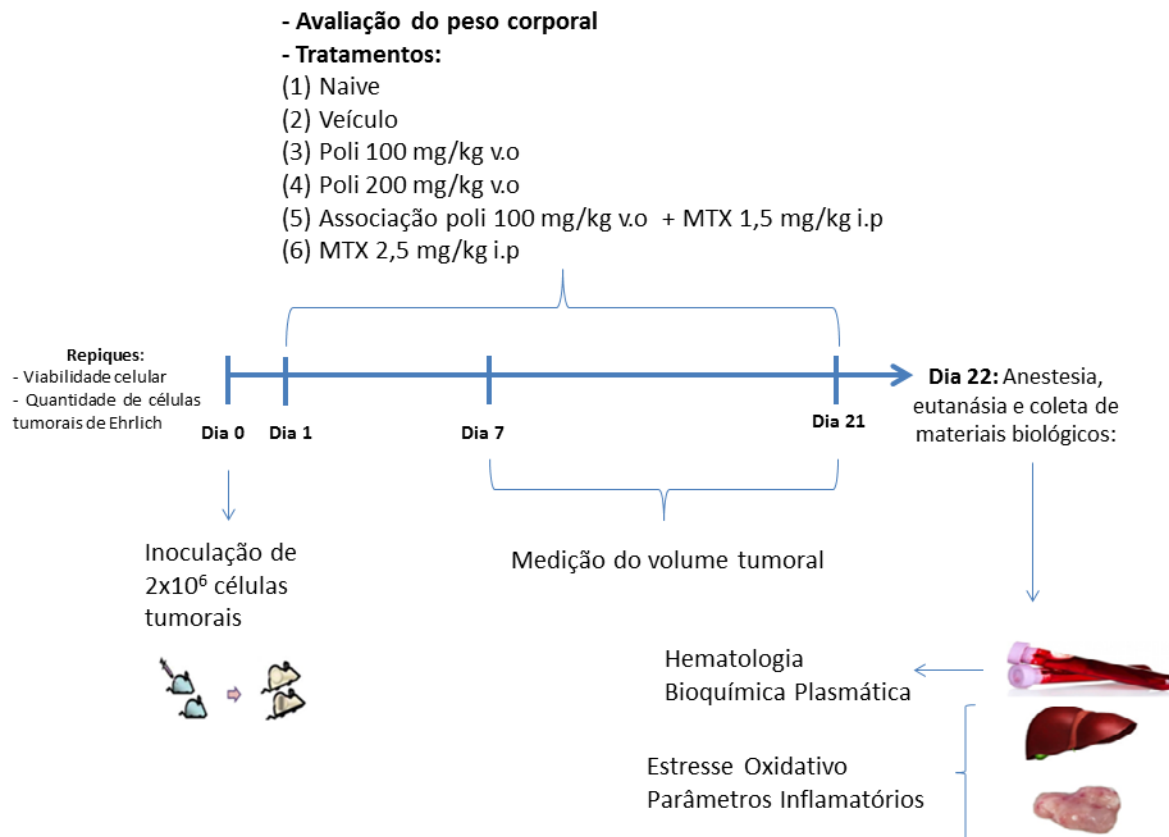


Figura 5 - Delineamento dos experimentos in vivo em camundongos inoculados com células de Ehrlich.  
Fonte: o autor (2019).

No 22º dia de experimento, os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal e foi realizada a coleta de materiais biológicos para análises: sangue da veia cava abdominal, órgãos (fígado, rins, pulmões e tecido adiposo intra-abdominal) e tumor; após a coleta sanguínea e dos órgãos, os animais foram eutanasiados. As amostras de tecido hepático (para determinação de parâmetros de estresse oxidativo) e tecido tumoral (para a avaliação do processo oxidativo) foram armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , para análises posteriores.

Para obter a medida do volume tumoral, um paquímetro digital foi utilizado. Para o cálculo, foram utilizados o menor e maior diâmetro, utilizando a seguinte fórmula (MISHRA, 2017):

$$\text{Vol (cm}^3\text{)} = L \times W^2 \times 0,52$$

Onde:

*L*: maior diâmetro tumoral (cm)

*W*: menor diâmetro tumoral (cm)



### 3.6 ANÁLISES DE BIOQUÍMICA PLASMÁTICA E HEMOGRAMA

Após a finalização dos tratamentos e anestesia dos animais, foi retirado aproximadamente 1,0 mL de sangue da veia cava abdominal; esse sangue foi armazenado no gelo e levado para o Hospital Veterinário da UFPR. Através do sistema automatizado para análises do plasma, foram mensurados alguns parâmetros de função hepática e metabólica do organismo, e também foram mensurados parâmetros hematológicos. Para a função hepática, foram mensurados os níveis das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), consideradas biomarcadores para o funcionamento desse órgão; para a função metabólica, foram mensurados: a quantidade de proteínas totais no plasma, albumina, globulina, e glicemia; e para avaliar a função renal, creatinina e ureia foram mensuradas.

### 3.7 ANÁLISES DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Para as análises dos parâmetros de estresse oxidativo, as amostras de tecido hepático e tumoral foram homogeneizadas em 2,7 mL de tampão fosfato de potássio. Para as análises da concentração de proteínas, atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), níveis de lipoperoxidação (LPO), as amostras foram centrifugadas a velocidade de 9700 x g durante 20 minutos a 4°C; 50 µL do sobrenadante foram misturados a 450 µL de tampão fosfato, e utilizados nos testes.

Para a determinação dos níveis de glutathiona (GSH), 100 µL do homogenato puro e 100 µL de Ácido Tricloroacético (ATC) 12,5%, foram centrifugados na velocidade de 6000 x g por 15 minutos a 4°C, dando origem à diluição utilizada nesse ensaio.

#### 3.7.1 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

Para a medida dos níveis de GSH presentes nas amostras de fígado e tumor, foi utilizado o método descrito por Sedlak & Lindsay (1968), que se baseia na interação entre a glutathiona e o 5,5-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB). Para a leitura dos resultados, 20 µl da diluição para GSH foram adicionados na placa de 96 poços; em seguida, foram adicionados 280 µl de Tris-HCl e 5 µl de DTNB em metanol. A absorbância foi medida a 415 nm em espectrofotômetro de microplaca, utilizando GSH como o padrão externo. Os resultados foram expressos em µg de GSH/ g de tecido.

### 3.7.2 Determinação da atividade da enzima superóxido desmutase (SOD)

A enzima SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, preparando a eliminação das espécies reativas do organismo, sendo a primeira linha de defesa do organismo contra os radicais livres (AZADMANESH, 2017). Foram adicionados 60 µL da diluição 1:10 em uma solução contendo tampão de 1327,5 µL de Tris-EDTA, e adicionadas a 100 µL de uma solução de pirogalol 15 mM. Após incubação por 20 min, a reação foi interrompida com 50 µL de solução de HCl a 1 M. Em seguida, 300 µL de cada amostra foram plaqueados, em triplicata, e a leitura foi realizada em espectrotômetro de microplaca a 440 nm. A atividade da enzima foi expressa em unidades de SOD por miligrama de proteína total (U SOD/ mg proteína).

### 3.7.3 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (LPO)

Para a determinação dos níveis de peroxidação lipídica nas amostras foi realizado o método de FOX descrito por Jiang (1991). Este método quantifica a formação de hidroperóxidos durante a peroxidação lipídica. Do sobrenadante, 100 µL foram adicionados a 100 µL de metanol PA, e centrifugados a velocidade de 8000 x g, por 5 minutos a 4°C. 100 µL desse sobrenadante foram adicionados a 900 µL do reativo de FOX-2, contendo: MeOH 90%, 100 µM xilenol laranja, 4 mM de BHT, 25 mM de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 250 µM de sulfato ferroso (Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e água destilada. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro; foram plaqueados 300 µL de cada amostra, em triplicata, e analisadas por espectrofotometria a 560 nm e os resultados foram expressos por concentração de hidroperóxidos (nmol.min<sup>-1</sup> mg. proteína<sup>-1</sup>).

### 3.7.4 Determinação da concentração de proteínas

As proteínas teciduais nas amostras de fígado e tumor foram quantificadas de acordo com o método descrito por Bradford (1976), utilizando a ligação entre as proteínas de alto peso molecular e o corante azul de Coomassie G-250. Em placa de 96 poços, foram pipetados 100 µL da diluição 1:10 de cada amostra, em triplicata, e posteriormente adicionados 250 µL de solução de Bradford (80% água destilada e 20% de Reagente de Bradford). As amostras foram lidas em 595 nm em espectrofotômetro de microplaca, utilizando albumina de soro bovino como padrão de análise. A concentração de proteína tecidual foi utilizada para determinação de outros parâmetros de estresse oxidativo.

### 3.7.5 Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

A enzima catalase atua na transformação do peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular, favorecendo a eliminação de radicais livres; sua atividade foi determinada no tecido tumoral conforme protocolo descrito por Aebi (1984) com modificações. Para tanto, 5 µL da diluição 1:10 foram plaqueados em duplicata em placa de 96 poços específica para catalase. A reação foi realizada utilizando 225 µL de solução de peróxido de hidrogênio 5 mM em tampão TRIS-EDTA (pH 7,0) e água destilada. A atividade da CAT foi monitorizada durante 5 leituras por 60 segundos a 240 nm em espectrofotômetro. A atividade da catalase é expressa em U de atividade / mg de proteína.

