



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA  
CELULAR**

**THIAGO SOUZA SANTOS**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL GENOTÓXICO E CITOTÓXICO  
DO EXTRATO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) CLARIFICADO SOBRE A  
LINHAGEM CELULAR AGP01 (CÂNCER GÁSTRICO)**

**BELÉM-PA, 2024**

THIAGO SOUZA SANTOS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL GENOTÓXICO E CITOTÓXICO  
DO EXTRATO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) CLARIFICADO SOBRE A  
LINHAGEM CELULAR AGP01 (CÂNCER GÁSTRICO)**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para obtenção de título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, área de Concentração Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará.

---

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia

**Belém-PA, 2024**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

- S237a Santos, Thiago Souza.  
Avaliação in vitro do potencial genotóxico e citotóxico do extrato do açaí (*Euterpe oleracea*) clarificado sobre a linhagem celular AGP01 (câncer gástrico) / Thiago Souza Santos. — 2024.  
84 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. Rommel Mário Rodriguez Burbano  
Coorientador(a): Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,  
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Neurociências e Biologia celular, Belém, 2024.
1. *Euterpe oleracea*. 2. Câncer gástrico. 3. Genotoxicidade.  
4. Citotoxicidade. 5. Migração. I. Título.

CDD 571.6

---

THIAGO SOUZA SANTOS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL GENOTÓXICO E CITOTÓXICO  
DO EXTRATO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) CLARIFICADO SOBRE A  
LINHAGEM CELULAR AGP01 (CÂNCER GÁSTRICO)**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para obtenção de título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, área de Concentração Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará.

---

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia

**BANCA EXAMINADORA**

---

Presidente: Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano

---

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia

---

Avaliadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edilene Oliveira da Silva  
(Membro interno)

---

Avaliadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lorena Araújo da Cunha  
(Membro externo)

**Belém-PA, 2024**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao laboratório LCH e todos os seus membros e ex membros, antigos e novos, por tudo que tive oportunidade de aprender ao longo dos anos em que sou parte deste laboratório. Agradeço ao meu orientador prof. Rommel Burbano pela oportunidade e por estar sempre disposto a ajudar os seus “tios”. À prof. Adriana Guimarães, através da qual conheci o laboratório e fui apresentado à mutagênese, área pela qual hoje sou apaixonado. Agradeço ao prof. Marcelo Bahia, por todo o apoio e ensinamentos e por estar sempre presente e envolvido em todos os passos de seus alunos, mesmo quando as coisas parecem estar indo para o pior lugar possível. E à professora Verônica Bahia, que foi uma pessoa fundamental na minha formação como cientista. Sou muito grato à Lorena Cunha, Tatiane Mota e Ingryd Ramos, que foram as pessoas que mais me ajudaram desde que entrei no laboratório no início, e com quem aprendi coisas que uso até hoje e tive a oportunidade de ensinar outras pessoas. Agradeço também aos meus colegas de laboratório e também amigos Alysson, Roberto e Andryo, pela companhia e por todas as vezes que precisei de ajuda para as atividades fundamentais do laboratório e sempre tive um de vocês presente.

Agradeço também à atual coordenação do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, pela organização e pelo esforço em manter os alunos sempre bem informados. E também pela compreensão quanto à situação específica de cada aluno que não conseguiu cumprir os prazos regimentais.

Agradeço também aos meus amigos pessoais, por estarem presentes e me dando apoio mesmo quando passamos muitos meses ou até anos sem contato: Letícias, Apenas um Grupo, Grupo de Sempre, Helna, Breno e Pâmela. Também sou extremamente grato à minha família, especialmente à minha mãe Mirian, por todo o apoio e por sempre acreditar em mim. Obrigado.

## RESUMO

O açaí (*Euterpe oleracea* MART) é uma fruta de grande importância para a região Amazônica em termos nutricionais, culturais e socioeconômicos. Nos últimos anos, o açaí tem sido alvo de diversos estudos devido às suas propriedades benéficas à saúde, incluindo efeitos contra células tumorais. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* os efeitos genotóxicos e citotóxicos do extrato do açaí clarificado em uma linhagem celular de câncer gástrico humano metastático (células AGP01). Para fins de comparação, utilizou-se uma linhagem celular não transformada de células epiteliais renais de macaco verde africano (células VERO). Foram realizados o ensaio de viabilidade por redução de resazurina, o ensaio cometa, a determinação da morte celular por corantes fluorescentes diferenciais e o ensaio de migração *Wound Healing* o de feridas. Foi observada redução na viabilidade apenas na linhagem AGP01 em 72h. Não houve dano genotóxico ou morte celular (através de apoptose ou necrose) em nenhuma das linhagens celulares. Entretanto, o extrato de açaí induziu redução da motilidade em ambas as linhagens celulares. A redução da viabilidade celular e a indução do efeito anti-migratório na linhagem celular AGP01 abrem perspectivas para explorar o potencial da *Euterpe oleracea* como adjuvante no tratamento do câncer gástrico.

**Palavras Chave:** *Euterpe oleracea*, Câncer Gástrico, Citotoxicidade, Genotoxicidade, Migração.

## ABSTRACT

Açaí (*Euterpe oleracea* MART) is a fruit of great importance for the Amazon region in nutritional, cultural and socioeconomic terms. In recent years, açaí has been the subject of several studies due to its beneficial properties for health, including effects against tumor cells. Therefore, the present work aimed to evaluate *in vitro* the genotoxic and cytotoxic effects of the clarified extract of açaí juice in a human metastatic gastric cancer cell line (AGP01 cells). For comparison purposes, a non-transformed cell line of African green monkey renal epithelial cells (VERO cells) was used. The viability assay by resazurin reduction, the comet assay, the determination of cell death by differential fluorescent dyes and the wound healing migration assay were performed. A reduction in viability was observed only in the AGP01 line within 72h. There was no genotoxic damage or cell death (through apoptosis or necrosis) in any of the cell lines. However, açaí extract induced motility reduction in both cell lines. The reduction in cell viability and the induction of the anti-migratory effect in the AGP01 cell line opens perspectives for exploring the potential of *Euterpe oleracea* as an adjuvant in the treatment of gastric cancer.

**Key words:** *Euterpe oleracea*, Gastric Cancer, Citotoxicity, Genotoxicity, Migration.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1:</b> Açaizeiros e cacho com os frutos.....	5
<b>FIGURA 2:</b> Delineamento experimental dos ensaios para avaliação do efeito do extrato de açaí clarificado sobre as linhagens VERO e AGP01. ....	12
<b>FIGURA 3:</b> Conversão de resazurina em resorufina .....	15
<b>FIGURA 4:</b> Fórmula para obtenção do índice de dano nuclear (IDN).....	18
<b>FIGURA 5:</b> Ranhura em uma monocamada celular confluyente. ....	20
<b>FIGURA 6:</b> Marcações feitas com caneta permanente em baixo dos poços na placa de 12 poços .....	21
<b>FIGURA 7:</b> Efeito do extrato de açaí clarificado sobre a viabilidade das linhagem VERO e AGP01 expostas durante 24h. ....	23
<b>FIGURA 8:</b> Efeito do extrato de açaí clarificado sobre a viabilidade das linhagem VERO e AGP01 expostas durante 72h. ....	24
<b>FIGURA 9:</b> Classificação visual dos nucleóides em diferentes classes de dano no ensaio cometa.....	25
<b>FIGURA 10:</b> Avaliação do potencial genotóxico do extrato de açaí clarificado nas linhagens celulares VERO e AGP01 expostas durante 3 horas. ....	25
<b>FIGURA 11:</b> Avaliação do potencial citotóxico do extrato do açaí clarificado por meio de corantes fluorescentes diferenciais nas linhagens VERO e AGP01 .....	26

**FIGURA 12:** Avaliação do potencial migratório das linhagem VERO e AGP01 expostas ao extrato do açaí clarificado por meio do ensaio de migração *Wound Healing*.  
..... 27

**FIGURA 13:** Fotomicrografias do ensaio de migração *Wound Healing* apresentando a área das lesões captadas nos diferentes tempos de tratamento nas linhagens VERO e AGP01. .... 28

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

AGP01 – Ascite Gástrica Paraense  
°C – Graus Célsius  
µg – Micrograma  
µl – Microlitro  
µm – Micrômetro  
µM – Micromolar  
AC – Açai Clarificado  
ANOVA – Análise de Variância  
BBN - N-butil-N-(4-hidroxibutil)-nitrosamina  
CA – California  
CO<sub>2</sub> – Gás carbônico (dióxido de carbono)  
C3G – Cianidina-3-glucosidio  
C3R – Cianidina-3-rutinosideo  
DAF – Diacetato de Fluoresceína  
DHZ - 1,2-dimetilhidrazina  
DMBA – 1,3-dimetilbutalamina  
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DOXO – Doxorrubicina  
EDTA – Etilenodiaminotetracético  
ERO – Espécies reativas de oxigênio  
g – Grama  
HO – Hoechst 33342  
IP – Iodeto de propídio  
l – Litro  
LCH – Laboratório de Citogenética Humana  
LNMC – Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular  
M – Molar  
mg – Miligrama  
mL – Mililitro

mM – Milimolar

MNU - Nmetil-N-nitrosourea

MTS – (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium)

MTT – (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide)

NaCl – Cloreto de Sódio

nm – Nanômetro

pH – proporção Hidrogeniônica

PPGNBC – Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular

rpm – Rotações Por Minuto

SBF – Soro Bovino Fetal

UFPA – Universidade Federal do Pará

URF – Unidades Relativas de Fluorescência

USA – United States of America

VERO – Rim de macaco verde africano

WSTs – Water-soluble Tetrazolium Salts

XTT – (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) -2H-tetrazolium-5-carboxanilide)



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 CÂNCER GÁSTRICO.....	2
1.2 AÇAÍ.....	5
1.3 AÇAÍ E CÂNCER .....	8
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	12
3.2 CULTIVO DAS LINHAGENS CELULARES .....	13
3.3 EXTRATO DO AÇAÍ CLARIFICADO.....	13
3.4 VIABILIDADE CELULAR: ENSAIO DE REDUÇÃO DE RESAZURINA....	14
3.4.1 Princípio da técnica.....	14
3.4.2 Procedimento experimental.....	15
3.5 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE: ENSAIO COMETA .....	16
3.5.1 Princípio da técnica.....	16
3.5.2 Procedimento experimental.....	17
3.6 AVALIAÇÃO DE POTENCIAL CITOTÓXICO: PADRÃO DE MORTE CELULAR POR MEIO DE CORANTES FLUORESCENTES DIFERENCIAIS .	19
3.6.1 Princípio da técnica.....	19
3.6.2 Procedimento experimental.....	19
3.7 AVALIAÇÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR: ENSAIO <i>WOUND HEALING</i> ..	20
3.7.1 Princípio da técnica.....	20
3.7.2 Procedimento experimental.....	21
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	22
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 VIABILIDADE CELULAR: ENSAIO DE REDUÇÃO DE RESAZURINA....	23
4.2 ENSAIO COMETA .....	24
4.3 Avaliação de potencial citotóxico: Padrão de morte celular por meio de corantes fluorescentes diferenciais .....	26
4.4 AVALIAÇÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR: ENSAIO DE MIGRAÇÃO <i>WOUND HEALING</i> .....	27

	xiii
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>35</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>
<b>ANEXO 1. Artigo submetido à revista Toxicology In Vitro. ....</b>	<b>46</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Os seres humanos são organismos multicelulares, cujas células se organizam em tecidos e estes formam os diversos órgãos que compõem os sistemas. Estima-se que o corpo humano seja composto por aproximadamente 37 trilhões de células (BIANCONI *et al.*, 2013). Todas essas células são resultado de muitas sucessivas divisões celulares que se iniciam a partir de uma única célula. Embora sejam clones, é esperado que existam certas diferenças no seu material genético, devido às mutações que surgem a cada divisão celular e que se fixam nas populações dos diferentes tecidos (ROY & CONROY, 2018). Isso acontece em condições fisiológicas normais, no entanto é um ponto essencial para o desenvolvimento do câncer, que também se desenvolve a partir de uma única célula de origem, com mutações acumuladas que lhe conferem certas vantagens (GREAVES & MALEY, 2012).

O que chamamos de câncer consiste em um conjunto de doenças que, apesar de acometerem tecidos e órgãos diferentes, possuem em comum o fato de se desenvolverem a partir de células do próprio organismo (HAUSMAN, 2019). Tais células não respondem mais aos mecanismos naturais de controle de proliferação, escapam às estratégias de controle como a apoptose, perdem comunicação com os tecidos circundantes, podem estimular angiogênese para suprir as próprias necessidades metabólicas, estimulam inflamação e até mesmo desenvolvem capacidade de se disseminar e invadir outros tecidos e órgãos (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

O câncer é uma das maiores causas de morte globalmente (PLUTYNSKI, 2018). Dados de 2020 considerando 185 países mostram que o tipo mais comumente diagnosticado é o câncer de mama (11,7% dos novos casos) seguido por câncer de pulmão (11,4%), colorretal (10%), próstata (7,3%) e câncer gástrico (7,7%). Destes, o câncer de pulmão apresentou a maior mortalidade, estimada em 1,8 milhões de mortes (18%), seguido por câncer colorretal (9,4%), de fígado (8,3%), câncer gástrico (7,7%) e câncer de mama (6,9%) (SUNG *et al.*, 2021).

Segundo estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o tumor maligno mais incidente no Brasil é o de pele não melanoma (31,3% do total de casos), seguido pelos de mama feminina (10,5%), próstata (10,2%), cólon e reto (6,5%), pulmão (4,6%) e estômago (3,1%). A distribuição da incidência por região geográfica mostra que existe grande variação na magnitude e nos tipos de câncer entre as diferentes Regiões do Brasil,

com o câncer de estômago ocupando posições mais elevadas na região norte, chegando a ser o segundo principal tipo em homens, com 11,9% dos casos, e o quinto em mulheres (5,9%). Estimativas ajustadas para 2023 apontam o estado do Pará com a terceira maior taxa prevista de câncer gástrico do Brasil, com 12,57 casos para cada 100.000 habitantes, atrás do Amazonas e do Amapá, respectivamente com 13,42 e 12,85 casos por 100.000 habitantes (INCA, 2022).

### 1.1 CÂNCER GÁSTRICO

O câncer gástrico corresponde aos tumores malignos que ocorrem na região do estômago. São uma categoria bastante heterogênea de tumores, podendo ser de vários tipos diferentes, dependendo do tecido celular de origem. Os principais tipos são: adenocarcinoma gástrico, de origem epitelial glandular; tumor estromal gastrointestinal, de origem mesenquimal; linfomas e tumores neuroendócrinos (KNIGHT & ALLUM, 2019). A vasta maioria das neoplasias gástricas são adenocarcinoma (cerca de 95%), que também possui subdivisões quanto à localização, histologia e características moleculares (LAURÉN, 1965; SIEWERT & STEIN, 2003).

Quanto à localização, os tumores podem se desenvolver na região proximal, que compreende principalmente a porção da cárdia, ou na região distal, que corresponde às porções do antro e piloro (PETRYSZYN *et al.*, 2020). Histologicamente, podem ser classificados como do tipo intestinal, com as células apresentando maior coesão e diferenciação, ou do tipo difuso, com células menos diferenciadas e menor organização tecidual (LAURÉN, 1965). O tipo intestinal é tipicamente localizado no antro, enquanto o tipo difuso é mais comumente encontrado na cárdia e no corpo (KNIGHT & ALLUM, 2019).

As classificações anatômicas e histológicas são as mais utilizadas, mas há também classificações moleculares, que levam em consideração mutações e alterações de expressão em genes específicos e a estabilidade cromossômica das células tumorais. De acordo com o *Cancer Genome Atlas Research Network* (2014), há 4 categorias: tumores positivos para EVB (Epstein-Barr Virus); tumores MSI, que possuem instabilidade de microsatélites (microsatellite instability); tumores GS, que são genomicamente estáveis (genomically stable); e tumores CIN, que possuem instabilidade cromossômica (chromosomal instability). Estas classificações sugerem a regulação positiva e/ou negativa de diferentes vias moleculares específicas, o que pode ser útil na escolha de tratamentos (PETRYSZYN *et al.*, 2020), pois cada tipo tumoral é diferente em termos

de mutação que carregam, sensibilidade a drogas, seu fenótipo e tumorigenicidade (SEENEEVASSEN *et al.*, 2021).

A carcinogênese gástrica envolve processos complexos, que podem incluir componentes hereditários e também há fatores de risco a se considerar. A idade é um dos fatores de risco, pois a probabilidade de desenvolver câncer gástrico aumenta nas faixas etárias mais altas. O sexo biológico também influencia, dado que a incidência em homens é duas vezes maior do que em mulheres. Além disso, pode haver influência de raça/etnia na susceptibilidade (JOSHI & BADGWELL, 2021). Outros fatores que também podem contribuir para maior risco de câncer gástrico incluem: consumo excessivo de sal; tabagismo; baixo consumo de frutas, vegetais e alimentos ricos em antioxidantes; consumo de álcool e obesidade. Porém, o principal fator ambiental ligado ao desenvolvimento do câncer gástrico é a infecção por *Helicobacter pylori* (KNIGHT & ALLUM, 2019).

*H. pylori* é uma bactéria microaerófila gram-negativa que comumente habita a mucosa do estômago. Considerada uma das bactérias patogênicas mais disseminadas, estima-se que está presente em aproximadamente 50% da população mundial, embora 90% dos infectados não apresentem nenhum sintoma (SMITH, 2021). A prevalência da infecção por *H. pylori* varia muito dependendo da região geográfica, tendendo a ser maior em países com menor desenvolvimento socioeconômico, apresentando também muita variação dentro dos mesmos países devido às diferenças demográficas (PLUMMER *et al.*, 2015; SMITH, 2021).

*H. pylori* foi reconhecida em 1994 pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer como um carcinogênico grupo 1 (MØLLER *et al.*, 1995) e representa 89% das causas do câncer gástrico não cardial (PLUMMER *et al.*, 2015). A infecção por *H. pylori* como causa do desenvolvimento de câncer gástrico é bem documentada, tanto por estudos epidemiológicos, como por estudos experimentais (GIESECKE *et al.*, 1993; ZHENG *et al.*, 2004). O processo inicia com reações inflamatórias que induzem gastrite crônica e que pode evoluir para gastrite atrófica, seguida de metaplasia intestinal, displasia e, por fim, câncer gástrico. Este conjunto de mudanças consecutivas na mucosa gástrica, induzidas por *H. pylori*, resultando em câncer gástrico é conhecido como cascata de Correa (CORREA, 1975).

Apesar da associação causal comprovada entre *H. pylori* e câncer gástrico, somente a infecção pela bactéria não é suficiente para gerar neoplasias. O câncer gástrico se desenvolve em cerca de 1% dos indivíduos infectados (VENNEMAN *et al.*, 2018), o que ressalta a importância dos outros fatores ambientais de risco e também da susceptibilidade genética do hospedeiro. O tipo de *H. pylori* causador da infecção também é importante, pois diferentes cepas possuem diferentes níveis de carcinogenicidade, com algumas sendo mais agressivas que outras (MIFTAHUSSURUR *et al.*, 2017).

Além de *H. pylori*, outras bactérias também parecem desempenhar papel importante na progressão tumoral, dado que toda a microbiota muda ao longo das fases da doença, possibilitando até a identificação de situações clínicas específicas dependendo do grupo de bactérias mais abundante em determinados casos (BARRA *et al.*, 2021).

A literatura também mostra a associação causal entre infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e câncer gástrico em cerca de 10% dos casos. O EBV é um vírus de herpes humana, causador da mononucleose. É bem conhecido por suas propriedades oncogênicas, devido à capacidade de interferir no ciclo celular e é também associado ao desenvolvimento de outros tipos de câncer, como linfoma de Hodgkin (NISHIKAWA *et al.*, 2018).

Embora os fatores causadores da neoplasia gástrica e sua forma de progressão sejam diversos, a inflamação crônica desempenha um papel fundamental em todos eles, e um dos fatores que influencia nos processos inflamatórios é a dieta. O estudo de Agudo *et al.* (2018) indica uma correlação entre o potencial inflamatório da dieta e o risco de desenvolver câncer gástrico. Um exemplo disso é o consumo de carne vermelha e/ou processada, que pode conter carcinogênicos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, produzidos pela alta temperatura ou pelo processo de defumação (BOUVARD *et al.*, 2015).

Assim como a má alimentação está associada a riscos de desenvolver câncer, pode-se inferir que uma alimentação rica em antioxidantes e com menor potencial inflamatório pode contribuir para a diminuição dos riscos. Por isso, o estudo de produtos naturais com potencial antioxidante, anti-inflamatório e antineoplásico comumente consumidos pela população é de grande importância para uma maior compreensão do câncer e a busca de novos compostos que auxiliem no tratamento de neoplasias.

## 1.2 AÇAÍ

Açaí é o fruto do açazeiro, uma palmeira nativa da Bacia Amazônica (Figura 1), que possui ampla distribuição na Amazônia, principalmente no Brasil, Venezuela e Colômbia, mas também no Equador, Suriname, Guayana e Panamá (SALES *et al.*, 2023). O açaí pertence à família *Arecaceae* e seu nome científico é *Euterpe oleracea* Martius, tendo recebido o epíteto genérico em alusão à deusa da mitologia grega *Euterpe*, que significa “elegância da floresta”, devido à beleza de suas palmeiras. O termo *oleracea* faz referência a plantas que podem ser usadas como alimento e o nome popular açaí tem origem tupi, que significa “fruto que chora” (DE OLIVEIRA & SCHWARTZ, 2018; SALES *et al.*, 2023).