### 3.7.6 Avaliação do potencial antioxidante *in vitro*

Para avaliar a capacidade antioxidante dos polissacarídeos extraídos da berinjela, foi utilizado o método do DPPH (BLOIS, 1958). Para a realização do teste foram plaqueados 280 µl dos polissacarídeos nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 µg/mL; o controle negativo foi a água destilada, e o controle positivo utilizado foi o ácido ascórbico (50 µg/mL), substância com atividade antioxidante comprovada. A fim de testar a estabilidade da solução de polissacarídeos quanto à atividade antioxidante, os mesmos foram diluídos um dia antes do uso ou no momento do teste do DPPH. As amostras foram colocadas na presença do DPPH – molécula com elétrons desparelhados que é reduzida na presença de compostos antioxidantes, alterando a quantidade da molécula na reação. A absorbância foi lida em 517 nm.

## 3.8 ANÁLISES DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS

Para a determinação dos parâmetros inflamatórios, foram pesados 0,1 g de tecido tumoral; as amostras foram homogeneizadas com 1 mL de PBS (NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) e centrifugadas a 9000 x g, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado e utilizado para a determinação dos níveis de nitrito; o pellet foi ressuspensionado com 1 mL de salina triton e centrifugado a 11000 x g, por 20 minutos a 4°C. Posteriormente, esse sobrenadante foi utilizado para a avaliação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glucosaminidase (NAG).

### 3.8.1 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A MPO é uma enzima encontrada em neutrófilos, sendo comumente utilizada como marcador indireto da infiltração dessas células em tecidos (ARATANI, 2018). Para avaliar a atividade enzimática, foi utilizado o método descrito por Bradley (1982), que se baseia na capacidade da MPO em reduzir peróxido de hidrogênio em água, utilizando o reagente 3,5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), doador de hidrogênio. Foram adicionados 30 µl do sobrenadante, em duplicata, na microplaca de 96 poços; acrescidos de 200 µl de solução de peróxido (tampão fosfato de potássio 80 mM, tampão fosfato de potássio 220 mM, água destilada e peróxido de hidrogênio). A reação foi iniciada com 20 µl de TMB (18,4 mM em dimetilformamida aquosa 8%); a reação foi incubada por 3 min a 37°C e interrompida com a adição de 30 µl acetato de sódio. A atividade da enzima foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm.

### 3.8.2 Determinação da atividade da enzima N-acetil-glucosaminidase (NAG)

A NAG é uma enzima produzida principalmente por macrófagos e que é geralmente utilizada como parâmetro de detecção da ativação e acúmulo de macrófagos no tecido (COELHO, 2014). Para determinação da atividade da NAG, as amostras foram analisadas pelo método descrito por Bailey (1988). Foram plaqueados 100 µl do sobrenadante, em duplicata, em microplaca de 96 poços; posteriormente foram adicionados 100 µl de uma solução de 2,24 mM de N-acetilglucosamina (substrato) em tampão citrato (39 mM, pH 4,5). A reação foi incubada por 60 min a 37°C e interrompida com 100 µl de tampão glicina (200 mM, pH 10,4) em cada poço. A atividade foi determinada por espectrofotômetro a 405 nm.

### 3.8.3 Determinação dos níveis de nitrito

O óxido nítrico (NO) é um mediador de respostas inflamatórias, envolvido na regulação da proliferação de células T auxiliares e produção de citocinas (GUZIK, 2003). O óxido nítrico possui meia-vida muito curta, devido a sua rápida oxidação em nitrito e nitrato (FILHO, 2000), então foi empregada uma metodologia indireta de medição dos níveis de óxido nítrico, avaliando os níveis de nitrito no tumor (GREEN, 1982). Após passarem pelo processo descrito em 3.8, 100 µl de cada amostra foram plaqueados em duplicata, e foram adicionados 100 µl do reagente de Griess (N-1-naf-tilediamina,

sulfanilamida, ácido fosfórico e água destilada). A densidade óptica foi medida a 543 nm em espectrofotômetro.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como a média + erro padrão da média (E.P.M.) com 8 animais por grupo. Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para avaliação das diferenças entre as médias os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo *post test* de Bonferroni. As análises e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o software GraphPadPrism (GraphPad Software, San Diego, EUA, v. 5.0), sendo o valor de  $p < 0,05$  considerado significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterização dos polissacarídeos

Na presente pesquisa foram estudados os frutos orgânicos de berinjela. Os frutos foram picados, congelados, liofilizados e parcialmente triturados, resultando em 75,3 g de material (92,7% de umidade). Posteriormente foi realizada a remoção de compostos apolares com clorofórmo-metanol (1:1, v/v) em aparelho de Soxhlet, obtendo-se um rendimento de 12 g (16%) de compostos de baixa massa, pigmentos e lipídios. O material deslipidificado foi submetido a quatro extrações aquosas sequenciais, sob refluxo. Os polissacarídeos presentes nos extratos aquosos foram recuperados por precipitação com 3 volumes de etanol e centrifugação. A análise da composição monossacarídica da fração aquosa, por espectro de RMN-<sup>13</sup>C indicou a presença de arabinose, galactose, além de ácido urônico, como principais monossacarídeos.

### 4.2 Volume tumoral

A Figura 6 apresenta o efeito do tratamento com os polissacarídeos extraídos da berinjela no volume tumoral, e nota-se uma significativa inibição do crescimento tumoral nos grupos tratados com os polissacarídeos quando comparados ao grupo veículo. Na dose de 100 mg/kg, a mais efetiva, o volume se mostrou 52% menor que o grupo veículo,

e na dose de 200 mg/kg 43% menor, ambos apresentando diferença estatística com o grupo veículo a partir do 12º dia de tratamento.

O tratamento com metotrexato, droga amplamente utilizada em quimioterapia e aqui como controle positivo, induziu volumes tumorais 43% menores que o grupo veículo, apresentando diferenças estatísticas nos dias 18 e 20. O grupo associação apresentou efeito menos expressivo do que o dos tratamentos isolados, com tumores 20% menores que o grupo veículo, e apresentando diferenças estatísticas nos dias finais do experimento.

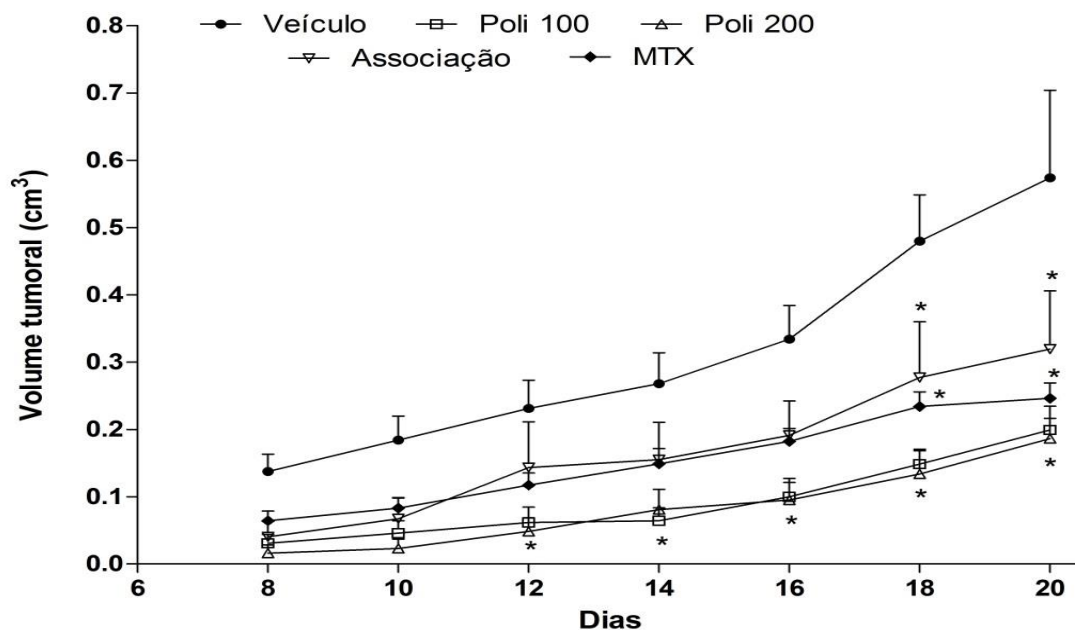


Figura 6 - Volume do Tumor de Ehrlich de camundongos tratados por 21 dias com metotrexato 2,5 mg/kg (i.p.), veículo, ou polissacarídeos da berinjela, nas doses de 100 mg/kg ou 200 mg/kg, ou associação de metotrexado 1,5 mg/kg (i.p.) e polissacarídeo na dose 100 mg/kg, por via oral. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e foram analisados por ANOVA de uma via seguida de post test de Bonferroni. \*  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Veículo.