**FIGURA 1:** Açazeiros (A) e cachos com os frutos (B). Fonte: Portal Embrapa e Projeto Jardinando.

O açaí possui grande importância cultural e socioeconômica na Região Amazônica, devido à sua presença diária na alimentação da população local e também exportação para as demais regiões do Brasil, sendo o estado do Pará o maior produtor para o mercado doméstico (DE OLIVEIRA & SCHWARTZ, 2018). Além do fruto, também é extraído palmito das palmeiras, e estas são também usadas como plantas ornamentais em jardins e parques, podendo ajudar em recuperação de áreas degradadas (DE OLIVEIRA & SCHWARTZ, 2018). Seus caroços são usados na confecção de biojóias, suas folhas e troncos são usados em construções (OLIVEIRA, 2006) e sua própria existência é inspiração para expressões artísticas e culturais, como músicas, lendas e poemas (NOGUEIRA *et al.*, 2005; MOURÃO, 2010; PONTE, 2012).

Para além da Região Amazônica e no restante do Brasil, hoje o açaí é valorizado no mundo todo, principalmente após ter sido alvo de várias pesquisas que evidenciaram o seu alto poder nutritivo e os benefícios que pode trazer à saúde (SILVA, 2019). Considerado uma “superfruta” devido ao seu teor nutricional e potencial antioxidante, o açaí tem ganhado cada vez mais atenção no mercado internacional, não somente na área alimentícia, com a produção de bebidas energéticas e suplementos dietéticos, mas também na indústria farmacêutica e cosmética (YAMAGUCHI *et al.*, 2015), o que estimula cada vez mais estudos para elucidar as suas características e seus potenciais efeitos biológicos.

A polpa do fruto do açaizeiro representa cerca de 5 a 15% do volume do fruto. Quanto ao valor nutricional, lipídeos são os principais macronutrientes presentes, compondo cerca de 40 a 60% de sua matéria seca, com sua maior porção representada pelos ácidos oleico, linoleico e palmítico. As fibras alimentares são o segundo componente mais prevalente na polpa, compondo 20 a 22% da matéria seca. Quanto à quantidade de proteínas, estas representam cerca de 6 a 10,5%. Os açúcares digeríveis são cerca de 3%, representados principalmente por glicose, frutose e sacarose. O açaí é também uma rica fonte de vitamina E, contribuindo com mais de 100% do valor recomendado diário a cada porção de 200g do suco. Possui também alto teor de minerais, principalmente selênio, manganês, cobre e cromo (BICHARA & ROGEZ, 2011); e de polifenóis, aos quais são atribuídos grande parte dos efeitos biológicos.

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos químicos que contém ao menos um anel aromático ligado a um radical hidroxila, chamado de fenol. Quando possuem vários fenóis em sua estrutura química, são classificados como polifenóis. Os polifenóis são antioxidantes não enzimáticos que combatem radicais livres e podem ter efeitos diversos no organismo. Os polifenóis amplamente distribuídos na natureza podem ser divididos em dois grandes grupos: ácidos fenólicos e flavonóides. Os flavonóides podem ser subdivididos em importantes classes, como flavonas, isoflavonas, flavononas, flavonóis, catequinas e antocianidinas (ANGELO & JORGE, 2006).

Dentro do grupo das antocianidinas estão as antocianinas. Antocianinas são pigmentos naturais encontrados principalmente em frutos de coloração escura e avermelhada/arroxeadas, como é o caso do açaí. Os principais compostos fenólicos encontrados no açaí são antocianinas, principalmente a Cianidina-3-glucosídeo (C3G) e a Cianidina -3-rutinosídeo (C3R) (BICHARA & ROGEZ, H., 2011). Gallori *et al.* (2004)

também relatou a presença de 4 outros principais compostos: orientina, homoorientina e isovitexina, que pertencem ao grupo das flavonas; e taxifolina deoxihexose, que pertence ao grupo flavonol. Pozo-Insfran *et al.* (2004), além de flavonóides, encontraram também diversos ácidos fenólicos na composição do açaí, como os ácidos cafeico, vanílico, ferúlico, e gálico.

A porção de componentes antioxidantes encontrada no açaí é maior do que de outras frutas ou vegetais. Mesmo depois da adição de água à polpa, o potencial antioxidante é maior do que o da polpa pura de outras frutas tropicais, como laranja, limão, abacate, abacaxi e banana (BICHARA & ROGEZ, 2011). No entanto, as propriedades químicas e a composição geral do açaí, incluindo os compostos fenólicos, podem variar dependendo de diversos fatores, como o sistema de cultivo, a técnica de coleta, estágio de maturação, tempo de transporte e processo de limpeza e maceração (CARVALHO *et al.*, 2017; DOMINGUES *et al.*, 2017). A forma mais consumida na região amazônica é a polpa fresca, feita a partir dos frutos batidos com água. Antes de batidos, o frutos podem passar por um processo chamado branqueamento, que consiste em mergulhá-los por cerca de 10 segundos em água quente (~80°C) e logo em seguida em água fria, para reduzir o conteúdo microbiano (BICHARA & ROGEZ, 2011). Nos estados brasileiros fora da região amazônica o açaí é consumido principalmente na forma pasteurizada e congelada, enquanto fora do Brasil o consumo é principalmente do suco ou produtos derivados do suco, como energéticos, suplementos em pó, chás e cápsulas gelatinosas (NOGUEIRA & SANTANA, 2014).

A clarificação é um dos principais processos para a obtenção do suco de açaí, e é de grande importância para o mercado nacional e internacional. O processo de clarificação da polpa envolve microfiltração e centrifugação, retirada de lipídios, fibras, proteínas e sólidos insolúveis. Desta forma, o produto final é um líquido de coloração roxa brilhante e sem turbidez, o que aumenta a aceitabilidade no mercado e o torna um modelo ideal para a avaliação do impacto dos compostos fenólicos (SOUZA-MONTEIRO, *et al.*, 2015), que são os principais componentes bioativos envolvidos nos diversos efeitos benéficos do açaí, devido às suas propriedades antioxidantes.

Explorando os efeitos biológicos do açaí, estudos tem demonstrado que o fruto é um potencial candidato para o tratamento e prevenção de diversas doenças, possuindo propriedades farmacológicas não somente na polpa, mas também nas folhas, no óleo, nas sementes e em porções fracionadas do fruto, que isolam alguns componentes de sua

composição. Os efeitos farmacológicos do açaí incluem efeito anti-inflamatório, antineoplásico, atividades cardioprotetora, antimicrobiana e hepatoprotetora (MAGALHÃES *et al.*, 2020). Tem sido relatado também efeito do açaí contra doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019) e até mesmo propriedades anticonvulsivantes (SOUZA-MONTEIRO, *et al.*, 2015). Outra propriedade interessante é a proteção contra síndromes metabólicas, como lipedema, hipertensão e diabetes (MAGALHÃES *et al.*, 2020), além de demonstrar também efeitos neuroprotetores contra retinopatias em decorrência de diabetes (DE OLIVEIRA *et al.*, 2023).

Com tantos efeitos positivos, era de se esperar que o açaí não causasse efeitos citotóxicos ou genotóxicos, o que de fato já foi evidenciado *in vitro* e *in vivo* (MARQUES *et al.*, 2016, 2017). Na verdade, o açaí possui propriedades citoprotetoras, como demonstrado por Ribeiro *et al* (2010), protegendo as células contra danos causados por medicamentos antitumorais, o que enriquece o seu potencial para uso em pesquisas sobre o câncer.

### 1.3 AÇAÍ E CÂNCER

Os potenciais efeitos antineoplásicos do açaí têm sido estudados tanto *in vivo* quanto *in vitro*, testando-se os diversos componentes do fruto. A literatura demonstra que o açaí é capaz de inibir a carcinogênese *in vivo* em diversos modelos de câncer. Alessandra-Perini *et al.* (2018) relataram que o extrato hidroalcoólico de açaí foi capaz de inibir a tumorigênese causada pelo carcinógeno DMBA (1,3-dimetilbutilamina) em modelo experimental de câncer de mama. Também há diversos trabalhos realizados *in vitro* relatando os efeitos do açaí sobre linhagens de câncer de mama. Hogan *et al.* (2010) testaram o extrato da polpa em células de câncer de mama MDA-468, porém não observaram nenhum efeito nesta linhagem. No entanto, Silva *et al.* (2014) testaram o efeito dos extratos hidroalcoólicos da polpa, da semente e do fruto total em linhagens de câncer colorretal (HT-29 e Caco-2) e câncer de mama (MCF-7) e somente a linhagem MCF-7 apresentou redução de viabilidade. Freitas *et al.*, (2017), também testando extratos de açaí em linhagem MCF-7, observaram ocorrência de morte celular por necroptose, enquanto Silva *et al.*, (2021) demonstraram que o tratamento com extrato do caroço induziu espécies reativas de oxigênio e autofagia na mesma linhagem.

O açaí também possui capacidade de inibir carcinogênese colorretal. Fragoso *et al.*, (2013) observaram atenuação da carcinogênese de cólon induzida por DHZ (1,2-dimetilhidrazina) em ratos alimentados com polpa de açaí. Choi *et al.* (2017) relataram que o açaí inibe a tumorigênese de cólon induzida por azoximetano e sulfato de dextrano sódico, com diminuição do nível de citocinas inflamatórias. Romualdo *et al.* (2015) demonstraram que a polpa possui efeito protetivo desde as fases iniciais da tumorigênese induzida por azoximetano. Segundo Fragoso *et al.* (2018), o extrato de açaí também foi capaz de inibir carcinogênese associada a colite, e os autores demonstraram que uma das antocianinas presentes no extrato (cianidina 3-rutinosídeo) é capaz de inibir a migração *in vitro* em linhagem de câncer de cólon RKO.

Outras linhagens de câncer de cólon também já foram expostas ao extrato de açaí. Dias *et al.* (2014) relataram efeitos antiproliferativos do extrato nas linhagens HT0-29 e SW-480, com atividade pró apoptótica somente na linhagem SW-480, porém apresentando modulação de genes associados a inflamação em ambas as linhagens. Pacheco-Palencia *et al.* (2010) também relataram inibição da proliferação de HT-29 induzida por frações monoméricas de antocianinas da polpa e também misturas polifenólicas do óleo (PACHECO-PALENCIA *et al.*, 2008). Indução de apoptose e parada no ciclo celular foram observados nas linhagens de adenocarcinoma colorretal CACO-2 e HCT-116, induzidas por extratos de açaí (DA SILVA *et al.*, 2023).

Estudos realizados em linhagem de câncer de próstata também apresentaram resultados positivos. O extrato do caroço causou efeitos citotóxicos na linhagem de câncer de próstata LNCaP, com alterações nucleares e mitocondriais, e reduziu citocinas inflamatórias e tamanho tumoral em modelo de carcinoma sólido de Ehrlich em ratos (FILHO *et al.*, 2023). Sibuyi *et al.* (2021) testaram nanopartículas de ouro conjugadas com extrato de açaí e observaram diminuição da viabilidade das células de adenocarcinoma de próstata PC3 e células de câncer de pâncreas Panc-1.

Monge-Fuentes *et al.* (2017) avaliaram o uso de óleo de açaí em nanoemulsão para o tratamento de melanoma em terapia fotodinâmica. Os autores relataram alta morte celular (85%) das células de melanoma em comparação com as células normais, que mantiveram viabilidade alta. A linhagem normal testada foi B16F10. No mesmo estudo, os autores também observaram redução do tamanho tumoral de 82% em um modelo de melanoma *in vivo*, comparado com o controle. Em linhagem de leucemia HL-60 polifenóis do açaí induziram apoptose por meio de ativação de caspase-3 (DEL POZO-

INSFRAN *et al.*, 2006). Ratos alimentados com polpa de açaí apresentaram inibição de carcinogênese na bexiga urinária induzida por N-butil-N-(4-hidroxiutil)-nitrosamina (BBN) e N-metil-N-nitrosourea (MNU) (FRAGOSO *et al.*, 2012). Stoner *et al.*, (2010) relataram que o açaí protegeu contra a indução de câncer esofágico em ratos, causada por N-nitrosometilbenzilamina. Martinez *et al.* (2018), testando extrato do caroço em linhagem de carcinoma pulmonar humano A549, observaram indução de apoptose e parada no ciclo celular.

Apesar dos diversos trabalhos já realizados avaliando os efeitos anticâncer do açaí em várias linhagens celulares, há uma lacuna quando se trata de câncer gástrico. Em uma busca no PubMed pelas palavras chave “câncer gástrico” e “*Euterpe oleracea*”, apenas um artigo se enquadra, em que os autores avaliaram os efeitos do açaí na tumorigênese induzida por *Helicobacter felis* em ratos. O açaí não foi capaz de prevenir o processo carcinogênico (LEE, J. Y. *et al.*, 2016). Esta escassez de estudos com a temática do câncer gástrico e açaí chama atenção para a necessidade de mais conhecimento sobre esta problemática.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* os efeitos genotóxicos e citotóxicos do extrato do açáí (*Euterpe oleracea*) clarificado na linhagem neoplásica AGP01 e comparar estes efeitos aos observados na linhagem não neoplásica VERO.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

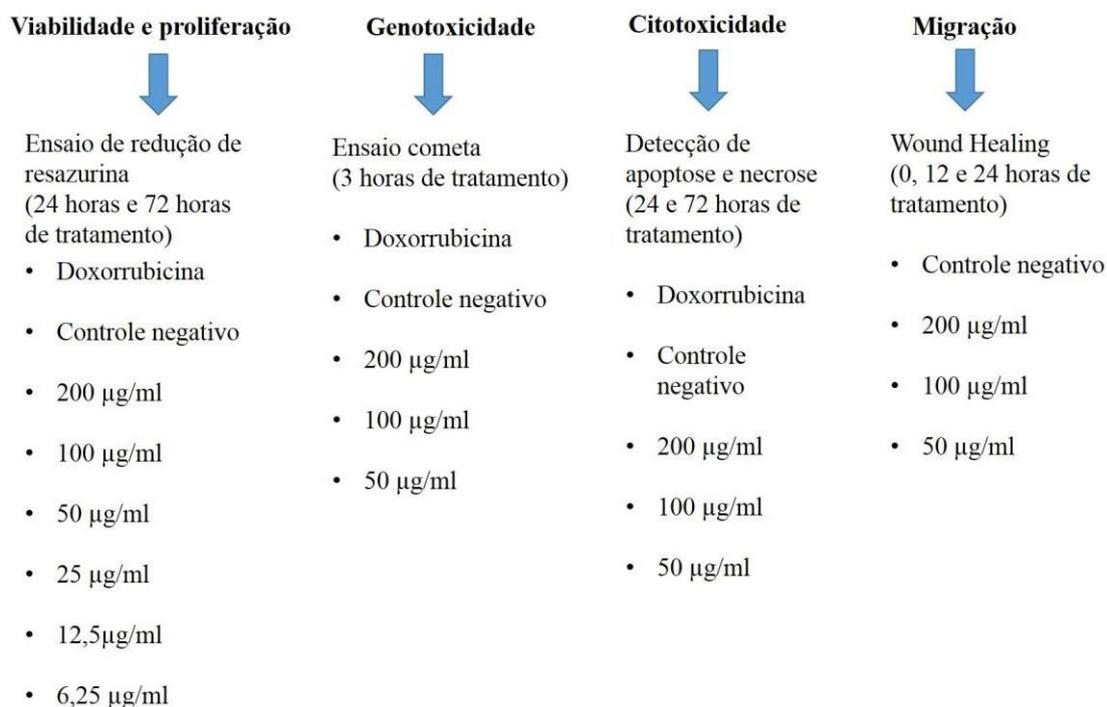
- Avaliar a viabilidade celular das linhagens VERO e AGP01 expostas ao AC.
- Determinar o índice de dano ao DNA induzido pelo AC nas linhagens VERO e AGP01.
- Quantificar a quantidade de células em apoptose e necrose induzida pelo AC nas linhagens VERO e AGP01.
- Verificar o efeito do AC sobre a migração das linhagens VERO e AGP01.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a avaliação *in vitro* dos efeitos do extrato do açaí clarificado foram definidos os grupos de tratamento a partir do ensaio de redução de resazurina, em que o extrato foi testado nas seguintes concentrações: 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml

Para os demais ensaios, os grupos de tratamento com o extrato foram somente 50 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml. Estas concentrações foram selecionadas a partir dos resultados do ensaio de viabilidade. Em todos os experimentos foi utilizado também um controle negativo em que as células foram tratadas somente com meio de cultura. Foi também utilizado um tratamento controle positivo com doxorrubicina em todos os experimentos, com exceção do ensaio *Wound Healing*. Os grupos de tratamento para cada ensaio estão ilustrados no esquema a seguir (figura 2).



**FIGURA 2:** Delineamento experimental dos ensaios para avaliação do efeito do extrato de açaí clarificado sobre as linhagens VERO e AGP01. Os mesmos ensaios foram realizados para as duas linhagens com os mesmos grupos de tratamento em pelo menos 3 experimentos independentes.

### 3.2 CULTIVO DAS LINHAGENS CELULARES

A linhagem VERO (YASUMURA & KAWAKITA, 1963), obtida a partir de epitélio renal de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), foi obtida do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem de adenocarcinoma gástrico metastático AGP01 (LEAL *et al.*, 2009), obtida de fluido ascítico de um paciente masculino de 55 anos do hospital universitário João de Barros Barreto (HUIBB), foi estabelecida pelo Laboratório de Citogenética Humana e Genética Toxicológica (LCH-UFPA) e pelo Laboratório de Neuroquímica Celular e Molecular (LNMC). Ambas as linhagens estavam armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  no laboratório multiusuário do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da UFPA (PPGNBC-UFPA).

Os criotubos para congelamento continham 1 ml de suspensão celular na densidade de  $10^6$  células/ml. A solução de congelamento utilizada é composta por 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido) e 90% de soro bovino fetal (SBF). O conteúdo das ampolas foi descongelado em temperatura ambiente e adicionado a 10 ml de meio de cultura DMEM suplementado com 15% de SBF e pH entre 7.2 e 7.4, acrescido dos antibióticos penicilina/estreptomicina (100U/mL/100 $\mu\text{g}$ /ml) e ciprofloxacina (20 $\mu\text{g}$ /ml) e mantido em garrafas de cultura de 25cm<sup>2</sup> de área. As garrafas foram mantidas em estufa incubadora com atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura 37° C. O meio de cultura foi trocado no dia seguinte ao congelamento para retirada do DMSO da solução de congelamento. Subcultivos foram realizados cerca de 2 a 3 vezes por semana de acordo com as necessidades das linhagens e seguindo os protocolos de cultivo celular do LCH-UFPA.

### 3.3 EXTRATO DO AÇAÍ CLARIFICADO

O extrato de açaí clarificado utilizado neste trabalho foi cedido pela Amazon Dreams (Belém – Pará – Brasil). O processo de produção do suco foi licenciado pela empresa e pela Universidade federal do Pará (PI 8 1003060-3) e inclui a microfiltração e centrifugação do fruto fresco. A quantificação dos principais compostos fenólicos presentes no açaí clarificado foi realizada pelo método UHPLC-DAD (DIAS *et al.*, 2013; DIAS *et al.*, 2012), e identificou 5 principais componentes, listados na tabela a seguir.

Tabela 1. Principais compostos fenólicos no açáí clarificado

Composto fenólico	quantidade (mg/l)	quantidade (%)
Cianidina 3-rutinosideo	448	63,9%*
Cianidina 3-glucosideo	184	26,2%*
Taxifolina deoxihexose	308	18,5%**
Orientina	381	22,9%**
Homoorientina	247	14,8%**

\*das antocianinas totais; \*\*do total de polifenóis.

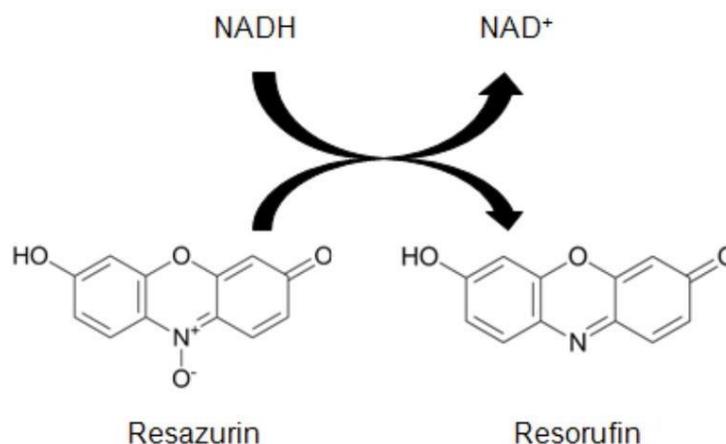
### 3.4 VIABILIDADE CELULAR: ENSAIO DE REDUÇÃO DE RESAZURINA

#### 3.4.1 Princípio da técnica

Ensaio baseado em atividade metabólica são amplamente utilizados para estimar número de células viáveis em placas de cultivo celular de múltiplos poços, possibilitando testagem de diversas substâncias em período de tempo relativamente curto, podendo determinar se os componentes testados possuem algum efeito direto sobre a proliferação celular ou mesmo efeitos citotóxicos, que levam a morte celular (RISS *et al.*, 2013). Estes métodos se baseiam principalmente na atividade de oxirredução realizadas por enzimas mitocondriais. Como exemplo de testes de atividade metabólica, podemos citar os ensaios de sais de tetrazólio (MTT, MTS, XTT, WSTs) e Alamar Blue, que é uma das mais referenciadas substâncias em citotoxicidade e viabilidade (RAMBERSAD, 2012) podendo inclusive ser utilizado para proliferação (ANSAR AHMED *et al.*, 1994).