#### 4.3 Peso corporal e porcentagem de gordura abdominal

A Figura 7.A apresenta resultados da diferença do peso corporal dos animais no último dia do experimento quando comparados ao primeiro dia. Apesar da dose de 200 mg/kg dos polissacarídeos apresentar efeito antitumoral significativo, os animais tratados com essa dose do extrato apresentaram diminuição do peso corporal - diferença entre o peso final descontado o peso tumoral (do 22º dia do experimento) e o peso inicial (do 1º dia do experimento) - quando comparados aos animais do grupo naïve e veículo; os

grupos tratados com o metotrexato (grupos MTX e Associação) também mostraram diminuição do peso corporal quando comparados ao grupo naive.

Na Figura 7.B observamos a porcentagem de gordura abdominal dos animais; os grupos Poli 200, Associação e MTX apresentaram menores porcentagens de gordura quando comparados ao grupo veículo; no grupo Poli 100, não houve diferença estatística.

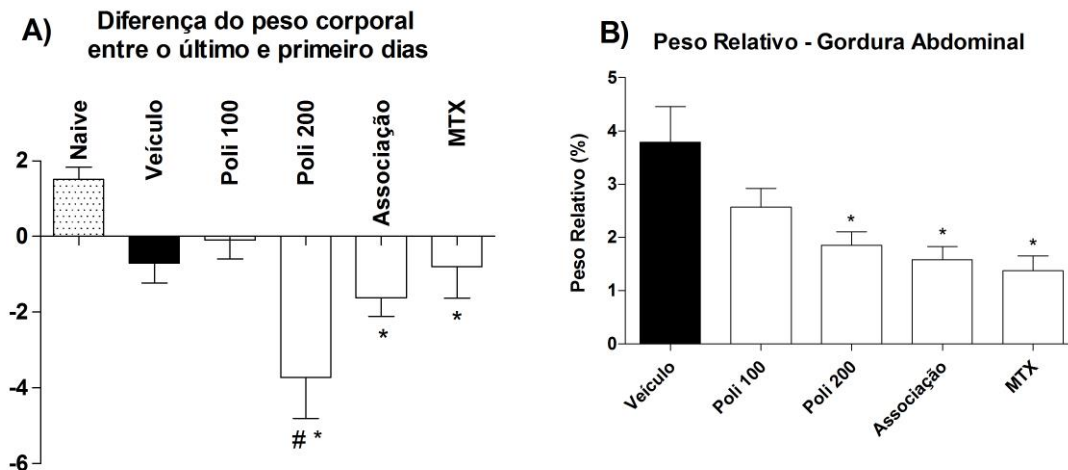


Figura 7 – (A) Diferença entre os pesos corporais dos animais entre o peso final (do 22º dia de tratamento) e o peso inicial (1º dia de tratamento). (B) Peso relativo da gordura abdominal de camundongos tratados por 21 dias com metotrexato 2,5 mg/kg (i.p.), veículo, ou polissacarídeos da berinjela, nas doses de 100 mg/kg ou 200 mg/kg, ou associação de metotrexado 1,5 mg/kg (i.p) e polissacarídeo na dose 100 mg/kg, por via oral. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e foram analisados por ANOVA de uma via seguida de post test de Bonferroni. \*  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Veículo. #  $p < 0,05$ , quando comparado as grupo Naive.

#### 4.3 Análises dos parâmetros de estresse oxidativo

##### 4.3.1 Concentração de proteínas

A Figura 8 apresenta a concentração de proteínas no tecido hepático (A) e tumoral (B). No tecido hepático, os grupos veículo, Poli 100, Poli 200 e MTX apresentaram diminuição da concentração de proteína no tecido quando comparados ao grupo naive; não houve diferenças em comparação ao grupo veículo. O tecido tumoral não apresentou diferença estatística entre os grupos neste parâmetro.

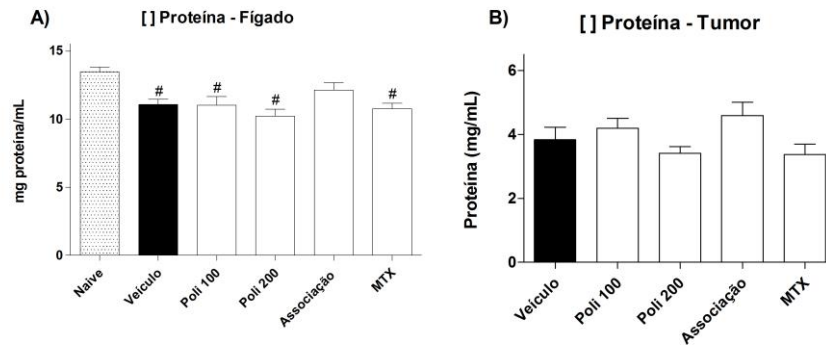


Figura 8- Concentração de proteínas nos tecidos hepático (A) e tumoral (B) de camundongos tratados por 21 dias com metotrexato 2,5 mg/kg (i.p.), veículo, ou polissacarídeos da berinjela, nas doses de 100 mg/kg ou 200 mg/kg, ou associação de metotrexado 1,5 mg/kg (i.p) e polissacarídeo na dose 100 mg/kg, por via oral. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e foram analisados por ANOVA de uma via seguida de post test de Bonferroni. \*  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Veículo. #  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Naive.

#### 4.3.2 Níveis de glutathiona (GSH)

Foi realizada a quantificação dos níveis de glutathiona (GSH) nos tecidos hepático e tumoral, como apresentado na Figura 9. As análises não mostram alteração nos níveis de GSH no fígado (9.A) e no tumor (9.B) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.

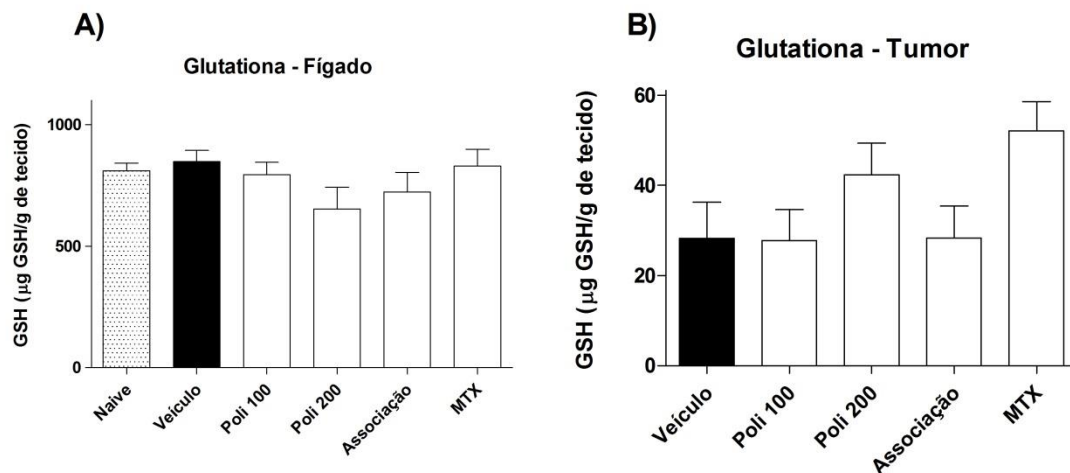


Figura 9 - Níveis de GSH nos tecidos hepático (A) e tumoral (B) de camundongos portadores de tumor de Ehrlich tratados por 21 dias com metotrexato 2,5 mg/kg (i.p.), veículo, ou polissacarídeos da berinjela, nas doses de 100 mg/kg ou 200 mg/kg, ou associação de metotrexado 1,5 mg/kg (i.p) e polissacarídeo na dose 100 mg/kg, por via oral. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e foram analisados por ANOVA de uma via seguida de post test de Bonferroni..



#### 4.3.3 Taxa de peroxidação lipídica

Foram realizadas análises para avaliar a taxa de LPO dos tecidos hepático e tumoral, como demonstrado na Figura 10. Não foram observadas alterações nestas taxas nos grupos tratados com os polissacarídeos quando comparados aos grupos naive e veículo no tecido hepático (Figura 10.A), e nem quando comparados ao grupo veículo no tecido tumoral (Figura 10.B). Destaca-se, no entanto, que os níveis de LPO no tecido tumoral foram, em todos os grupos, aproximadamente 10 x mais elevados do que no fígado.

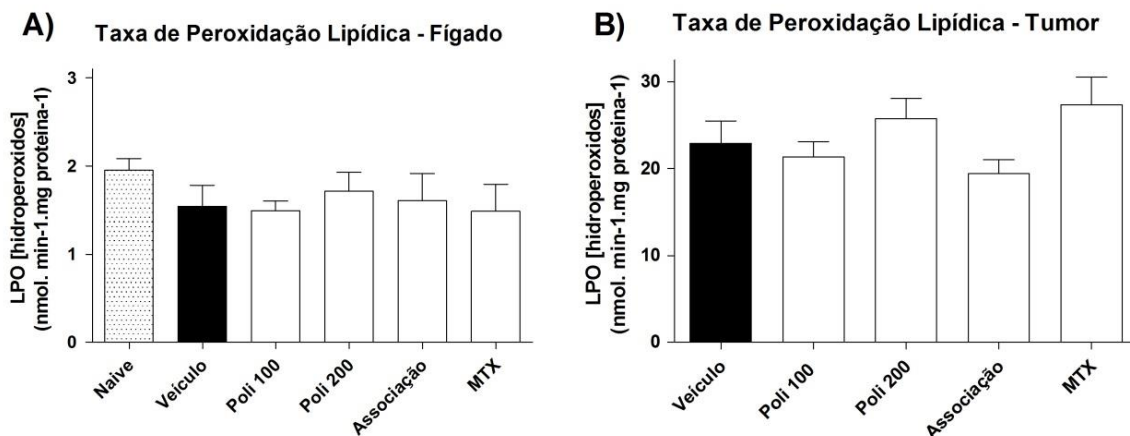


Figura 10 - Taxa de peroxidação lipídica nos tecidos hepático (A) e tumoral (B) de camundongos portadores de tumor de Ehrlich tratados por 21 dias com metotrexato 2,5 mg/kg (i.p.), veículo, ou polissacarídeos da berinjela, nas doses de 100 mg/kg ou 200 mg/kg, ou associação de metotrexado 1,5 mg/kg (i.p.) e polissacarídeo na dose 100 mg/kg, por via oral. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e foram analisados por ANOVA de uma via seguida de post test de Bonferroni.

#### 4.3.4 Atividade da enzima Superóxido dismutase

Foi mensurada a atividade da enzima SOD nos tecido hepático e tumoral (Figura 11). Os grupos tratados com os polissacarídeos da berinjela não sofreram alterações na atividade da enzima quando comparados aos grupos naive e veículo no tecido hepático (Figura 11.A) e ao grupo veículo no tecido tumoral (Figura 11.B).

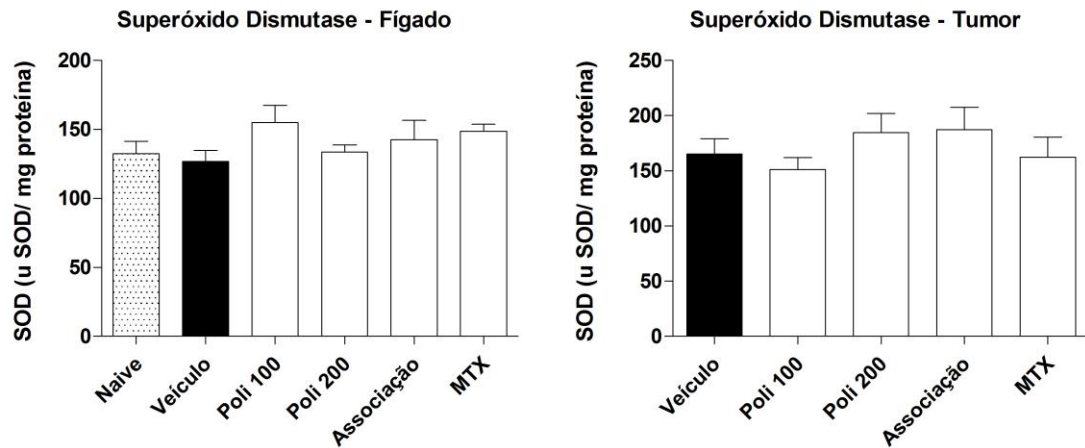


Figura 11 - Atividade da enzima superóxido dismutase nos tecidos hepático (A) e tumoral (B) de camundongos portadores de tumor de Ehrlich tratados por 21 dias com metotrexato 2,5 mg/kg (i.p.), veículo, ou polissacarídeos da berinjela, nas doses de 100 mg/kg ou 200 mg/kg, ou associação de metotrexado 1,5 mg/kg (i.p) e polissacarídeo na dose 100 mg/kg, por via oral. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e foram analisados por ANOVA de uma via seguida de post test de Bonferroni.

#### 4.3.5 Atividade da enzima catalase

Foi mensurada a atividade da enzima catalase apenas no tecido hepático (Figura 12). Não houve diferenças significativas na atividade enzimática nos grupos tratados com os polissacarídeos quando comparados ao grupo veículo.

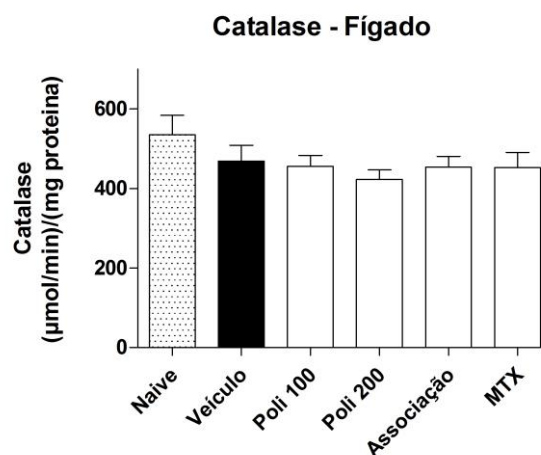


Figura 12 - Atividade da enzima catalase no tecido hepático de camundongos portadores de tumor de Ehrlich tratados por 21 dias com metotrexato 2,5 mg/kg (i.p.), veículo, ou polissacarídeos da berinjela, nas doses de 100 mg/kg ou 200 mg/kg, ou associação de metotrexado 1,5 mg/kg (i.p) e polissacarídeo na dose 100 mg/kg, por via oral. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e foram analisados por ANOVA de uma via seguida de post test de Bonferroni.

#### 4.3.6 Potencial antioxidante dos polissacarídeos

Em complementação às análises dos parâmetros de estresse oxidativo em tecidos dos camundongos, foi realizado um teste para analisar *in vitro* o potencial antioxidante dos polissacarídeos da berinjela, utilizando o método do DPPH (Figura 13). Os resultados demonstram que os polissacarídeos da berinjela diluídos um dia antes do uso (A), quanto os diluídos no momento do teste (B), apresentaram capacidade antioxidante apenas nas maiores concentrações – de 1000 µg/mL e 300 µg/mL – quando comparados ao grupo controle negativo (água), que não possui atividade antioxidante. O ácido ascórbico, substância utilizada como controle positivo, apresentou a maior capacidade antioxidante em ambos os casos.

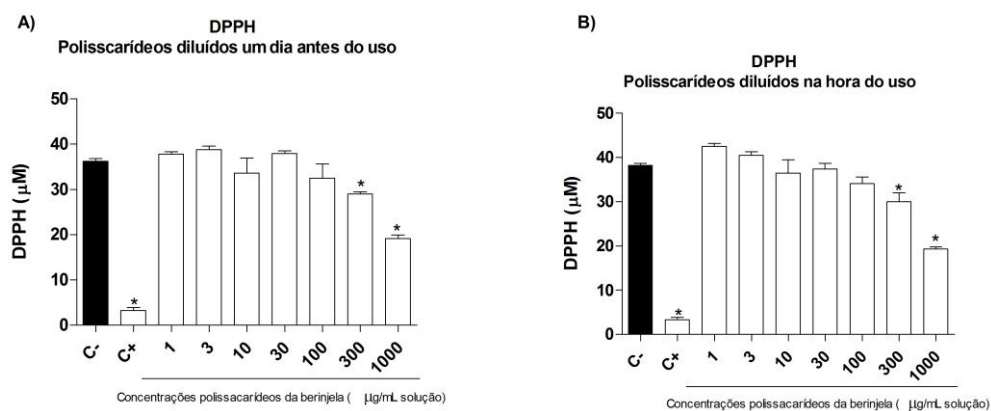


Figura 13 - Potencial antioxidante dos polissacarídeos extraídos da berinjela frente ao reagente DPPH. Os dados, realizados em triplicata, estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle negativo.

#### 4.4 Parâmetros do processo inflamatório no tecido tumoral

A atividade da enzima mieloperoxidase foi mensurada no tecido tumoral (Figura 14.A). Os grupos tratados com os polissacarídeos não causaram nenhuma alteração significativa na atividade da enzima quando comparados ao grupo veículo. Para a avaliação indireta da quantidade de óxido nítrico no tecido tumoral, foi realizada a mensuração dos níveis de nitrito nas amostras. Não foram observadas diferenças estatísticas nos grupos tratados quando comparados com o grupo veículo (Figura 14.B). Também foi mensurada a atividade da enzima N-acetilglucosaminidase (NAG) no tecido tumoral (Figura 14.C). O grupo Associação apresentou diminuição dos níveis de NAG nos animais do grupo quando comparados ao grupo veículo. Os demais grupos tratados não apresentaram diferenças estatísticas e comparação ao grupo veículo.