AlamarBlue™ (Biosource, Camarillo, CA, USA) possui como principal componente ativo a resazurina (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide). Estudos comparativos entre o Alamar Blue™ e resazurina confirmam eficácia, sensibilidade e confiabilidade equivalentes (BORRA *et al.*, 2009). Resazurina é solúvel em soluções aquosas e tampões fisiológicos. Sua solubilização resulta em um líquido de coloração azul profundo, podendo ser adicionada diretamente a culturas celulares e não possui toxicidade. As células com metabolismo ativo podem reduzir a resazurina, convertendo-a em resorufina (7-hydroxyphenoxazin-3-one), uma substância de coloração rosa e altamente fluorescente, solúvel em solução aquosa e também não citotóxica. A conversão

de resazurina em resorufina é proporcional à quantidade de células viáveis. A conversão é feita por enzimas redutases mitocondriais e uma das vantagens sobre o MTT é que a resazurina também pode ser reduzida por citocromos (RAMBERSAD, 2012).



**FIGURA 3** conversão de resazurina (resazurina), de coloração azul, não fluorescente em resorufina (resorufin) de coloração rosa, altamente fluorescente. Fonte: (RISS *et al.*, 2013).

A quantificação da redução de resazurina pode ser feita de forma colorimétrica, medindo-se a diferença entre as absorvâncias do comprimento de onda da resazurina (600 nm) e da resorufina (570 nm) porém a leitura no espectrômetro de fluorescência é muito mais sensível do que a leitura colorimétrica. Os parâmetros para leitura fluorimétrica são 560 nm excitação / 590 nm emissão.

### 3.4.2 Procedimento experimental

Para realização deste ensaio as duas linhagens celulares foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços na quantidade  $2 \times 10^3$  células/poço, incubadas por 24 horas para adesão. Passadas 24 horas, foi realizado o tratamento em triplicata com um controle negativo (somente DMEM) um controle positivo (doxorubicina  $0,5 \mu\text{M}$ ) e 6 concentrações do extrato de AC obtidas por diluição seriada em DMEM (200; 100; 50; 25; 12,5 e  $6,25 \mu\text{g/ml}$ ). Os tempos de tratamento foram 24 e 72 horas.

Após os tempos totais de tratamento, o meio de tratamento foi retirado de todos os poços e foi adicionada solução de resazurina na concentração de  $0,3 \text{ mM}$  nos poços tratados e também em poços na total ausência de células, com objetivo de obter os valores

de fluorescência de background. As placas foram incubadas novamente por 3 horas e, após o período de incubação, foi realizada a leitura em espectrofotometria de fluorescência nos comprimentos de onda 560 nm para excitação e 590 nm emissão.

Os valores obtidos por meio da leitura no espectrofotômetro de fluorescência são expressos em URF (unidades relativas de fluorescência). Foi calculada a média de fluorescência de background (a partir dos poços sem células) e este valor foi subtraído de todos valores obtidos nos poços tratados tanto dos controles (negativo e positivo) quanto dos tratamentos com o extrato. Os valores foram convertidos em percentual, considerando como 100% os valores dos controles negativos.

### 3.5 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE: ENSAIO COMETA

#### 3.5.1 Princípio da técnica

Genotoxicidade é a capacidade de agentes físicos ou químicos (orgânicos ou inorgânicos) de causar alterações no DNA, sejam estas estruturais ou funcionais. Os danos ao DNA são chamados de danos genotóxicos. Quando estas alterações se fixam de forma capaz de ser transmitida aos descendentes, são consideradas alterações mutagênicas. Uma das formas mais comuns de danos ao DNA é a fragmentação da macromolécula. O ensaio cometa, também conhecido como eletroforese em gel de células individuais, é um ensaio de genotoxicidade capaz de detectar fragmentação do DNA, seja de fita simples ou de fita dupla, causadas por danos oxidativos ou ligações cruzadas.

Primeiramente relatada por Ostling & Johanson (1984), a técnica sofreu modificações e adaptações para a forma mais utilizada atualmente (ANDERSON, 1996; SINGH *et al.*, 1988). A técnica pode ser realizada potencialmente em qualquer célula eucariótica nucleada. Primeiramente, as células devem ser embebidas em gel de agarose e sofrer lise em solução contendo detergentes e solventes para romper e dissolver as organelas membranosas, principalmente a membrana plasmática e a carioteca, em alta concentração de sais para extração de nucleoproteínas. Este processo resulta em uma estrutura formada por cromatina altamente condensada e enovelada, denominada nucleóide, localizada no mesmo lugar onde antes havia o núcleo (KOPPEN *et al.*, 2018; LORENZO *et al.*, 2013).

Os nucleóides em gel de agarose devem passar por uma eletroforese em tampão alcalino em baixa temperatura. O tampão altamente alcalino promove afrouxamento das

alças e exposição de sítios álcali-lábeis na cromatina, e a eletroforese cria um campo elétrico que induz a migração da molécula de DNA, que possui carga negativa, em direção ao polo positivo da eletroforese (ânodo). Quanto maior a fragmentação no DNA do nucleóide, maior será a distância percorrida e espalhamento dos fragmentos no gel, devido à menor massa dos fragmentos pequenos e maior relaxamento das alças devido à alta fragmentação. A migração do DNA dos nucleóides após eletroforese pode ser observada em microscópio por meio de coloração com corantes fluorescentes. Quando há danos, possuem uma aparência semelhante a um cometa. Podem ser classificados em diferentes níveis de danos, considerando tamanho, forma e intensidade de brilho da cauda do cometa.

### **3.5.2 Procedimento experimental**

Para realização do Ensaio Cometa, as linhagens VERO e AGP01 foram semeadas em placas de cultivo de 12 poços, na quantidade  $1,8 \times 10^5$  células/poço e incubadas durante 24 horas até o tratamento. Após este período, o meio de cultura foi retirado, os poços foram lavados com solução PBS a 37°C e foi adicionado o tratamento com 3 concentrações de extrato de AC (50, 100 e 200 µg/ml), além de um controle negativo somente com DMEM e um controle positivo com solução de doxorrubicina a 2 µM. A concentração de doxorrubicina foi maior no ensaio cometa em comparação com os outros ensaios realizados (redução de resazurina e citotoxicidade com corantes fluorescentes) devido ao menor tempo de tratamento.

Após 3 horas de tratamento, as soluções foram todas retiradas e os poços foram lavados com PBS. Após a lavagem, foram obtidas as suspensões celulares por meio de adição de Tripsina/EDTA, incubação na estufa de CO<sub>2</sub> por 5 minutos e adição de DMEM suplementado com SBF para inativação da tripsina. As suspensões foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos e mantidas em baixa temperatura em um recipiente com gelo e baixa luminosidade. A maior parte do sobrenadante foi retirada após a centrifugação e cerca de 20 µL da suspensão celular concentrada foi homogeneizada com 300 µL de agarose de baixo ponto de fusão a aproximadamente 37°C. Esta mistura foi adicionada a lâminas previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal, na quantidade aproximada de 100 µL para cada lâmina, sendo 3 lâminas para cada grupo de tratamento em cada experimento.

As lâminas contendo as suspensões celulares homogeneizadas em gel de agarose foram cobertas com lamínulas e levadas à geladeira por 10 minutos para solidificação da agarose. As lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas foram mergulhadas em posição vertical em uma solução de lise (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, Triton X-100 1%, DMSO 10%; pH 10) a 4°C protegidas da luz e permaneceram desta forma por aproximadamente 72 horas para completar a etapa de lise.

Após a etapa de lise, as lâminas foram cuidadosamente retiradas da solução de lise e dispostas, horizontalmente, em cuba de eletroforese imersas em solução tampão de eletroforese (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM; pH ≥13) a 4°C, por 20 minutos, para permitir desenovelamento e afrouxamento das alças de DNA e exposição de sítios álcali-lábeis. Após este período, foi conduzida a eletroforese a 34V e 300mA por 20 minutos e baixa luminosidade. Após a eletroforese, as lâminas foram imersas rapidamente em água destilada gelada para retirada da solução de eletroforese e, em seguida, imersas novamente em água destilada gelada por 5 minutos para neutralização. Após a neutralização, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 3 minutos, secas em temperatura ambiente e armazenadas para análise sob abrigo da luz.

As lâminas foram coradas com 50 µL de solução de brometo de etídio na concentração 0,2 µg/ml e observadas em microscópio óptico de fluorescência, com filtro 516-560 nm, barreira de filtro 590 nm e aumento de 400x. Os nucleóides foram classificados em 5 classes, de acordo com a extensão e formato da cauda. As categorias são enumeradas de 0 a 4. A classe 0 representa uma célula normal considerada sem danos (<5%); a classe 1, baixo nível de danos (5-20%); a classe 2, nível médio de danos (20-40%); a classe 3, alto nível de danos (40-95%) e a classe 4 seria uma célula com dano total (>95%).

Foram analisados 100 nucleóides por grupo de tratamento. Após a contagem dos nucleóides categorizados em cada classe, foi calculado o índice de dano nuclear (IDN) a partir da fórmula a seguir (Figura 4) em 3 experimentos independentes.

$$IDN = \frac{(n^{\circ}cel \text{ classe } 0 \times 0 + n^{\circ}cel \text{ classe } 1 \times 1 + n^{\circ}cel \text{ classe } 2 \times 2 + n^{\circ}cel \text{ classe } 3 \times 3 + n^{\circ}cel \text{ classe } 4 \times 4)}{n^{\circ}cel \text{ analisadas}}$$

**FIGURA 4** – Fórmula para obtenção do índice de dano nuclear (IDN) calculado a partir do número de nucleóides obtidos de cada classe de danos. Fonte: Singh *et al.*, 1988.

## 3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO: PADRÃO DE MORTE CELULAR POR MEIO DE CORANTES FLUORESCENTES DIFERENCIAIS

### 3.6.1 Princípio da técnica

Células em processo de morte celular apresentam características que as distinguem das células viáveis. Observando os aspectos morfológicos com o auxílio de corantes fluorescentes é possível fazer a identificação do tipo de morte. As membranas celulares são permeáveis ao corante bisbenzidina Hoechst 33342 (HO), que entra no núcleo e se une às ligações adenina-timina e emite fluorescência azul, permitindo a visualização da cromatina. Já o corante iodeto de propídio (IP) não passa pela membrana intacta de células viáveis, sendo incorporado somente pelas células que perderam a integridade da membrana. Devido a isso, a presença da coloração vermelha do IP indica um evento de morte celular. O corante Fluoresceína Diacetato (DAF) cora em verde o citoplasma de células com membrana plasmática intacta (RELLO *et al.*, 2005).

Por meio da associação destes 3 corantes pode-se identificar células viáveis, com citoplasma corado em verde pelo DAF e núcleo azul corado pelo HO. As células apoptóticas também são coradas em verde pelo DAF, porém com o núcleo fragmentado ou altamente compactado, com cromatina condensada. Também podem apresentar projeções citoplasmáticas (blebs) e corpos apoptóticos. Em fases tardias de apoptose, pode ocorrer absorção de IP, corando as células apoptóticas em vermelho. As células necróticas são uniformemente coradas em vermelho pelo IP e sem os aspectos nucleares característicos de apoptose.

### 3.6.2 Procedimento experimental

Para a realização do ensaio de Padrão de Morte Celular por meio de corantes fluorescentes diferenciais, as duas linhagens foram semeadas na quantidade  $10^5$  células/poço para o tempo de tratamento de 24 horas e  $5 \times 10^4$  células/poço para o tratamento de 72 horas em placas de 12 poços. Após 24h da semeadura, foi realizado o tratamento com 200, 100 e 50  $\mu\text{g/ml}$  de AC, além de um controle negativo somente com DMEM e um controle positivo com 0,5  $\mu\text{M}$  de Doxorubicina.

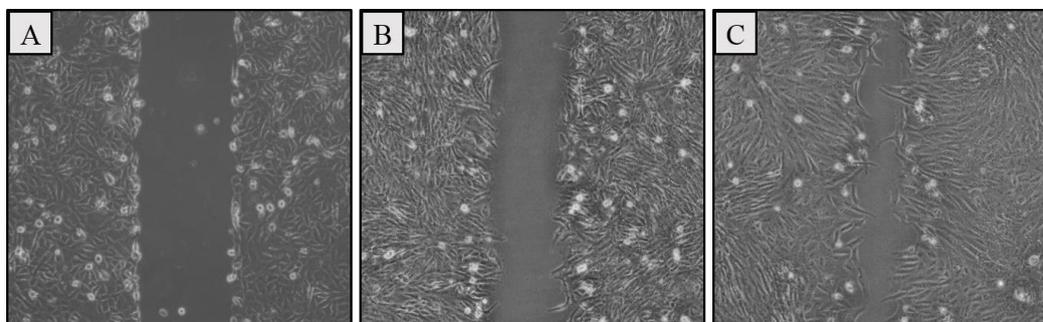
Ao final dos tempos de tratamento, todo o conteúdo dos poços foi coletado em tubos de centrifugação, incluindo as células em suspensão. As células aderidas foram desagregadas com tripsina e a enzima foi inativada com DMEM suplementado. Os tubos

foram centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, deixando aproximadamente 100  $\mu$ L para ressuspensão. Em seguida foi adicionado 4  $\mu$ L da solução de corantes fluorescentes previamente preparada (25  $\mu$ L de IP a 1mg/ml diluído em água destilada + 50  $\mu$ L de DAF a 1,5 mg/mL diluído em DMSO + 10  $\mu$ L de HO a 1mg/mL diluído em água destilada + 15  $\mu$ L de PBS pH= 7.2) e os tubos foram levados à incubadora por 5 minutos para captação dos corantes pelas células. Após este período, as suspensões celulares coradas foram transferidas para lâminas e cobertas com lamínulas para análise em microscópio fluorescente equipado com filtro triplo. Foram analisadas 300 células por grupo de tratamento em cada experimento. As células foram classificadas, por meio da coloração e morfologia, em viáveis, necróticas e apoptóticas. Foram realizados 3 experimentos independentes.

### 3.7 AVALIAÇÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR: ENSAIO *WOUND HEALING*

#### 3.7.1 Princípio da técnica

O ensaio de migração por cicatrização, também conhecido como *ensaio de ranhura* ou ensaio *Wound Healing* é uma técnica padrão para avaliação da atividade migratória coletiva de uma monocamada celular *in vitro*, podendo ser adaptado de várias formas de acordo com os objetivos de estudo (ALMEIDA, V. M. *et al.*, 2019; JONKMAN *et al.*, 2014). De forma geral, consiste em uma descontinuidade em uma monocamada homogênea confluenta, que deve ser acompanhada e fotografada em intervalos regulares para posterior quantificação do fechamento da lesão (Figura 5) que ocorre devido ao movimento orientado das células em direção à área da ranhura (JONKMAN *et al.*, 2014; MARTIN; PARKHURST, 2004).

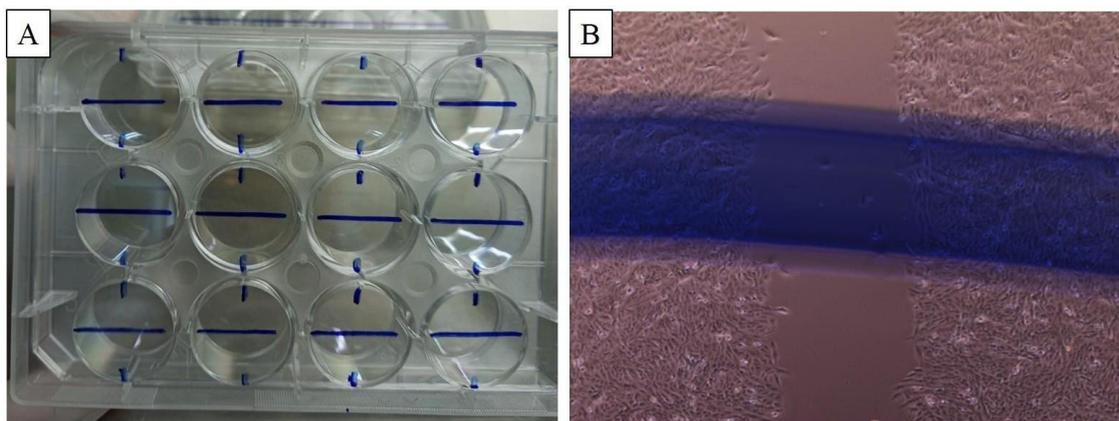


**FIGURA 5:** Ranhura em uma monocamada celular confluenta. A mesma região inicial da ranhura é fotografada em intervalos regulares para mensurar a cicatrização devido à migração. A: 0h. B: 12h. C: 24h. Fonte: acervo do autor.

### 3.7.2 Procedimento experimental

Para realização do ensaio de migração *Wound Healing*, foram semeadas  $2 \times 10^5$  células em placas de cultivo de 12 poços. As placas foram incubadas em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ . Após 24h da semeadura, foi feita uma lesão vertical contínua em todos os poços utilizando micropipeta com ponteira de 200 microlitros. Após a lesão, os poços foram lavados cuidadosamente duas vezes com DMEM sem SBF, com o objetivo retirar as células que ficam em suspensão devido à raspagem. Após a lavagem, foi realizado o tratamento em triplicata com as concentrações de AC (50, 100 e 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e um controle negativo somente com DMEM.

Este ensaio foi realizado com suplementação de 5% de SBF para todos os tratamentos e tempo total de 24 horas, pois o objetivo é evidenciar a movimentação das células já existentes e sem influência da replicação celular. A captura das imagens foi feita no invertoscópio EVOS XL® no tempo inicial do tratamento (0h), após 12 horas e após 24 horas, sempre na mesma região de cada poço. Para encontrar a mesma região a ser acompanhada ao longo do ensaio, foi feita uma marcação horizontal com caneta permanente abaixo de cada poço e foi selecionada a região imediatamente acima ou abaixo da marcação, que é facilmente visível em invertoscópio (Figura 6).



**FIGURA 6:** Marcações feitas com caneta permanente em baixo dos poços na placa de 12 poços (A). Visão da marcação em invertoscópio (B). A imagem a ser capturada para análise é da área imediatamente abaixo ou imediatamente acima da linha azul.

As imagens capturadas em todos os tempos de tratamento (0, 12 e 24h) foram processadas medidas pelo programa Image J para detectar automaticamente a área das

lesões, seguindo o protocolo recomendado por Treloar & Simpson (2013). Foram realizados 4 experimentos independentes, com triplicata.

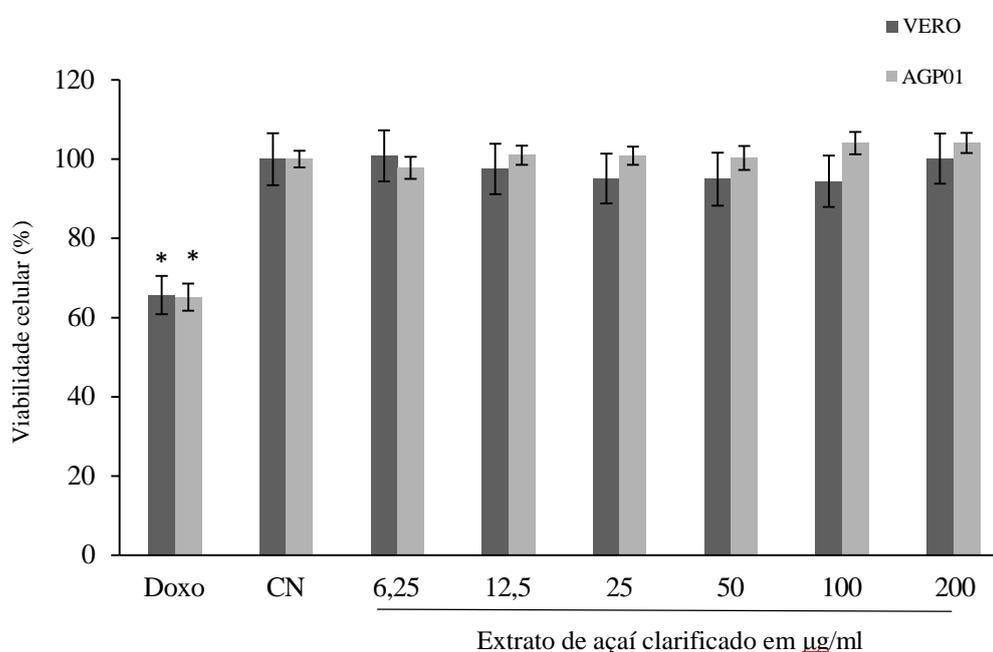
### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As médias de 3 experimentos independentes entre os grupos no ensaio de Redução de Resazurina, ensaio Cometa e Avaliação de Citotoxicidade por Corantes Fluorescentes Diferenciais foram comparadas por análise de variância (ANOVA) no programa GraphPad Prism 5.00, seguidas de pós teste Tukey HSD. As médias de 4 experimentos independentes, com triplicatas, do ensaio de migração *Wound Healing* foram comparadas por ANOVA 2-way, seguidas por pós teste Bonferroni no programa GraphPad Prism 5.00. O nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) foi adotado para todos os ensaios. Os dados são apresentados com média e erro padrão.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 VIABILIDADE CELULAR: ENSAIO DE REDUÇÃO DE RESAZURINA

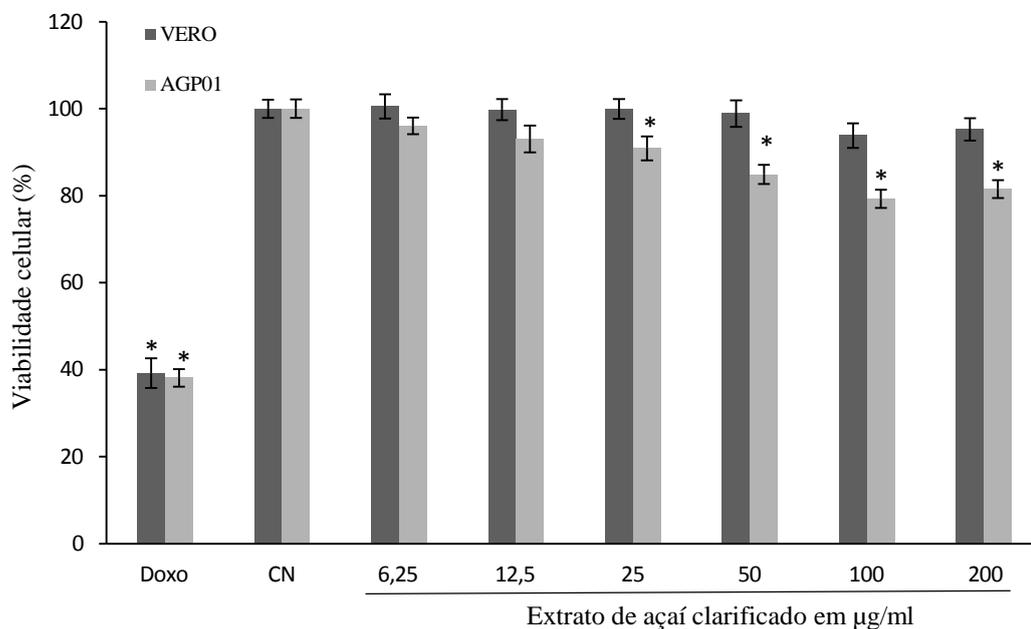
Os resultados do ensaio de redução de resazurina, após 24 horas de tratamento com AC, mostraram que não houve diferenças na viabilidade para ambas as linhagens ( $p < 0,05$ ) em comparação com os controles negativos (figura 7). No entanto, nos grupos controle positivo, tratados com doxorrubicina, houve redução significativa da viabilidade. A linhagem VERO reduziu para 65,7% e a AGP01 para 65,2% ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo.