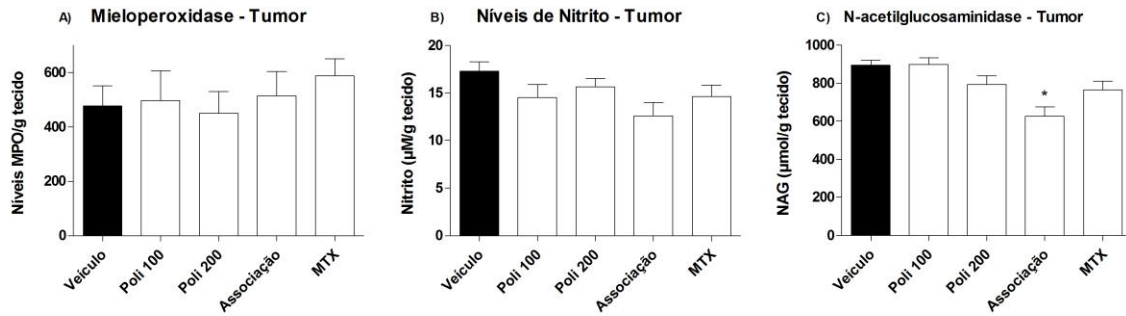


Figura 14 – Mensuração dos parâmetros inflamatórios no tecido tumoral; A) atividade da enzima mieloperoxidase B) níveis de nitrito e C) atividade da enzima N-acetilglucosaminidase no tecido tumoral de camundongos portadores de tumor de Ehrlich tratados por 21 dias com metotrexato 2,5 mg/kg (i.p.), veículo, ou polissacarídeos da berinjela, nas doses de 100 mg/kg ou 200 mg/kg, ou associação de metotrexado 1,5 mg/kg (i.p.) e polissacarídeo na dose 100 mg/kg, por via oral. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e foram analisados por ANOVA de uma via seguida de post test de Bonferroni. \*  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Veículo.

#### 4.5 Peso relativo dos órgãos

Na Figura 15 são apresentados os pesos relativos dos seguintes órgãos: fígado (A), rins (B), baço (C) e pulmões (D). Nenhum dos tratamentos apresentou diferenças estatísticas nos pesos dos órgãos quando comparados ao grupo veículo.

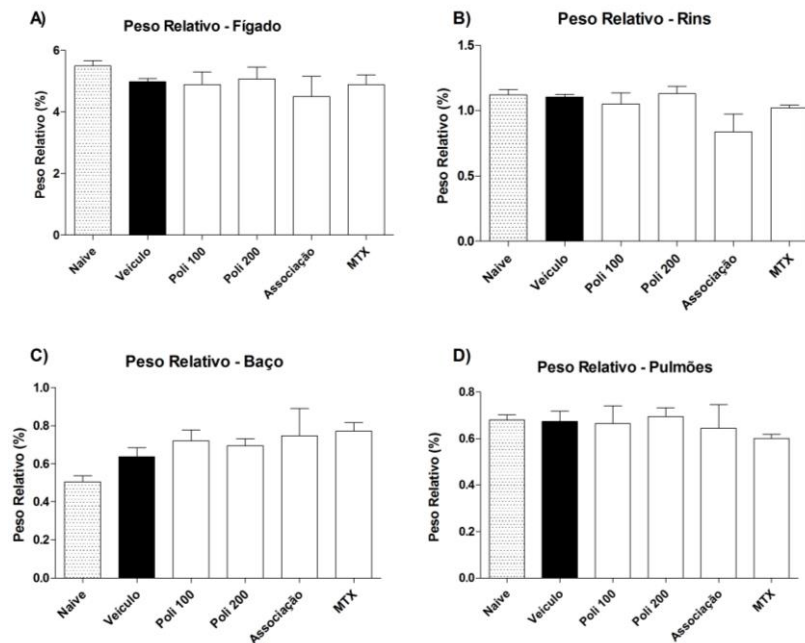


Figura 15- Peso relativo dos órgãos fígado (A), rins (B), baço (C) e pulmões (D) camundongos portadores de tumor de Ehrlich tratados por 21 dias com metotrexato 2,5 mg/kg (i.p.), veículo, ou polissacarídeos da berinjela, nas doses de 100 mg/kg ou 200mg/kg, ou associação de metotrexado 1,5 mg/kg (i.p.) e polissacarídeo na dose 100 mg/kg, por via oral. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e foram analisados por ANOVA de uma via seguida de post test de Bonferroni.

#### 4.6 Análise dos parâmetros de bioquímica plasmática

Foram realizadas análises da bioquímica plasmática para avaliar funções metabólicas dos animais: as enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina, albumina, globulina e proteína total (Tabela 1). Os níveis da enzima AST se mostraram significativamente elevados nos grupos portadores de tumor quando comparados aos resultados do grupo naive; nos demais parâmetros não foram observadas diferenças significativas ao serem comparados aos grupos naive e veículo. Nos parâmetros hematológicos, diversas alterações foram encontradas: aumento da porcentagem de granulócitos em todos os grupos portadores de tumor quando comparados ao grupo naive, aumento da porcentagem de monócitos no grupo veículo quando comparado ao grupo naive, aumento do hematócrito dos grupos Poli 100 e Poli 200 quando comparados ao grupo naive.

Tabela 1 – Parâmetros hematológicos e de bioquímica plasmática de camundongos portadores de tumor de Ehrlich. Os animais foram tratados por 21 com metotrexato 2,5 mg/kg (i.p.), veículo, ou polissacarídeos da berinjela, nas doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg, ou associação de metotrexato 1,5 mg/kg (i.p) e polissacarídeo na dose 100 mg/kg, por via oral.

Parâmetros	Grupos Experimentais					
	Naive	Veículo	Poli 100	Poli 200	Associação	MTX
MON%	3,9 ± 1	6,8 ± 1,89 #	4,9 ± 1,15	5,2 ± 2,31	5,3 ± 1,39	4,9 ± 1,17
GRAN%	23,2 ± 2,6	40,5 ± 3,3 #	39,2 ± 2,4 #	38,2 ± 5,1 #	43,7 ± 3,1 #	42,2 ± 4,1 #
LINF%	72,9 ± 2,8	52,8 ± 3,3	56,1 ± 2,6	56,6 ± 5,7	50,0 ± 3,3	52,5 ± 4,18
HGB	12,2 ± 1,4	12,6 ± 0,64	12,1 ± 0,72	11,8 ± 0,77	12,2 ± 0,57	12,1 ± 0,78
HCT	40,7 ± 1,4	37,2 ± 0,79	36,3 ± 0,74 #	35,5 ± 0,8 #	36,6 ± 0,83	36,6 ± 0,92
ALT	38,43 ± 3,895	39,49 ± 4,337	38,98 ± 2,773	43,24 ± 4,277	33,90 ± 3,069	46,10 ± 6,425
AST	148,4 ± 12,35	178,3 ± 25,67	217,3 ± 15,57	191,0 ± 28,51	290,3 ± 67,77 #	255,1 ± 18,77
Creatinina	0,433 ± 0,0373	0,443 ± 0,03	0,450 ± 0,0189	0,429 ± 0,018	0,433 ± 0,0211	0,425 ± 0,031
Albumina	2,45 ± 0,2487	2,19 ± 0,1243	2,30 ± 0,1524	2,21 ± 0,2224	2,12 ± 0,1537	2,02 ± 0,0959
Globulina	2,45 ± 0,2487	2,19 ± 0,1243	2,30 ± 0,1524	2,21 ± 0,2224	2,18 ± 0,1537	2,02 ± 0,0959
Proteína Total	5,00 ± 0,3324	4,74 ± 0,1645	4,92 ± 0,1485	4,90 ± 0,1476	4,48 ± 0,2197	4,75 ± 0,0945

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média, e foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni. #  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo naive. Legenda: MON%: monócitos; GRAN%: granulócitos; LINF%: linfócitos; HGB: hemoglobina; HCT: hematócrito; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase.

## 5 DISCUSSÃO

Nossos dados demonstraram o efeito antitumoral de polissacarídeos extraídos da berinjela contra o tumor sólido de Ehrlich. Dentro de nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo a demonstrar tal efeito. Não foram encontrados outros estudos que comprovem a atividade antineoplásica dos polissacarídeos extraídos da berinjela, porém polissacarídeos extraídos de outras fontes naturais tiveram sua atividade antitumoral demonstrada: Jin e colaboradores (2012) exibiram o efeito antitumoral *in vitro* da fração polissacarídica do Goji (*Lycium barbarum*) em linhagens BIU87 de carcinoma de bexiga, linhagens SW480 e Caco-2 de câncer de colón; Liu e colaboradores (2016) demonstraram a atividade antitumoral dos polissacarídeos extraídos do cogumelo *Phellinus baumii* frente a células HeLa (tumor cervical), células SGC-7901 (tumor gástrico) e RAW264.7 (macrófagos transformados por vírus de leucemia murino); Yuan (2017) evidenciou a atividade antitumoral dos polissacarídeos extraídos da batata doce, diante do modelo de hepatoma de células H22 em camundongos fêmeas, enquanto Razali (2016) relatou o efeito de supressão tumoral dos polissacarídeos extraídos da erva moura (*Solanum nigrum*) em camundongos portadores de carcinoma mamário 4T1. O presente trabalho demonstrou que os polissacarídeos extraídos da berinjela nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg foram capazes de diminuir de maneira eficaz o crescimento tumoral de Ehrlich, que é de origem mamária.

Apesar de ambas as doses testadas dos polissacarídeos apresentarem uma atividade antitumoral significativa, a dose de 200 mg/kg do composto causou a perda de, em média, 3,7 gramas de peso corporal nos animais ao longo de 21 dias de tratamento. Esta foi uma diminuição significativa do peso quando comparada aos animais dos grupos naive e veículo, o que não ocorreu com o grupo Poli 100. Interessantemente, também foi evidenciada a influência do tratamento no grupo Poli 200 no peso relativo da gordura abdominal, na qual o grupo Poli 200 novamente se mostrou alterado quando comparado ao grupo veículo. Infelizmente o lipidograma não foi avaliado neste trabalho, então não é possível inferir se esta redução de peso corporal e de tecido adiposo foi acompanhada de redução do perfil lipídico plasmático. Entretanto, Gürbüz (2018) aponta que um dos benefícios dos compostos ativos da berinjela é o auxílio na digestão lipídica e inibição da absorção desses compostos. Em estudo publicado por Sudheesh (1996) é proposto que o extrato da berinjela é capaz de causar um efeito hipolipidêmico em ratos com dietas normais e hipercalóricas, diminuindo os níveis de colesterol séricos e altos níveis de ácidos biliares no fígado e nas fezes. Ossamulu (2014) demonstrou o efeito hipolipidêmico de quatro variedades de berinjela em ratos em dieta hipercalórica, onde a berinjela levou

à diminuição do colesterol, do ganho de peso e ao aumento nos níveis séricos de HDL quando comparados ao grupo veículo. Porém, alguns outros estudos apresentam resultados diferentes: Silva e colaboradores (2004) ao tratarem pacientes hiperlipidêmicos com o extrato seco da berinjela não observaram diferenças significativas nos níveis de colesterol, HDL e índice de massa corpórea quando comparados ao grupo placebo. O estudo conduzido por Gonçalves (2006), que utilizou o extrato seco da berinjela para tratar pacientes com dislipidemias, observou uma pequena redução nos valores de colesterol, porém sem diferenças nos pesos corporais.

Ainda, alguns estudos apontam o efeito hipocolesterolêmico de diversos polissacarídeos: Cheng e Huang (2010) apontaram o importante papel de beta-glucanas no efeito hipocolesterolêmico de diversos tipos de alga, atuando na diminuição da absorção de colesterol. Chau e Huang (2005) demonstraram o efeito hipocolesterolêmico dos polissacarídeos extraídos da semente do maracujá (*Passiflora edulis*) na diminuição dos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol, e aumentando os níveis de colesterol e ácidos biliares nas fezes. LeHoux e Grondin (1993) estudaram o efeito de quitosanas nos níveis de colesterol de ratos submetidos a dieta hipercalórica, e constataram que o polissacarídeo foi capaz de reduzir em 54% a taxa de colesterol no sangue. São necessários novos estudos para avaliar se os polissacarídeos da berinjela são capazes de causar modificações no perfil lipídico e na massa corporal de animais, em diferentes condições experimentais.

A glutathione é uma molécula endógena que atua na detoxificação de espécies reativas e na manutenção das defesas antioxidantes do organismo. Estudos apontam que em casos de câncer os níveis de GSH estão aumentados no tecido tumoral, tornando as células cancerosas resistentes à morte celular via estresse oxidativo, e estão diminuídos em outros tecidos do organismo, como o fígado (CORSO, 2018). Um composto ideal que exerça sua atividade antitumoral através da modulação do sistema antioxidante seria capaz de diminuir os níveis de GSH no tecido tumoral, tornando-o mais suscetíveis à ação de espécies reativas. Os resultados obtidos apontam que os tratamentos com os polissacarídeos da berinjela não foram capazes de diminuir os níveis da glutathione no tecido tumoral e no tecido hepático quando comparados ao tratamento com o veículo, demonstrando que a atividade antitumoral não está relacionada a alterações nos níveis de GSH. Resultados semelhantes foram encontrados em nosso grupo de pesquisa por Adami et al. (2018), onde os polissacarídeos extraídos do pimentão não alteraram os níveis de glutathione nesses mesmos tecidos.

Outro parâmetro que pode estar associado com o nível celular de GSH é a peroxidação lipídica, que ocorre quando radicais livres não combatidos pelas defesas antioxidantes interagem com ácidos graxos poli-insaturados de membranas celulares, causando alterações na integridade, permeabilidade e fluidez das mesmas (FRANÇA, 2013). Espera-se que um composto de atividade antitumoral antioxidante seja capaz de diminuir as taxas de peroxidação lipídica nos tecidos saudáveis do organismo, mas aumentar essas taxas no tecido tumoral, auxiliando na destruição dessas células. No entanto, não houve diferenças significativas nas taxa de lipoperoxidação entre os grupos tratados com os polissacarídeos da berinjela quando comparados ao grupo naive e ao grupo veículo nos tecidos hepático e tumoral, o que sugere que os polissacarídeos não atuam na modulação das taxas de peroxidação lipídica nos tecidos estudados. Esses resultados também são compatíveis com os dados publicados por Adami e colaboradores, nos quais os polissacarídeos provenientes do pimentão não alteraram os níveis de peroxidação nos tecidos hepático e tumoral.

A superóxido dismutase é uma enzima antioxidante considerada a primeira linha de defesa do organismo contra a ação do radical superóxido, catalisando sua transformação em peróxido de hidrogênio (ROBINS, 2014). Uma redução nos níveis de SOD no tecido tumoral causada por um composto com atividade antitumoral antioxidante auxiliaria na supressão tumoral aumentando a exposição das células tumorais aos radicais livres (CORSO et al., 2019). Trabalhando de modo complementar à SOD está a catalase, responsável pela metabolização do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, para sua eliminação do organismo, sendo uma importante defesa do organismo contra danos oxidativos (GLORIEUX, 2017). Compostos com atividade antitumoral por modulação do sistema antioxidante alteram a quantidade da CAT, aumentando seus níveis no tecido hepático e diminuindo esses níveis no tecido tumoral (ORSOLIC, 2016). No entanto, os tratamentos com os polissacarídeos da berinjela não foram capazes de alterar a atividade das enzimas SOD e CAT nos tecidos hepático e tumoral quando comparados aos grupos veículo e naive.

Pelos dados acima, observa-se que os polissacarídeos da berinjela não modulam o sistema antioxidante nos tecidos hepático e tumoral. Para descartar totalmente a hipótese desta modulação, foi realizado o teste *in vitro* do DPPH, para analisar o potencial antioxidante *per se* dos polissacarídeos da berinjela. O DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil) é uma substância radicalar que é reduzida na presença de compostos antioxidantes, diminuindo a quantidade de DPPH e conseqüentemente a absorbância da reação. O



controle positivo – ácido ascórbico, uma substância sabidamente antioxidante – foi capaz de reduzir 91% da quantidade de DPPH da reação. Nos testes com as diferentes concentrações dos polissacarídeos da berinjela, apenas as maiores concentrações, de 1000 e 300 µg/mL, foram capazes de reduzir o DPPH em 46% e 20%, respectivamente. O método DPPH é largamente utilizado para avaliação da capacidade antioxidante de um composto, porém não deve ser utilizado como o único parâmetro para descartar o potencial antioxidante de um composto (OLIVEIRA, 2014). Com a junção dos dados obtidos com os testes de parâmetros do processo oxidativo *in vivo* e o teste do potencial antioxidante *in vitro* é possível inferir que os polissacarídeos da berinjela não exercem sua ação antitumoral por meio de alterações no sistema antioxidante.

Considerando que a atividade dos polissacarídeos não se deve ao sistema redox, outra possibilidade de ação antitumoral seria a modulação do processo inflamatório no microambiente tumoral. Para tanto, alguns parâmetros desta modulação foram analisados. A enzima mieloperoxidase é abundantemente expressa em células do sistema imune, principalmente neutrófilos; ela é estocada nos grânulos azurófilos e é secretada quando essas células são estimuladas. A liberação de MPO em neutrófilos ativados intensifica o processo inflamatório e dano tecidual (KHAN, 2018). Em complementação, a N-acetilglucosaminidase é uma enzima produzida majoritariamente por macrófagos, e tem sido utilizada para a detecção de ativação e acúmulo dessas células nos tecidos (COELHO, 2013); altos níveis de NAG no tecido tumoral indicam um alto número dessas células fagocitárias presentes, auxiliando na ação antitumoral. Adicionalmente, o óxido nítrico é um sinalizador intracelular que tem inúmeros efeitos no organismo, entre eles a mediação de mecanismos de toxicidade e defesa no organismo durante quadros de inflamação (DUSSE, 2003). Como o NO possui meia-vida curta, foi realizada a medição dos níveis de seu metabólito, nitrito. Porém, os níveis de nitrito e a atividade de MPO e NAG no tecido tumoral dos animais tratados com os polissacarídeos da berinjela não foram alterados, indicando que o efeito antitumoral não deve ser mediado por processo inflamatório. Entretanto, ressalta-se que outros marcadores importantes no microambiente tumoral, como TNF-alfa e interleucina (IL)-6, IL-10 e IL-4, não foram mensurados para afirmar o envolvimento, ou não, dos polissacarídeos na resposta inflamatória do tumor.