**FIGURA 7:** Efeito do extrato de açaí clarificado sobre a viabilidade das linhagem VERO e AGP01 expostas durante 24h. Não houve diferença significativa entre as duas linhagens. \* $p < 0,05$  em relação aos respectivos controles negativos. Doxo: doxorrubicina 0,5 $\mu\text{M}$ . CN: controle negativo. Gráfico representa dados de 3 experimentos independentes, com triplicata.

Para o tratamento de 72h, houve redução de viabilidade da linhagem AGP01 a partir da concentração de 25  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ) em comparação ao controle negativo. Os percentuais de viabilidade celular foram 96,04; 93,03; 90,9; 84,9; 79,27 e 81,5 % para as concentrações 6.25; 12.5; 25; 50; 100 e 200  $\mu\text{g/ml}$  de AC, respectivamente. A viabilidade das células VERO tratadas com doxorrubicina em 72h foi 39,19%, significativamente

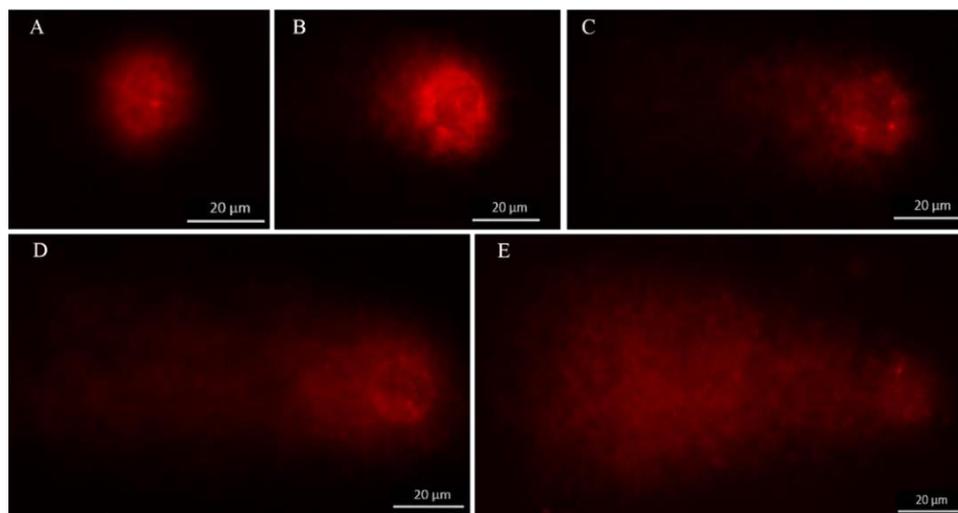
menor que o controle negativo (100%) ( $p < 0,05$ ). Porém o tratamento com o AC não teve nenhum efeito significativo sobre a linhagem VERO ( $p > 0,05$ ) (Figura 8).



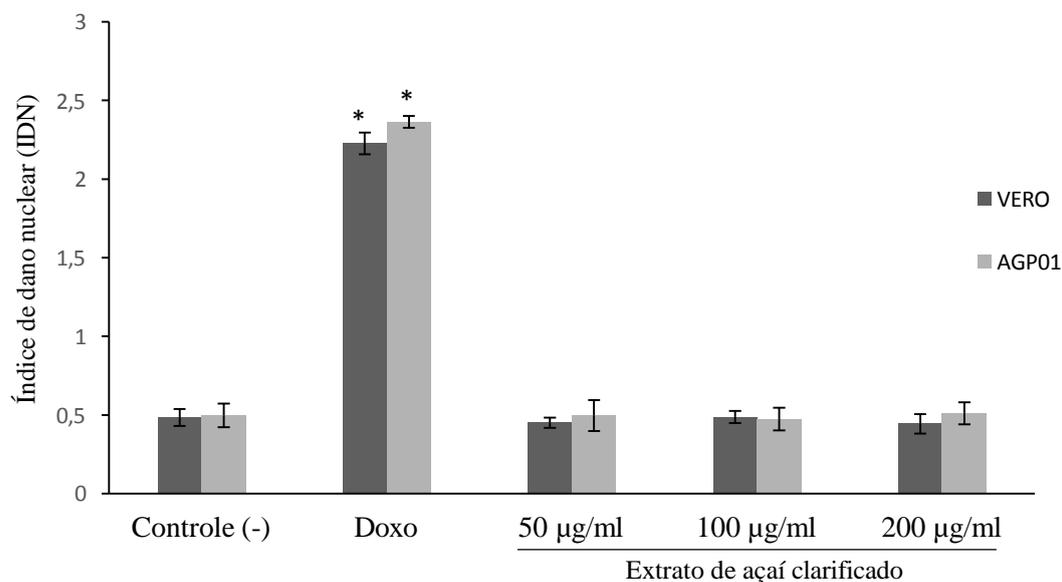
**FIGURA 8:** Efeito do extrato de açaí clarificado sobre a viabilidade das linhagem VERO e AGP01 expostas durante 72h. \* $p < 0,05$  em comparação com os respectivos controles negativos. Doxo: doxorubicina 0,5µM. CN: controle negativo. Gráfico representa dados de 3 experimentos independentes, com triplicata.

#### 4.2 ENSAIO COMETA

O extrato do AC não causou danos genotóxicos detectáveis pelo ensaio cometa em nenhuma das concentrações testadas nas duas linhagens celulares ( $p > 0,05$ ). A doxorubicina aumentou significativamente o IDN para ambas as linhagens: 2,22 para VERO e 2,36 para AGP01, em comparação com os respectivos controles negativos: 0,48 e 0,49. Todos os grupos tratados com AC nas duas linhagens tiveram IDN estatisticamente semelhantes aos controles negativos. A figura 9 mostra a representação do padrão de scores utilizado como parâmetro para a obtenção dos índices de dano obtidos da linhagem AGP01. A linhagem VERO apresenta o mesmo padrão de score visual. A figura 10 mostra todos os índices de dano obtidos para todos os grupos tratados.



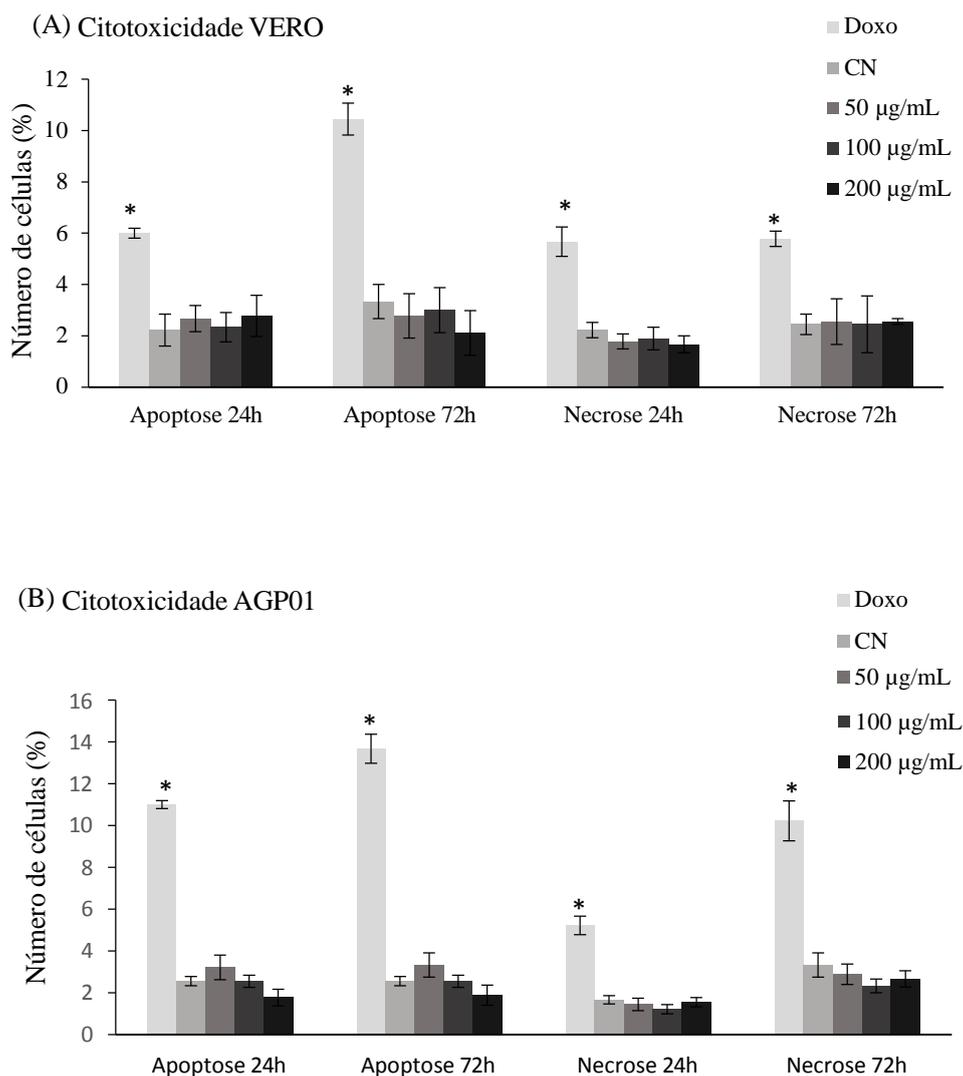
**FIGURA 9:** Classificação visual dos nucleóides em diferentes classes de dano no ensaio cometa. A: classe 0, considerada sem danos (<5%). B: Classe 1, baixo nível de danos (5-20%). C: classe 2, nível médio de danos (20-40%). D: classe 3, alto nível de danos (40-95%). Classe 4: dano total (>95%). Linhagem celular AGP01.



**FIGURA 10:** Avaliação do potencial genotóxico do extrato de açaí clarificado nas linhagens celulares VERO e AGP01 expostas durante 3 horas. \* $p < 0,05$  em comparação com o índice dos respectivos controles negativos. Doxo: doxorubicina 2  $\mu\text{M}$ . CN: controle negativo. Gráfico representa dados de 3 experimentos independentes.

### 4.3 AVALIAÇÃO DE POTENCIAL CITOTÓXICO: PADRÃO DE MORTE CELULAR POR MEIO DE CORANTES FLUORESCENTES DIFERENCIAIS

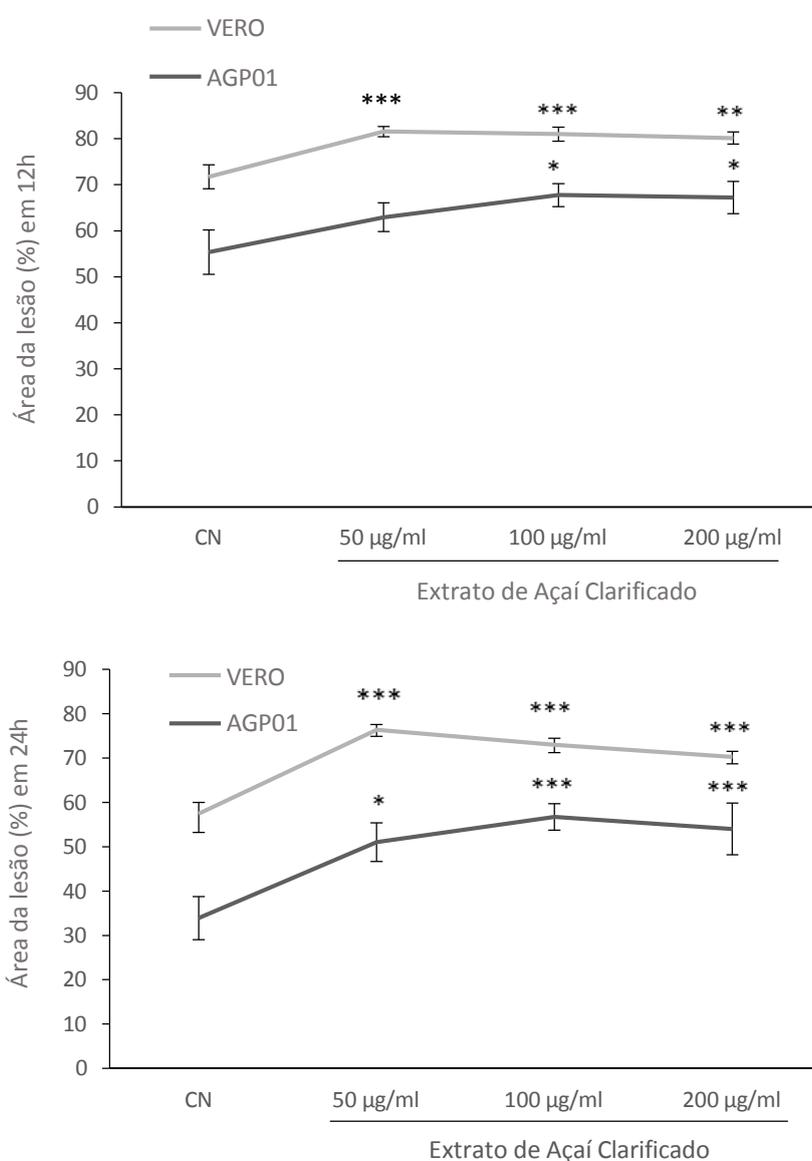
Nas condições avaliadas, o extrato do açaí clarificado não induziu morte celular por apoptose ou necrose em nenhuma das linhagens ( $p > 0,05$ ). A figura 11 mostra o resultado do padrão de morte para as linhagens VERO (A) e AGP01 (B). Doxorrubicina induziu apoptose e necrose significativamente para as duas linhagens ( $p < 0,05$ ) comparada com os respectivos controles negativos.



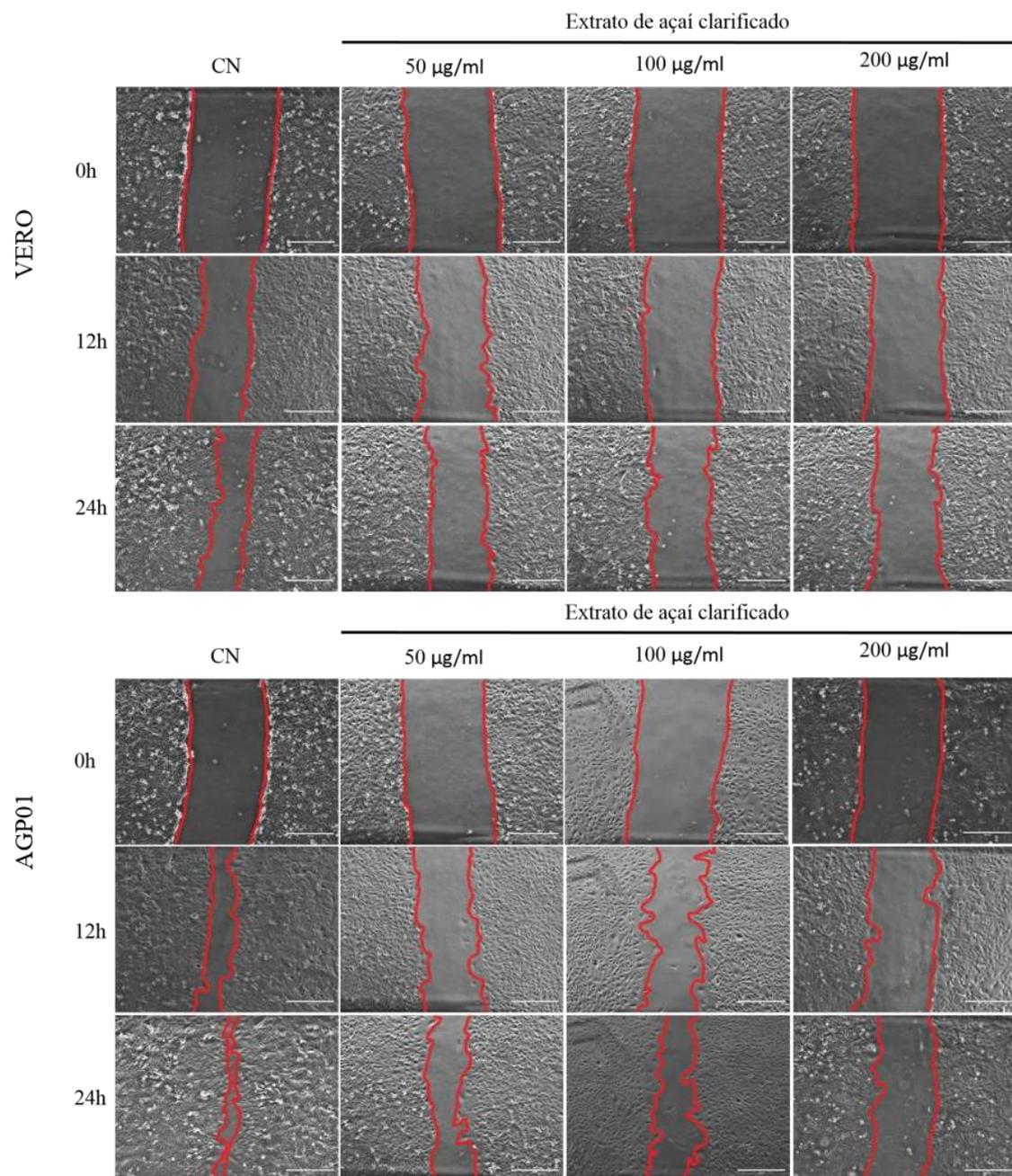
**FIGURA 11:** Avaliação do potencial citotóxico do extrato do açaí clarificado por meio de corantes fluorescentes diferenciais na linhagem não neoplásica VERO (A) e na linhagem neoplásica AGP01 (B). \* $p < 0,05$  em comparação com os respectivos controles negativos. CN: controle negativo. Gráficos representam dados de 3 experimentos independentes.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR: ENSAIO *WOUND HEALING*

O efeito anti-migratório do açaí clarificado foi observado em ambas as linhagens. Para a linhagem VERO, este efeito foi significativo ( $p < 0,05$ ) em todas as concentrações avaliadas e em ambos os tempos de tratamento (12 e 24h) quando comparado com o controle negativo (figura 10). Para a linhagem AGP01, em 12h de tratamento, o efeito anti-migratório foi observado somente nas duas maiores concentrações (100 e 200  $\mu\text{g/ml}$ ). Porém, todas as concentrações inibiram significativamente a migração em 24h de tratamento, comparadas com o controle negativo (figura 12). O perfil migratório das duas linhagens é mostrado na figura 13.



**FIGURA 12:** Avaliação do potencial migratório das linhagem VERO e AGP01 expostas ao extrato do açaí clarificado por meio do ensaio *Wound Healing*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em comparação com o respectivo controle negativo. CN: controle negativo. Gráfico representa média e erro padrão de 4 experimentos independentes.



**FIGURA 13:** Fotomicrografias do ensaio *Wound Healing* apresentando a área das lesões captadas nos diferentes tempos de tratamento nas linhagens VERO e AGP01. O limite entre a monocamada e a área da lesão está marcado em vermelho.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados do Ensaio de Redução de Resazurina mostraram que o AC não apresentou nenhum efeito sobre a viabilidade da linhagem VERO em nenhum dos tempos de tratamento (figuras 6 e 7). Não encontramos na literatura nenhum trabalho que tenha avaliado os efeitos do açaí em células VERO, no entanto há trabalhos que demonstram a ausência de citotoxicidade de extratos de açaí contra células não tumorais. Marques *et al.* (2017), em estudo avaliando o efeito do óleo da polpa do açaí, não observaram nenhuma alteração na viabilidade de linfócitos humanos. Da mesma forma, Arrifano *et al.* (2018), avaliando o mesmo extrato utilizado no presente trabalho (açaí clarificado), não observaram alteração na viabilidade em cultura de neurônios corticais. Porém, quando se trata de células tumorais, a literatura relata efeitos citotóxicos de diferentes extratos de açaí em algumas linhagens, como veremos adiante.