O peso relativo dos órgãos não apresentou diferenças significantes entre os tratamentos, porém foi observada uma tendência no aumento do peso relativo do baço nos animais portadores de tumor; estudos demonstram que a presença do tumor sólido

de Ehrlich nos animais é responsável por quadros de esplenomegalia (RIVENSON, 1981). Finalmente, os resultados das análises de bioquímica plasmática apontam que não houve diferença entre os grupos tratados com os polissacarídeos da berinjela quando comparados aos grupos veículo e naive nos seguintes parâmetros: alanina aminotransferase, creatinina, albumina, globulina e proteína total. Nos níveis séricos da enzima aspartato aminotransferase foi observada uma elevação significativa nos grupos portadores de tumor; e diversos parâmetros hematológicos se mostraram alterados quando comparados ao grupo naive. Essas alterações ocorrem devido à presença do tumor nos animais, porém mesmo com as alterações, os resultados não se mostraram fora do padrão de normalidade para a espécie (DINIZ et al., 2006; SANTOS et al., 2016). Sugere-se, portanto, que os tratamentos de 21 dias com os polissacarídeos não causem alterações metabólicas e funcionais significativas nos camundongos, corroborando estudos que mostram baixa toxicidade de polissacarídeos (ADAMI et al., 2018; STIPP et al., 2017; EL-MAGD et al., 2017; MEDHAT et al., 2017).

## **6. CONCLUSÃO**

Com os resultados obtidos nesse estudo é possível inferir que os polissacarídeos extraídos da berinjela possuem um efeito antitumoral significativo, corroborando com dados anteriores obtidos pelo nosso grupo com polissacarídeos de outras fontes (STIPP et al., 2017; ADAMI et al., 2018; TAMIELLO et al., 2018). O mecanismo de ação antitumoral não ocorre devido a alterações no sistema antioxidante, bem como pela modulação da resposta inflamatória. Outras vias de transdução celular que podem levar à redução do tumor, como apoptose, necroptose, ferroptose e modulação da angiogênese, precisam ser investigadas. Ainda são necessários futuros estudos para determinar o mecanismo de ação responsável pela atividade antitumoral dos polissacarídeos extraídos da berinjela, já que o tratamento com a dose de 100 mg/kg foi capaz de frear o crescimento do tumor e não induziu efeitos adversos como hipertrofia dos órgãos, alterações bioquímicas ou hematológicas .

## 7. REFERÊNCIAS

ABBAS, Z.; REHMAN, S. An overview of cancer treatment modalities. In: SHAHZAD, H. **Neoplasms**. 1. Ed. 2018. cap. 6, p. 139 – 157.

ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V 37, n. 3 p. 293 – 302. Dez, 2001.

ABDIN, A. A.; SOLIMAN, N. A.; SAIED, E. M. Effect of propranolol on IL-10, visfatin, Hsp70, iNOS, TLR2, and survivin in amelioration of tumor progression and survival in Solid Ehrlich Carcinoma-bearing mice. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 6, p. 1114–1121, 2014. Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2014.07.010>>. .

ADAMI, E. R.; CORSO, C. R.; TURIN-OLIVEIRA, N. M.; et al. Antineoplastic effect of pectic polysaccharides from green sweet pepper (*Capsicum annuum*) on mammary tumor cells in vivo and in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, n. July, p. 280–292, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.071>>. .

ALDUBAYAN, M. A.; ELGHARABAWY, R. M.; AHMED, A. S.; TOUSSON, E. Antineoplastic Activity and Curative Role of Avenanthramides against the Growth of Ehrlich Solid Tumors in Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–12, 2019. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/5162687/>>. .

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). How chemotherapy drugs work. Disponível em: <<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html>>. Acesso: 17 fev. 2019.

ARATANI, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 640, n. December 2017, p. 47–52, 2018.

ASLAM, M. S.; NAVEED, S.; ABBAS, Z.; AHMAD, A. Side effects of chemotherapy in cancer patients and evaluation on patients opinion about starvation based differential chemotherapy. **Journal of cancer therapy**. N 5, p. 817 - 822. Julho, 2014.

ATHAR, M. A.; GULL, I.; ABBAS, Z.; et al. Side Effects of Chemotherapy in Cancer Patients and Evaluation of Patients Opinion about Starvation Based Differential Chemotherapy. **Journal of Cancer Therapy**, v. 05, n. 08, p. 817–822, 2014.

AZADMANESH, J.; BORGSTAHL, G. A Review of the Catalytic Mechanism of Human Manganese Superoxide Dismutase. **Antioxidants**, v. 7, n. 2, p. 25, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2076-3921/7/2/25>>. .

BAILEY, P. J. Sponge Implants as Models. **Methods in Enzymology**, v. 162, n. C, p. 327–334, 1988.

BASSIONY, H.; SABET, S.; EL-DIN, T. A. S.; MOHAMED, M. M.; EL-GHOR, A. A. Magnetite nanoparticles inhibit tumor growth and upregulate the expression of P53/P16 in Ehrlich solid carcinoma bearing mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–9, 2014.

BLOIS, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. v 29. 1199 - 1200.

BRADFORD, M. M. Sistema séptico domiciliario | Rotomoldeo en Colombia Tanques Plásticos En Colombia Rotoplast. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976. Disponível em: <<http://www.rotoplast.com.co/sistema-septico-domiciliario/>>. .

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206–209, 1982. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12506462>>. .

CANDLAND, D. K.; BLOOMQUIST, D. W. Interspecies comparisons of the reliability of dominance orders. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 59, n. 1, p. 135–137, 1965. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>>. .

CIÊNCIAS, F. D. E.; FCF, F. Tema 7: Polissacarídeos QFL-0343 – Reatividade de Compostos Orgânicos II. , 2016.

CHAU, C. F.; HUANG, Y. L. Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, n. 8, p. 786–790, 2005.

CHEN, J.; HUANG, X. F. Beta-glucan may play an important role in algae hypocholesterolemia effect. **European Journal of Nutrition**, v. 49, n. 1, p. 63–64, 2010.

COELHO, B. A.; BELO, A. V.; ANDRADE, S. P.; et al. N-acetylglucosaminidase, myeloperoxidase and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer

patients. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 68, n. 2, p. 185–189, 2014.

CORSO, C. R.; ACCO, A. Glutathione system in animal model of solid tumors: From regulation to therapeutic target. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 128, n. April, p. 43–57, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.05.014>>.

CORSO, CR; STIPP. MC; ADAMI ER; DA SILVA, LM; MARIOTT, M; DE ANDRADE, SF; DE SOUZA, EAR; KLASSEN, G; BELTRAME, OC; QUEIROZ-TELLES, JE; DE OLIVEIRA, CS; STEFANELLO, MÉA; ACCO, A. Salvia lachnostachys Benth has antitumor and chemopreventive effects against solid Ehrlich carcinoma. **Molecular Biology Reports**, 2019. Springer Netherlands. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11033-019-04931-3>>. .

DO NASCIMENTO, G.E.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L.M.C. New findings on green sweet pepper (*Capsicum annun*) pectins: Rhamnogalacturonan and type I and II arabinogalactans. **Carbohydrate Polymers**. V 171, p. 292 – 299. 2017.

EL-MAGD, M. A.; KHAMIS, A.; NASR ELDEEN, S. K.; IBRAHIM, W. M.; SALAMA, A. F. Trehalose enhances the antitumor potential of methotrexate against mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 92, p. 870–878, 2017. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.005>>. .

FAMOUS, I.; OLUFUNMILAYO, H.; AUDU, A.; CHIDI, E.; YEMI, H. Hypolipidemic Properties of Four Varieties of Eggplants ( *Solanum melongena* L .). **Ijpsi.Org**, v. 3, n. 8, p. 47–54, 2014. Disponível em: <[http://www.ijpsi.org/Papers/Vol3\(8\)/H038047054.pdf](http://www.ijpsi.org/Papers/Vol3(8)/H038047054.pdf)>. .

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265–271, 2000. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302000000300012&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302000000300012&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. .

FRANJACOMO, F. T. T. *et al.* Solid Ehrlich carcinoma reproduces functional and biological characteristics of cancer cachexia . **Life Sciences**. V 162, p. 47 – 53. Ago, 2016.

GABRIEL DE OLIVEIRA, E. C. M.; GABRIEL DE OLIVEIRA, ELISABETE C. MORAES, NATHANIEL A. BRUNSELL, YOSIO E. SHIMABUKURO; NATHANIEL A. BRUNSELL, Y.

E. S.; et al. We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 % Control of a Proportional Hydraulic System. **Intech open**, v. 2, p. 64, 2015.

GLORIEUX, C.; CALDERON, P. B. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 10, p. 1095–1108, 2017.

GONÇALVES, M. DA C. R.; DINIZ, M. F. F. M.; DANTAS, A. H. G.; BORBA, J. D. C. Modesto efeito hipolipemiante do extrato seco de Berinjela (*Solanum melongena* L.) em mulheres com dislipidemias, sob controle nutricional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 656–663, 2006.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 128, p. 119-132, 1984.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; et al. Analysis of Nitrate , Nitrite , and [ <sup>15</sup>N ] Nitrate in Biological Fluids Automated NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> Analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131–138, 1982.

GULBAS, B.T.; WESTWELL, A.D.; SUZEN, S. Oxidative stress in carcinogenesis: new syntetic compounds with dual effects upon free radicals and cancer. **Current Medicinal Chemistry**. V 20, p. 4451 – 4459. 2013.

GÜRBÜZ, N.; ULUIŞIK, S.; FRARY, ANNE; FRARY, AMY; DOĞANLAR, S. Health benefits and bioactive compounds of eggplant. **Food Chemistry**, v. 268, n. May, p. 602–610, 2018.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R. Cb\_0291. , p. 469–487, 2003.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathiona s-transferase – The first enzymatic set in mercapturic acid formation. **The journal of biological chemistry**. V 249, n 22, p. 7130 – 7139. Novembro, 1974.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, Â. Glutathiona e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). ABC do câncer. **Ministério da Saúde**. 4 ed, 2018, cap 1, p. 13 – 26.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853–856, 1991.

JIN, M.; HUANG, Q.; ZHAO, K.; SHANG, P. Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, n. 1, p. 16–23, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.11.023>>. .

KHAN, A.; ALSAHLI, M.; RAHMANI, A. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. **Medical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 33, 2018.

KOTHARI, D.; PATEL, S.; KIM, S. K. Anticancer and other therapeutic relevance of mushroom polysaccharides: A holistic appraisal. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 105, n. May, p. 377–394, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.138>>. .

LEHOUX, JG.; GRONDIN, F. Some effects of chitosan on liver function in rats. **The Endocrine Society**, v. 132, n. 3, p. 1078 – 1084, 1993.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2001.

LIU, M. M.; ZENG, P.; LI, X. T.; SHI, L. G. Antitumor and immunomodulation activities of polysaccharide from *Phellinus baumii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 1199–1205, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.086>>. .

MACIEL, J. V.; DURIGON, A. M. M.; SOUZA, M. M.; et al. Polysaccharides derived from natural sources applied to the development of chemically modified electrodes for environmental applications: A review. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, p. e00062, 2019. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214158818300254>>. .

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V. DE; RUIZ, M. R.; et al. Ácidos Graxos Poliinsaturados Ômega-3 E Ômega-6: Importância E Ocorrência Em Alimentos Acids: Importance and Occurrence in Foods. **Revista de Nutrição, Campinas**, v. 19, n. 6, p. 761–770, 2006.

MATSCHKE, V.; THEISS, C.; MATSCHKE, J. Oxidative stress: the lowest common denominator of multiple diseases. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 2, p. 238, 2019. Disponível em: <<http://www.nrroonline.org/text.asp?2019/14/2/238/244780>>. .

MEDHAT, D.; HUSSEIN, J.; EL-NAGGAR, M. E.; et al. Effect of Au-dextran NPs as anti-tumor agent against EAC and solid tumor in mice by biochemical evaluations and histopathological investigations. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 1006–1016, 2017. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.043>>. .

MISHRA, S.; TAMTA, A. K.; SARIKHANI, M.; et al. Subcutaneous Ehrlich Ascites Carcinoma mice model for studying cancer-induced cardiomyopathy. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23669-9>>. .

National Cancer Institute (NCI). Understanding Cancer - What is cancer. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso: 20 fev. 2019.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Health topics – Cancer. Disponível em: <<https://www.who.int/topics/cancer/en/>>. Acesso: 24 fev. 2019.

Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Folha informativa – Cancer. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094)>. Acesso: 26 fev. 2018.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph: Estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.

ORŠOLIĆ, N.; KUNŠTIĆ, M.; KUKOLJ, M.; GRAČAN, R.; NEMRAVA, J. Oxidative stress, polarization of macrophages and tumour angiogenesis: Efficacy of caffeic acid. **Chemico-Biological Interactions**, v. 256, p. 111–124, 2016.

OZASLAN, M. *et al.* Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**. V 10, n.3, p. 2375 – 2378. Março, 2011.

OZASLAN, M.; KARAGOZ, I.; KILIC, I.; GULDUR, M. Ehrlich ascites carcinoma. **African**



**Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375–2378, 2013. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/93164>>. .

PACKER, L.; GLAZER, A. R. Oxygen radicals in biological systems: Preface. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. 1947, p. 121–126, 1990.

POPRAC, P.; JOMOVA, K.; SIMUNKOVA, M.; et al. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 7, p. 592–607, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.005>>. .

RAZALI, F. N.; SINNI AH, S. K.; HUSSIN, H.; ZAINAL ABIDIN, N.; SHUIB, A. S. Tumor suppression effect of Solanum nigrum polysaccharide fraction on Breast cancer via immunomodulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 185–193, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.079>>. .

RIVENSON, A.; SCHNELLE, V.; MOROSON, H.; MADDEN, R.; HERP, A. Variable response of spleen to Ehrlich's tumor according to the physical form (ascitic or solid) of the tumor. **Experientia**, v. 37, n. 2, p. 195–197, 1981.

ROBBINS, D.; ZHAO, Y. Manganese superoxide dismutase in cancer prevention. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, n. 10, p. 1628–1645, 2014.

SANT'ANA DUSSE, L. M.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. DAS G. Revisão sobre óxido nítrico Nitric oxide revision. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343–350, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v39n4/18548.pdf>>. .

SANTOS, E. W.; DE OLIVEIRA, D. C.; HASTREITER, A.; et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos para camundongos das linhagens C57BL/6, Swiss Webster e BALB/c. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 138–145, 2016.

SANTOS, H. B.; DAS, M.; TOSCANO, G.; ADÉLIA, Ê.; RIBEIRO, N. Padronização dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de Camundongos Swiss e Ratos Wistar. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 10, n. 2, p. 171–176, 2009.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**. V 25, p.192 – 205. 1968.

SERVICE, R. Estimation Sulfhydryl JOZEF. , v. 205, p. 192–205, 1968.

SILVA, G. E. C. DA; TAKAHASHI, M. H.; EIK FILHO, W.; et al. Ausência de efeito hipolipemiante da *Solanum melongena* L. (berinjela) em pacientes hiperlipidêmicos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 3, p. 368–373, 2004.

SOSA, V. *et al.* Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing Research Reviews**. V 12, p. 376 – 390. 2013.

STIPP, M. C.; BEZERRA, I. DE L.; CORSO, C. R.; et al. Necroptosis mediates the antineoplastic effects of the soluble fraction of polysaccharide from red wine in Walker-256 tumor-bearing rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 160, p. 123–133, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.047>>. .

SUDHEESH, S.; PRESANNAKUMAR, G.; VIJAYAKUMAR, S.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Hypolipidemic effect of flavonoids from *Solanum melongena*. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 321–330, 1997.

TADEU, F.; FRAJACOMO, T.; SOUZA, C. DE; et al. The psychiatric factor in compensation cases. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 193, n. 5, p. 389, 1965. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.08.009>>. .

TAMIELLO, C. S.; ADAMI, E. R.; DE OLIVEIRA, N. M. T.; et al. Structural features of polysaccharides from edible jambo (*Syzygium jambos*) fruits and antitumor activity of extracted pectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1414–1421, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.164>>. .

TANAKA, T.; SHIMIZU, M.; KOCHI, T.; MORIWAKI, H. Chemical-induced Carcinogenesis. **Journal of Experimental and Clinical Medicine(Taiwan)**, v. 5, n. 6, p. 203–209, 2013. Elsevier Taiwan LLC. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jecm.2013.10.009>>. .

TEKINER-GULBAS, B.; WESTWELL, A.; SUZEN, S. Oxidative stress in carcinogenesis: new synthetic compounds with dual effects upon free radicals and cancer. **Current**

**Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 36, p. 4451–4459, 2013. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=20&issue=36&spage=4451>>. .

TEIXIERA, L.A.; FONSECA, C.O. Sobre a história social do câncer. In: \_\_. De doença desconhecida a problema de saúde pública: o INCA e o controle do câncer no Brasil. **Ministério da Saúde**. 1 ed. 2007, cap. 1, p. 13 – 24.

XIE, J.; YU, M.; WANG, Q.; et al. Natural polysaccharides exhibit anti-tumor activity by targeting gut microbiota. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, n. 235, p. 743–751, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.083>>. .

XU, L.; CAO, J.; CHEN, W. Structural characterization of a broccoli polysaccharide and evaluation of anti-cancer cell proliferation effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, p. 179–184, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.011>>. .

YUAN, B.; YANG, X. Q.; KOU, M.; et al. Selenylation of polysaccharide from the sweet potato and evaluation of antioxidant, antitumor, and antidiabetic activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 3, p. 605–617, 2017.

ZHANG, J.; WANG, X.; VIKASH, V.; et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. Figure 1, 2016. Hindawi Publishing Corporation.

ZHU, Q.; CHEN, J.; LI, Q.; WANG, T.; LI, H. Antitumor activity of polysaccharide from *Laminaria japonica* on mice bearing H22 liver cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 156–158, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.090>>. .