Apesar de o AC não ter demonstrado nenhum efeito em células VERO, ele reduziu significativamente a viabilidade da linhagem AGP01 em 72h de tratamento, a partir da concentração de 25 µg/mL (figura 7). Embora o efeito tenha sido significativo, o menor valor de viabilidade obtido foi de 79,27%, na concentração de 100 µg/mL, uma redução de apenas 20,73%. Desta forma, não foi possível obter uma IC50. Até o presente momento, não há nenhum outro trabalho publicado que tenha testado efeitos de algum extrato de açaí sobre uma linhagem de câncer gástrico. No entanto, há relatos de atividade antineoplásica do açaí contra outros tipos de câncer. Jobim *et al.* (2019) avaliaram o efeito do extrato hidroalcoólico do açaí na linhagem de câncer de próstata DU-145. Os autores testaram concentrações entre 1 e 1000 µg/mL. Em 48 e 72 horas de tratamento, todas as concentrações testadas causaram diminuição significativa na viabilidade. Silva *et al.* (2014) testaram extratos hidroalcoólicos da polpa e da semente do açaí em linhagens de câncer de mama e câncer colorretal. Os autores observaram efeitos somente no tratamento com o extrato da semente e apenas na linhagem de câncer de mama (MCF-7), que apresentou redução significativa da viabilidade. Da Silva *et al.* (2023) também não observaram efeitos do extrato hidroalcoólico da semente sobre linhagens de câncer colorretal (HT-29, Caco-2 e HCT-116). Porém, quando testaram o óleo da semente, observaram redução da viabilidade nas três linhagens. Martinez *et al.* (2018), testando o extrato da semente, também observaram efeitos sobre células de carcinoma pulmonar humano (A549).

Os efeitos antitumorais dos extratos de açaí, tanto da polpa quanto da semente, se devem principalmente à presença de compostos fenólicos em sua composição. É relatado na literatura que os compostos fenólicos exercem atividade antioxidante em células normais, mas podem agir como pró-oxidantes em células tumorais. A ação pró-oxidante dos compostos fenólicos se baseia na geração de radicais fenoxil ou complexos oxirredutores associados a íons metais de transição, o que gera espécies reativas de oxigênio (ERO), que pode resultar em dano oxidativo (HALLIWELL, 2011). Como as células neoplásicas possuem maior concentração de íons de cobre e maior atividade metabólica do que as células não tumorais, componentes pró-oxidantes elevam os níveis celulares de ERO a níveis citotóxicos nestas células, mas não em células normais (EGHBALIFERIZ & IRANSHAHI, 2016). Este mecanismo pode, possivelmente, explicar as diferenças de viabilidade celular encontradas nas células testadas no presente estudo. No entanto, seriam necessários experimentos de avaliação de estresse oxidativo para confirmar esta hipótese,

Estresse oxidativo pode elevar os níveis de quebra de DNA, detectáveis pelo ensaio cometa, o que pode induzir as células a sofrer apoptose quando não há possibilidade de reparo no DNA fragmentado. Nos nossos resultados da avaliação de genotoxicidade, não houve ação genotóxica do AC detectada pelo ensaio cometa em nenhuma concentração para as duas linhagens testadas (figura 8). Estes resultados estão de acordo com a literatura. Diversos trabalhos demonstram que o açaí não causa efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (MARQUES *et al.*, 2016, 2017; RIBEIRO, J. C. *et al.*, 2010).

Quanto à avaliação de citotoxicidade por corantes fluorescentes, também não observamos morte celular (apoptose ou necrose) causada pelo tratamento com o extrato (figura 9). Em contraste com nossos resultados, Dias *et al.* (2014) observaram indução de apoptose em células de câncer de cólon humanas SW-480 tratadas com açaí clarificado. Da mesma forma, Pozo-Insfran *et al.* (2006) também relataram apoptose causada por polifenóis do açaí, porém em linhagem de leucemia HL-60. Silva *et al.* (2014) também relataram que não houve morte celular por apoptose na linhagem MCF-7 tratada com extrato hidroalcoólico da semente do açaí, porém observou indícios de autofagia em análises morfológicas, o que explicaria a redução da viabilidade desta linhagem. Posteriormente, Freitas *et al.* (2017) também avaliaram o efeito do extrato hidroalcoólico

da semente do açaí em MCF-7 e observaram, além de autofagia, ocorrência de morte celular por necrose.

Compostos fenólicos podem causar danos oxidativos que resultam em autofagia. Autofagia é um processo de autodigestão que objetiva reciclar os nutrientes de componentes danificados nas células, que pode ser uma resposta a diversas condições de estresse. Em células tumorais, espécies reativas de oxigênio podem induzir autofagia via estresse oxidativo, ou autofagia pode ocorrer para reduzir espécies reativas de oxigênio (YUN; LEE, Sang, 2018). No presente trabalho, não foram feitas análises morfológicas para detecção de autofagia. No entanto, como não observamos nem apoptose e nem necrose em nossos resultados, é possível que a redução da viabilidade observada nas células AGP01 tenha ocorrido por indução de autofagia. Como citado anteriormente, extratos hidroalcoólicos da semente do açaí são capazes de induzir este tipo de morte celular (FREITAS *et al.*, 2017; SILVA, Dulcelena Ferreira *et al.*, 2014). Autofagia, induzida por óleo da semente do açaí, foi também observada em células de câncer colorretal (Silva *et al.*, 2023).

Os diversos efeitos dos compostos fenólicos do açaí demonstram que sua ação pode ser diferente dependendo de cada composto específico, ou da ação sinérgica entre eles. Também depende do tipo de célula com a qual eles interagem, por isso algumas linhagens não respondem ao tratamento com o AC ou outros extratos de açaí, enquanto outras podem apresentar redução de viabilidade, que pode estar associada a morte celular por necrose ou apoptose, ou também parada no ciclo celular, como observado por Martinez *et al.* (2018) em células de carcinoma pulmonar humano. Barbosa *et al.* (2016) relataram que estes efeitos sinérgicos estão na base das diferentes respostas antioxidantes apresentadas pelo extrato etanólico do açaí da espécie *Euterpe precatoria* Mart. Tal sinergismo ocorre porque a combinação de diferentes compostos em uma determinada concentração eficaz fortalece ou enfraquece a eliminação de radicais livres, como já observado em *Glossogyne tenuifolia* (HSU *et al.*, 2005). No presente trabalho, a redução da viabilidade da linhagem AGP01 foi pequena, e sem ocorrência de morte celular por apoptose ou necrose, o que talvez possa ser explicado pela interação entre os compostos fenólicos específicos do extrato utilizado e as particularidades da linhagem exposta.

Os ensaios de migração celular (*wound healing*) realizados no presente estudo mostraram que o extrato de açaí clarificado diminuiu significativamente a capacidade migratória das duas linhagens testadas (figura 10). A migração celular, em células

tumorais, é um requisito para a progressão da cascata metastática, seguida de invasão e colonização em regiões distais. No entanto, é uma característica fundamental em processos fisiológicos como morfogênese, resposta imune, regeneração e cicatrização (VAN ZIJL; KRUPITZA; MIKULITS, 2011).

Não encontramos na literatura nenhum trabalho que tenha avaliado o potencial antimigratório do extrato de açaí em linhagens tumorais, o que torna mais difícil uma melhor interpretação de nossos dados de migração para a linhagem AGP01. No entanto, existem vários estudos que avaliam os efeitos antimigratórios das substâncias isoladas presentes no açaí. Por exemplo, Fragoso *et al.* (2013) testaram o efeito da Cianidina 3-glucosídio, uma das antocianinas presentes no açaí, sobre a migração de células de câncer de cólon RKO. Os autores relataram redução da migração celular causada pela antocianina. Chen *et al.* (2006) testaram os efeitos da Cianidina-3-glucosídio e da Cianidina-3-rutinosídio sobre a migração da linhagem A549, uma linhagem de carcinoma pulmonar altamente metastática e invasiva. Os autores relataram redução da invasibilidade e migração. Cianidina-3-glucosídio e Cianidina-3-rutinosídio são antocianinas que estão entre os 5 principais compostos presentes no AC que utilizamos nos nossos experimentos. Os outros componentes são Orientina e Homoorientina, que são flavonóides do grupo das Flavonas, e Taxifolina deoxihexose, um flavonóide pertencente ao grupo Flavonol (ARRIFANO *et al.*, 2018). A taxifolina foi testada por Xie *et al.* (2021) em duas linhagens de câncer gástrico (AGS e NCI-187). Os autores observaram redução do potencial migratório dessas linhagens, bem como redução da invasividade, por meio de câmara de Boyden. De forma geral, estas substâncias, isoladamente, atuam como agentes antimigratórios em células neoplásicas. Ao atuarem em conjunto em nosso extrato, tais substâncias apresentaram o mesmo tipo de efeito nas células AGP01. Nossos resultados abrem perspectivas para mais estudos do uso do açaí como um coadjuvante no tratamento de câncer gástrico, uma vez que poderia impedir a migração e invasão de células deste tipo de neoplasia.

A literatura tem demonstrado que, contrariamente ao que ocorre em células neoplásicas, o açaí apresenta uma eficiente capacidade de induzir a migração de células não-transformadas. Matta *et al.* (2020) mostraram, por meio de ensaio de migração *in vitro*, que o óleo de açaí tem a capacidade de induzir significativamente a migração de células da derme de fibroblastos humanos (HDFa). Os autores atribuem este efeito a presença de ácidos graxos, zinco e ferro presentes no óleo. Interdonato *et al.* (2023)

verificaram que a administração de polpa de açaí melhorava significativamente a cicatrização de feridas artificialmente infligidas em camundongos CD1. Por meio de Western Blot, estes autores mostraram que o açaí é capaz de modular a via de sinalização Wnt. Os autores também mostraram, por meio de imunohistoquímica, que a ativação da via Wnt, por sua vez, desencadeia a síntese de fatores de crescimento envolvidos no processo de cicatrização, como, por exemplo, o TGF- $\beta$  e o VEGF. O TGF- $\beta$  é um potente estimulador da migração de fibroblastos e de células endoteliais.

Apesar da literatura demonstrar que o açaí age preferencialmente como um agente facilitador da migração em células não-transformadas, não foi o que observamos em nossos experimentos nas células VERO. Ainda assim, nossos resultados estão de acordo com os de Costa *et al.* (2021). Este autores verificaram, por meio do ensaio *wound healing*, que o extrato hidroalcoólico do açaí usado como suplemento alimentar reduz o potencial migratório da linhagem de células endoteliais da microvasculatura humana HMEC-1, da mesma forma que observado no presente estudo, para a linhagem VERO. Outra semelhança com os nossos resultados reside no fato de que a ação antimigratória observada pelos autores ocorreu na ausência de citotoxicidade. Os autores também avaliaram a composição química do extrato, que revelou a presença de antocianinas como Cianidina-3-glucosídeo e Cianidina-3-rutinosídeo.

Uma possível hipótese para explicar, em parte, o efeito antimigratório observado em ambas as linhagens do presente estudo seria o fato de que, possivelmente, o extrato de AC estaria inibindo a via Wnt em nossas condições experimentais, impedindo a síntese de fatores de crescimento importantes para a migração, como o TGF- $\beta$ . A literatura mostra algumas evidências de que o açaí inibe a síntese de TGF- $\beta$ , dando suporte a esta hipótese. Por exemplo, Zhou *et al.* (2018) demonstraram que a polpa de açaí era capaz de diminuir a síntese deste fator de crescimento em fígado de ratos Wistar expostos ao álcool. Além disto, Cordeiro *et al.* (2018) verificaram que o extrato da semente do açaí diminuía a síntese de TGF- $\beta$  em ratos Wistar diabéticos e hipertensos.

A inibição da via Wnt também diminui a produção de fatores de transcrição como TCF/LCF. O TCF está relacionado à transcrição de diversos genes associados a proliferação, apoptose, migração, angiogênese e à indução da Transição Epitelial mesenquimal (TEM), que confere às células neoplásicas um comportamento mais invasivo. A literatura demonstra que os compostos fenólicos podem induzir regulação negativa de proteínas importantes para o fenótipo epitelial, como a E-caderina; e aumento

de marcadores de células mesenquimais, como a N-caderina. Xie et al. (2021) demonstraram esta alteração induzida pela Taxifolina nas duas linhagens de câncer gástrico utilizadas no estudo. Orientina e Homoorientina também podem causar alterações na transcrição de metaloproteinases relacionadas ao potencial migratório em células de câncer (KIM, S.-J. *et al.*, 2018; YE *et al.*, 2016), por vias que também podem estar relacionadas à via Wnt. A inibição de fatores de crescimento, como o TGF- $\beta$ , e de fatores de transcrição, como o TCF, em nossas condições experimentais precisa, no entanto, ser confirmada com métodos específicos.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O extrato do açaí clarificado do açaí não causou danos citotóxicos (apoptose e necrose) e genotóxicos nas linhagens celulares Vero e AGP01. Isso demonstra a segurança para o consumo deste produto, como já relatado na literatura. Porém reduziu moderadamente a viabilidade da linhagem neoplásica e apresentou potencial anti-migratório para as duas linhagens, o que pode ser explorado quanto ao potencial como coadjuvante no tratamento de neoplasias, no entanto, os mecanismos específicos de inibição precisam ser elucidados. Este é o primeiro trabalho a testar o efeito de um extrato de açaí sobre células de câncer gástrico. Além disso, as características dos polifenóis específicos do açaí clarificado podem se mostrar promissoras para outros tipos de câncer em trabalhos futuros, devido ao efeito sinérgico dos componentes específicos.

## 7. REFERÊNCIAS

AGUDO, A. *et al.* Inflammatory potential of the diet and risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 107, n. 4, p. 607–616. 2018.

ALESSANDRA-PERINI, J. *et al.* Euterpe oleracea extract inhibits tumorigenesis effect of the chemical carcinogen DMBA in breast experimental cancer. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 116. 2018.

ALMEIDA, V. M. *et al.* Anticancer drug screening: standardization of in vitro wound healing assay. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, n. 6. 2019.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 350, n. 1, p. 103–108. 1996.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. 66(1): 1-9, 2007.

ANSAR AHMED, S.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, n. 2, p. 211–224. 1994.

ARRIFANO, G. P. F. *et al.* Clarified Açai ( *Euterpe oleracea* ) Juice as an Anticonvulsant Agent : *In Vitro* Mechanistic Study of GABAergic Targets. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018.

BARRA, W. F. *et al.* Gastric Cancer Microbiome. **Pathobiology**, v. 88, n. 2, p. 156–169. 2021.

BIANCONI, E. *et al.* An estimation of the number of cells in the human body. **Annals of Human Biology**, v. 40, n. 6, p. 463–471. 2013.

BICHARA, C. M. G.; ROGEZ, H. Açai ( *Euterpe oleracea* Martius). **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits**. Elsevier, 2011.

BORRA, R. C. *et al.* A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. **Brazilian Oral Research**, v. 23, n. 3, p. 255–262. 2009.

BOUVARD, V. *et al.* Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 16, p. 1599–1600. 2015.

CARVALHO, A.V.; SILVEIRA, T.F.F.; MATTIETTO, R.DE A.; OLIVEIRA, M.DO S.P.DE; GODOY, H.T.; Chemical composition and antioxidant capacity of açai (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps. **J. Sci. Food Agric.** 97. 2017.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature**, v. 513, n. 7517, p. 202–209. 2014.

CHEN, P.-N. *et al.* Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. **Cancer Letters**, v. 235, n. 2, p. 248–259. 2006.

CHOI, Yoon Jin *et al.* Açai Berries Inhibit Colon Tumorigenesis in Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. **Gut and Liver**, v. 11, n. 2, p. 243–252. 2017.

CORREA, P. A MODEL FOR GASTRIC CANCER EPIDEMIOLOGY. **The Lancet**, v. 306, n. 7924, p. 58–60. 1975.

COSTA, R. *et al.* Antiangiogenic and Antioxidant In Vitro Properties of Hydroethanolic Extract from açai (*Euterpe oleracea*) Dietary Powder Supplement. **Molecules**, v. 26, n. 7, 2021.

DA SILVA, M. A. C. N. *et al.* Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Oil Exerts a Cytotoxic Role over Colorectal Cancer Cells: Insights of Annexin A2 Regulation and Molecular Modeling. **Metabolites**, v. 13, n. 7, p. 789. 2023.

DE OLIVEIRA, E. D. F. *et al.* Neuroprotective effects of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against diabetic retinopathy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1143923. 2023.

DE OLIVEIRA, M. D. S. P.; SCHWARTZ, G. Açai— *Euterpe oleracea*. **Exotic Fruits**. Elsevier, 2018.

DE OLIVEIRA, N.K.S.; ALMEIDA, M.R.S.; PONTES, F.M.M.; BARCELOS, M.P., DE PAULA DA SILVA, C.H.T.; ROSA, J.M.C., CRUZ, R.A.S.; DA SILVA HAGEMELIM, L.I., Antioxidant Effect of Flavonoids Present in *Euterpe oleracea* Martius and Neurodegenerative Diseases: A Literature Review. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem**, 19, 75–99. 2019.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açai ( *Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1539–1545. 2004.

DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T. Açai ( *Euterpe oleracea* Mart.) Polyphenolics in Their Glycoside and Aglycone Forms Induce Apoptosis of HL-60 Leukemia Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1222–1229. 2006.

DIAS, Aécio L. S. *et al.* Development and validation of an UHPLC-LTQ-Orbitrap MS method for non-anthocyanin flavonoids quantification in *Euterpe oleracea* juice. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 28, p. 9235–9249. 2013.

DIAS, A.L.S. *et al.* A rapid validated UHPLC–PDA method for anthocyanins quantification from *Euterpe oleracea* fruits. **Journal of Chromatography B**, v. 907, p. 108–116. 2012.

DOMINGUES, A.F.N.; MATTIETTO, R.DE A.; OLIVEIRA, M.DO S.P.; Teor de lipídeos em caroços de *Euterpe oleracea* Mart. **Boletim de Pesquisa 115**. Embrapa Amazônia Oriental. 2017.

EGHBALIFERIZ, S.; IRANSHAHI, M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals: Prooxidant Activity of Polyphenols and Carotenoids. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 9, p. 1379–1391. 2016.

FILHO, W. E. M. *et al.* Antitumor Effect of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Extract in LNCaP Cells and in the Solid Ehrlich Carcinoma Model. **Cancers**, v. 15, n. 9, p. 2544. 2023.

- FRAGOSO, M. F. *et al.* Inhibition of Mouse Urinary Bladder Carcinogenesis by Açai Fruit (*Euterpe oleracea* Martius) Intake. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 3, p. 235–241. 2012.
- FRAGOSO, M. F. *et al.* Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 68–76. 2013.
- FRAGOSO, M. F. *et al.* Lyophilized açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart) attenuates colitis-associated colon carcinogenesis while its main anthocyanin has the potential to affect the motility of colon cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 237–245. 2018.
- FREITAS, D. D. S. *et al.* Cytotoxic analysis and chemical characterization of fractions of the hydroalcoholic extract of the *Euterpe oleracea* Mart. seed in the MCF-7 cell line. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 6, p. 714–721. 2017.
- GALLORI, S. *et al.* Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açai palm). **Chromatographia**, v. 59, n. 11–12. 2004.
- GIESECKE, J. *et al.* International association between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. **The Lancet**, v. 342, n. 8863, p. 120–121. 1993.
- GREAVES, M.; MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 306–313. 2012.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125–130. 2011.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674. 2011.
- HAUSMAN, D. M. What Is Cancer? **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 62, n. 4, p. 778–784. 2019.
- HOGAN, S. *et al.* Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 208–214. 2010.

INCA, I. N. De C. INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025 — Instituto Nacional de Câncer - INCA. 2022.

JOBIM, M. L. *et al.* Açai (*Euterpe oleracea*, Mart.), an Amazonian fruit has antitumor effects on prostate cancer cells. **Archives in Biosciences & Health**, v. 1, n. 1, p. 61–76. 2019.

JONKMAN, J. E. N. *et al.* An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. **Cell Adhesion & Migration**, v. 8, n. 5, p. 440–451. 2014.

JOSHI, S. S.; BADGWELL, B. D. Current treatment and recent progress in gastric cancer. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 264–279. 2021.

KIM, S.-J. *et al.* Orientin inhibits invasion by suppressing MMP-9 and IL-8 expression via the PKC $\alpha$ / ERK/AP-1/STAT3-mediated signaling pathways in TPA-treated MCF-7 breast cancer cells. **Phytomedicine**, v. 50, p. 35–42. 2018.

KNIGHT, W. R.; ALLUM, W. H. Gastric tumours. **Medicine**, v. 47, n. 5, p. 309–313. 2019.

KOPPEN, G. *et al.* The comet assay in human biomonitoring: cryopreservation of whole blood and comparison with isolated mononuclear cells. **Mutagenesis**, v. 33, n. 1, p. 41–47. 2018.

LAURÉN, P. The Two Histological Main Types Of Gastric Carcinoma: Diffuse And So-Called Intestinal-Type Carcinoma: An Attempt at a Histo-Clinical Classification. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 64, n. 1, p. 31–49. 1965.

LEAL, M. F. *et al.* Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 195, n. 1, p. 85–91. 2009.

LEE, J. Y. *et al.* Anti-inflammatory and Anti-tumorigenic Effects of Açai Berry in *Helicobacter felis* -infected mice. **Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n. 1, p. 48–54. 2016.

LORENZO, Y. *et al.* The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. **Mutagenesis**, v. 28, n. 4, p. 427–432. 2013.

MAGALHÃES, T. S. S. DE A. *et al.* The Use of *Euterpe oleracea* Mart. As a New Perspective for Disease Treatment and Prevention. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 813. 2020.

MARQUES, E.S.; FRODER, J.G.; CARVALHO, J.C.T.; ROSA, P.C.P.; PERAZZO, F.F.; MAISTRO, E.L. Evaluation of the genotoxicity of *Euterpe oleraceae* Mart. (Arecaceae) fruit oil (açai), in mammalian cells *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**. **93**: 13-19, 2016.

MARQUES, E.S. TSUBOY, M.S.F.; CARVALHO, J.C.T.; ROSA, P.C.P.; PERAZZO, F.F.; GAIVÃO, I.O.M.; MAISTRO, E.L. First cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic assessment of *Euterpe oleracea* fruit oil (açai) in cultured human cells. **Genetics and Molecular Research**. 16 (3). 2017.

MARTIN, P.; PARKHURST, S. M. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. **Development**, v. 131, n. 13, p. 3021–3034. 2004.

MARTINEZ, R. *et al.* Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Extract Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Lung Carcinoma Cells. **Foods**, v. 7, n. 11, p. 178. 2018.

MERTENS-TALCOTT, S. U. Pro-Apoptotic Activities of Polyphenolics From Açai (*Euterpe oleracea* Martius) in Human SW-480 Colon Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 8, p. 1394–1405. 2014.

MIFTAHUSSURUR, M.; YAMAOKA, Y.; GRAHAM, D. Y. *Helicobacter pylori* as an oncogenic pathogen, revisited. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 19, p. e4. 2017.

MØLLER, H.; HESELTINE, E.; VAINIO, H. Working group report on schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Meeting held at IARC, LYON. **International Journal of Cancer**, 3 mar. 1995. v. 60, n. 5, p. 587–589. 1994.

MONGE-FUENTES, V. *et al.* Photodynamic therapy mediated by acai oil (*Euterpe oleracea* Martius) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 166, p. 301–310. 2017.

MOURÃO, L. História e natureza: do açaí ao palmito. **Revista Territórios e Fronteiras** V.3. N.2. 2010.

NOGUEIRA, O.L.; FIGUEIREDO, F.J.C.; MULLER, A.A. **Sistemas de produção: Açaí**. EMBRAPA, 2005.

NOGUEIRA, A.K.M.; SANTANA, A.C.; Benefícios socioeconômicos da adoção de novas tecnologias no cultivo do açaí no Estado do Pará. **Ceres**. 63, 17. 2014.

NISHIKAWA, J. *et al.* Clinical Importance of Epstein–Barr Virus-Associated Gastric Cancer. **Cancers**, v. 10, n. 6, p. 167. 2018.

OLIVEIRA, M.S.P. de. **Biologia floral do açaizeiro**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. V.8. 26p. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. 2006.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291–298. 1984.

PACHECO-PALENCIA, L. A. *et al.* Absorption and Biological Activity of Phytochemical-Rich Extracts from Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Pulp and Oil in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 3593–3600. 2008.

PACHECO-PALENCIA, L.; MERTENS-TALCOTT, S. U.; TALCOTT, S. T. In vitro absorption and antiproliferative activities of monomeric and polymeric anthocyanin fractions from açaí fruit (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1071–1078. 2010.

PETRYSZYN, P.; CHAPELLE, N.; MATYSIAK-BUDNIK, T. Gastric Cancer: Where Are We Heading? **Digestive Diseases**, v. 38, n. 4, p. 280–285. 2020.

PLUMMER, M. *et al.* Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*: *Helicobacter pylori* in gastric cancer. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 2, p. 487–490. 2015.

PLUTYNSKI, A. **Explaining Cancer**. Oxford University Press, V. 1. 2018.

PONTE, R. X. **Os usos do açaí, a árvore da vida**. VI Encontro Nacional da Anppas. Belém – PA – Brasil. 2012.

RAMBERSAD, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360. 2012.

RELLO, S. *et al.* Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. **Apoptosis**, jan. v. 10, n. 1, p. 201–208. 2005.

RIBEIRO, J. C. *et al.* Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açaí pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 695, n. 1–2, p. 22–28. 2010.

RISS, T. L. *et al.* Cell Viability Assays. 2013.

ROMUALDO, Guilherme Ribeiro *et al.* Protective effects of spray-dried açaí (*Euterpe oleracea* Mart) fruit pulp against initiation step of colon carcinogenesis. **Food Research International**, v. 77, p. 432–440. 2015.

ROY, A. L.; CONROY, R. S. Toward mapping the human body at a cellular resolution. **Molecular Biology of the Cell**, ago. v. 29, n. 15, p. 1779–1785. 2018.

SALES, P. F. *et al.* Pharmacological Potential and Mechanisms of Action Involved in Oil Species from the Brazilian Amazon: The Case of *Abelmoschus esculentus* L. Moench, *Euterpe oleracea* Martius and *Bixa orellana* Linné. **Pharmacognosy Reviews**, p. 24–42. 2023.

SEENEEVASSEN, L. *et al.* Gastric Cancer: Advances in Carcinogenesis Research and New Therapeutic Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3418. 2021.

SIBUYI, N. R. S. *et al.* Green synthesis of gold nanoparticles using Acai berry and Elderberry extracts and investigation of their effect on prostate and pancreatic cancer cells. **Nanobiomedicine**, v. 8, p. 184. 2021.

SIEWERT, J. R.; STEIN, H. J. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. **British Journal of Surgery**, v. 85, n. 11, p. 1457–1459. 2003.

SILVA, Dulcelena Ferreira *et al.* Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 175. 2014.

SILVA, S.M.S. **Do consumo local ao mercado de alimentos saudáveis: como a crescente demanda por açaí (*euterpe oleracea* mart.) afeta os meios de vida de comunidades ribeirinhas?** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Extensão Rural). Departamento de Economia Rural da Universidade Federal de Viçosa. 153 f. 2019.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191. 1988.

SMITH, S. M. (Org.). **Helicobacter Pylori**. New York, NY: Springer US, V. 2283. 2021.

SOUZA-MONTEIRO, José Rogerio *et al.* Anticonvulsant properties of *Euterpe oleracea* in mice. **Neurochemistry International**, v. 90, p. 20–27. 2015.

STONER, G. D. *et al.* Multiple Berry Types Prevent N-nitrosomethylbenzylamine-Induced Esophageal Cancer in Rats. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 6, p. 1138–1145. 2010.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. v. 71, n. 3, p. 209–249. 2021.

TRELOAR, K. K.; SIMPSON, M. J. Sensitivity of Edge Detection Methods for Quantifying Cell Migration Assays. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e67389. 2013.

VAN ZIJL, F.; KRUPITZA, G.; MIKULITS, W. Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 728, n. 1–2, p. 23–34. 2011.

VENNEMAN, K. *et al.* The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Europe and the impact of lifestyle on its natural evolution toward stomach cancer after infection: A systematic review. **Helicobacter**, v. 23, n. 3, p. e12483. 2018.

XIE, J.; PANG, Y.; WU, X. Taxifolin suppresses the malignant progression of gastric cancer by regulating the AhR/CYP1A1 signaling pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 48, n. 5, p. 197. 2021.

YAMAGUCHI, K. K. D. L. *et al.* Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137–151. 2015.

YASUMURA, Y.; KAWAKITA, Y. Studies on SV40 in tissue culture: preliminary step for cancer reserach in vitro (in Japanese). **Nihon Rinsho**, 1963.

YE, T. *et al.* Isoorientin induces apoptosis, decreases invasiveness, and downregulates VEGF secretion by activating AMPK signaling in pancreatic cancer cells. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 9, p. 7481–7492. 2016.

YUN, C.; LEE, Sang. The Roles of Autophagy in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3466. 2018.

ZHENG, Q. *et al.* Development of gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori*. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 19, n. 10, p. 1192–1198. 2004.

# Toxicology in Vitro

## In vitro assessment of the genotoxic and cytotoxic effects of clarified açai (*Euterpe oleracea* MART) extract in a gastric cancer cell line (AGP01 cells).

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Research Paper
<b>Section/Category:</b>	Mechanisms
<b>Keywords:</b>	Açaí; Cell viability; Wound healing assay; Cyanidin 3-glucoside; Cyanidin-3-rutinoside; Taxifolin.
<b>Corresponding Author:</b>	Marcelo Bahia Federal University of Para Belem, Brazil
<b>First Author:</b>	Thiago Santos
<b>Order of Authors:</b>	Thiago Santos Marcelo Bahia Adriana Guimarães Carolina Souza Nilton Muto Hervé Rogez Rommel Burbano
<b>Abstract:</b>	<p>Açaí (<i>Euterpe oleracea</i> MART) is a fruit of great importance for the Amazon region in nutritional, cultural and socioeconomic terms. In recent years, açai has been the subject of several studies due to its beneficial properties for health, including effects against tumor cells. Therefore, the present work aimed to evaluate in vitro the genotoxic and cytotoxic effects of the clarified extract of açai juice in a human metastatic gastric cancer cell line (AGP01 cells). For comparison purposes, a non-transformed cell line of African green monkey renal epithelial cells (VERO cells) was used. The viability assay by resazurin reduction, the comet assay, the determination of cell death by differential fluorescent dyes and the wound healing migration assay were performed. A reduction in viability was observed only in the AGP01 line within 72h. There was no genotoxic damage or cell death (through apoptosis or necrosis) in any of the cell lines. However, açai extract induced motility reduction in both cell lines. The reduction in cell viability and the induction of the anti-migratory effect in the AGP01 cell line opens perspectives for exploring the potential of açai as an adjuvant in the treatment of gastric cancer.</p>
<b>Suggested Reviewers:</b>	Carmen Branco carmen.branco@gmail.com Specialist in the genotoxicity/citotoxicity field.  Stephano Mello stepano_mello@urmc.rochester.edu Specialist in the genotoxicity/citotoxicity field.  Raquel Santos raquel.santos@unifran.edu.br Specialist in the genotoxicity/citotoxicity field.  Danielle Calcagno danicalcagno@gmail.com Specialist in the genotoxicity/citotoxicity field.

Toxicology *in Vitro*

January 08, 2024

Dear Editors,

We are contacting you to submit our article entitled "In vitro assessment of the genotoxic and cytotoxic effects of clarified *açaí* (*Euterpe oleracea* MART) extract in a gastric cancer cell line (AGP01 cells)." to be considered for publication in this renowned journal.

Our results show that the clarified *açaí* extract is not genotoxic or cytotoxic in the assessed conditions, however, it decreases cell viability in a concentration-dependent manner and induces a clear anti-migratory effect, which opens perspectives for exploring the potential of *açaí* as an adjuvant in the treatment of gastric cancer.

We certify that this manuscript has not been published elsewhere and is not under consideration by another journal, all authors have approved the manuscript and are in agreement with its submission to the journal. We are fully aware of the reach of *Toxicology in Vitro*, justifying our intention to enthusiastically submit our scientific article for your consideration.

Kind regards,

Marcelo de Oliveira Bahia

**Highlights**

- Gastric cancer cells decrease their motility when exposed to clarified açai extract.
- Clarified açai extract affects the viability of gastric cancer cells.
- The viability of non-transformed cells is not affected by the clarified açai extract.

***In vitro* assessment of the genotoxic and cytotoxic effects of clarified açai (*Euterpe oleracea* MART) extract in a gastric cancer cell line (AGP01 cells).**

Thiago S. Santos<sup>1</sup>, Marcelo O. Bahia<sup>1\*</sup>, Adriana C. Guimarães<sup>1</sup>, Carolina R. T. Souza<sup>1</sup>, Nilton A. Muto<sup>2</sup>, Hervé Rogez<sup>2</sup> and Rommel M. R. Burbano<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenética Humana e Genética Toxicológica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém-Pará, Brazil.

<sup>2</sup>Centro de Valorização de Compostos Bioativos da Amazônia, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém-Pará, Brazil.

\* Corresponding author:

Marcelo de Oliveira Bahia  
Laboratory of Human Cytogenetic  
Institute of Biological Sciences  
Federal University of Pará  
Av. Augusto Corrêa, 01, 66075-110, Belém-PA. Brazil.  
Tel.: +55(91)32017102; fax: +55(91)32017568.  
E-mail address: mbahia@ufpa.br

## **Abstract**

*Açaí* (*Euterpe oleracea* MART) is a fruit of great importance for the Amazon region in nutritional, cultural and socioeconomic terms. In recent years, *açaí* has been the subject of several studies due to its beneficial properties for health, including effects against tumor cells. Therefore, the present work aimed to evaluate *in vitro* the genotoxic and cytotoxic effects of the clarified extract of *açaí* juice in a human metastatic gastric cancer cell line (AGP01 cells). For comparison purposes, a non-transformed cell line of African green monkey renal epithelial cells (VERO cells) was used. The viability assay by resazurin reduction, the comet assay, the determination of cell death by differential fluorescent dyes and the wound healing migration assay were performed. A reduction in viability was observed only in the AGP01 line within 72h. There was no genotoxic damage or cell death (through apoptosis or necrosis) in any of the cell lines. However, *açaí* extract induced motility reduction in both cell lines. The reduction in cell viability and the induction of the anti-migratory effect in the AGP01 cell line opens perspectives for exploring the potential of *açaí* as an adjuvant in the treatment of gastric cancer.

**Keywords:** *Açaí*, Cell viability, Wound healing assay, Cyanidin 3-glucoside, Cyanidin-3-rutinoside, Taxifolin.

## 1. Introduction

The *açaí* (*Euterpe oleraceae* MART) is an extremely important plant for the Amazon region. The juice extracted from the fruit is much appreciated in the region and is regularly consumed as part of the population's diet (Nogueira et al., 2005; Mourão, 2010). More recently, *açaí* has transcended local borders to become a product of great economic value, seen as a functional and nutritious food. The fruit has been elevated to the rank of "superfruit" and is widely consumed by followers of a "healthy lifestyle", consequently becoming part of a food market whose consumption is based on health benefits. This market represents a global trend, where *açaí*-based products are now associated with diets with high nutritional power, mainly due to the numerous scientific studies that report the biological effects (generally beneficial) of *açaí* (Silva, 2019).

Among the studies that prove the beneficial effects of regular *açaí* intake are those showing the fruit's strong antioxidant potential, mainly due to the presence of polyphenols in its constitution. By exploring this effect, several studies have shown that *açaí* is a potential candidate for the treatment of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's, since these conditions have oxidative stress as one of their pathogenic bases (Oliveira et al., 2019). The fruit's pharmacological effects also include anti-inflammatory, cardioprotective and anticancer activity (Moura and Resende, 2016; Alessandra-Perini et al., 2018). In addition, *açaí* has not shown genotoxicity *in vitro* or *in vivo* in several different cell types (Udani et al., 2011; Caiado et al., 2017; Marques et al., 2017) and also has antigenotoxic properties, protecting cells against damage induced by antitumor agents (Ribeiro et al., 2010).

Regarding its anticancer effects, Alessandra-Perini et al. (2018), in a recent review, demonstrated that *açaí* is safe and appears to be effective as an anticancer agent, mainly due to its anti-inflammatory, antioxidant, antiproliferative and antiapoptotic effects. The authors analyzed several studies that used *açaí* in preclinical models of esophageal, urothelial, colon and melanoma cancer, among others. All the studies evaluated were conducted on rodents.

Despite the existence of numerous studies pointing to the anti-cancer effects of *açaí*, both *in vivo* (Alessandra-Perini et al., 2018) and *in vitro* (Dias et al., 2014; Diaconeasa et al., 2015; Freitas et al., 2017), there are no studies conducted with the aim of evaluating the effects of *açaí* against gastric cancer (GC). In a quick search on PUBMED using the keywords "gastric cancer" and "*Euterpe oleracea*", only one article is retrieved in which the authors evaluated the effects of *açaí* on GC induced by *Helicobacter felis* in C57BL/6 mice. The authors found that *açaí* was unable to prevent the carcinogenic process in the mice assayed (Lee et al., 2016).

The lack of studies on GC is surprising, given that this cancer is considered a global public health problem, with more than one million new cases estimated annually and low survival statistics worldwide (Sung et al., 2021). In addition, GC is the fifth most diagnosed worldwide, with most new annual cases occurring mainly in Asian and South American countries (Rawla and Barsouk, 2019). Thus, the aim of this study is to evaluate *in vitro* the genotoxic and cytotoxic effects of clarified *açaí* pulp extract on a GC cell line (AGP01) and to compare these effects with those presented by a non-transformed cell line (VERO).

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Cell lines cultures and treatments*

The AGP01 gastric cancer cells used for the experiments in this study were obtained from the ascitic fluid of a 55-year-old male patient at the João de Barros Barreto University Hospital (HUJBB) and were established by the Cellular and Molecular Neurochemistry Laboratory together with the Human Cytogenetics Laboratory, both located at the Institute of Biological Sciences of the Federal University of Pará (Leal et al., 2009). VERO cells, obtained from African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) kidney epithelial cells (Yasumura, 1963), were purchased from the *Banco de Células do Rio de Janeiro* (BCRJ - Rio de Janeiro Cell Bank). The cells were cultured in DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, São Paulo, Brazil), 3.7 mg/mL ciprofloxacin, 0.1 mg/mL streptomycin, 99 U/mL penicillin and kept at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The cells were subcultured 2-3 times a week.

For the *in vitro* evaluation of the effects of the clarified *açaí* pulp extract, we first carried out the resazurin reduction assay, in which the extract was tested at the following concentrations: 6.25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL and 200 µg/mL. For the subsequent assays (comet assay, cell death by fluorescence microscopy and wound healing assay), the extract treatment groups were 50 µg/mL, 100 µg/mL and 200 µg/mL. In all experiments, a negative control was also used in which the cells were treated only with culture medium. A positive control treatment with doxorubicin (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) was also used in all experiments, except for the wound healing assay.

## 2.2. Clarified *açaí* (CA) pulp extract

The clarified *açaí* pulp extract used in this study was kindly provided by Amazon Dreams (Belém, Pará, Brazil). The juice prepared from the fresh fruit was microfiltered and centrifuged according to a process licensed by Amazon Dreams together with the Federal University of Pará (Belém, Pará, Brazil) (PI 8 1003060-3) (Souza-Monteiro et al., 2015). The anthocyanins and the main flavonoids present in the clarified pulp were quantified using two validated UHPLC-DAD methods (Dias et al., 2012, 2013) with the standard compounds (orientin, homoorientin, taxifolin, cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-rutinoside) purchased from Extrasynthèse (Genay, Rhône, France). The concentrations of the five main phenolic compounds found in CA were as follows, all expressed in 100 mL of pulp: 38 mg of orientin, 25 mg of homoorientin, 31 mg of taxifolin deoxyhexose, 18 mg of cyanidin 3-glucoside and 45 mg of cyanidin 3-rutinoside.

## 2.3. Resazurin reduction assay

For this assay, the two cell lines were seeded in 96-well culture plates at  $2 \times 10^3$  cells/well. Treatments were carried out in triplicate for 24 and 72 hours. A negative control (DMEM only), a positive control (doxorubicin 0.5 µM) and 6 concentrations of CA extract obtained by serial dilution in DMEM (200; 100; 50; 25; 12.5 and 6.25 µg/mL) were used. After treatment, Resazurin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at a concentration of 0.3 mM was added to the treated wells and to wells without cells, to obtain background fluorescence values. The plates were incubated

for 3 hours and then, read by fluorescence spectrophotometry (560 nm for excitation and 590 nm for emission). Cell viability was calculated as the percentage of absorbance in relation to the absorbance of the control.

#### 2.4. Comet assay

For the comet assay, cell lines were seeded in 12-well culture plates at  $1.8 \times 10^5$  cells/well and treated with 3 concentrations of CA extract (50, 100 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a negative control with DMEM only and a positive control with doxorubicin 2  $\mu\text{M}$ . The concentration of doxorubicin was higher in the comet assay compared to the other tests carried out (resazurin reduction and cell death by fluorescence microscopy) due to the shorter treatment time.

After 3 hours of treatment, 20  $\mu\text{L}$  of concentrated cell suspension was homogenized with low melting point agarose (0.5%) at approximately 37°C. This mixture was added to slides previously covered with normal melting point agarose (1.5%) and chilled at 4 °C for 10 min. After agarose polymerization, the coverslips were carefully removed and the slides were incubated in lysis solution (2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO; pH 10) at 4°C, protected from light and left for approximately 72 hours.

Then, slides were submitted to horizontal electrophoresis in an alkaline buffer solution (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM; pH  $\geq 13$ ) at 4°C for 20 minutes at 34V and 300mA. After electrophoresis, the slides were immersed in ice-cold distilled water for 5 minutes. Slides were, then, fixed in absolute ethanol for 3 minutes, and stained with ethidium bromide (0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for analyses. Slides were analyzed using an Olympus BX41 fluorescence microscope, containing three filters (DAPI/FITC/TRITC). The image capture was performed using the “Applied Spectral Imaging” software. The nucleoids were classified into 5 categories according to the length and shape of the tail. The categories are listed from 0 to 4: 0 = no damage (<5%); 1 = low level of damage (5-20%); 2 = medium level of damage (20-40%); 3 = high level of damage (40-95%) and 4 = total damage (>95%).

One hundred nucleoids were analyzed per treatment group. The nuclear damage index (NDI) was calculated using the following formula:  $NDI (au): [(N1*1 + N2*2 + N3*3 + N4*4)] / 100$  (total number of analyzed cells), where NDI is the DNA damage index, *au* is the arbitrary unit, and N1–N4 are cells in categories 1, 2, 3, and 4.

### *2.5. Morphologic analyses of cell death by fluorescence microscopy*

For this assay, cell lines were seeded at  $10^5$  cells/well for the 24-hour treatment time and  $5 \times 10^4$  cells/well for the 72-hour treatment in 12-well. After 24 hours, treatment was carried out with 50, 100 and 200  $\mu\text{g/mL}$  of CA extract plus a negative control with DMEM only. Doxorubicin ( $0.5 \mu\text{M}$ ) was used as a positive control.

At the end of the treatment, cells were trypsinized and the supernatant was resuspended in a mix of freshly prepared fluorescent dye solution (25  $\mu\text{L}$  of propidium iodide at  $1\text{mg/mL}$  diluted in distilled water + 50  $\mu\text{L}$  of fluorescein diacetate at  $1.5\text{mg/mL}$  diluted in DMSO + 10  $\mu\text{L}$  of Hoechst 33342 at  $1\text{mg/mL}$  diluted in distilled water + 15  $\mu\text{L}$  of PBS pH= 7.2) for 5 minutes at  $37^\circ\text{C}$ . Two hundred cells per treatment group were analyzed in a fluorescent microscope (Olympus® BX41) equipped with a triple filter.

By combining these 3 dyes, viable cells can be identified with a cytoplasm stained green by fluorescein diacetate and an intact nucleus stained blue by Hoechst 33342. Apoptotic cells are also stained green by fluorescein diacetate; however, the nucleus is fragmented or highly compacted with condensed chromatin. They may also show cytoplasmic blebs and apoptotic bodies. In the late stages of apoptosis, propidium iodide absorption may occur, staining the apoptotic cells red. Necrotic cells are uniformly stained red by propidium iodide and lack the nuclear features characteristic of apoptosis (Chan et al., 2015)

### *2.6. Wound healing assay*

For the wound healing assay, each cell line was seeded at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/well in 12-well culture plates. After 24 hours, a continuous vertical lesion was made in all the wells using a micropipette with a 200-microliter tip. Cells were, then, washed and treatment

was carried out in triplicate with AC concentrations (50, 100 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and a negative control with DMEM only. Images were captured using an EVOS XL® inverted microscope at different times (0, 12 and 24 h). The images captured at all treatment times were processed using the Image J program to automatically detect the area of the lesions, following the protocol recommended by Treloar and Simpson (2013).

## 2.7. Statistical analysis

The means between the groups in the resazurin reduction, comet assay and apoptosis/necrosis assessment were compared using analysis of variance (ANOVA) in GraphPad Prism 5.00 software followed by Tukey HSD post-test. A significance level of 95% was adopted, with  $p < 0.05$ . Data is presented as mean and standard error from 3 independent experiments.

For the wound healing assay, the comparison between the mean measurements of lesion area was made by 2-way ANOVA followed by Bonferroni post-test in the GraphPad Prism 5.00 software. Data is presented with mean and standard error, from 4 independent experiments with triplicates.

## 3. Results

### 3.1. Resazurin reduction assay

The results of the cell viability test, after 24 h of treatment with CA extract, showed that there were no changes in cell viability for both cell lines ( $p > 0.05$ ) (Figure 1A). However, doxorubicin significantly reduced cell viability to 65.7% for VERO and 65.2% for AGP01 ( $p < 0.05$ ) compared to the negative control (100%) (Figure 1A). For the 72-h treatment, there was a significant decrease in cell viability of the AGP01 cell line from 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0.05$ ) compared to the control (100%). Although the effect was significant, the lowest viability value obtained was 79.27% at a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a reduction of only 20.73%. It was therefore not possible to obtain an  $\text{IC}_{50}$  (Figure 1B). The survival percentages were 96.04; 93.03; 90.9; 84.9; 79.27 and 81.5 % for concentrations of 6.25; 12.5; 25; 50; 100 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CA extract, respectively. The viability of the AGP01 cells exposed to doxorubicin was 38.11 %, a value that was statistically

different from the negative control (100%) ( $p < 0.05$ ). Treatment with CA extract had no significant effect on VERO cells ( $p > 0.05$ ). However, doxorubicin significantly reduced the viability (39.19%) of VERO cells ( $p < 0.05$ ) compared to the negative control (100%) (Figure 1B).

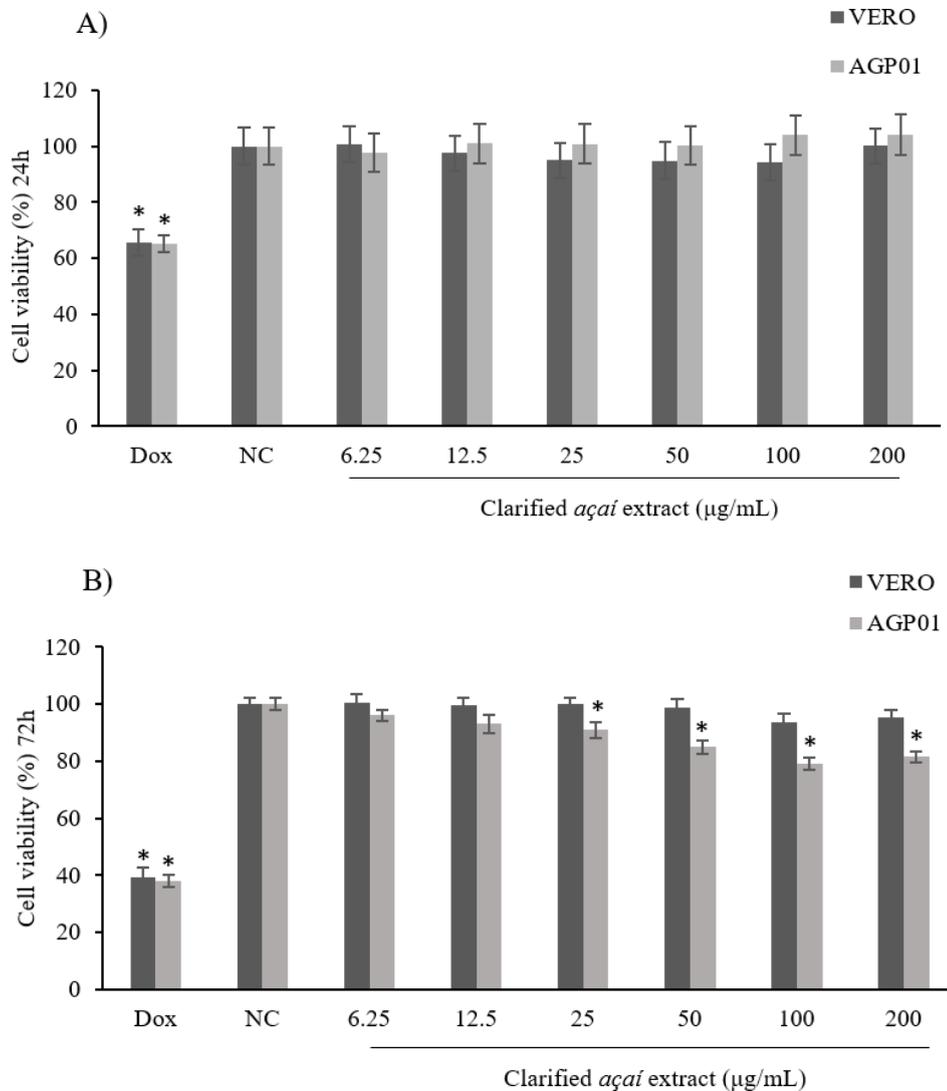


Figure 1: Effect of clarified açai extract on the viability of the VERO and AGP01 cell lines exposed for 24 h (A) and 72 h (B) expressed as percentage. \* $p < 0.05$  when compared to their respective negative controls (ANOVA/Tukey's posttest). Dox: doxorubicin 0.5µM. NC: negative control. Data are expressed as the mean values obtained from three independent experiments.

### 3.2. Comet assay

CA extract did not cause genotoxic damage detectable by the comet assay in any of the concentrations tested in the two cell lines ( $p > 0.05$ ). Doxorubicin significantly increased NDI for

both VERO (NDI=2.22) and AGP01 (NDI=2.36) cell lines ( $p<0.05$ ) when compared to their respective negative controls (NDI=0.48 and NDI=0.49) (Figure 2).

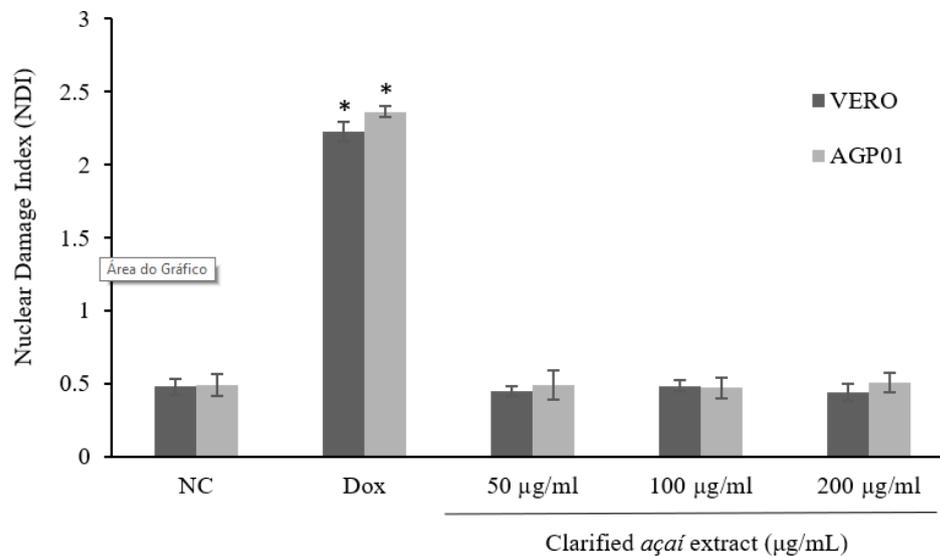


Figure 2: Effect of clarified *açai* extract treatment on VERO and AGP01 cells analyzed by the comet assay in the period of 3 hr. \* $p<0.05$  when compared to their respective negative controls (ANOVA/Tukey's posttest). Dox: doxorubicin 2  $\mu$ M. NC: negative control. Data are expressed as the mean values obtained from three independent experiments.

### 3.3. Morphologic analyses of cell death by fluorescence microscopy

CA extract did not induce an increase in cell death, either by necrosis or apoptosis, under the conditions evaluated ( $p>0.05$ ). Figure 3A shows the results of the cell death pattern for VERO cells, while Figure 3B shows the cell death pattern for AGP01 cells. Doxorubicin induced apoptosis and necrosis significantly ( $p<0.05$ ) compared to the respective negative controls in all conditions evaluated.

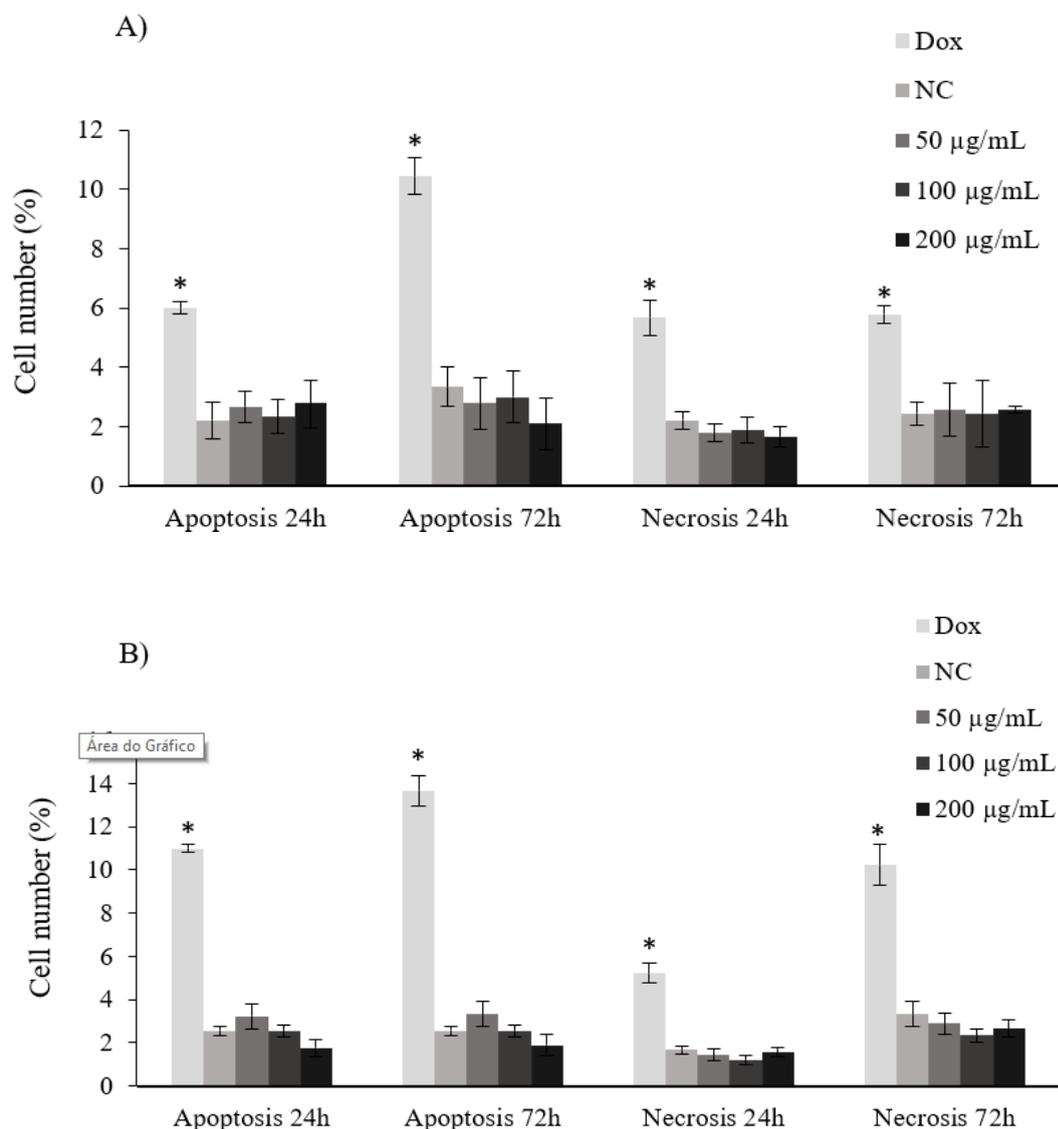


Figure 3: Effect of clarified açai extract on VERO (A) and AGP01 (B) cell lines analyzed by differential fluorescent staining. \* $p < 0.05$  when compared to their respective negative controls (ANOVA/Tukey's posttest). Dox: doxorubicin  $0.5 \mu\text{M}$ . NC: negative control. Data are expressed as the mean values obtained from three independent experiments.

### 3.4. Wound healing assay

The anti-migratory effect of CA extract was observed for both cell lines (Figures 4A and 4B). For the VERO cell line, this effect was significant ( $p < 0.05$ ) for all concentrations evaluated and in both treatment times (12 and 24 h) when compared to negative control (Figures 4A and 4B). For AGP01 cell line, the anti-migratory effect was observed only for the two highest CA

concentrations (100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ) at 12-h treatment (Figure 4A). However, all CA concentrations significantly inhibited cell migration at 24-h treatment, when compared to negative control (Figure 4B). The migratory profile of both cells is shown in Figure 5.

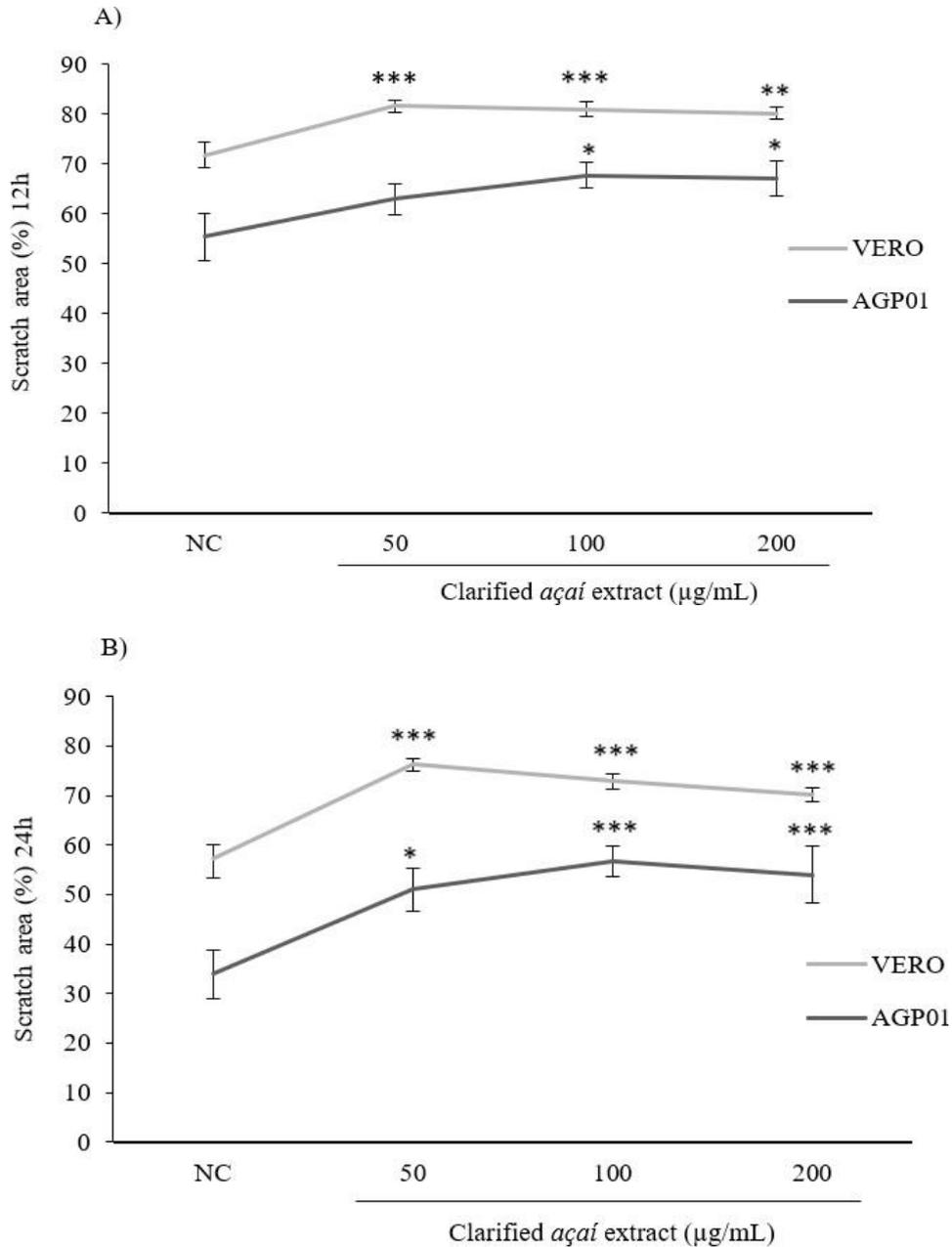


Figure 4: Migration of VERO and AGP1 cells observed after treatment with clarified açai extract at 12 h (A) and 24 h (B). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  and \*\*\* $p < 0,001$  when compared to their respective negative controls (Two-way ANOVA/Tukey's posttest). NC: negative control. Data are expressed as the mean values obtained from four independent experiments.

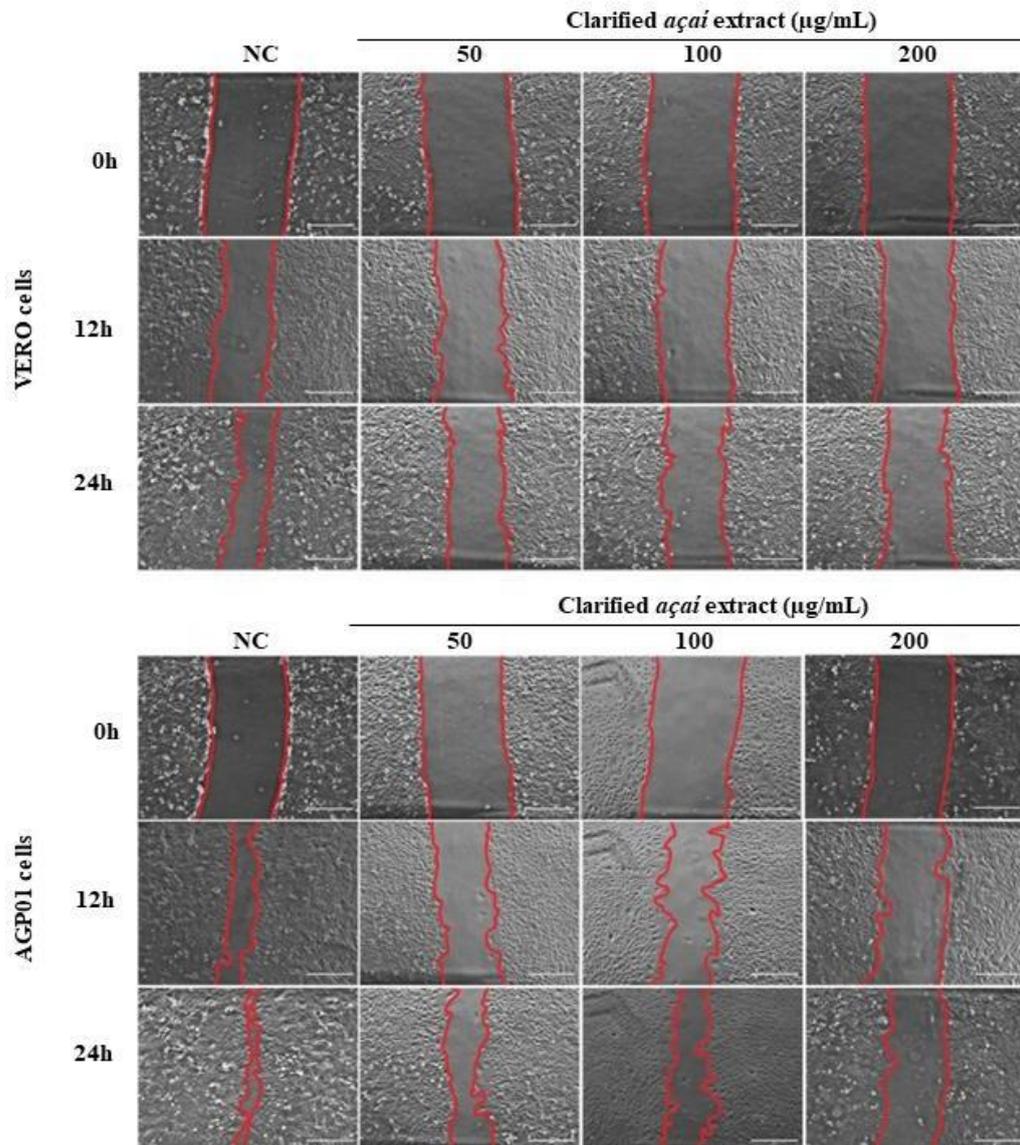


Figure 5: The migratory profiles of VERO and AGP01 cells after treatment with clarified *açai* extract at 0h, 12 h and 24 h as observed in an optical microscope.

#### 4. Discussion

The results of the resazurin reduction assay showed that CA had no effect on the viability of the VERO cell line in both 24 and 72 h harvest times (Figures 1A and 1B). We did not find any studies in the literature that have evaluated the effects of *açaí* on VERO cells, however, there are studies that demonstrate the absence of cytotoxicity of *açaí* extracts against non-tumor cells (Marques et al., 2017; Arrifano et al., 2018). Although CA showed no effect on VERO cells, it significantly reduced the viability of the AGP01 cell line after 72 hours of treatment, starting at a concentration of 25  $\mu\text{g/mL}$  (Figure 1B). To date, there is no other published work that has tested the effects of any *açaí* extract on a gastric cancer cell line. However, there are reports of *açaí*'s antineoplastic activity against other types of cancer. Jobim et al. (2019) evaluated the effect of *açaí* hydroalcoholic extract on the DU-145 prostate cancer cells. The authors tested concentrations between 1 and 1000  $\mu\text{g/mL}$ . At 48 and 72 hours of treatment, all the concentrations tested caused a significant decrease in viability. Silva et al. (2014) tested hydroalcoholic extracts of *açaí* pulp and seeds on breast cancer and colorectal cancer cell lines. The authors observed effects only in the treatment with the seed extract and only in the breast cancer cell line (MCF-7), which showed a significant reduction in viability.

The anti-tumor effects of *açaí* extracts, both pulp and seed, are mainly due to the presence of phenolic compounds in their composition. It has been reported in the literature that phenolic compounds exert antioxidant activity in normal cells, however, can act as pro-oxidants in tumor cells. The pro-oxidant action of phenolic compounds is based on the generation of phenoxyl radicals or oxidizing complexes associated with transition metal ions, which generates reactive oxygen species (ROS), resulting in oxidative damage (Halliwell, 2011). As neoplastic cells have a higher concentration of copper ions and greater metabolic activity than non-tumor cells, pro-oxidant components raise cellular ROS levels to cytotoxic levels in these cells, but not in normal cells (Eghbaliferiz and Iranshahi, 2016). This mechanism could possibly explain the differences in cell viability found in the cells tested in this study. However, experiments assessing oxidative stress would be necessary to confirm this hypothesis.

In our genotoxicity evaluation results, there was no genotoxic effect of CA detected by the comet assay at any concentration for the two cell lines evaluated (Figure 2). These results are in line with the literature. Several studies have shown that *açaí* does not cause genotoxic and/or mutagenic effects, either *in vivo* or *in vitro* (Marques et al., 2016; 2017; Ribeiro et al., 2010). Regarding the assessment of cytotoxicity by fluorescent dyes, we also did not observe cell death (apoptosis or necrosis) caused by treatment with the extract (Figure 3). Silva et al. (2014) also reported that there was no cell death by apoptosis in the MCF-7 cell line treated with hydroalcoholic extract of the *açaí* seed, however they observed signs of autophagy in morphological analyzes, which would explain the reduction in viability of this cell line. Subsequently, Freitas et al. (2017) also evaluated the effect of the hydroalcoholic extract of the *açaí* seed on MCF-7 cell line and observed, in addition to autophagy, the occurrence of cell death by necrosis.

Phenolic compounds can cause oxidative damage that results in autophagy. Autophagy is a process of self-digestion that aims to recycle nutrients from damaged components in cells, which can be a response to various stress conditions. In tumor cells, reactive oxygen species can induce autophagy via oxidative stress, or autophagy can occur to reduce reactive oxygen species (Yun and Lee, 2018). In the present study, no morphological analyses were carried out to detect autophagy. However, as we observed neither apoptosis nor necrosis in our results, it is possible that the reduction in viability observed in AGP01 cells occurred due to the induction of autophagy. As previously mentioned, hydroalcoholic extracts of the *açaí* seed can induce this type of cell death (Freitas et al., 2017; Silva et al., 2014). Autophagy, induced by *açaí* seed oil, was also observed in colorectal cancer cells (Silva et al., 2023).

The wound healing assay carried out in this study showed that the clarified *açaí* extract significantly reduced the migratory capacity of both VERO and AGP01 cell lines (Figures 4 and 5). No studies in the literature have assessed the antimigratory potential of *açaí* extract in tumor cell lines, posing challenges in interpreting our migration data for the AGP01 cell line. Nevertheless, there are several studies showing the antimigratory effects of specific substances

found in *açaí* in cancer cells. For example, Fragoso et al. (2018) observed that cyanidin-3-glucoside reduces the motility of RKO colon cancer cells. Chen et al. (2006) found that both cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside decrease the invasiveness and motility of A549, a highly metastatic and invasive lung carcinoma cell line. Cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside are among the five major anthocyanins present in the CA used in our experiments. The other components include orientin and homoorientin, which are flavonoids of the flavone group, and taxifolin deoxyhexose, a flavonoid belonging to the flavonol group (Arrifano et al., 2018). According to Xie et al. (2021), taxifolin reduces the migratory potential of two gastric cancer cell lines (AGS and NCI-187). In general, these substances act as antimigratory agents in neoplastic cells when tested individually. In our extract, when used together, these substances demonstrated the same effect on AGP01 cells. Our results reveal the potential for further research on the use of *açaí* as an adjunct in the treatment of gastric cancer, as it could prevent the migration and invasion of cells of this type of neoplasia.

The literature has demonstrated that *açaí* has an efficient ability to induce migration in non-transformed cells, as observed in HDFa human fibroblast dermal cells (Matta et al., 2020). Interdonato et al. (2023) found that administering açai pulp can modulate the Wnt signaling pathway, triggering the synthesis of growth factors involved in the wound healing process, such as TGF- $\beta$  and VEGF. TGF- $\beta$  is a potent stimulator of fibroblast and endothelial cell migration.

Although the literature indicates that *açaí* preferentially acts as a facilitating agent for migration in non-transformed cells, our experiments in VERO cells did not observe such effects. Nonetheless, our findings are consistent with those of Costa et al. (2021). The authors found that the hydroalcoholic extract of *açaí* used as a dietary supplement reduces the migratory potential of the human microvascular endothelial cell line HMEC-1, similar to the findings in the present study, for the VERO cell line. Another similarity with our results is that the observed anti-migratory action observed by the authors occurred in the absence of cytotoxicity. The authors also analyzed the extract's chemical composition, which indicated the existence of anthocyanins such as cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside.

One possible explanation for the observed antimigratory effect in both cell lines in the present study is that the CA extract may be inhibiting the Wnt pathway in our experimental conditions, which in turn inhibits the synthesis of growth factors important for cell motility, such as TGF- $\beta$ . Existing literature provides evidence that *açaí* inhibits TGF- $\beta$  synthesis and supports this hypothesis (Cordeiro et al., 2018; Zhou et al., 2018).

Inhibition of the Wnt pathway also decreases the production of transcription factors such as TCF/LCF, which are associated with the transcription of various genes involved in proliferation, apoptosis, migration, angiogenesis, and the initiation of epithelial-mesenchymal transition (EMT), which confers a more invasive behavior to neoplastic cells. Phenolic compounds can induce negative regulation of proteins crucial for epithelial phenotype, such as E-cadherin, and raise markers of mesenchymal cells, including N-cadherin. In their study, Xie et al. (2021) demonstrated this alteration prompted by taxifolin in the two gastric cancer cell lines utilized. Orientin and homoorientin can alter the transcription of metalloproteinases that are related to migratory potential in cancer cells (Ye et al., 2016; Kim et al., 2018), potentially via the Wnt pathway. However, inhibition of growth factors such as TGF- $\beta$  and transcription factors such as TCF in our experimental conditions needs to be confirmed using specific methods.

## **5. Conclusion**

In conclusion, the clarified *açaí* juice extract did not cause cytotoxic (apoptosis and necrosis) or genotoxic effects to VERO and AGP01 cell lines. However, the extract moderately decreased the viability of the neoplastic cell line and exhibited anti-migratory potential for both cell lines, which can be explored regarding its potential as a co-adjuvant in the treatment of neoplasia. The specific mechanisms underlying this inhibition needs to be elucidated. This study is the first to investigate the impact of *açaí* extract on gastric cancer cells. Furthermore, the features of clarified *açaí* polyphenols may show promising results for other types of cancer in future studies, due to the synergetic effects of the specific components.

## **Authors' contributions**

**Thiago S. Santos:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – Original draft, Writing – Review and editing. **Marcelo O. Bahia:** Conceptualization, Validation, Formal analysis, Resources, Writing – Original draft, Writing – Review and editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Adriana C. Guimarães:** Resources, Writing – Review and editing, Funding acquisition. **Carolina R. T. Souza:** Resources, Writing – Review and editing, Funding acquisition. **Nilton A. Muto:** Methodology, Resources, Writing – Review and editing. **Hervé Rogez:** Methodology, Resources, Writing – Review and editing. **Rommel M. R. Burbano:** Conceptualization, Resources, Writing – Original draft, Writing – Review and editing, Supervision, Funding acquisition.

## **Declaration of interests**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## **Acknowledgements**

The author thanks the Brazilian agencies CNPq and CAPES for the support.

## References

- Alessandra-Perini, J., Rodrigues-Baptista, K.C., Machado, D.E., Nasciutti, L.E., Perini, J.A., 2018. Anticancer potential, molecular mechanisms and toxicity of *Euterpe oleracea* extract (açai): A systematic review. *PLoS ONE* 13, e0200101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200101>
- Arrifano, G.P.F., Lichtenstein, M.P., Souza-Monteiro, J.R., Farina, M., Rogez, H., Carvalho, J.C.T., Suñol, C., Crespo-López, M.E., 2018. Clarified Açai (*Euterpe oleracea*) Juice as an Anticonvulsant Agent: In Vitro Mechanistic Study of GABAergic Targets. *Oxid Med Cell Longev* 2018, 2678089. <https://doi.org/10.1155/2018/2678089>
- Chan, L.L.-Y., Kuksin, D., Laverty, D.J., Saldi, S., Qiu, J., 2015. Morphological observation and analysis using automated image cytometry for the comparison of trypan blue and fluorescence-based viability detection method. *Cytotechnology* 67, 461–473. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9704-5>
- Chen, P.-N., Chu, S.-C., Chiou, H.-L., Kuo, W.-H., Chiang, C.-L., Hsieh, Y.-S., 2006. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Lett* 235, 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.04.033>
- Cordeiro, V.S.C., Bem, G.F., Costa, C.A., Santos, I.B., Carvalho, L.C.R.M., Ognibene, D.T., Rocha, A.P.M., Carvalho, J.J., Moura, R.S., Resende, A.C., 2018. *Euterpe oleracea* Mart. seed extract protects against renal injury in diabetic and spontaneously hypertensive rats: role of inflammation and oxidative stress. *Eur J Nutr* 57, 817–832. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1371-1>
- Costa, R., Azevedo, D., Barata, P., Soares, R., Guido, L.F., Carvalho, D.O., 2021. Antiangiogenic and Antioxidant In Vitro Properties of Hydroethanolic Extract from açai (*Euterpe oleracea*) Dietary Powder Supplement. *Molecules* 26, 2011. <https://doi.org/10.3390/molecules26072011>
- Diaconeasa, Z., Leopold, L., Ruginã, D., Ayvaz, H., Socaciu, C., 2015. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin rich extracts from blueberry and blackcurrant juice. *Int J Mol Sci* 16, 2352–2365. <https://doi.org/10.3390/ijms16022352>
- Dias, A.L.S., Rozet, E., Chataigné, G., Oliveira, A.C., Rabelo, C. a. S., Hubert, P., Rogez, H., Quetin-Leclercq, J., 2012. A rapid validated UHPLC-PDA method for anthocyanins quantification from *Euterpe oleracea* fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 907, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.09.015>
- Dias, A.L.S., Rozet, E., Larondelle, Y., Hubert, P., Rogez, H., Quetin-Leclercq, J., 2013. Development and validation of an UHPLC-LTQ-Orbitrap MS method for non-anthocyanin flavonoids quantification in *Euterpe oleracea* juice. *Anal Bioanal Chem* 405, 9235–9249. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7325-z>
- Dias, M.M. dos S., Noratto, G., Martino, H.S.D., Arbizu, S., Peluzio, M. do C.G., Talcott, S., Ramos, A.M., Mertens-Talcott, S.U., 2014. Pro-apoptotic activities of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in human SW-480 colon cancer cells. *Nutr Cancer* 66, 1394–1405. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.956252>
- Eghbaliferiz, S., Iranshahi, M., 2016. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. *Phytother Res* 30, 1379–1391. <https://doi.org/10.1002/ptr.5643>

Fragoso, M.F., Romualdo, G.R., Vanderveer, L.A., Franco-Barraza, J., Cukierman, E., Clapper, M.L., Carvalho, R.F., Barbisan, L.F., 2018. Lyophilized açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart) attenuates colitis-associated colon carcinogenesis while its main anthocyanin has the potential to affect the motility of colon cancer cells. *Food Chem Toxicol* 121, 237–245.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.078>

Freitas, D. da S., Morgado-Díaz, J.A., Gehren, A.S., Vidal, F.C.B., Fernandes, R.M.T., Romão, W., Tose, L.V., Frazão, F.N.S., Costa, M.C.P., Silva, D.F., Nascimento, M. do D.S.B., 2017. Cytotoxic analysis and chemical characterization of fractions of the hydroalcoholic extract of the *Euterpe oleracea* Mart. seed in the MCF-7 cell line. *J Pharm Pharmacol* 69, 714–721.

<https://doi.org/10.1111/jphp.12679>

Halliwell, B., 2011. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci* 32, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002>

Interdonato, L., Marino, Y., Franco, G.A., Arangia, A., D'Amico, R., Siracusa, R., Cordaro, M., Impellizzeri, D., Fusco, R., Cuzzocrea, S., Paola, R.D., 2023. Açai Berry Administration Promotes Wound Healing through Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway. *Int J Mol Sci* 24, 834.

<https://doi.org/10.3390/ijms24010834>

Jobim, M.L., Barbisan, F., Fortuna, M., Teixeira, C.F., Boligon, A.A., Ribeiro, E.E., Cruz, I.B.M. da, 2019. Açai (*Euterpe oleracea*, Mart.), an Amazonian fruit has antitumor effects on prostate cancer cells. *Archives in Biosciences & Health* 1, 61–76.

<https://doi.org/10.18593/abh.16966>

Kim, S.-J., Pham, T.-H., Bak, Y., Ryu, H.-W., Oh, S.-R., Yoon, D.-Y., 2018. Orientin inhibits invasion by suppressing MMP-9 and IL-8 expression via the PKC $\alpha$ /ERK/AP-1/STAT3-mediated signaling pathways in TPA-treated MCF-7 breast cancer cells. *Phytomedicine* 50, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.172>

Leal, M.F., Martins do Nascimento, J.L., da Silva, C.E.A., Vita Lamarão, M.F., Calcagno, D.Q., Khayat, A.S., Assumpção, P.P., Cabral, I.R., de Arruda Cardoso Smith, M., Burbano, R.R., 2009. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 195, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2009.04.020>

Lee, J.Y., Kim, N., Choi, Yoon Jeong, Nam, R.H., Lee, S., Ham, M.H., Suh, J.H., Choi, Yoon Jin, Lee, H.S., Lee, D.H., 2016. Anti-inflammatory and Anti-tumorigenic Effects of Açai Berry in *Helicobacter felis*-infected mice. *J Cancer Prev* 21, 48–54.

<https://doi.org/10.15430/JCP.2016.21.1.48>

Marques, E.S., Froder, J.G., Carvalho, J.C.T., Rosa, P.C.P., Perazzo, F.F., Maistro, E.L., 2016. Evaluation of the genotoxicity of *Euterpe oleracea* Mart. (Arecaceae) fruit oil (açai), in mammalian cells in vivo. *Food Chem Toxicol* 93, 13–19.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.018>

Marques, E.S., Tsuboy, M.S.F., Carvalho, J.C.T., Rosa, P.C.P., Perazzo, F.F., Gaivão, I.O.M., Maistro, E.L., 2017. First cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic assessment of *Euterpe oleracea* fruit oil (açai) in cultured human cells. *Genet Mol Res* 16.

<https://doi.org/10.4238/gmr16039700>

Matta, F.V., Xiong, J., Lila, M.A., Ward, N., Felipe-Sotelo, M., Esposito, D., 2020. Chemical Composition and Bioactive Properties of Commercial and Non-Commercial Purple and White Açai Berries. *Foods (Basel, Switzerland)* 9. <https://doi.org/10.3390/foods9101481>

- Moura, R.S., Resende, Â.C., 2016. Cardiovascular and Metabolic Effects of Açai, an Amazon Plant. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 68, 19. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000347>
- Mourão, L., 2010. História e natureza: Do açai ao palmito. *Revista Territórios e Fronteiras* 3, 74–96. <https://doi.org/10.22228/rt-f.v3i2.69>
- Nogueira, O.L., Figueiredo, F.J.C., Muller, A.A., 2005. Sistemas de produção: Açai. EMBRAPA. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/408196/1/SISTEMAPROD4ONLINE.pdf> (accessed 07 Jan 2024).
- Oliveira, N.K.S., Almeida, M.R.S., Pontes, F.M.M., Barcelos, M.P., de Paula da Silva, C.H.T., Rosa, J.M.C., Cruz, R.A.S., da Silva Hage-Melim, L.I., 2019. Antioxidant Effect of Flavonoids Present in Euterpe oleracea Martius and Neurodegenerative Diseases: A Literature Review. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 19, 75–99. <https://doi.org/10.2174/1871524919666190502105855>
- Rawla, P., Barsouk, A., 2019. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Prz Gastroenterol* 14, 26–38. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.80001>
- Ribeiro, J.C., Antunes, L.M.G., Aissa, A.F., Darin, J.D.C., De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., Bianchi, M. de L.P., 2010. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutat Res* 695, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.10.009>
- Silva, S.M. da, 2019. Do consumo local ao mercado de alimentos saudáveis: como a crescente demanda por açai (*Euterpe oleracea* mart.) afeta os meios de vida de comunidades ribeirinhas? Master's dissertation (Programa de Pós-Graduação em Extensão Rural). Departamento de Economia Rural da Universidade Federal de Viçosa. 153 f. 2019. <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/27533/1/texto%20completo.pdf> (accessed 07 Jan 2024).
- Silva, D.F., Vidal, F.C.B., Santos, D., Costa, M.C.P., Morgado-Díaz, J.A., do Desterro Soares Brandão Nascimento, M., de Moura, R.S., 2014. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. *BMC Complement Altern Med* 14, 175. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-175>
- Silva, M.A.C.N., Tessmann, J.W., Borges, K.R.A., Wolff, L.A.S., Botelho, F.D., Vieira, L.A., Morgado-Diaz, J.A., Franca, T.C.C., Barbosa, M. do C.L., Nascimento, M. do D.S.B., Rocha, M.R., de Carvalho, J.E., 2023. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Oil Exerts a Cytotoxic Role over Colorectal Cancer Cells: Insights of Annexin A2 Regulation and Molecular Modeling. *Metabolites* 13, 789. <https://doi.org/10.3390/metabo13070789>
- Souza-Monteiro, J.R., Hamoy, M., Santana-Coelho, D., Arrifano, G.P.F., Paraense, R.S.O., Costa-Malaquias, A., Mendonça, J.R., da Silva, R.F., Monteiro, W.S.C., Rogez, H., de Oliveira, D.L., do Nascimento, J.L.M., Crespo-López, M.E., 2015. Anticonvulsant properties of *Euterpe oleracea* in mice. *Neurochem Int* 90, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.06.014>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Treloar, K.K., Simpson, M.J., 2013. Sensitivity of Edge Detection Methods for Quantifying Cell Migration Assays. *PLoS ONE* 8, e67389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067389>

Xie, J., Pang, Y., Wu, X., 2021. Taxifolin suppresses the malignant progression of gastric cancer by regulating the AhR/CYP1A1 signaling pathway. *Int J Mol Med* 48, 197. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5030>

Yasumura, Y., 1963. The research for the SV40 by means of tissue culture technique. *Nippon Rinsho* 21, 1201–1215.

Ye, T., Su, J., Huang, C., Yu, D., Dai, S., Huang, X., Chen, B., Zhou, M., 2016. Isoorientin induces apoptosis, decreases invasiveness, and downregulates VEGF secretion by activating AMPK signaling in pancreatic cancer cells. *Onco Targets Ther* 9, 7481–7492. <https://doi.org/10.2147/OTT.S122653>

Yun, C.W., Lee, S.H., 2018. The Roles of Autophagy in Cancer. *Int J Mol Sci* 19, 3466. <https://doi.org/10.3390/ijms19113466>

Zhou, J., Zhang, J., Wang, C., Qu, S., Zhu, Y., Yang, Z., Wang, L., 2018. Açáí (*Euterpe oleracea* Mart.) attenuates alcohol-induced liver injury in rats by alleviating oxidative stress and inflammatory response. *Exp Ther Med* 15, 166–172. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5427>

**Declaration of interests**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: