

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

**Nathália Araújo Rocha**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO DE  
SEMENTES DE *Eschweilera ovata* (CAMBESS.) MIERS**

Juiz de Fora

2021

**Nathália Araújo Rocha**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO DE  
SEMENTES DE *Eschweilera ovata* (CAMBESS.) MIERS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Saúde da Universidade Federal  
de Juiz de Fora como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em Saúde. Área  
de concentração Saúde Brasileira

ORIENTADORA: Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nádia Rezende Barbosa Raposo

JUIZ DE FORA

2021

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Araújo Rocha, Nathália .

Avaliação in vitro das propriedades biológicas do extrato de sementes de *Eschweilera ovata* (Cambess.) Miers / Nathália Araújo Rocha. -- 2021.

80 p. : il.

Orientadora: Nádia Rezende Barbosa Raposo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2021.

1. *Eschweilera ovata*. 2. extrato vegetal. 3. citotoxicidade. 4. atividade antioxidante. 5. câncer de mama. I. Raposo, Nádia Rezende Barbosa, orient. II. Título.

**Nathália Araújo Rocha**

**Avaliação *in vitro* das propriedades biológicas do extrato de sementes de *Eschweilera ovata* (Cambess.) Miers**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira

Aprovada em 15 de junho de 2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo - Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Doutor Hudson Caetano Polonini  
Fagron BV

## AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus, que tem estado comigo em todos os momentos, me fortalecendo e derramado de sua graça sobre mim.

Agradeço também a todos que torceram por mim e me incentivaram, em especial:

Meus pais, Cláudio e Fátima, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, me incentivando a ir mais longe.

Meus irmãos Thiago e Felipe por me incentivarem e acreditarem que sou capaz, também celebrando comigo minhas conquistas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) pela possibilidade de realização desse projeto.

À UFJF pelo financiamento da bolsa de estudos durante o mestrado.

À minha orientadora, Professora Doutora Nádia Rezende Barbosa Raposo, por ser muito mais que uma excelente orientadora, ser também um ser humano que me deu apoio nos momentos que precisei, também se alegrando comigo nas minhas conquistas acadêmicas.

Ao professor Doutor Marcos Antônio Fernandes Brandão por sempre me incentivar a ser cada vez melhor no que me proponho a fazer, além de sua contribuição em diversos projetos realizados no núcleo.

Aos Dr. Hudson Polonini, que foi meu professor na graduação e ao Urias, que me ensinou muito, ambos se tornaram amigos queridos.

Aos professores Doutor César Augusto Caneschi e Professora Doutora Maria das Graças Afonso Miranda Chaves, pelo aceite em participar da banca.

À Dr. Cristine Bastos do Amarante, do Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém/PA) pela parceria.

Sou grata também aos colegas e parceiros do Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS). Em especial à Laura e Pollyana, com quem tive mais contato e sempre foram muito solícitas em ensinar o que sabiam e me ajudar no que precisei. Também agradeço ao Dr. César que me ajudou muito e Alexandre Lataliza que também sempre foi muito solícito.

Aos meus amigos da faculdade que permaneceram junto a mim durante toda essa caminhada, sempre me incentivando e torcendo por mim, muito obrigada a cada um de vocês por estarem comigo.

Aos meus amigos de modo geral, em especial Angélica, Alexandre, Adassa, Ludiaine, Luciane, Victória por me apoiarem e acreditarem em mim, a amizade de cada um de vocês faz diferença na minha vida.

“Mas a vereda dos justos é como a luz da aurora, que vai brilhando mais e mais até ser dia perfeito”.

Provérbios 4:18

## RESUMO

*Eschweilera ovata* (Cambess.) Miers tem sido usada na medicina popular, mas pouco se sabe sobre suas propriedades biológicas. Este trabalho teve como objetivo a triagem *in vitro* do extrato seco das sementes de *E. ovata*. Foi encontrado conteúdo fenólico significativo de  $349,10 \pm 28,50$  mg/100 mg e ótima capacidade antioxidante pelo método DPPH ( $CI_{50} = 5,19 \pm 0,36$  µg/mL). Além disso, o extrato foi potencialmente tóxico no ensaio de *Artemia salina* ( $CL_{50} = 203,41 \pm 3,70$  µg/mL) e reduziu significativamente a viabilidade do fibroblasto murino L929 e das linhas celulares de câncer de mama MDA-MB-231, MCF7 e 4T1. A análise elementar mostrou a composição das sementes de *E. ovata* de carbono ( $45,00 \pm 0,23\%$ ), hidrogênio ( $6,36 \pm 0,01\%$ ), nitrogênio ( $1,86 \pm 0,07\%$ ), enxofre ( $0,89 \pm 0,14\%$ ) e valor de proteína total de 11,62 %, sugerindo perfil nutritivo da amostra. Em conjunto, nossos resultados apoiam as propriedades biológicas das sementes de *E. ovata* e destacam a aplicabilidade potencial desta espécie nos campos de pesquisa farmacêutica e cosmética.

Palavra-chave: *Eschweilera ovata*; extrato vegetal; atividade antioxidante; citotoxicidade; câncer de mama.



## ABSTRACT

*Eschweilera ovata* (Cambess.) Miers has been used in folk medicine, but little is known about its biological properties. This study aimed to screen in vitro the dry extract of the *E. ovata* seeds. It was found significant phenolic content of  $349.10 \pm 28.50$  mg/100 mg and had optimum antioxidant capacity by the DPPH method ( $IC_{50} = 5.19 \pm 0.36$   $\mu$ g/mL). Besides, the extract was potentially toxic on the brine shrimp assay ( $LC_{50} = 203.41 \pm 3.70$   $\mu$ g/mL) and reduced significantly the viability of murine fibroblast L929 and the breast cancer cell lines MDA-MB-231, MCF7, and 4T1. The elemental analysis showed the *E. ovata* seeds composition of carbon ( $45.00 \pm 0.23\%$ ), hydrogen ( $6.36 \pm 0.01\%$ ), nitrogen ( $1.86 \pm 0.07\%$ ), sulfur ( $0.89 \pm 0.14\%$ ), and the total protein value of 11.62%, suggesting nutritive profile of the sample. Altogether, our findings support the biological properties of the *E. ovata* seeds and highlight the potential applicability of this specie on the pharmaceutical and cosmetic research fields.

Keywords: *Eschweilera ovata*; plant extract; antioxidant activity; cytotoxicity; breast cancer.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Estrutura anatômica da mama feminina humana .....21
- Figura 2 – Citotoxicidade do extrato obtido das sementes de *Eschweilera ovata* em células L929, MDA-MB-231, MCF7 e 4T1 pelo ensaio MTT 17.....43

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Atividade antioxidante do extrato seco obtido das sementes de *Eschweilera ovata* (ESEO) e do padrão de referência.....38
- Tabela 2 – Toxicidade aguda do extrato seco obtido das sementes de *Eschweilera ovata* (ESEO) frente microcrustáceo *Artemia salina* após 24 h de incubação.....40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AG	Ácido gálico
AGE	Ácido gálico equivalente
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKt	Proteína quinase B
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
BRAC 1	Gene associado ao câncer de mama 1
BRAC 2	Gene associado ao câncer de mama 2
CDK	Quinase dependente de ciclina
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória a 50%
CL <sub>50</sub>	Concentração letal a 50%
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazila
ER	Receptor de estrogênio
ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Fc	Fragmento cristalizável
H	Hora
HER 2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2

INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Min	Minuto
mL	Mililitro
MRI	Ressonância magnética
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio]
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBPK	<i>Physiologically Based Pharmacokinetic models</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PICS	Práticas Integrativas e Complementares
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPS	Política Nacional de Promoção da Saúde
PR	Receptor de progesterona
QALI	Ano de vida ajustado pela qualidade
QSAR	<i>Quantitative Structure-activity Relationship</i>
SERMs	Moduladores seletivos de receptor de estrogênio
SUS	Sistema Único de Saúde
T&CM	Medicina Tradicional e Complementar
TNM	Tumor-nódulo-metástase

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>4</b>
2.1 GERAL .....	4
2.2 ESPECÍFICOS .....	4
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
3.1 LECYTHIDACEAE POIT .....	5
<b>3.1.1 Gênero <i>Eschweilera</i> .....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.2 <i>Eschweilera ovata</i> (Cambess.) Mart. ex Miers .....</b>	<b>9</b>
3.2 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E TOXICIDADE .....	10
<b>3.2.1 Ensaio <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2.2 Atividade antioxidante .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2.3 Sequestro radicalar de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2.4 Cultura celular .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.5 Citotoxicidade .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.6 Ensaio de toxicidade .....</b>	<b>15</b>
3.3 FITOTERAPIA .....	16
<b>3.3.1 Espécies vegetais no tratamento de câncer .....</b>	<b>17</b>
3.4 CÂNCER DE MAMA .....	19
<b>3.4.1 Epidemiologia .....</b>	<b>19</b>
<b>3.4.2 Fisiopatologia .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4.3 Fatores de risco .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4.4 Diagnóstico .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4.5 Tratamento.....</b>	<b>27</b>
3.4.5.1 <i>Tratamento local</i> .....	27
3.4.5.2 <i>Tratamento sistêmico</i> .....	28
3.4.5.3 <i>Hormonioterapia</i> .....	29
3.4.5.4 <i>Terapia alvo</i> .....	30

3.4.5.4.1 Câncer de mama HER2+ .....	30
3.4.5.4.2 Câncer de mama BRCA .....	31
3.4.5.4.3 Câncer triplo negativo .....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1 MATERIAL VEGETAL .....	33
4.2 PREPARO DO EXTRATO .....	33
4.3 CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL .....	33
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	34
4.5 TOXICIDADE AGUDA .....	35
4.6 CITOTOXICIDADE .....	35
4.7 ANÁLISE ELEMENTAR CHNS .....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
5.1 CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL .....	37
5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	38
5.3 TOXICIDADE AGUDA FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO <i>Artemia salina</i> .....	39
5.4 CITOTOXICIDADE .....	41
5.5 ANÁLISE ELEMENTAR CHNS .....	44
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Eschweilera ovata* (Cambess.) Miers, vulgarmente conhecida como embiriba, é uma espécie arbórea tropical distribuída do norte do Espírito Santo ao leste da Amazônia (GONÇALVES, 2010). A *E. ovata* pertence à família Lecythidaceae, cujas espécies apresentam indicações etnofarmacológicas tais quais: anti-hipertensiva, analgésica, anti-helmíntica, anti-inflamatória, antisséptica, antioxidante e antitumoral (COSTA, 2003; OUTUKI *et al.*, 2015; SILVA, 2014a). Diferentes gêneros de *Eschweilera* apresentam atividade biológica diversificada, como antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica e antibacteriana (ANDREA BARROSO AMANCIO, 2011; OUTUKI *et al.*, 2015, 2016). A espécie *Eschweilera ovata* é popularmente utilizada para tratar dores estomacais, e musculares (DE FÁTIMA AGRA; DE FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; LIMA *et al.*, 2019; SILVA, 2014a). Além disso, sua madeira tem seu uso na fabricação de berimbau (GONÇALVES, 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), através da Medicina Tradicional e Complementar (do inglês, *traditional and complementary medicine* - T&CM), estimula a busca de mecanismos naturais de prevenção de agravo e recuperação da saúde. No Brasil, as T&CM foram integradas na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), que oferece diferentes práticas alternativas à medicina baseada em evidências no Sistema Único de Saúde (SUS) e dentre elas, a Fitoterapia (BRASIL, 2006).

A Fitoterapia é a mais usada dentre as práticas de Medicina alternativa em pacientes com câncer. Substâncias derivadas de metabólitos secundários são utilizadas no tratamento antitumoral, como o alcaloide vincristina, derivado das folhas de *Catharanthus roseus* (L.) G.Don; o diterpeno tricíclico paclitaxel, isolado da casca de *Taxus brevifolia* Nutt.; e a homoharringtonina, um alcaloide que pode ser isolado de diferentes espécies de *Cephalotaxus* (SECA; PINTO, 2018).

Apesar de sua evolução ao longo dos anos, a terapia convencional para tratamento de câncer de mama apresenta limitações como presença de efeitos colaterais e resistência multidroga. A quimioterapia e radioterapia são os tratamentos mais amplamente utilizados na prática médica, porém apresentam sérios efeitos colaterais que diminuem a qualidade de vida dos pacientes, e podem levar a alterações no plano terapêutico (DE ALMEIDA *et al.*, 2020). Outro problema na terapia anticâncer atual é a



resistência multidroga, pois, a terapia com a maioria dos medicamentos falha e a taxa de sobrevida do paciente é reduzida (MITRA; DASH, 2018).

A neoplasia maligna da mama é o segundo tipo de neoplasia mais incidente mundialmente, com 2,1 milhões de novos casos em 2018, de um total de 18 milhões dos casos de câncer. O câncer de mama foi o tipo mais frequente em mulheres (24,2%). No triênio 2020-2022, é estimada a ocorrência de 625 mil novos casos de câncer a cada ano no Brasil, sendo esperado 66 mil novos casos de câncer de mama (INCA, 2020a). Entretanto, o câncer de mama apresenta bom prognóstico quando diagnosticado e tratado precocemente (BRASIL, 2018). Os sinais clínicos e sintomas comuns para a doença são o aparecimento de nódulo indolor, endurecido na mama, assimetria dos seios, mamilo retraído, retração cutânea, secreção mamilar sanguínea ou serosa unilateral e surgimento de edema cutâneo (WINTERS *et al.*, 2017). Alguns fatores de risco para o desenvolvimento dessa malignidade são: ser do sexo feminino, idade avançada, histórico familiar de câncer de mama, exposição a estrogênio, gravidez tardia, menopausa tardia, consumo de álcool e mutação de genes como o gene associado ao câncer de mama 1 (BRCA 1), o BRCA 2 e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER 2, do inglês *epidermal growth factor 2*) (SUN *et al.*, 2017). A avaliação do padrão molecular do tumor no carcinoma de mama é importante pois prediz o prognóstico da doença, assim como a resposta a terapias específicas. Esta pode ser feita por imuno-histquímica, na qual são quantificados os receptor de estrogênio alfa (REalfa), receptor de progesterona (RP) e o HER 2, ou por microarranjo, classificando os tumores em Luminal (A e B), HER e basaloide (INCA, 2019a; WAKS; WINER, 2019).

Ações de rastreamento podem ser realizadas para a detecção precoce do câncer de mama, tais quais: exame clínico das mamas, mamografia, ressonância nuclear magnética e ultrassonografia. O diagnóstico dessa malignidade é confirmado por meio da biópsia da lesão, com classificação histopatológica e molecular da doença (AKRAM *et al.*, 2017).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2019a), o tratamento pode ser local ou sistêmico, a depender do estadiamento da doença. O tratamento local consiste de cirurgia e radioterapia, e o sistêmico é composto por quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica.

Apesar de sua evolução ao longo dos anos, a terapia convencional para tratamento de câncer de mama apresenta limitações como presença de efeitos colaterais e

resistência multidroga. A quimioterapia e radioterapia são os tratamentos mais amplamente utilizados na prática médica, porém apresentam sérios efeitos colaterais que diminuem a qualidade de vida dos pacientes, e podem levar a alterações no plano terapêutico (DE ALMEIDA *et al.*, 2020). Outro problema na terapia anticâncer atual é a resistência multidroga, pois, a terapia com a maioria dos medicamentos falha e a taxa de sobrevivência do paciente é reduzida (MITRA; DASH, 2018).

Tendo em vista que o reconhecimento do uso de espécies vegetais como recurso natural, financeiramente acessível e eficaz para a síntese de quimioterápicos, e tratamento adjuvante no combate ao câncer tem crescido nas últimas décadas (LOPES; DOURADO; OLIVEIRA, 2017), e sabendo-se da escassez de estudos que avaliando o potencial farmacológico de *Eschweilera ovata*, esse estudo objetivou estudar as potenciais atividades biológicas do extrato hidroalcoólico das sementes de *Eschweilera ovata* (Cambess.) Miers. Com este propósito, foi realizada a quantificação de conteúdo fenólico total, avaliação das potencialidades biológicas (atividade antioxidante e antiproliferativa), toxicidade aguda do extrato frente a *Artemia salina*. Também foi avaliada a atividade citotóxica frente à linhagens celulares sadia e de adenocarcinoma mamário e feita análise elementar do extrato.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar as atividades biológicas e a toxicidade *in vitro* do extrato hidroalcoólico (seco) obtido das sementes de *Eschweilera ovata* (Cambess.) Miers.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Quantificar o conteúdo fenólico total através do método Folin–Ciocalteu

Determinar a atividade antioxidante do extrato seco de sementes de *Eschweilera ovata* pelo método de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH).

Avaliar a toxicidade aguda do extrato seco de *E. ovata* frente ao microcrustáceo marinho *Artemia salina*.

Analisar a atividade citotóxica *in vitro* do extrato estudado frente a linhagem celular sadia de fibroblasto murino (L929) e as linhagens celulares tumorais de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-231 e MCF7) e adenocarcinoma mamário murino (4T1).

Analisar os elementos carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre utilizando-se o analisador elementar CHNS/O.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 LECYTHIDACEAE POIT

A família Lecythidaceae Poit. é de distribuição pantropical, compreende 25 gêneros e cerca de 400 espécies, dentre as quais se encontra *Eschweilera ovata* (Cambess.) Mart. ex Mier (CATENACCI, 2015; COSTA, 2003). As Lecythidaceae se encontram distribuídas em regiões tropicais da África, Madagascar, Ilhas Maurício, Ásia, Austrália, ilhas do Pacífico, e nos Neotrópicos. Essa família é dividida em três subfamílias: Foetidioideae (leste da África), Planchonioideae (espécies localizadas nos trópicos africano e asiático, Austrália e Ilhas do Pacífico), e Lecythidoideae (composta por espécies neotropicais)(MORI *et al.*, 2007). No Brasil existem aproximadamente dez gêneros e 118 espécies, sendo 40 delas endêmicas. Dentre suas espécies há árvores, arbustos e lianas, que estão distribuídas predominantemente em terra firme da Bacia Amazônica e em áreas de menor altitude (abaixo de 1000 metros) (CATENACCI, 2015; SILVA, 2014b).

Estudos feitos com espécies dessa família têm identificado triterpenos pentacíclicos, saponinas, ácido elágico e alcaloides do tipo indol [2,1-b] quinazolínicos. Alguns constituintes como triterpenos pentacíclicos possuem atividade anti-inflamatória e antitumoral, e saponinas apresentam atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antihepatotóxica (COSTA, 2003).

Diversos estudos têm identificado atividades farmacológicas em espécies da família Lecythidaceae, tais quais: antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica, antiparasitária e antimicrobiana, dentre outras, como demonstrado abaixo.

A espécie *Bertholletia excelsa* Kunth (castanha-do-Brasil ou castanha-do-pará) é a espécie mais estudada dessa família, pelo fato de suas sementes serem utilizadas na fabricação de alimentos e cosméticos, sendo mundialmente comercializadas. Espécies dessa família podem ser utilizadas na culinária (*in natura* ou na preparação de alimentos), no artesanato, na área cosmética, na medicina popular para tratamento de sarnas, resfriado e dor de estômago, possuindo ainda atividade anti-inflamatória, antioxidante e antiparasitária (SILVA, 2014b; TEIXEIRA *et al.*, 2019b).

A espécie *Careya arborea* é usada na medicina tradicional chinesa, como antipirético, adstringente e tônico, sendo também utilizada para tratar sintomas da gripe, úlcera, doenças de pele, asma e dor de ouvido (AMBARDAR; AERI, 2013). Essa

espécie apresenta ações farmacológicas: antimicrobiana, antileishmaniosa, anticoagulante, antioxidante e antitumoral (AS; S, 2018). A análise do extrato etanólico das frutas dessa espécie revelaram a presença de alcaloides, flavonoides, taninos, esteróis, fenóis e óleos fixos. Dentre os fenóis, há elevada concentração de ácido gálico, o que justifica a atividade antibacteriana das frutas (AS; S, 2019). Senthilkumar e colaboradores (2007) testaram as atividades antitumoral e antioxidante de diferentes extratos obtidos a partir das cascas do caule de *Careya arborea* frente a diferentes linhagens celulares: HeLa (carcinoma cervical humano), HEP-2 (carcinoma de laringe humano), RD (rabdiosarcoma humano) e células Vero (epitelial renal de macaco verde africano). O extrato bruto de metanol 50%, clorofórmico, e de acetato de etila exibiram potente citotoxicidade contra a linhagem tumoral HELA, com  $CI_{50}$  variando de 6,25  $\mu\text{g/mL}$  a 9,4  $\mu\text{g/mL}$ . Os extratos metanólico bruto a 50% e clorofórmico, foram os mais ativos contra as linhagens celulares. Todos os extratos se mostraram seguros quando em contato com célula Vero não tumoral. Os extratos metanólico obtido e aquoso apresentaram potente atividade antioxidante, quando testados por diferentes métodos, dentre eles o DPPH (SENTHILKUMAR *et al.*, 2007).

O potencial citotóxico também foi testado quanto à espécie *Couroupita guianensis* frente à linhagem celular HT-29 (adenocarcinoma de cólon), constatando-se citotoxicidade do extrato de etil acetato da folha ( $CI_{50}=300 \mu\text{g/mL}$ ) e do extrato metanólico bruto da folha ( $CI_{50}=220 \mu\text{g/mL}$ ). A análise fitoquímica e o potencial antioxidante foram quantificados em diferentes extratos da espécie. Foram detectados terpenoides, glicosídeos, fenóis e flavonoides nos extratos clorofórmico, metanólico e acetato de etila da folha e do caule. O extrato metanólico da folha de *C. guianensis* apresentou maior conteúdo fenólico, de 96,90 mg EAG/g do extrato, apresentando a melhor atividade antioxidante dentre os extratos testados ( $CI_{50} = 16,15 \mu\text{g/mL}$ ) (SIRISHA; JAISHREE, 2018). Em outro estudo, o conteúdo fenólico total do extrato aquoso dessa espécie foi de  $343 \pm 0,8 \text{ mg EAG/g}$  do extrato, e com atividade antioxidante sequestradora do radical DPPH de 89,2% para a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , sendo evidenciada a relação entre o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante do extrato (SATHISHKUMAR *et al.*, 2016).

Extratos metanólicos da casca e da madeira de diferentes espécies da família Lecythidaceae foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana. O extrato oriundo das espécies *Corythophora amapaensis*, *Eschweilera coriacea*, *Gustavia hexapétala* e *Lecythis corrugata* apresentaram maior zona de inibição de crescimento quando em

contato com *Staphylococcus aureus*. A fração diclorometano das espécies *E. coriacea* e *Gustavia hexapetala* resultaram em maior halo de inibição de crescimento frente a *Escherichia coli* (ROVIRA *et al.*, 1999).

Diferentes extratos obtidos a partir de folha, da casca e de galho de *Barringtonia racemosa* foram avaliados quanto à atividade antifúngica por Hussin e colaboradores (2009) frente a sete diferentes fungos. O extrato metanólico obtido das folhas de *B. racemosa* foi o que apresentou maior efeito inibitório frente ao *Fusarium sp.* (53,45%), seguido por *Ganoderma lucidum* (34,57%), *Aspergillus* (32,27%) e *T. koningii* (20,99%). Bons resultados de inibição do crescimento fúngico também foram observados pelo extrato aquoso das folhas frente ao *Fusarium sp.* (51,72%) e pelo extrato etanólico da casca contra *Rhizopus sp.* (37,50%). Foram detectados diferentes padrões de ácido fenólico e flavonoide em diferentes extratos da folha, da casca e do galho de *B. racemosa*, sendo que o extrato hidrometanólico a 60% da folha apresentou maior concentração de ácido gálico (171,81 µg/mL). A presença de ácido fenólico e de flavonoide pode ser a justificativa para a ação fungicida dos extratos (HUSSIN *et al.*, 2009).

A espécie *Petersianthus macrocarpus* foi estudada quanto às suas atividades analgésica e antioxidante em estudo conduzido por Orabueze e colaboradores (2016). O extrato metanólico da casca do caule de *P. macrocarpus* e suas frações, administrados oralmente, apresentaram efeito analgésico significativo em camundongos albinos no teste de placa quente, no qual é avaliado o tempo de latência ao calor. O extrato proporcionou aumento de 84,5% do tempo de latência na concentração de 1.000 mg/Kg. As frações aquosa, acetato de etila, clorofórmica e hexânica também apresentaram aumento significativo no tempo de latência na dose de 200 mg/Kg (100,41%, 86,35%, 56,40% e 56,98%, respectivamente). O extrato metanólico demonstrou atividade antioxidante, com concentração inibitória mínima (CI<sub>50</sub>) de 50 µg/mL, e as frações aquosa e de acetato de etila na concentração de 100 µg/mL apresentaram atividade sequestradora de DPPH superior a 90%. O conteúdo fenólico total do extrato pelo reagente Folin-Ciocalteu foi de 142 mg/g de ácido gálico (ORABUEZE; ADESEGUN; COKER, 2016).

### 3.1.1 Gênero *Eschweilera*

*Eschweilera* é o maior gênero da família Lecythidaceae, com quase cem espécies, que podem ser encontradas no Brasil, Colômbia, Venezuela, Nicarágua, Suriname, Peru e Equador (TAVARES, 2014). No Brasil, suas espécies são frequentes no Norte e Nordeste, sendo utilizadas na construção de cercas, indústria madeireira e como combustível doméstico (CATENACCI, 2015; COSTA, 2003; SILVA, 2014b).

Estudos fitoquímicos têm identificado a presença de diterpenos (TAVARES, 2014), triterpenos (DE CARVALHO *et al.*, 1998), saponinas (COSTA, 2003), esteróis (DE CARVALHO *et al.*, 1998), derivados de ácido elágico, flavonoides (YANG *et al.*, 1998) em espécies do gênero *Eschweilera*.

Estudos têm identificado potenciais atividades biológicas em diferentes espécies de *Eschweilera*. De acordo com Rodrigues e colaboradores (2014), o extrato aquoso das folhas de *Eschweilera pedicellata* (Rich.) demonstrou atividade antifúngica frente às espécies *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, com concentração inibitória mínima (CIM) de 0,50 mg/mL, 1,0 mg/mL e 0,12 mg/mL, respectivamente (RODRIGUES *et al.*, 2014). Atividade antimicrobiana foi observada em extrato metanólico da madeira e das cascas de *Eschweilera coriacea* e de *E. congestiflora* quando em contato com *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus coli*. A fração apolar do extrato de *E. congestiflora* apresentou elevada atividade inibitória contra *E. coli* (ROVIRA 1999). Yang e colaboradores (1998) isolaram três derivados de ácido elágico de *E. coriacea*, o que poderia justificar sua atividade antifúngica.

Taylor e colaboradores (2006) registraram a citotoxicidade do extrato etanólico das folhas de *Eschweilera tenuifolia* frente à linhagem celular de câncer de cólon HT-29, com inibição de 77% das células tumorais na concentração de 100 µg/mL. O extrato etanólico das folhas, de galhos e da casca de *E. tenuifolia* também apresentaram atividade inibitória das proteases leucina aminopeptidase (LAP), elastase e catepsina D (TAYLOR *et al.*, 2006). O extrato etanólico da raiz de *Eschweilera bracteosa* apresentou fraca toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* (QUIGNARD *et al.*, 2003b).

Atividades antioxidante e anti-inflamatória foram demonstradas para a espécie *Eschweilera nana*, popularmente conhecida por sapucaia. As frações metanólica e etanólica do extrato hidroetanólico das folhas dessa espécie apresentaram bom potencial antioxidante, com concentração inibitória a 50% (CI<sub>50</sub>) de 12,63 ± 0,13 µg/mL e 10,87 ± 0,03 µg/mL, respectivamente. Essas mesmas frações também apresentaram atividade

anti-inflamatória tópica, com inibição de até 67% do edema. Foi observado no estudo que as funções antioxidante e anti-inflamatória possivelmente estavam ligadas à presença de rutina e de hiperosídeo no extrato estudado (OUTUKI *et al.*, 2015).

### 3.1.2 *Eschweilera ovata* (Cambess.) Mart. ex Miers

*Eschweilera ovata* (Cambess.) Mart. ex Miers é uma espécie de relevância ecológica e sócio-econômica, sendo popularmente conhecida por embiriba ou biriba. Tal espécie distribui-se em todo o Leste do Brasil (da Amazônia à região Sul), e é exclusiva de matas pluviais atlântica e amazônicas (SILVA, 2014b). Embiriba é uma espécie perenifólia (folhagem durante todo o ano), heliófila (necessita de total exposição solar), secundária e de dispersão moderadamente contínua ao longo de sua área de distribuição (OLIVEIRA *et al.*, 2012a). A espécie é climácica, mas atua como pioneira antrópica na ocupação de áreas degradadas, contribuindo com incremento de carbono e nitrogênio para restauração do solo (GUSSON, 2003).

Sua madeira é empregada na construção naval e civil, estacas, serviços de marcenaria e também é utilizada para a confecção de berimbau. Suas sementes servem de recursos para uma variedade de animais e para seres humanos, pois são comestíveis (GONÇALVES, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012a; SILVA, 2014b; TEIXEIRA *et al.*, 2019b).

A espécie *Eschweilera ovata* também apresenta atividades biológicas, como registradas em diferentes pesquisas. Segundo Agra e colaboradores (2007), o óleo extraído das sementes de *E. ovata* é utilizado como emoliente contra dores musculares no Nordeste do Brasil e suas sementes são ingeridas como alimento, por serem fonte de proteína (DE FÁTIMA AGRA; DE FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

Em Juazeiro do Norte, o chá feito a partir das sementes de *E. ovata* é utilizada por curandeiros para alívio de dores estomacais (LIMA *et al.*, 2019). O extrato metanólico das folhas dessa espécie apresentou atividade antioxidante pelo método DPPH, com  $CI_{50}$  (extrato seco necessário para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH) de  $52,2 \pm 5,9 \mu\text{g/mL}$ . Foi quantificado o conteúdo fenólico total de tal extrato, no qual foram encontrados 4,4 g de ácido pirogálico/100g do extrato, empregando o método de Ciocalteu (CFT) (SANTANA; NUNEZ; MOYA, 2015).

Deste modo, devido à escassez de dados na literatura, estudo das propriedades biológicas de *Eschweilera ovata* (Cambess.) Mart. ex Miers se torna importante para



nosso grupo de estudo. Portanto, neste estudo foram avaliados o conteúdo fenólico total, a atividade antioxidante, a toxicidade aguda, citotoxicidade, e, por fim, a quantificação do conteúdo de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e enxofre (S) pelo analisador elementar CHNS/O do extrato liofilizado obtido das sementes de *E. ovata*.

## 3.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E TOXICIDADE

### 3.2.1 Ensaios *in silico* e *in vitro*

A pesquisa científica com animais é utilizada desde a antiguidade e tem sido contestada nas últimas décadas, pelo grande número de animais utilizados e pelo sofrimento causado a eles (VICTAL *et al.*, 2014). Métodos alternativos à utilização animal têm sido aplicados para avaliação de propriedades biológicas e toxicidade. Tais métodos se baseiam no programa denominado de 3 R's que consiste em redução (*reduction*) do número de animais utilizados por estudo, o que pode se dar através da melhoria do desenho experimental e desenvolvimento de metodologias como *ex vivo* e *in vitro*; refinamento (*refinement*) do estudo, com uso de métodos que minimizem a dor e sofrimento sofridos pelos animais, como utilização de analgésicos e anestésicos adequados; e substituição (*replacement*) dos estudos *in vivo* por outras metodologias, como a *in silico* e *in vitro* (DÍAZ *et al.*, 2020).

Os estudos *in silico* são desenvolvidos através de programas computacionais que permitem a predição de propriedades químicas, efeitos biológicos e toxicológicos de uma substância química de acordo com a sua estrutura molecular (VICTAL *et al.*, 2014). Os modelos computacionais têm como vantagens sua rapidez, baixo custo, acurácia e o fato de poderem ser implementados antes dos compostos serem sintetizados (YANG *et al.*, 2018).

Tais modelos são utilizados em estágios iniciais de pesquisa e desenvolvimento (P&D), na seleção e otimização de moléculas com potencial de desenvolvimento e contribuem na redução do custo do desenvolvimento de novos candidatos a fármacos, com redução do número de animais em ensaios experimentais, assim como promove a química verde, por promover o aumento da eficiência do processo (CRONIN, 2010; YANG *et al.*, 2018). Muitos modelos computacionais têm sido desenvolvidos para avaliar a segurança de fármacos, e podem ser divididos em três categorias: classificação qualificativa (grau de toxicidade de fármaco), regressão quantitativa (predição da toxicidade exata de fármacos) e comparação cruzada (predição de *endpoints*

toxicológicos) (YANG *et al.*, 2018). Os testes *in silico* podem ser baseados em modelos matemáticos, QSAR (*Quantitative Structure-activity Relationship*), e PBPK (*Physiologically Based Pharmacokinetic models*), entre outros modelos, e podem fazer predição de toxicidade após a seleção, validação metodológica e fundamentação científica dos modelos inseridos (SANTOS, 2011).

Já as metodologias *in vitro* apresentam vantagens como a redução de custos, menor sujeição a interferentes externos, assim como menor utilização de espaço físico e fazem uso de organismos como bactérias, fungos, algas e crustáceos, além de frações do sistema biológico, tais como suspensões celulares, cultivo de tecidos, cultivos celulares, enzimas e proteínas (BEDNARCZUK *et al.*, 2010; BROWN *et al.*, 2019; DÍAZ *et al.*, 2020). Pode-se tomar como exemplo modelos *in vitro* desenvolvidos para o estudo de células tumorais, que permitem o estudo do crescimento e proliferação tumorais, migração celular, invasão, remodelamento matricial, intravasamento e extravasamento tumorais, angiogênese e liberação de fármacos, sendo que a complexidade de cada modelo dependerá dos objetivos a serem alcançados com o estudo (KATT *et al.*, 2016).

### 3.2.2 Atividade antioxidante

As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio são geradas constantemente no corpo humano e possuem funções biológicas benéficas no organismo como desintoxicação e defesa química, assim como para reações de biossíntese e sinalização celular, sendo mantidos em certos níveis pelo sistema antioxidante endógeno. Espécies reativas de oxigênio possuem moléculas como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), superóxido ( $O_2^-$ ), oxigênio *singlete* ( $1/2 O_2$ ) e radical hidroxil ( $OH\cdot$ ). As espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são derivadas do radical óxido nítrico (NO), e são formadas a partir da reação de óxido nítrico (NO) com superóxido ( $O_2^-$ ), gerando peróxido de nitrito ( $ONOO^-$ ), sendo capaz de formar outras espécies como dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) (PISOSCHI; POP, 2015).

Quando há espécies reativas geradas em excesso e o sistema antioxidante é incapaz de neutralizá-los, o equilíbrio entre elementos pró-oxidantes e antioxidantes é rompido, com maior presença de pró-oxidantes, o que é chamado de estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode levar à adaptação celular, através da regulação positiva do sistema antioxidante e reestabelecimento do equilíbrio no sistema pró e antioxidante. Porém, se não houver reestabelecimento desse balanço, o estresse oxidativo resultará em lesão celular, com EROs/ERNs atacando moléculas lipofílicas como DNA,

proteínas e lipídios. Como resultado de tal ataque, poderá ocorrer formação de produtos de peroxidação lipídica, amino ácido oxidados, bases de DNA oxidados, o que pode levar à perda de função, integridade e viabilidade celulares. A oxidação do DNA é prejudicial, pois impacta negativamente na transcrição e replicação genética. A oxidação lipídica tem potencial danoso com relação às membranas celulares, trazendo instabilidade à mesma, e podem também levar à ativação de aldeídos, que podem trazer prejuízo ao funcionamento proteico, por se fixar às proteínas. A oxidação proteica pode levar à perda da função destas por fatores como envelhecimento incorreto e oxidação da cadeia lateral das proteínas (GURER-ORHAN *et al.*, 2017; PISOSCHI; POP, 2015).

Para combater as espécies reativas, o organismo produz substâncias que são capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos, cumprindo sua função de antioxidante. O sistema antioxidante é compreendido de enzimas antioxidantes e de moléculas antioxidantes não enzimáticas. As enzimas antioxidantes são compreendidas de superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. As moléculas antioxidantes não enzimáticas compreendem a glutathione, proteínas e compostos de baixo peso molecular como coenzima Q, ácido lipóico, ácido ascórbico, tocoferol e ácido úrico (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013).

### **3.2.3 Sequestro radicalar de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)**

Existem diversos métodos de análise da atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, cada um com suas especificidades, vantagens e desvantagens. Tais testes têm sido utilizados de maneira usual, se tornando importantes ferramentas na triagem de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos (ALVES *et al.*, 2010).

O teste de sequestro de radical de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) se tornou popular entre os estudos de atividade antioxidante, pois é de simples execução (possui poucas etapas de reagentes), apresenta alta sensibilidade, acurácia, é rápido e de baixo custo. Os resultados são reprodutíveis e comparáveis a outros métodos de análise da atividade antioxidante. Este ensaio é útil na avaliação da atividade de sequestro de radical de fenol, catecóis e anilinas (ALVES *et al.*, 2010; GULCIN, 2020).

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável, por causa do deslocamento do elétron emparelhado por toda a molécula. Esse radical não se dimeriza e o deslocamento do elétron confere à molécula coloração violeta, caracterizada pela banda de absorção em etanol no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 517 nm.

Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma substância em sequestrar o radical DPPH, com redução deste a hidrazina. Quando em contato com uma substância doadora de átomo de hidrogênio, a solução de DPPH é reduzida, adquirindo coloração amarela. Os resultados são reportados como concentração de antioxidante que causa redução em 50% da absorvância de DPPH (MOON; SHIBAMOTO, 2009; SINGH; SINGH, 2008; THANGARAJ, 2016).

### 3.2.4 Cultura celular

A técnica de cultura de células foi desenvolvida como metodologia para estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em meio ambiente controlado. Pelo fato de manterem o genoma e os mecanismos fundamentais de proliferação, a cultura de células pode ser considerada um modelo experimental que serve como *screening* para estudo com animais. A princípio, esta técnica era feita usando-se tecidos fragmentados mecanicamente em frascos com fluidos dos animais de onde vinham os tecidos, sendo denominada cultivo de tecidos, do inglês, *tissue culture* (ASSIS et al., 2007; CHRISTINA; GUIMARÃES, 2010). Atualmente, a utilização da cultura de células não se delimita somente ao estudo do comportamento de células e tecidos *in vitro*, pois possui aplicabilidade médica, como no tratamento de doenças degenerativas, pesquisas com células-tronco, modelagem de doenças, estudo de doenças infecciosas e, no campo de estudo de neoplasias, culturas celulares tem papel fundamental no esclarecimento de diagnóstico e auxílio no tratamento de diversos tipos de neoplasias, sendo também implementadas no *screening* de candidatos a fármacos e biomarcadores tumorais (CHIARADIA; LANCASTER, 2020; FAN; DEMIRCI; CHEN, 2019).

O uso de cultivo celular como modelo experimental apresenta como principais vantagens o controle do ambiente, homogeneidade da amostra quando comparada aos animais, e o custo dos experimentos. Existem diferentes tipos de cultura, as com células primárias, células estabelecidas e células transformadas. A cultura primária se dá a partir do crescimento de células advindas de tecido por desagregação mecânica ou enzimática. A linhagem celular contínua consiste de células com alta proliferação e que não perderam as características do tecido da qual se originaram, sendo muito utilizada em pesquisas, por poder ser mantido em cultura por um longo período de tempo. Já as células transformadas são morfológica e geneticamente diferentes do tecido original, nas quais podem ocorrer mutações em genes responsáveis pelo controle do ciclo celular. Elas podem ser transformadas no meio de cultura, ou obtidas de tecidos

mutados, sendo muito utilizadas em estudos como os de citotoxicidade e de controle de qualidade (CHRISTINA; GUIMARÃES, 2010).

### 3.2.5 Citotoxicidade

Os objetivos principais do sistema *in vitro* tem sido a reprodução das características do tecido, suas interações célula-célula, criação de microambiente celular apropriado, *performance* rápida dos ensaios de citotoxicidade, acurácia e sensibilidade na identificação do *endpoint* do ensaio (MAHTO; CHANDRA; RHEE, 2010).

Diferentes métodos *in vitro* para avaliar a toxicidade de compostos, foram padronizados utilizando-se a cultura de células. Esses testes de toxicidade se dão colocando-se o material em contato com cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular (ROGERO *et al.*, 2003).

Dentre os métodos utilizados para estudo de citotoxicidade *in vitro*, tem-se o ensaio de redução de tetrazolio, redução de resazurina e da atividade de protease, que medem o metabolismo celular ou a atividade enzimática como marcadores da viabilidade celular (RISS *et al.*, 2016).

O ensaio de MTT pertence à categoria de redução de tetrazolio. Neste ensaio, o MTT é reduzido pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis com metabolismo ativo. Como resultado, tem-se a formação de formazan, um precipitado de coloração azul-magenta, cuja absorvância pode ser medida em comprimento de onda de 570 nm. O mecanismo exato de redução de MTT a formazan não é completamente entendido, mas provavelmente envolve reação com NADH ou moléculas redutoras similares, as quais transferem elétron para o MTT. O formazan formado precisa ser solubilizado antes da leitura em espectrofotômetro, sendo o montante de produto gerado, geralmente proporcional ao número de células viáveis metabolicamente ativas. Condições da cultura que alterem o metabolismo celular podem afetar a taxa de redução de MTT a formazan (MAHTO; CHANDRA; RHEE, 2010; RISS *et al.*, 2016)

Outro método colorimétrico utilizado é a avaliação da redução de resazurina. A solução de tal composto apresenta coloração azulada. As células viáveis com metabolismo ativo podem reduzir resazurina ao produto resofurina, de coloração rosa e é fluorescente. A quantidade de resofurina produzida é proporcional ao número de células viáveis, que podem ser quantificadas medindo-se sua fluorescência ou absorvância. Esse tipo de ensaio é relativamente barato, porém apresenta como

desvantagens a possibilidade de interferência fluorescente de compostos sendo testados, e seus efeitos tóxicos diretos sobre as células (RISS *et al.*, 2019).

Medir a atividade de protease conservada e constitutiva em células vivas demonstrou ser um marcador de viabilidade celular. O substrato de protease fluorogênica permeável a células (glicilfenilalanil-aminofluorocumarina; GF-AFC) é utilizado para detectar a atividade de protease de células viáveis. Tal substrato penetra células vivas onde ocorre remoção de aminoácidos pela atividade de aminopeptidase citoplasmática, com liberação de aminofluorocumarina e geração de sinal fluorescente proporcional ao número de células viáveis. Quando ocorre morte celular, a atividade protease desaparece, tornando essa atividade da protease um marcador seletivo da população de células viáveis (RISS *et al.*, 2016).

### 3.2.6 Ensaios de toxicidade

A avaliação de toxicidade de certa substância tem como objetivo prever seus possíveis efeitos nocivos quando em contato com o ser humano. Os testes de toxicidade podem ser utilizados em diferentes análises, como substâncias químicas, efluentes industriais, sedimentos, solos, entre outros. Os parâmetros avaliados em tais testes são mortalidade, taxa de natalidade, crescimento, tamanho corporal médio, genotoxicidade, entre outros. A agência que elabora normas concernentes aos testes de toxicidade no Brasil, é a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), padronizando testes com organismos-padrão (SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015).

Os bioensaios podem ser utilizados como forma de avaliação da toxicidade de certa substância, fazendo uso de organismos vivos para determinação de tal toxicidade. No bioensaio, certo organismo é colocado em contato com diferentes concentrações da substância potencialmente tóxica e é observado se há efeitos no comportamento ou sobrevivência de tal organismo. Diferentes organismos podem ser utilizados nos bioensaios como: bactérias (*Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium phosphoreum* and *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*), algas (*Raphidocelis subcapitata*), organismos invertebrados (*Daphnia magna*, *Artemia salina*, *Thamnocephalus platyurus*), peixes e mexilhões (GHOSH; THAKUR; KAUSHIK, 2017).

*Artemia* spp. são crustáceos pertencentes à família Anostraca, e são largamente utilizados em estudos de letalidade e avaliações toxicológicas. O gênero *Artemia* possui seis espécies, sendo as mais utilizadas em estudo de atividade biológica a *Artemia*

*salina*, *A. franciscana* e *A. urmiana*. Tais microcrustáceos são comuns em ambientes isolados em água com alta salinidade e relativamente quente, como lagos salgados, lagoas e minas de sal (NTUNGWE N *et al.*, 2020).

Bioensaios utilizando *Artemia salina* são caracterizados pelo seu baixo custo, tempo de obtenção do resultado curto, além de não exigir equipamentos sofisticados para a execução dos testes, o que permite a utilização desses organismos em uma variedade de estudos (ARCANJO *et al.*, 2012; DE SOUZA LIMA; SOTO-BLANCO, 2010; FREIRES *et al.*, 2017; QUIGNARD *et al.*, 2003a).

O bioensaio de toxicidade utilizando *Artemia salina* Leach é um método simples de *screening* da toxicidade de extratos vegetais, sendo também utilizado para estudo de atividade biológica, sendo indicador de potencial atividade antitumoral inseticida e antifúngica (KARCHESY *et al.*, 2016; NTUNGWE N *et al.*, 2020). Tal bioensaio também tem sido utilizado para guiar o isolamento de biocompostos, testar a qualidade da água e detecção de toxinas fúngicas (ARCANJO *et al.*, 2012; KARCHESY *et al.*, 2016).

### 3.3 FITOTERAPIA

A riqueza e diversidade contidas na flora são recursos únicos para o potencial desenvolvimento de medicamentos, porém, uma pequena porcentagem de plantas tem sido investigada quanto às suas propriedades fitoquímicas e farmacológicas. Acredita-se que aproximadamente 50 mil espécies tenham sido utilizadas com propósitos medicinais, mas somente cerca de 5 mil espécies foram estudadas, com evidência para uso medicinal. Recentemente, porém, tem havido aumento do número de publicações científicas voltadas ao estudo de medicina herbal, demonstrando o crescente interesse científico nessa área (POPOVIĆ *et al.*, 2016).

O uso de plantas medicinais, seja para tratamento ou prevenção de enfermidades, pode ser considerado uma das práticas médicas mais antigas, havendo compêndios de plantas utilizadas com propósitos medicinais que datam de 200 D.C.. Em países em desenvolvimento, a fitoterapia e outras práticas de medicina tradicional podem ser a única opção terapêutica em muitas comunidades (DE MORAES MELLO BOCCOLINI; SIQUEIRA BOCCOLINI, 2020; LI; WENG, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), desde a Conferência Internacional sobre Assistência Primária em Saúde de 1978, tem incentivado o uso de plantas medicinais de modo seguro para tratamentos de saúde, uma vez que 80% da população

faz uso de tais recursos na atenção primária à saúde, sendo a população de países em desenvolvimento os que mais utilizam essas práticas. O uso de medicina complementar tem crescido em países desenvolvidos para prevenção de doenças e promoção da saúde. Já nos países em desenvolvimento, o uso de medicina tradicional pode ser atribuído à sua acessibilidade, o que está possivelmente ligado ao conjunto de conhecimentos e crenças da população, uma vez que a medicina complementar pode ser o único meio de acesso a tratamento de saúde (DE MORAES MELLO BOCCOLINI; SIQUEIRA BOCCOLINI, 2020).

No Brasil, a medicina tradicional foi construída a partir do conhecimento e prática de diversos grupos, especialmente indígenas, africanos e europeus. O uso de plantas medicinais se destaca entre as diversas práticas da medicina tradicional (ZANK; HANAZAKI, 2017). Na década de 1980, o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais possibilitou o uso de fitoterapia na saúde pública, observou-se crescimento no número de programas municipais de fitoterapia a partir dos anos 1990, com a criação do SUS (RIBEIRO, 2019).

Reconhecendo a necessidade de práticas de saúde mais integrativas e participativas, o governo brasileiro promulgou em 2006 a Política Nacional de Promoção da Saúde (PNPS). Procurando fortalecer as Práticas Integrativas e Complementares (PICS), o Ministro da Saúde o promulgou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (DE MORAES MELLO BOCCOLINI; SIQUEIRA BOCCOLINI, 2020; FRANCO DE SÁ; NOGUEIRA; GUERRA, 2019). Através dessa Política, passaram a ser oferecidas no SUS diversas práticas integrativas e complementares, tais quais: fitoterapia, homeopatia, medicina tradicional chinesa/acupuntura e medicina antroposófica. Em 2008, havia oferta de Medicina Tradicional e Complementar (MT&C) em 25% dos municípios brasileiros, com forte presença na atenção primária à saúde, principalmente na Estratégia Saúde da Família (ESF) (DE SOUSA; TESSER, 2017).

### **3.3.1 Espécies vegetais no tratamento de câncer**

Pacientes diagnosticados com câncer têm feito uso de medicina tradicional e complementar em conjunto com terapias medicamentosas convencionais, como quimioterapia e radioterapia, tanto para cura quanto para auxílio no tratamento da doença (GALL *et al.*, 2018). Os fitoquímicos derivados de espécies vegetais são mais utilizados no tratamento de câncer devido à sua baixa toxicidade, segurança e



disponibilidade. Fitoquímicos de diferentes classes têm sido utilizados como agentes terapêuticos no desenvolvimento de medicamentos no combate ao câncer de mama, como polifenóis, alcaloides, flavonoides, terpenoides, saponinas, glicosídeos, e proteínas (SUBRAMANI; LAKSHMANASWAMY, 2017).

O metabólito secundário da classe dos alcaloides denominado vinca foi isolado de *Catharanthus roseus* (antiga *Vinca rosea*) em 1950. O uso desse alcaloide foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de diferentes tipos de câncer, como câncer de mama e pulmão, leucemia, e linfoma de Hodgkin. Devido aos seus efeitos no combate ao câncer, vários análogos foram obtidos, como vincristina e vimblastina. Vincristina é o mais potente entre os alcaloides de vinca, sendo obtida a partir de *Catharanthus roseus* em 1961, e aprovada pelo FDA em 1963, sendo utilizado para o tratamento de câncer de mama, linfoma Hodgkin e não Hodgkin, mieloblastoma, entre outros tipos. Seu mecanismo de ação se dá pela sua ligação à subunidade beta de tubulina, impedindo a polimerização, o que não possibilita a formação do fuso mitótico e causa a interrupção do ciclo celular na fase M. Todo esse processo resulta na supressão da mitose (NAAZ *et al.*, 2019).

Paclitaxel é outro exemplo de metabólito secundário que deu origem à medicamento de tratamento do câncer. Esse diterpeno tricíclico foi isolado da casca do caule de *Taxus brevifolia* Nutt em 1971. Seu uso principal é no tratamento de câncer de mama, ovário, próstata, pulmão e sarcoma de Kaposi, sendo comercializado pelo nome comercial Taxol<sup>®</sup> desde 1993. Seu mecanismo de ação envolve a estabilização de microtúbulos durante a divisão celular, interferindo na dinâmica do microtúbulos. Como consequência, haverá o impedimento da despolimerização, o que acarreta na interrupção do ciclo celular na fase G2 ou M (ABU SAMAAN *et al.*, 2019; NAAZ *et al.*, 2019).

Homoharringtonina é um alcaloide isolado de cascas das árvores *Cephalotaxus harringtonii* (Knight ex J.Forbes) K. Koch e *Cephalotaxus fortunei* Hook e utilizado para tratamento de câncer na medicina tradicional chinesa. Esse alcaloide age através da inibição de síntese proteica e, recentemente, outros mecanismos indicaram que ele pode também afetar vias de sinalização, como a via JAK-STAT5. Ele foi aprovado em 2012 pelo FDA para uso no tratamento de leucemia mieloide crônica, em pacientes com resistência e/ou intolerância a dois ou mais inibidores de tirosina quinase (SECA; PINTO, 2018).

Tendo em vista que as espécies vegetais são utilizadas como tratamento alternativo de câncer, e que propriedades antitumorais foram relatadas para mais de três

mil espécies mundialmente, vê-se a necessidade de estudo de novas espécies vegetais que possam ser utilizadas nos estudos de novos medicamentos para o tratamento anticâncer (SECA; PINTO, 2018). A partir desse conhecimento, será abordado de modo mais aprofundado o câncer de mama.

### 3.4 CÂNCER DE MAMA

#### 3.4.1 Epidemiologia

Atualmente, o câncer é o principal problema de saúde mundial, apresentando aumento da incidência e mortalidade em âmbito global, fato associado ao envelhecimento e crescimento populacional assim como à mudança na distribuição e prevalência dos fatores de risco associados ao câncer, em especial aqueles ligados ao desenvolvimento econômico (CHOUDHARI *et al.*, 2020; FIDLER *et al.*, 2017). Nos países em desenvolvimento pode ser observada transição nos principais tipos de câncer, havendo declínio de casos de câncer ligados à infecção e aumento daqueles ligados à melhoria de condição socioeconômica, com incorporação de hábitos da vida urbanizada como sedentarismo e alimentação inadequada (INCA, 2020a).

De acordo com a estimativa mundial, em 2018 ocorreram 18 milhões de novos casos de câncer no mundo, com aproximadamente 9,6 milhões de óbitos (QUINTANILHA *et al.*, 2019). O câncer de pulmão é o mais incidente mundialmente, seguido pelo câncer de mama, cada um com mais de dois milhões de casos (BRAY *et al.*, 2018). No Brasil, a estimativa é de que ocorram 625 mil novos casos de câncer para cada ano do triênio 2020-2022. Em homens e mulheres, o tipo de câncer mais frequente será o câncer de pele não melanoma, sendo seguido pelo câncer de próstata em homens (29,2%) e câncer de mama em mulheres (29,7%). A região Sudeste concentra a maior porcentagem de incidência de câncer no Brasil, sendo seguida pelas regiões Nordeste e Sul (INCA, 2020a).

Mundialmente, o câncer de mama é o mais incidente nas mulheres e o risco de desenvolver essa neoplasia maligna ao longo da vida da mulher tem aumentado de forma constante (INCA, 2019a; JASRA; ANAMPA, 2018). Em 2018 ocorreram 2,1 milhões de casos, o que equivale a 11,6% de todos os cânceres estimados, e representa um risco estimado de 55,2/100 mil (INCA, 2020a; PATEL, 2019; ROJAS; STUCKEY, 2016).

No Brasil, a estimativa é de 60 mil novos casos de câncer de mama no biênio 2018-2019, com 18.296 óbitos por câncer de mama em 2019 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2020; QUINTANILHA *et al.*, 2019; SANTOS, 2018). Já para cada ano do triênio 2020-2022, estima-se a ocorrência de 66.280 novos casos de câncer de mama, o que corresponde a um risco estimado de 61,61 novos casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2020a).

Em geral, maior incidência de câncer de mama é documentada em países com maiores rendas (92 por 100.000 na América do Norte) e menor incidência em países de baixa renda (27 por 100.00 em países da África Central), o que pode estar ligado ao estilo de vida e história reprodutiva em países desenvolvidos. Tem havido aumento na incidência do câncer de mama ao longo do tempo, sendo que em 1980 houve 641.000 casos, chegando a 2010 com 1,6 milhões de casos, e é esperado que em 2030 haja aproximadamente 3,2 milhões de casos por ano (WINTERS *et al.*, 2017).

No Brasil, a sobrevida em cinco anos era de 76,9% (75,5 - 78) para os anos 2005 a 2009, caindo para 75,2% (73,9 - 76,5) no período de 2010 a 2014. Há fatores relacionados à dificuldade do acesso das mulheres aos métodos diagnósticos e conhecimento da doença, que resultam em chegada de paciente com câncer em estágio mais avançado, com piora do prognóstico (AKRAM *et al.*, 2017; INCA, 2019a).

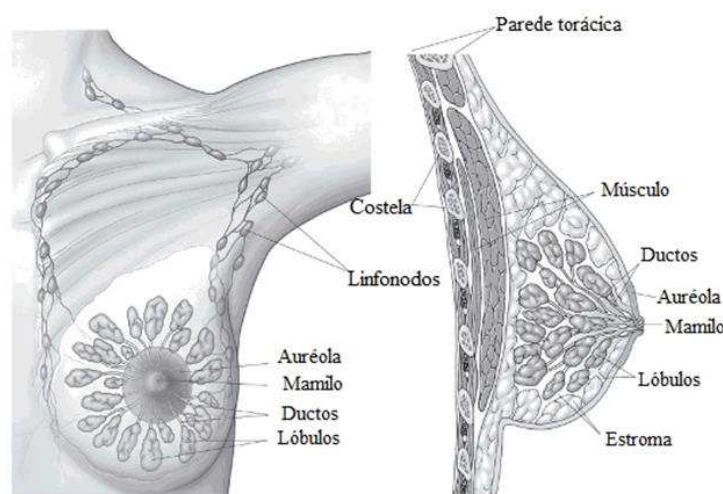
Em países de alta renda, o câncer de mama é mais frequentemente diagnosticado na idade de aproximada de 64 anos, sendo menos de 5% dos casos detectados em mulheres jovens (< 40 anos) (FRANZOI *et al.*, 2019; ROJAS; STUCKEY, 2016; WINTERS *et al.*, 2017). Entretanto, na América Latina, 20% a 30% dos casos são diagnosticados em mulheres entre 20 a 44 anos (WINTERS *et al.*, 2017), e no Brasil, o diagnóstico de câncer de mama se dá mais frequentemente entre 53 a 55 anos, sendo 10.5% dos casos de câncer de mama diagnosticados em mulheres jovens (FRANZOI *et al.*, 2019; ORLANDINI *et al.*, 2021).

A alta incidência de câncer de mama diagnosticada em jovens é importante, pois o diagnóstico e tratamento do câncer de mama é desafiador em pacientes dessa faixa etária, uma vez que a doença é principalmente diagnosticada em mulheres sintomáticas e a maioria das pacientes é diagnosticada com a doença em estágio avançado, com subtipos agressivos da doença sendo frequentes (ORLANDINI *et al.*, 2021). Em uma análise do estudo AMAZONIA III, um registro prospectivo e multicêntrico do câncer de mama no Brasil de 2016 a 2018, Franzoi e colaboradores (2019) demonstraram que 17% das pacientes diagnosticadas com a doença no estudo eram jovens (<40 anos). As

mulheres jovens foram usualmente diagnosticadas com câncer de mama mais agressivo e de pior prognóstico, com lesões histopatológicas localmente avançadas (T3, T4) e maior proporção de tumores triplo negativos em relação à doença em mulheres mais idosas. Nesta análise, também foi verificado o impacto socioeconômico do diagnóstico de câncer de mama em mulheres jovens, pois estas, com maior frequência que as mais idosas, possuem emprego, maior nível de escolaridade e são casadas (FRANZOI *et al.*, 2019).

### 3.4.2 Fisiopatologia

A mama é uma glândula cutânea exócrina modificada fixada na parede. Ela é composta por pele e tecido subcutâneo, parênquima da mama (lobos e ductos) e estroma de sustentação, composto por tecido adiposo e conjuntivo suprido por uma rede de nervos, vasos sanguíneos, linfáticos e ligamentos. Os lobos são as glândulas produtoras de leite e se subdividem em lóbulos, e os ductos são pequenos tubos que transportam o leite dos lobos ao mamilo (AKRAM *et al.*, 2017; JESINGER, 2014).



**Figura 1.** Estrutura anatômica da mama feminina humana. Fonte: Adaptado de (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019a).

Câncer é o termo genérico usado para se referir a um conjunto heterogêneo de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, e surge a partir de mutações genéticas. Essas mutações podem ocorrer em genes chamados protooncogenes, que são inativos em células normais. Porém, quando ativados, eles se transformam em oncogenes, responsáveis pela malignização celular. A divisão celular se dá de forma rápida, resultando em células agressivas e incontrolláveis, que tendem a

invadir tecidos adjacentes e outros órgãos (metástase), com formação de tumor. Carcinogênese ou oncogênese é o nome que se dá ao processo de formação do câncer que, de maneira geral, ocorre lentamente, sendo compreendido pelos estágios de iniciação, promoção e progressão (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014; INCA, 2019b).

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum em mulheres mundialmente, havendo diferentes tipos de câncer de mama. Alguns tipos apresentam crescimento acelerado, enquanto outros crescem lentamente, e isso se deve às características próprias de cada tumor. O câncer de mama também acomete homens, porém, esses casos representam apenas 1% dos casos da doença (INCA, 2020b).

O tipo histológico mais comum do câncer de mama é o carcinoma de células epiteliais, que se divide em lesões *in situ* e invasoras. Carcinoma não invasivo é o câncer que não se estende além dos lobos ou ductos de onde está situado. Exemplos desse tipo de câncer são o carcinoma ductal não invasivo e o carcinoma lobular não invasivo, em que células cancerígenas se multiplicam nos ductos ou lóbulos mamários, respectivamente, mas não se estendem para outros tecidos. Porém, carcinoma *in situ* pode se transformar em invasivo. O carcinoma de mama invasivo ocorre quando células malignas invadem tecidos adjacentes ao do ducto ou lóbulo mamário. As células tumorais podem alcançar diferentes partes do corpo através do sistema imune ou da circulação sistêmica e, quando se espalha para outros órgãos, é chamado de metastático, atingindo principalmente o cérebro, ossos, pulmão e fígado. Há diversos tipos de câncer de mama invasivo: carcinoma lobular invasivo, ductal invasivo, medular, mucinoso, tubular, câncer de mama inflamatório, doença da mama de Paget, triplo negativo, entre outros. O mais frequente dentre estes é o carcinoma ductal invasivo (50-75% dos pacientes), seguido do carcinoma lobular invasivo (5-15% dos pacientes) (AKRAM *et al.*, 2017; INCA, 2020a; WATKINS, 2019). O *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), criou em 1959 um Manual de Estadiamento do Tumor, que faz uso do sistema de estadiamento tumor-nódulo-metástase (TNM), uma ferramenta para auxiliar médicos a definir o prognóstico do paciente com acurácia. No sistema TNM, a extensão da doença é classificada de acordo com informações anatômicas como tamanho do tumor primário (T); presença, ausência, e extensão do acometimento do linfonodo (N); e presença ou ausência de metástases distantes (M). Na oitava edição do manual, ocorreu a incorporação de biomarcadores no estadiamento tumoral, que são: receptor de estrogênio, receptor de progesterona, receptor de fator de crescimento epidermal 2, e

também há avaliação do grau do câncer, que indica o quão parecidas são as células cancerígenas com as normais (AJCC, 2017; CHAVEZ-MACGREGOR *et al.*, 2017; GIULIANO; EDGE; HORTOBAGYI, 2018).

O câncer de mama pode também ser classificado com base no perfil molecular em quatro subtipos: luminal A: é o mais comum e é caracterizado por alta expressão de receptores de estrogênio (RE) e genes regulados por RE, e baixa expressão de genes associados à proliferação; luminal B: associado à baixa expressão de RE e alta expressão de genes associados à proliferação; receptores de fator de crescimento epidérmico 2 (HER 2) associado à amplificação ou alta expressão de genes ERBB2, e baixa expressão de genes do perfil luminal; e o subtipo *basal like*, ou triplo negativo, o qual está associado à não expressão de RE, receptores de progesterona (RP) e HER2, e alta expressão de genes de proliferação (FRANZOI *et al.*, 2019; GODOY-ORTIZ *et al.*, 2019; LIBSON; LIPPMAN, 2014).

O receptor de estrogênio é encontrado em 70% de cânceres invasivos, sendo um receptor de hormônio esteroide e um fator de transcrição que, quando ativado por estrogênio, ativa vias de crescimento oncogênicas em células de câncer de mama. A expressão do receptor de hormônio esteroide progesterona, intimamente relacionado, também é um marcador de sinalização RE. O receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2), é um receptor transmembrana de tirosina quinase na família de receptor de fator de crescimento epidérmico, o qual é amplificado ou super expresso em aproximadamente 20% dos cânceres de mama (GODOY-ORTIZ *et al.*, 2019; GOMBOS, 2019; WAKS; WINER, 2019). Tumores com amplificação ou super expressão do gene ERBB2, são HER2+. Já o câncer de mama triplo negativo acomete aproximadamente 15% dos pacientes com câncer de mama, ele é caracterizado pela ausência de expressão de alvos moleculares, apresentando alto risco de recidiva à distância nos primeiros três a cinco anos após o diagnóstico (WAKS; WINER, 2019).

A escolha da melhor associação das terapias leva em consideração o estadiamento clínico anatômico e/ou patológico, o tipo histológico, a presença de receptores de estrogênio e progesterona, a alta expressão do HER2 no tumor e o estado de saúde do(a) paciente (INCA, 2019a).

### 3.4.3 Fatores de risco

A maioria dos casos de câncer de mama está relacionada a fatores ambientais (ROJAS; STUCKEY, 2016). A exposição à radiação ionizante é um fator de risco ambiental, sendo o risco maior em mulheres jovens e diretamente proporcional à dose e à frequência de radiação recebida (INCA, 2019c; LAGE *et al.*, 2020). Outro fator associado ao risco de câncer de mama é a hipertensão, sendo que mulheres hipertensas podem ter risco 15% maior de desenvolver o câncer (HAN *et al.*, 2017). Fatores como sedentarismo, sobrepeso e obesidade pós-menopausa, e tabagismo também estão relacionados ao risco de câncer de mama (JERÔNIMO; FREITAS; WELLER, 2017).

A idade é um dos principais fatores de risco, e mulheres que histórico familiar de carcinoma mamário tem de duas a quatro vezes mais chances de desenvolver a doença (AKRAM *et al.*, 2017).

Uma vez que a mama é sensível aos níveis de estrogênio no organismo, então fatores relacionados a alterações hormonais da mulher, como menarca precoce (em torno de 11 anos), menopausa tardia (aos 55 anos ou mais), conceber o primeiro filho depois dos 30 anos ou nuliparidade, curta duração de amamentação e uso de contraceptivos orais, também estão relacionados à elevação do risco de desenvolver a doença. O consumo de álcool é outro fator ambiental, que pode elevar os níveis de hormônios relacionados a estrogênio, e podem ativar a cascata de sinalização de receptores de estrogênio (AKRAM *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2017; WINTERS *et al.*, 2017).

Já os fatores de risco de origem genética são: mutação em BRCA 1e BRCA 2 (do inglês, *Breast Cancer Susceptibility Gene 1 e 2*), que são genes responsáveis por codificar proteínas de supressão tumoral, essenciais para controle e inibição de crescimento celular. Mutações nesses genes podem causar câncer de mama ou em outros órgãos como ovários, pâncreas e próstata. Aproximadamente 5-10% de todos os casos de câncer de mama são causados por mutações nesses genes e, pessoas que possuem variantes patogênicas do gene BRCA tem risco de 40% a 80% de desenvolver câncer de mama durante a vida, sendo essas variantes importantes preditores dessa malignidade (SIMOES CORREA-GALENDI *et al.*, 2021; SUN *et al.*, 2017).

Países como os Estados Unidos, oferecem testes genéticos à população com risco de possuírem mutação nos genes BRCA, como mulheres com história familiar de mutações no gene BRCA 1 e/ou BRCA 2, câncer de mama em pacientes jovens, 2 ou mais cânceres de mama primários, linhagem de judeus Ashkenazi (VALENCIA *et al.*,

2017). Mulheres sem câncer de mama que apresentarem mutação nesses genes podem ser incluídas nas estratégias de redução de risco da doença, como aumento da vigilância, quimioprevenção e intervenções cirúrgicas (mastectomia ou salpingo-ooforectomia) (MANCHANDA *et al.*, 2020). No Brasil, no âmbito do SUS, o teste genético é oferecido somente no contexto de pesquisa científica. Porém, diferentes estudos têm mostrado que a aplicação do teste genético poderia ser considerada de custo-benefício para a economia brasileira, além de poder incrementar o ano de vida ajustado pela qualidade (QALY, do inglês *quality-adjusted life-year*) para a população de risco de ter essas mutações genéticas (MANCHANDA *et al.*, 2020; SIMOES CORREA-GALENDI *et al.*, 2021).

HER2, também conhecido como *c-erbB-2*, é um proto-oncogene importante no câncer de mama. Alterações desse proto-oncogene têm sido relacionadas a carcinogênese e prognóstico do câncer de mama, sendo que a superexpressão de HER2 é detectada em cerca de 20% de câncer de mama primário e tal proto-oncogene se encontra em níveis mais elevados em mulheres na premenopausa e em pacientes com câncer de mama receptor de estrogênio negativo (RE<sup>-</sup>). A superexpressão desse gene aumenta o número de células-tronco neoplásicas e indica resultados clínicos não favoráveis, estando a alteração em HER2 possivelmente ligada ao desenvolvimento e progressão do câncer de mama (ESCÓRCIO-DOURADO *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2017). O receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*), também conhecido como HER1 em humanos é uma glicoproteína da família da tirosina quinase está ligada à proliferação celular e proteção contra apoptose. Ela se encontra superexpressa em mais de 30% dos casos de câncer inflamatório, e também no câncer de mama triplo-negativo (SUN *et al.*, 2017).

#### 3.4.4 Diagnóstico

Estratégias do controle de câncer no Brasil vêm sendo implementadas visando à prevenção primária, detecção precoce, tratamento, reabilitação e cuidados paliativos. As estratégias de detecção precoce envolvem ações de rastreamento e diagnóstico precoce, e têm em vista o diagnóstico do câncer de mama em sua fase inicial, resultando em melhor prognóstico e menor morbidade para o paciente (INCA, 2015).

Diretrizes internacionais têm recomendações diversas a respeito do rastreamento do câncer de mama. A *American College of Radiology* recomenda realização de mamografia anual, em mulheres com risco moderado de câncer de mama, a partir de 40



anos de idade e enquanto a mulher estiver saudável (MONTICCIOLO *et al.*, 2017). Para mulheres com alto risco de desenvolverem a doença, como mulheres negras, descendentes de judias de Ashkenazi, com fatores de risco genéticos, entre outros fatores, a avaliação deve de modo geral ser feita em média a partir de 30 anos fazendo-se uso de mamografia e ressonância magnética (MRI) anualmente (MONTICCIOLO *et al.*, 2018). A *American Cancer Society* preconiza que mulheres de risco moderado da doença, dos 45-54 anos devem fazer mamografia anualmente, e de dois em dois anos a partir dos 55 anos, enquanto estiver saudável e expectativa de viver por mais 10 anos, não sendo recomendado o exame clínico da mama. Mulheres com alto risco devem fazer mamografia e MRI anualmente, a partir dos 30 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020a). Já segundo *U.S. Preventive Force* a mamografia deve ser oferecida a mulheres de risco moderado a cada dois anos, com idade de 50 a 74 anos. Esta diretriz afirma que não há evidência suficiente para avaliar os benefícios e malefícios do uso de mamografia digital com tomossíntese 3D, ultrassonografia e MRI (SIU, 2016).

No Brasil, segundo as diretrizes para detecção precoce para o câncer de mama do Ministério da Saúde (INCA, 2015; MIGOWSKI *et al.*, 2018a), o rastreamento do câncer de mama em mulheres de risco moderado deve ser feito com realização da mamografia em mulheres de 50 a 69 anos, de modo bienal. Recomendação contra o autoexame de mamas, ressonância magnética, ultrassonografia, termografia e tomossíntese é feita, pois, de acordo com as diretrizes, ainda não há evidências suficientes para avaliar se o rastreamento do câncer de mama utilizando esses métodos pode trazer algum benefício, e se os possíveis benefícios superam os danos associados a tais danos. Não há recomendação contrária ou favorável ao exame clínico de mamas, havendo incerteza entre os possíveis benefícios e malefícios do procedimento (ARN MIGOWSKI, 2017). Segundo as diretrizes brasileiras, o dano mais comum de rastreamento mamográfico é o resultado falso-positivo, e os danos mais graves, o sobrediagnóstico e sobretratamento, sendo a proporção de resultados falso-positivo maior em mulheres mais jovens. Afirmam também que o maior benefício de rastreamento por mamografia ocorre em mulheres na faixa de 60-69 anos e o menor, na faixa de 40-49 anos. Já o rastreamento por exame clínico das mamas não possui evidências em suficiente quanto à eficácia dessa prática na redução da mortalidade (MIGOWSKI *et al.*, 2018b).

O diagnóstico precoce deve ser implementado através de estratégias de conscientização, promovendo o reconhecimento de sinais de alerta nas mamas; a

identificação de sinais e sintomas suspeitos como presença de nódulos mamários, descarga papilar sanguinolenta, retração na pele da mama, mudança no formato do mamilo, entre outros sinais do câncer de mama já citados. Também é recomendado que o diagnóstico precoce seja feito em um único serviço de saúde (MIGOWSKI *et al.*, 2018b).

Após a realização do rastreamento e diagnóstico precoce, é necessária a confirmação do diagnóstico de câncer de mama. A biópsia é considerada o exame padrão ouro para diagnóstico do câncer, sendo constituída da remoção de pequena quantidade de tecido para avaliação anatomopatológica da presença de câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

### **3.4.5 Tratamento**

#### *3.4.5.1 Tratamento local*

O principal objetivo do tratamento de câncer, em casos não metastáticos, é a erradicação do tumor da mama e dos linfonodos axilares, prevenindo a ocorrência de metástase. Para cânceres metastáticos, o objetivo é prolongar o tempo de vida e palição dos sintomas, sendo que atualmente o câncer a nível metastático permanece incurável em praticamente todos os pacientes com essa condição (WAKS; WINER, 2019).

A terapia local o tratamento de câncer de mama tem como uma das possibilidades a intervenção cirúrgica. As abordagens padrão da cirurgia são mastectomia total, com retirada total da mama; ou cirurgia com conservação da mama, baseada na remoção completa do câncer com as margens cirúrgicas adequadas, enquanto preserva a aparência e forma naturais da mama. No procedimento cirúrgico, pode-se verificar a presença ou não de células tumorais nos linfonodos axilares através da dissecação dos linfonodos axilares ou biópsia de linfonodo sentinela (HARBECK; GNANT, 2017; LIBSON; LIPPMAN, 2014; WAKS; WINER, 2019).

Outra forma de tratamento local é a radioterapia, utilizada para destruir células tumorais. Esta consiste de radiação ionizante, que tem energia suficiente para danificar o material genético celular, bloqueando a capacidade celular de se dividir e proliferar. (BASKAR *et al.*, 2012). Na radioterapia, regimes de tratamento fracionado foram estabelecidos, o que permite que células normais danificadas se recuperem antes de outra dose de radiação ser administrada. A radiação fracionada também aumenta o dano às células tumorais, podendo reoxigenar as células tumorais e redistribuir seus ciclos

celulares para fases em que as células estão mais sensíveis. Os efeitos terapêuticos de radiação ionizante são tradicionalmente associados à quebra de fitas duplas de DNA, que é o tipo de dano mais letal às células tumorais. O dano ao DNA induz a ativação de p53, fator de transcrição que age principalmente como supressor tumoral. A Ativação de p53 eleva a expressão de genes que induzem parada do ciclo celular, apoptose, autofagia ou senescência celular (LEE *et al.*, 2017). A radiação também leva à geração de espécies reativas de oxigênio que, em excesso, podem levar à peroxidação lipídica, quebra da fita de DNA e alterações de base, que resultam no dano ao DNA (FISCHER; SEO; EFFERTH, 2018). As células saudáveis também podem sofrer os efeitos deletérios da radiação, o que pode gerar produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), com subsequente dano ao DNA. Uma das estratégias utilizadas para superar esses efeitos é o uso de agentes citoprotetores, como a amifostina. Porém, o uso de radioprotetores na clínica médica é pouco utilizado (FISCHER; SEO; EFFERTH, 2018; SMITH *et al.*, 2017).

#### 3.4.5.2 Tratamento sistêmico

O tratamento sistêmico poderá ser pré-operatório (neoadjuvante), pós-operatório (adjuvante), ou ambos. Para cânceres metastáticos, os objetivos são prolongar o tempo de vida e palição dos sintomas, sendo que atualmente o câncer a nível metastático permanece incurável em praticamente todos os pacientes com essa condição (WAKS; WINER, 2019).

Os taxanos, como paclitaxel e docetaxel, são medicamentos empregados na terapia do câncer de mama em estágio inicial e avançado. Essa classe age por meio da ligação à  $\beta$ -tubulina, estabilizando microtúbulos e impedindo sua despolimerização, levando ao processo de apoptose. Paclitaxel é um produto natural derivado das folhas de *Taxus brevifolia*, sendo docetaxel considerado um taxano de segunda geração (CHOUDHARI *et al.*, 2020; MURRAY *et al.*, 2012).

Medicamentos pertencentes à classe das platinas também são utilizadas no tratamento quimioterápico de câncer de mama. Cisplatina foi o primeiro medicamento dessa classe a ser aprovada para uso em 1978, sendo posteriormente aprovadas a carboplatina e a oxaliplatina. O mecanismo de ação dessa classe de medicamentos ocorre pela ligação de tais moléculas com o DNA, com a formação de adutos. A formação de adutos acarreta na interrupção do processo replicação e transcrição do DNA, dando início à apoptose (ROSSI; DI MAIO, 2016).

As antraciclina são antibióticos antitumorais. Elas são classicamente conhecidas por sua ação inibitória sobre DNA girase, topoisomerase II A, impedindo que essa proteína religue as fitas de DNA. Esse processo resultará na quebra da fita de DNA, com inibição de replicação e transcrição, e consequente apoptose. Além disso, elas podem gerar espécies reativas de oxigênio, o que pode levar ao dano no DNA e peroxidação lipídica, estando tal mecanismo relacionado à cardiotoxicidade induzida por essa classe de antitumorais. Dentre as antraciclina usadas no tratamento de câncer de mama, tem-se doxorubicina e epirrubicina (CARVALHO *et al.*, 2009; JASRA; ANAMPA, 2018).

#### 3.4.5.3 *Hormonioterapia*

Inibidores de aromatase e moduladores seletivos de receptor de estrogênio (SERMs, do inglês, *selective estrogen receptor modulators*), podem ser utilizados no tratamento de câncer de mama positivo para receptor de estrogênio e/ou progesterona (CAFFA *et al.*, 2021; PATEL; BIHANI, 2018). Os SERMs são utilizados em mulher na pré-menopausa, e é recomendado seu uso por cinco anos, com utilização posterior de inibidor de aromatase. Já os inibidores da aromatase são prescritos a pacientes que passaram pela menopausa de forma natural ou induzida (WATKINS, 2019).

Tamoxifeno inibe competitivamente a ligação de estrogênio ao seu receptor, e é utilizado na prevenção do câncer de mama em pacientes de alto risco, assim como no tratamento do câncer de mama. O tratamento com esse medicamento por cinco anos reduz recorrência de câncer de mama em 40%, com redução da mortalidade em um terço (LIBSON; LIPPMAN, 2014; PEDDI, 2018).

Outra classe de medicamentos utilizada na terapia endócrina são os inibidores de aromatase. A enzima aromatase é responsável pela síntese de estrogênio a partir de precursores esterodais, em tecidos periféricos, como gordura, músculos, fígado e tecido mamário. Uma vez que a maior fonte de estrógenos em mulheres na pós-menopausa é a aromatização periférica de andrógenos, catalisada pela enzima aromatase, os inibidores dessa enzima irão decrescer a produção de estrogênio nessas mulheres. Exemplos de medicamentos pertencentes a essa classe são exemestano, letrozol e anastrozol. A terapia com tamoxifeno por cinco anos, seguida pelo tratamento com inibidor de aromatase ou, terapia com tamoxifeno por dois ou três anos com posterior uso de inibidor de aromatase, até o quinto ano de tratamento, tem se mostrado mais eficiente do

que uso somente de tamoxifeno (LIBSON; LIPPMAN, 2014; PATEL, 2019; YANG *et al.*, 2013).

A resistência endócrina é o maior desafio na terapia hormonal, com diferentes mecanismos envolvidos no escape de células tumorais do bloqueio de receptores de estrogênio. Alguns desses mecanismos são mediados através das vias fosfatidilinositol 3 quinase/proteína quinase B/ alvo da rapamicina em mamíferos (PI3K/AKT/mTOR) (LIBSON; LIPPMAN, 2014). A ativação da via PI3K/AKT está associada ao crescimento tumoral, progressão do ciclo celular e inibição da apoptose através da regulação negativa de genes supressores tumorais como FOXO3 e CDKN1B (LIU *et al.*, 2021a; OZATES *et al.*, 2021). Estudos que visam inibir a via PI3K/AKT/mTOR têm sido conduzidos. O estudo de Zhu e colaboradores (2019) demonstrou que a utilização de tamoxifeno em conjunto com rapamicina, um inibidor de mTORC1, resultou em aumento significativo da apoptose de células tumorais MCF7 e ZR751 e inibição significativa do crescimento tumoral *in vivo*, quando comparado ao controle. Também foi verificado neste estudo que a rapamicina aumenta a sensibilidade de células tumorais ER+ ao tamoxifeno. Já o estudo conduzido por Ozates e colaboradores (2021) mostrou que rapamicina e AZD3463 (agente antitumoral que inibe a atividade da via PI3K/AKT, sendo um potencial inibidor de ALK/ IGF1R), foram utilizados na avaliação de sua ação frente células tumorais MCF7, em tratamento conjunto (AZD-RAPA) e separados. O estudo demonstrou que tratamento com rapamicina e AZD3463 reduziu de forma significativa a sobrevivência de células tumorais testadas, com indução da autofagia da linhagem celular. A substância AZD3463 e AZD-RAPA apresentaram efeito citostático e induziram à apoptose as células tumorais testadas (OZATES *et al.*, 2021).

#### 3.4.5.4 *Terapia alvo*

##### 3.4.5.4.1 Câncer de mama HER2+

Um possível alvo terapêutico para o tratamento de câncer são os receptores da família HER. Há quatro membros pertencentes à família HER: receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR, também conhecido como ERBB1/HER1), HER2/Neu/ERBB2, HER3/ERRB3 e HER4/ERBB4. Os receptores HER pertencem à família de receptores tirosina quinase, que são proteínas transmembrana que agem fosforilando substratos de proteínas na porção tirosina, levando a alterações em sua

capacidade de sinalização. No câncer de mama, HER2 está superexpresso em 20 a 30% dos casos, o que se relaciona a tumores mais agressivos e com prognóstico mais pobre (OCANA; PANDIELLA, 2012). A superexpressão de HER2 permite crescimento, sobrevivência e diferenciação celulares através da cascata de sinalização por diferentes vias, levando ao crescimento e proliferação celular mais rapidamente (ASIF *et al.*, 2016).

Um medicamento que é indicado para pacientes com câncer de mama metastático que apresentam tumores com superexpressão de HER2 é o trastuzumabe, um anticorpo monoclonal recombinante humanizado. Vários mecanismos têm sido propostos para sua atividade antitumoral, porém, o mecanismo de ação exato permanece desconhecido. Acredita-se que a ação extracelular do trastuzumabe ocorra por meio da citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos, em que o a região do fragmento cristalizável (Fc) de células imunes reconhecem a porção Fc do trastuzumabe em células cancerígenas e atacam tais células, resultando em sua destruição (NAMI; MAADI; WANG, 2018).

Outra classe medicamentosa utilizada no tratamento de câncer de mama HER2+ são os inibidores de tirosina quinase. Lapatinibe e neratinibe são inibidores de tirosina quinase de EGFR e HER2 reversível, que se ligam ao sítio de ligação de adenosina trifosfato (ATP) do domínio intracelular do receptor, levando à inibição do crescimento das células tumorais (ROSKOSKI, 2019).

As quinases dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4 e CDK6) também são alvo para a terapia do câncer de mama. A progressão das células pelo ciclo celular é em grande parte dirigido pelas proteínas ciclinas e suas quinases, as quinases dependentes de ciclina (CDKs). As CDK4 e CDK6 atuam na transição celular da fase G1 para a fase S, tais quinases irão atuar na fosforilação e consequente inativação da proteína supressora tumoral retinoblastoma. A inibição de CDK4/6 levará à ativação da proteína retinoblastoma, com consequente parada da divisão celular. Palbociclibe, ribociclibe e abemaciclibe são medicamentos pertencentes a essa classe utilizados para tratamento de câncer de mama (GOEL *et al.*, 2018; PEDDI, 2018).

#### 3.4.5.4.2 Câncer de mama BRCA

A terapia pode ser direcionada para pacientes com câncer de mama que possuam mutação genética nos genes BRCA.

A polimerase poli-ADP-ribose é uma família de proteínas que está envolvida em processos como regulação de transcrição, controle da divisão celular e manutenção da telomerase. A inibição dessa polimerase pode levar ao bloqueio do reparo das quebras de fita simples do DNA. As mutações do gene BRCA podem ter como consequência a perda de função no reparo de fitas duplas do DNA. Deste modo, os inibidores de polimerase poli-ADP-ribose podem ser utilizados em pacientes com mutação no gene BRCA, com bloqueio do reparo das quebras de fita simples de DNA e de danos ao DNA de fita dupla, causando falha no reparo de DNA e, consequente, morte das células tumorais (LIU *et al.*, 2021b). Olaparibe e talazoparibe são medicamentos dessa classe aprovados para o tratamento de pacientes com câncer de mama avançado HER2 negativo, com mutação no gene BRCA1/2 e que já foram tratadas com quimioterapia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020b).

#### 3.4.5.4.3 Câncer triplo negativo

Nos estágios iniciais do câncer, quando ainda não há metástase, a cirurgia de conservação da mama ou mastectomia são indicadas, seguida de radioterapia, no caso de células tumorais nos linfonodos. A quimioterapia é o tratamento sistêmico de primeira escolha para esses pacientes.

Em pacientes com metástase, diferentes medicamentos podem ser usados, como taxanos, antraciclinas, capecitabina, dentre outros. Em mulheres com mutação no gene BRCA, e que não respondem a medicamentos quimioterápicos comuns, medicamentos da classe das platinas (cisplatina, carboplatina) ou os inibidores de polimerase poli-ADP-ribose (olaparibe, talazoparibe) podem ser considerados (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020c; MCCANN; HURVITZ, 2021). Pacientes com câncer de mama triplo negativo metastático que expressem a proteína PD-1 podem ser tratados com atezolizumabe, um medicamento aprovado pela ANVISA que atua no bloqueio da proteína 1 de morte celular programada (PD-1). A PD-1 e seus ligantes (PD-L1 e PD-L2) são expressos em diferentes tipos celulares e podem controlar a ativação de linfócitos T células chave na ação protetora do sistema imunológico. Tal proteína faz o bloqueio da ativação de linfócitos T, atuando no crescimento tumoral, e a superexpressão de PD-L1 pode induzir à “exaustão” dos linfócitos T, um importante mecanismo de escape imunológico em tumores (LIU *et al.*, 2021b; TEIXEIRA *et al.*, 2019a).

Deste modo, devido à possibilidade de espécies vegetais serem utilizadas como adjuvantes no tratamento antitumoral, e devido à escassez de dados na literatura a respeito de propriedades biológicas de *E. ovata*, a pesquisa de tais propriedades de *Eschweilera ovata* (Cambess.) Mart. ex Miers se torna importante para nosso grupo de estudo. Portanto, neste estudo foram avaliados o conteúdo fenólico total, a atividade antioxidante, a toxicidade aguda, citotoxicidade, e, por fim, a quantificação do conteúdo de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e enxofre (S) pelo analisador elementar CHNS/O do extrato liofilizado obtido das sementes de *E. ovata*.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

As sementes de *Eschweilera ovata* (Cambess.) Mart. ex Miers. foram adquiridas no mercado Oriental Central Comércio Ltda. (Cadastro Nacional da Pessoa Jurídica – CNPJ - 83.649.269/0001-20), no município de Belém, Pará, Brasil.

### 4.2 PREPARO DO EXTRATO

As sementes (15 g) foram extraídas com 500 mL de etanol 70% por 72 h e mantidas ao abrigo da luz. Posteriormente, o extrato foi filtrado, evaporado sob baixa pressão (Rotavapor® R-210, Buchi, Suíça) e liofilizado (ALPHA 1–4 LD plus, Christ, Germany) sob pressão de 1,8mbar e temperatura de -13°C. O rendimento final foi de 6%.

### 4.3 CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

O conteúdo fenólico total (CFT) foi determinado utilizando-se o método Folin–Ciocalteu. Foram adicionados 50 µL de extrato dissolvido em etanol (10 mg/mL), 250 µL de reagente Folin–Ciocalteu, 500 µL de carbonato de sódio a 20%, e 4,2 mL de água destilada. A reação se deu em temperatura ambiente, no escuro, por 30 min. A absorvância foi lida em espectrofotômetro com leitor de microplaca em comprimento de onda fixo de 765 nm. O ácido gálico (AG; Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado como padrão de referência e a curva padrão foi construída a partir de suas soluções etanólicas nas concentrações de 25 a 700 µg/mL para determinar o conteúdo fenólico do extrato obtido das sementes de *E. ovata*. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em miligramas de AG equivalentes (AGE) por grama do extrato seco.

### 4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada pelo método espectrofotométrico de redução do radical livre e estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), descrito por Sreejayan e

Rao (1996) com algumas modificações. Para a realização do ensaio foi preparada uma solução de DPPH a 50 µM pela pesagem de 100 µg de DPPH solubilizado em 50 mL de etanol absoluto. Quanto ao preparo da amostra, o extrato seco obtido das sementes de *E. ovata* foi pesado e solubilizado em etanol para análise, obtendo-se a concentração de 1.000 µg/mL. A partir dessa, foram realizadas diluições seriadas, tendo o etanol absoluto como diluente. Em microplaca de 96 poços, 150 µL de DPPH foram adicionados a uma alíquota de 50 µL das soluções previamente preparadas, resultando em solução final da faixa de concentrações-teste de 0,97 a 250 µg/mL. O controle negativo da amostra foi preparado para cada concentração, sendo 150 µL de etanol absoluto adicionado à 50 µL da solução teste. Resveratrol (Sigma-Aldrich, EUA) foi o padrão utilizado no ensaio, tendo sido preparado do mesmo modo que a amostra, nas mesmas concentrações.

A mistura reacional foi então mantida durante 30 min ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Então, a absorvância foi medida em espectrofotômetro (Multiskan GO, Datamed, EUA) a 510 nm contra o controle negativo (etanol). Após a leitura da absorvância das amostras, foi calculada a inibição do radical DPPH utilizando a Equação 1:

$$CI_{50} (\%) = 100 \times (A_0 - A_s) / A_0 \text{ (Eq. 1)}$$

sendo  $A_0$  a absorção de controle negativo, e  $A_s$  a absorção da amostra de teste.

Este cálculo foi utilizado para todas as concentrações da amostra e seus resultados foram plotados para construção de uma curva analítica de inibição *versus* concentração da amostra (µ/mL). O valor  $CI_{50}$  foi calculado a partir da equação do gráfico de dispersão linear elaborada com o auxílio do *software* GraphPad Prism 5, o qual representa a concentração de extrato que inibe 50% do radical DPPH. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados encontrados foram submetidos ao teste t de Student para amostras independentes e o nível de significância considerado foi de 95%

#### 4.5 TOXICIDADE AGUDA

O ensaio de toxicidade aguda empregando o modelo de *Artemia salina* foi realizado de acordo com descrito por Meyer e colaboradores (1982), com modificações.

Os ovos encistados do microcrustáceo foram incubados em água marinha artificial preparada de acordo com Martins e colaboradores (2019), com pH=8-9, em temperatura ambiente. Após 48 h de incubação, os ovos eclodiram, e 10 unidades do microcrustáceo foram coletadas e colocadas em poços contendo o extrato das sementes de *E. ovata* dissolvido em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1%, e o volume foi completado até 50 mL utilizando água marinha artificial. O extrato foi testado na faixa de concentração de 10 a 1.000 µg/mL e o ensaio foi realizado em triplicata. O timol foi utilizado como fármaco de referência, na mesma faixa de concentração do extrato e, a solução de DMSO 0,1% foi usada como controle do solvente. Após 24 h, os microcrustáceos sobreviventes foram contados e a porcentagem de morte foi calculada. A concentração letal a 50% (CL<sub>50</sub>) representa a concentração do extrato que causou a morte de 50% dos organismos testados e foi calculada por análise Probit (FINNEY, 1971). O teste t de *Student* de amostras independentes foi utilizado para avaliar diferenças significativas dos valores de CL<sub>50</sub> entre os grupos de interesse.

#### 4.6 CITOTOXICIDADE

Para o estudo da viabilidade celular foram realizados ensaios em cultura de células empregando diferentes linhagens celulares, a saber: L929, de fibroblasto murinho saudável; MDA-MB-231 e MCF7, provenientes de carcinoma mamário humano; e 4T1, linhagem celular tumoral de glândula mamária murino. As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA) e 10 mM de ácido [4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanolsulfônico] (HEPES, Sigma-Aldrich, EUA) e mantidas em estufa sob atmosfera umidificada a 37 °C à 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e pH=7,2. O ensaio foi realizado utilizando-se o método de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio] (MTT)(MOSMANN, 1983).

Inicialmente, placas de 96 poços foram plaqueadas com densidade de células de 10<sup>4</sup> células por poço em 100 µL de meio. Após 24 h de incubação, o meio foi substituído pelos tratamentos. O ensaio foi realizado em quintuplicata, e em cada réplica, 100 µL do extrato de *E. ovata* solubilizado a 1% de etanol foi diluído no meio de cultura DMEM, com faixa de concentração variando de 31,25 a 1.000 µg/mL. O controle do experimento foi realizado nas mesmas condições, porém sem os extratos. O

controle do solvente também foi preparado, pela adição de 1% de etanol em meio DMEM. Após a adição do tratamento, as placas foram incubadas novamente a 37 °C à 5% CO<sub>2</sub> por 48 h. Após esse período, o tratamento foi removido e os poços lavados com 200 µL de tampão fosfato (PBS, do inglês *Phosphate-buffered Saline*) e aplicados 20 µL da solução de MTT, sendo as placas novamente incubadas por 3 h a 37 °C à 5% CO<sub>2</sub>. Os cristais de formazana foram solubilizados com 100 µL de DMSO. A absorvância foi medida em espectrofotômetro com leitor de placa em comprimento de onda fixo de 540 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem (%) da viabilidade celular, comparando o controle negativo com as células que receberam tratamento. A concentração inibitória a 50% (CI<sub>50</sub>) foi calculada, e tal valor expressa a concentração que reduz a viabilidade celular em 50%. O valor da CI<sub>50</sub> foi calculado por meio de gráfico da mortalidade celular em função das concentrações de extrato, utilizando o *software Microsoft Office Excel 2007*.

#### 4.7 ANÁLISE ELEMENTAR CHNS

O conteúdo de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e enxofre (S) foram quantificados pelo analisador elementar CHNS/O Analyser 2400 Series II (Perkin Elmer Sdn Bhd.: Selangor, Malasia) (MENDONÇA DE ASSIS *et al.*, 2019). Fez-se uso de 2,3 mg de sementes de *E. ovata* no experimento. A amostra foi incinerada e os gases hélio e oxigênio foram utilizados como gás carreador e de ignição, respectivamente. As temperaturas das colunas de combustão e de redução foram de 975 °C e 500 °C, respectivamente. As análises foram realizadas em duplicata e o padrão de referência utilizado foi Cistina N241-0324 (C = 29,99%, H = 5,03%, N = 11,67%, S = 26,69%). O analisador elementar foi padronizado diariamente, e as leituras da amostra foram alternadas por leituras do branco (amostra sem analito).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

A partir do extrato hidroetanólico liofilizado das sementes de *E. ovata*, o conteúdo de compostos fenólicos foi de  $349,1 \pm 28,5$  mg de AGE/ g de extrato seco. Os compostos fenólicos são os metabólitos secundários mais frequentes e difundidos no reino vegetal, presentes em praticamente todos os órgãos da planta. Ainda, são classificados de acordo com sua estrutura química, possuindo diversas funções nas plantas (TANASE; COSARCĂ; MUNTEAN, 2019).

Diferentes espécies da família Lecythidaceae possuem compostos fenólicos em entre seus metabólitos secundários. No extrato aquoso de *Couropita guianensis* foi detectada a presença de compostos fenólicos, com conteúdo fenólico total de  $343 \pm 0,8$  mg AGE/g do extrato, similar ao conteúdo fenólico encontrado no nosso estudo (SATHISHKUMAR *et al.*, 2016). O extrato metanólico da casca de caule de *Petersianthus macrocarpus* também teve seu conteúdo fenólico total calculado, resultando em 142 mg AGE/g do extrato (ORABUEZE; ADESEGUN; COKER, 2016). No extrato etanólico das frutas de *Careya arborea* foi detectada presença de fenóis, e dentre estes, elevada concentração de ácido gálico (AS; S, 2019). Dentre os metabólitos de *Bertholletia excelsa*, foram identificados ácidos fenólicos, flavonoides e derivados, como ácido gálico, ácido elágico, catequina, quercetina e taxifolina (JOHN; SHAHIDI, 2010). No gênero *Eschweilera* também foram detectados polifenóis no extrato metanólico das cascas de *Eschweilera coriacea* (YANG *et al.*, 1998).

Compostos fenólicos têm despertado interesse por conta de seus benefícios à saúde, por possuírem atividades anti-inflamatória, antibacteriana, antitumoral e antioxidante (WOJDYŁO *et al.*, 2019). A presença de polifenóis também tem sido associada à atividade antioxidante de diferentes espécies da família Lecythidaceae, uma vez que eles são agentes redutores, sendo capazes de doar hidrogênio ou elétrons aos radicais livres (DEMOLINER *et al.*, 2018; JOHN; SHAHIDI, 2010; ORABUEZE; ADESEGUN; COKER, 2016; SATHISHKUMAR *et al.*, 2016).

## 5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O método DPPH é um dos mais utilizados para se estimar o potencial antioxidante de compostos por sua simplicidade e rapidez. A capacidade antiradicalar do extrato de *Eschweilera ovata* foi comparada ao padrão de referência, resveratrol, uma molécula isolada a partir de uma fonte natural (Tabela 1). O resultado foi expresso como  $CI_{50}$ , em que quanto maior a capacidade antioxidante da substância, menor será o valor de  $CI_{50}$ .

**Tabela 1.** Atividade antioxidante do extrato seco obtido das sementes de *Eschweilera ovata* (ESEO) e do padrão de referência.

Amostras	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) #
ESEO	$5,19 \pm 0,36^*$
Resveratrol	$8,97 \pm 0,42$

#Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3) \*  $p < 0,05$ , realizado pelo teste t de Student

De acordo com Martins e colaboradores (2016), a atividade antioxidante é considerada ótima quando o valor de  $CI_{50}$  é inferior a  $15 \mu\text{g/mL}$ . Desse modo, o extrato de *E. ovata* demonstrou ótima capacidade antioxidante, significativamente maior do que resveratrol, apesar de ser uma mistura de compostos, havendo estudos demonstrando que a capacidade antioxidante de um extrato vegetal pode estar relacionada ao seu conteúdo de compostos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007; DUAN *et al.*, 2020; DUTRA, 2019).

A avaliação de atividade antioxidante das sementes de *E. ovata* não havia sido previamente registrada, porém o extrato metanólico das folhas de *E. ovata* foi avaliada quanto a sua atividade antioxidante por Santana e colaboradores (2015), os quais encontraram  $CE_{50} = 52,2$  g de extrato seco/g DPPH ( $CE_{50}$  é a concentração efetiva da amostra necessária para reduzir a concentração inicial do radical DPPH em 50%).

No gênero *Eschweilera* foi analisado o extrato hidroetanólico 90% das folhas de *Eschweilera nana* e suas frações pelo método DPPH, apresentando valores de  $CI_{50}$  próximos ao do resveratrol. O extrato etanólico apresentou  $CI_{50}$  de  $10,87 \mu\text{g/mL}$ , a fração metanólica mostrou  $CI_{50}$  de  $12,63 \mu\text{g/mL}$ . A partir da fração metanólica, subfrações foram obtidas, as quais apresentaram  $CI_{50}$  de  $7,38 \mu\text{g/mL}$  e  $17,06 \mu\text{g/mL}$ . Os flavonoides hiperosídeo e rutina foram identificados nas subfrações, sendo levantada a

hipótese de a atividade antioxidante estar ligada à presença de compostos fenólicos no extrato, assim como na fração metanólica e suas subfrações (OUTUKI *et al.*, 2015).

Diferentes espécies da família Lecythidaceae apresentaram atividade antioxidante quando avaliadas pelo método DPPH e apresentaram valores de  $CI_{50}$  para seus extratos superiores ao valor encontrado na espécie estudada, ou seja, com potencial antioxidante inferior ao de *E. ovata*. A atividade antioxidante do extrato liofilizado da fruta de *Phyllanthus emblica* foi avaliada, obtendo-se  $CI_{50}$  de 28.9  $\mu\text{g/mL}$  (ROSE *et al.*, 2018). Diferentes extratos da folha de *Careya arborea* tiveram seu potencial antioxidante analisado, e o extrato etanólico mostrou melhor potencial antioxidante com  $CI_{50}=78,10$   $\mu\text{g/mL}$ , sendo detectada a presença dos compostos fenólicos no extrato, relacionando sua presença à atividade antioxidante encontrada (SHAILAJA D; BALAJI G; MADHAV R, 2019). O extrato metanólico obtido das cascas de caule de *Petersianthus macrocarpus* demonstrou  $CI_{50}=50$   $\mu\text{g/mL}$  e foram detectados entre os metabólitos secundários, os compostos fenólicos e saponinas, que podem estar ligados ao potencial antioxidante do extrato (ORABUEZE; ADESEGUN; COKER, 2016).

O acúmulo de espécies reativas no organismo pode culminar no estresse oxidativo. Elevados níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem levar à degradação do DNA, proteínas e modificações em lipídios celulares. O estresse desempenha papel importante no envelhecimento e desenvolvimento de condições degenerativas e crônicas, tais como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, inflamação e câncer (IKUMAWOYI; AGBAJE; AWODELE, 2017; SIMIONI *et al.*, 2018). A superprodução de EROs/ERNs contribui para o início e desenvolvimento da carcinogênese por meio de eventos que ocorrem a nível celular e molecular como os danos ao DNA, que podem resultar em erros na replicação, parada da transcrição ou instabilidade genômica, podendo resultar em transformação de células saudáveis e células tumorais (MOLDOGAZIEVA; LUTSENKO; TARENTIEV, 2018; RUSSO *et al.*, 2012). Portanto, a verificação de atividade antioxidante do extrato estudado é importante, pois auxilia no reestabelecimento do equilíbrio de oxi-redução do organismo.

### 5.3 TOXICIDADE AGUDA FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO *Artemia salina*

O extrato de *E. ovata* também foi avaliado quanto à sua toxicidade aguda frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Tal teste é amplamente utilizado, pois apresenta

baixo custo, é simples e rápido. O resultado obtido no ensaio para o extrato obtido das sementes de *E. ovata* se encontra na Tabela 2. De acordo com Ogbole e colaboradores (2017), valores de  $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$  indicam que a atividade do extrato vegetal se dá pela presença de metabólitos secundários bioativos, sendo considerados tóxicos frente o microcrustáceo (MEYER *et al.*, 1982).

**Tabela 2.** Toxicidade aguda do extrato seco obtido das sementes de *Eschweilera ovata* (ESEO) frente microcrustáceo *Artemia salina* após 24 h de incubação.

Amostras	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )#
ESEO	$203,41 \pm 3,7^*$
Timol	$28,0 \pm 2,5$

#Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=5) \*  $p < 0,05$  analisado pelo teste t de Student

A investigação de toxicidade aguda frente *Artemia salina* tem sido pouco relatada em espécies da família Lecythidaceae. O extrato de diclorometano/metanol (1:1, v/v) obtido das sementes de *Barringtonia pterocarpa* evidenciou  $CL_{50} = 259 \mu\text{g/mL}$ , com toxicidade próxima a apresentada neste estudo. Porém, seu extrato aquoso não se mostrou tóxico frente ao microcrustáceo ( $CL_{50} > 1.000 \mu\text{g/mL}$ ), assim como os extratos aquoso e orgânico da semente de *Careya arborea* (CANTRELL *et al.*, 2003). Foi avaliado também o extrato metanólico das folhas de *Lecythis pisonis*, que mostrou toxicidade moderada, com  $CL_{50} = 665,7 \mu\text{g/mL}$  (BARRETO *et al.*, 2020). Já o extrato metanólico obtido das folhas de *Couroupita guianensis* mostrou fraca atividade frente *A. salina*, eliminando 60% dos microcrustáceo na concentração de 6 mg/mL (BHUVANESWARI *et al.*, 2014).

Os bioensaios têm como vantagem o fato de detectarem qualquer composto aos quais os bioindicadores são sensíveis, e *Artemia salina* é amplamente utilizada como bioindicador de toxicidade, permitindo categorizar em níveis discretos de toxicidade qualquer substância (ÁLVAREZ-ALARCÓN *et al.*, 2021; NTUNGWE N *et al.*, 2020). Em geral, extratos vegetais que têm demonstrado toxicidade frente *A. salina* têm também apresentado boa *performance* como agentes antiproliferativos frente linhagens celulares tumorais, sendo classificados como potentes candidatos antitumorais, sendo



também indicador de potencial atividade inseticida e fungicida (ELSYANA; BINTANG; PRIOSOERYANTO, 2016; NTUNGWE N *et al.*, 2020).

Estudos têm demonstrado correlação positiva entre teste de *A. salina* e outros estudos de toxicidade. Parra e colaboradores (2001) avaliaram a toxicidade de 20 extratos vegetais que possuem importantes propriedades farmacológicas, utilizando métodos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados dos testes executados apresentaram correlação positiva ( $r=0,85$ ,  $p<0,05$ ), sugerindo que o bioensaio de *A. salina* seja útil na predição de toxicidade de extratos vegetais. Moshi e colaboradores (2014) estudaram a toxicidade do extrato etanólico de *Crassocephalum vitellinum* frente *A. salina* e toxicidade aguda em camundongos, com resultados similares. O extrato apresentou baixa toxicidade ao microcrustáceo e não foi tóxico aos camundongos, sendo que os animais sobreviveram por 28 dias do período de observação com concentração máxima de 5.000 mg/Kg. O extrato aquoso de soritesidina, uma nova toxina proteica derivada da esponja marinha *Spongosorites* sp., também apresentou resultados de toxicidade similar em *A. salina* e em camundongos. O extrato exibiu alta toxicidade frente *A. salina*, com  $CL_{50}$  de 0,34  $\mu\text{g/mL}$  em 48 h, e foi letal ao camundongo na concentração de 5 ng/mL após injeção intracerebroventricular (SAKAI *et al.*, 2019). Araújo e colaboradores (2011) estudaram a toxicidade e atividade antitumoral frente Sarcoma-180 de lectina proveniente da casca de *Crataeva tapia*. A proteína estudada demonstrou ser tóxica frente *A. salina* ( $CL_{50} = 71,73 \mu\text{g/mL}$ ), e reduziu significativamente ( $p<0,05$ ), em camundongo albino suíço, o volume do tumor de Sarcoma 180 comparado ao grupo controle na concentração de 20 mg/Kg, reforçando assim a correlação entre toxicidade frente *A. salina* e atividade antitumoral em camundongos.

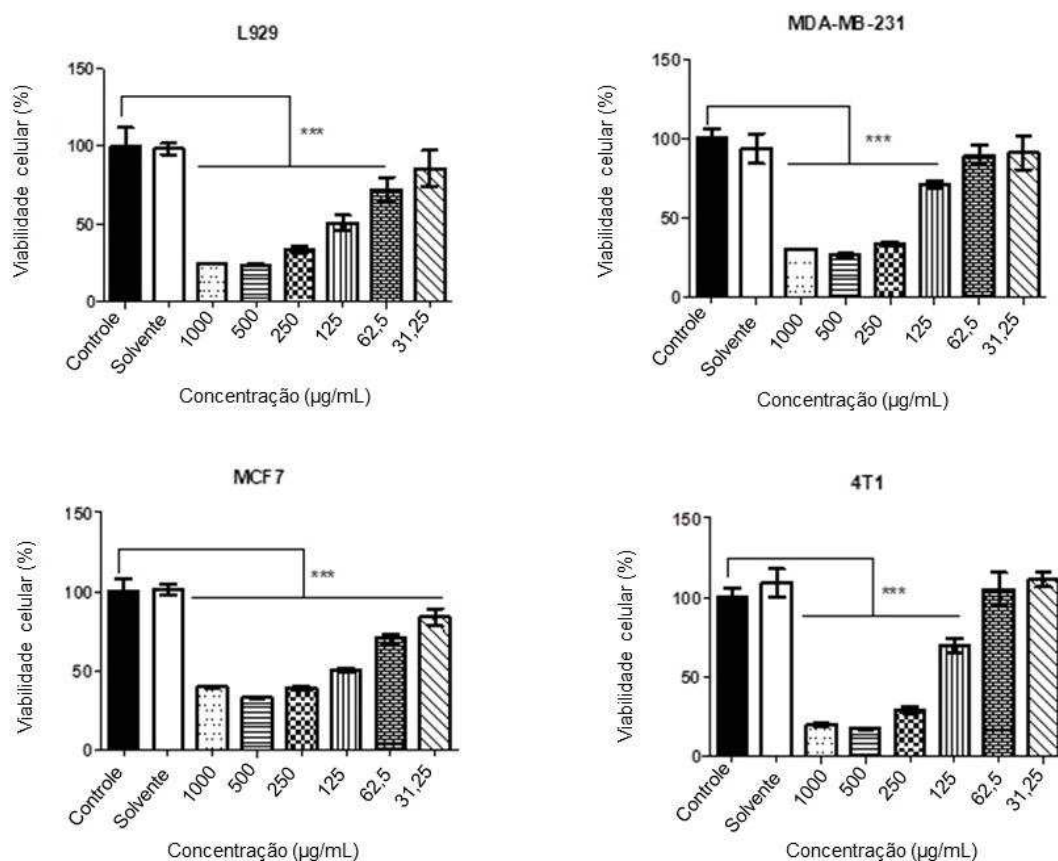
#### 5.4 CITOTOXICIDADE

A linhagem celular de fibroblasto murino (L929) representou nesse estudo as células saudáveis, sendo utilizada para comparar a *performance* do extrato vegetal frente células saudáveis e células tumorais, indicando deste modo a seletividade do extrato. Neste contexto, o desejável seria que o extrato de interesse causasse mais dano às células tumorais do que às saudáveis (GRAIDIST; MARTLA; SUKPONDMA, 2015).

O extrato das sementes de *E. ovata* reduziu de forma significativa a viabilidade celular de L929 nas concentrações de 62,5  $\mu\text{g/mL}$  a 1.000  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 2). Porém, cabe ressaltar que os medicamentos antineoplásicos, de forma geral, não são seletivos

frente às células tumorais, sendo tóxicos em células tumorais e células saudáveis (DE CARVALHO *et al.*, 2020). Pode-se também levar em conta o fato de trabalharmos neste estudo com o extrato bruto, havendo possibilidade de aumentar a seletividade do extrato estudado frente células tumorais pelo processo de fracionamento do mesmo (BRGLEZ MOJZER *et al.*, 2016).

Em relação às linhagens celulares tumorais, foi observada redução da viabilidade das três após tratamento com o extrato de *E. ovata*, como pode ser observada na Figura 2. Para as células MDA-MB-231 e 4T1, o extrato foi significativamente citotóxico entre as concentrações 1.000 e 125 µg/mL. Já para as células MCF7, o extrato se apresentou citotóxico em todas as concentrações testadas. As linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF7 foram isoladas de tecido humano, porém, possuem características moleculares distintas. A linhagem celular MDA-MB-231 tem características de tumores triplo-negativos, e a linhagem MCF7 pode ser classificada como linhagem celular de carcinoma de mama luminal, pois é positivo para receptores de estrogênio e progesterona e negativo para receptor do fator de crescimento epitelial humano (HER-2) (DAI *et al.*, 2017). O câncer de mama luminal está associado ao melhor prognóstico e pode ser tratado com terapia hormonal, já o carcinoma triplo-negativo continua sem tratamento específico (ADÉLAÏDE *et al.*, 2007). As células 4T1 são originadas de tecido de murino e são caracterizadas pela habilidade de metástase para diferentes locais de maneira espontânea, podendo ser relacionado ao estágio IV de câncer de mama humano (LIU *et al.*, 2019). Portanto, nossos resultados sugerem que o extrato estudado interfere na viabilidade celular de células tumorais de diferentes aspectos moleculares.



**Figura 2.** Citotoxicidade do extrato obtido das sementes de *Eschweilera ovata* em células L929, MDA-MB-231, MCF7 e 4T1 pelo ensaio MTT. \*\*\* p < 0,001 em relação ao controle; MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio]

Estudos da atividade antiproliferativa de diferentes espécies de Lecythidaceae frente linhagem celular de adenocarcinoma mamário MCF7 foram conduzidos, evidenciando que diferentes espécies dessa família são citotóxicas frente à linhagem celular testada. O extrato etanólico obtido das folhas de *Careya sphaerica* resultou em  $CI_{50}$  de  $21.03 \pm 0.92 \mu\text{g/mL}$ , utilizando-se o método sulforrodamina B (SRB) (BURANRAT; KONSUE; WONGSUWAN, 2020). Já a espécie *Barringtonia racemosa*, quando o extrato metanólico de sua fruta foi avaliado, apresentou atividade antiproliferativa, com  $CI_{50}$  de  $57,61 \mu\text{g/mL}$  (KUMAR *et al.*, 2019). A síntese de nanopartículas de prata a partir do extrato das folhas de *Couroupita guianensis* apresentaram efeito citotóxico frente MCF-7 de modo dose-dependente, com  $CI_{50}$  de  $20 \mu\text{L/mL}$ , pelo método MTT (PREETHA *et al.*, 2013). Diferindo dos resultados anteriores, o extrato metanólico da folha, tronco e casca de *Barringtonia macrostachya* não foram citotóxicos frente às células MCF-7 (NURHANAN *et al.*, 2008).

Quanto ao gênero *Eschweilera*, o extrato etanólico de diferentes partes da espécie *E. tenuifolia* foi avaliado contra diferentes linhagens celulares cancerígenas, sendo observada potente e parcialmente seletiva toxicidade do extrato etanólico de suas folhas frente linhagem celular de adenocarcinoma do cólon humano (HT-29), apresentando citotoxicidade a 100 µg/mL. Essa espécie também apresentou inibição da atividade de proteases, importantes agentes no crescimento e na expansão tumorais (TAYLOR *et al.*, 2006).

Alguns constituintes com atividades farmacológicas têm sido identificados em espécies do gênero *Eschweilera*, dentre eles há compostos fenólicos, como flavonoides, triterpenos pentacíclicos, esteroides e saponinas (COSTA, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2012b). Estudos têm verificado o potencial antitumoral de diferentes constituintes presentes nesse gênero. Os flavonoides possuem potencial atividade tumoral, agindo por diferentes mecanismos nas células tumorais, como inibição do crescimento celular e indução da apoptose (KANADASWAMI *et al.*, 2005). Ácidos fenólicos, como ácido elágico, têm demonstrado atividade antitumoral *in vitro* frente diferentes linhagens celulares, e *in vivo*, agindo por diferentes mecanismos como indução da apoptose e interrupção do ciclo celular (CECI *et al.*, 2018; REZAEI-SERESHT *et al.*, 2019). Triterpenos pentacíclicos também têm revelado atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* (VALDÉS *et al.*, 2016). A possível presença de um ou mais constituintes que possuem atividade antitumoral pode ser a causa da ação citotóxica do extrato de *E. ovata* frente as linhagens tumorais testadas.

Portanto, em vista da citotoxicidade de *E. ovata* frente diferentes linhagens tumorais, e da falta de conhecimento científico robusto a respeito deste extrato vegetal, apoiamos a continuação da investigação da perspectiva antitumoral de *E. ovata*.

## 5.5 ANÁLISE ELEMENTAR CHNS

Por fim, a análise elementar do extrato seco obtido das sementes de *E. ovata* revelou que o carbono é o mineral mais abundante ( $45,00 \pm 0,23\%$ ), seguido por hidrogênio ( $6,36 \pm 0,01\%$ ), nitrogênio ( $1,86 \pm 0,07\%$ ), e enxofre ( $0,89 \pm 0,14\%$ ). A partir do conteúdo de nitrogênio, o valor de proteína total foi de 11,62%. Outros estudos têm demonstrado que as sementes de *E. ovata* apresentam elevado percentual de carboidratos, amido e fibras, sendo fonte de proteínas (DE SOUZA *et al.*, 2012; SILVA, 2014b).

Resíduos industriais de *Bertholletia excelsa* (Lecythidaceae), popularmente conhecida como castanha-do-pará, tiveram seus elementos químicos analisados, resultando em carbono ( $53,54 \pm 0,81\%$ ), nitrogênio ( $1,57 \pm 0,05\%$ ), hidrogênio ( $5,69 \pm 0,07\%$ ) e enxofre ( $0,11 \pm 0,01\%$ ). Tais resultados corroboram para o uso de tais resíduos serem utilizados como precursores na produção de carvão ativado (LEANDRO *et al.*, 2019). Outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa também fez a análise elementar de extratos vegetais. A análise elementar do tronco da espécie *Amburana Cearensis* resultou em maior porcentagem de carbono ( $47,41 \pm 0,06\%$ ), sendo seguido de hidrogênio ( $6,55 \pm 0,11\%$ ), nitrogênio ( $0,25 \pm 0,07\%$ ) e enxofre ( $0,97 \pm 0,01\%$ ). O conteúdo de proteína total de 1,56%, demonstrando menor conteúdo proteico do que o encontrado em *E. ovata*. (AUGUSTO *et al.*, 2019) Mendonça de Assis e colaboradores (2019) avaliaram a casca de *Plinia cauliflora*, conhecida como jaboticaba. Os valores obtidos para a análise elementar desta espécie foram de carbono (45.06%), hidrogênio (6.73%), nitrogênio (1.22%) e enxofre (1.04%). O conteúdo total de proteínas foi de 7.63%.

A investigação de composição de elementos de espécies vegetais que são consumidas por humanos é importante, pois tais elementos possuem diferenciadas funções em reações bioquímicas e síntese proteica, atuando na regulação do processo fisiológico (MANDAL *et al.*, 2017; MENDONÇA DE ASSIS *et al.*, 2019). Milhões de crianças, em especial em países em desenvolvimento, sobrevivem de alimentos de primeira necessidade que, em geral, são fontes insuficientes de aminoácidos essenciais, prejudicando o desenvolvimento dessas crianças (SEMBA, 2016). Portanto, a utilização de espécies vegetais como suplemento alimentar poderia ser uma alternativa barata para lidar com esse problema (MENDONÇA DE ASSIS *et al.*, 2019).

A razão nitrogênio/enxofre foi proposta como critério de qualidade de proteínas em dietas humanas e, na maior parte das espécies vegetais, o tal razão está entre 10:1 e 15:1 (KAUR *et al.*, 2013). Foi encontrada a razão 2:1 para as sementes de *E. ovata*, o que sugere alto perfil nutritivo da espécie. A partir da avaliação de seus elementos, as sementes de *E. ovata* podem ser uma alternativa como matéria prima no mercado alimentício, além do segmento cosmético.

## 6. CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos a partir do extrato seco das sementes de *E. ovata* permite concluir que este apresenta atividades biológicas promissoras. Foi verificada a presença de conteúdo fenólico no extrato, assim como seu ótimo potencial antioxidante, com resultado superior ao do resveratrol. O extrato estudado também se mostrou tóxico ao microcrustáceo *Artemia salina*, o que pode servir como indicador de potencial atividade antitumoral. Também foi verificada redução da viabilidade celular frente linhagem celular de fibroblasto (L929) e frente todas as linhagens tumorais de câncer de mama (MCF-7, MDA-MB 231 e 4T1), evidenciando a citotoxicidade do extrato.

Deste modo, essa espécie vegetal pode ser utilizada como objeto de estudo na pesquisa mais aprofundada de suas atividades farmacológicas, em especial em relação à atividade antitumoral, tendo em vista seus resultados de atividade antioxidante e redução da viabilidade celular das linhagens tumorais testadas.

## REFERÊNCIAS

ABU SAMAAN, Tala M. *et al.* Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer. **Biomolecules**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 1–22, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom9120789>

ADÉLAÏDE, José *et al.* Integrated profiling of basal and luminal breast cancers. **Cancer Research**, [S. l.], v. 67, n. 24, p. 11565–11575, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2536>

AJCC. **AJCC Cancer Staging Manual 8th edition**. 8. ed. [S. l.]: Springer New York, 2017. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-0-387-88441-7>

AKRAM, Muhammad *et al.* Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological Research**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 1–23, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>

ÁLVAREZ-ALARCIÓN, Natalie *et al.* Zebrafish and Artemia salina in vivo evaluation of the recreational 25C-NBOMe drug demonstrates its high toxicity. **Toxicology Reports**, [S. l.], v. 8, p. 315–323, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.01.010>

ALVES, Clayton Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, [S. l.], v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>

AMBARDAR, Nupur; AERI, Vidhu. A better understanding of traditional uses of *Careya arborea* Roxb.: Phytochemical and pharmacological review. **Tang [Humanitas Medicine]**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 28.1-28.7, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5667/tang.2013.0013>

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Oncogenes and tumor supressor genes**. [s. l.], 2014. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/genetics/genes-and-cancer/oncogenes-tumor-suppressor-genes.html>.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast biopsy**. [s. l.], 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection/breast-biopsy.html>. Acesso em: 29 out. 2020.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **American Cancer Society Recommendations for the Early Detection of Breast Cancer**. [s. l.], 2020a. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection/american-cancer-society-recommendations-for-the-early-detection-of-breast-cancer.html#references>.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Targeted Drug Therapy for Breast Cancer**. [s. l.], 2020b. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/targeted-therapy-for-breast-cancer.html>. Acesso em: 16 fev. 2021.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Treatment of Triple-negative Breast Cancer**. [s. l.], 2020c. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/treatment-of-triple-negative.html>. Acesso em: 18 fev. 2021.

ANDREA BARROSO AMANCIO. **ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE MATAMATÁ- AMARELO (Eschweilera coriacea (DC.) S.A. Mori) UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES**. 2011. [s. l.], 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ARAÚJO, Regina M. S. *et al.* Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. **Natural Products and Bioprospecting**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 97–100, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13659-011-0014-8>

ARCANJO, DDR. *et al.* Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, [S. l.], v. 72, n. 3, p. 505–509, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1519-69842012000300013>

ARN MIGOWSKI, Maria Beatriz Kneip Dias e Denise Rangel Sant' Ana. Diretrizes para a Detecção Precoce do Câncer de Mama no Brasil - Sumário Executivo. **Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, [S. l.], n. 21, 2017. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//sumario-diretrizes-deteccao-precoce-mama-2017.pdf>

AS, Navya; S, Anitha. Antimicrobial activities of *Careya arborea* : A review. [S. l.], v. 7, n. 4, p. 3155–3157, 2018.

AS, Navya; S, Anitha. Review on pharmacognostic and pharmacological activities of *Careya arborea* plant. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 4165–4169, 2019.

ASIF, Hafiz Muhammad *et al.* MINI-REVIEW HER-2 Positive Breast Cancer - a Mini-Review. [S. l.], v. 17, p. 1609–1615, 2016.

ASSIS, Maria de Fátima Lima de *et al.* Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em medicina e biologia. **Cad. saúde colet., (Rio J.)**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 425–432, 2007.

AUGUSTO, Alexandre *et al.* Antioxidant , Cytotoxic , Antiproliferative And Acetylcholinesterase Inhibition Properties Of The Extract From *Amburana Cearensis*. [S. l.], v. 6, n. 1, 2019.

BARRETO, Kíssila Gomes *et al.* Phytochemical Profile and Antioxidant activity of a *Lecythis pisonis* Cambess. Specimen (*Lecythidaceae*). **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 1511–1528, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/1984->



6835.20200118

BASKAR, Rajamanickam *et al.* Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. **International Journal of Medical Sciences**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 193–199, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>

BEDNARCZUK, V. .. *et al.* TESTES IN VITRO E IN VIVO UTILIZADOS NA TRIAGEM TOXICOLÓGICA DE PRODUTOS NATURAIS. [S. l.], v. 11, n. 2, p. 43–50, 2010.

BHUVANESWARI, S. *et al.* Studies on the phytochemistry and bioactivity of leaves of trees in Chennai - I. **International Journal of ChemTech Research**, [S. l.], v. 6, n. 9, p. 4078–4083, 2014.

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

BRGLEZ MOJZER, Eva *et al.* Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [S. l.], v. 21, n. 7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>

BROWN, Jason L. *et al.* Polymicrobial oral biofilm models: simplifying the complex. **Journal of medical microbiology**, [S. l.], v. 68, n. 11, p. 1573–1584, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001063>

BURANRAT, Benjaporn; KONSUE, Ampa; WONGSUWAN, Pornpimon. Extracts of edible, medicinal Thai plants inhibit the human breast cancer cells. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 595–601, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4314/tjpr.v19i3.20>

CAFFA, Irene *et al.* **HHS Public Access**. [S. l.: s. n.]. v. 583E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2502-7.Fasting-mimicking>

CANTRELL, C. L. *et al.* Bioactive crude plant seed extracts from the NCAUR oilseed repository. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 325–333, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1078/094471103322004820>

CARVALHO, Cristina *et al.* Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. **Current Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 16, n. 25, p. 3267–3285, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/092986709788803312>

CATENACCI, Fernanda Silveira. **LECYTHIDACEAE POIT. NA REGIÃO DO ALTO RIO MADEIRA, RONDÔNIA**. 2015. - Universidade de Brasília, [S. l.], 2015. Disponível em: <http://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf>

CECI, Claudia *et al.* Experimental evidence of the antitumor, antimetastatic and antiangiogenic activity of ellagic acid. **Nutrients**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 1–23, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu10111756>

CHAVEZ-MACGREGOR, Mariana *et al.* Incorporating Tumor Characteristics to the American Joint Committee on Cancer Breast Cancer Staging System. **The Oncologist**, [S. l.], v. 22, n. 11, p. 1292–1300, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0116>

CHIARADIA, Ilaria; LANCASTER, Madeline A. Brain organoids for the study of human neurobiology at the interface of in vitro and in vivo. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 23, n. 12, p. 1496–1508, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00730-3>

CHOUDHARI, Amit S. *et al.* Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 10, n. January, p. 1–17, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01614>

CHRISTINA, Anna; GUIMARÃES, Rosa. Cultivo celular. *In: [S. l.: s. n.]*. p. 215–253. *E-book*.

COSTA, PATRÍCIA MIRANDA DA. **TRITERPENOS, SAPONINAS E FLAVONOÍDES DE LICANIA ARIANEAE (CHRYSOBALANACEAE) E ESCHWEILERA LONGIPES (LECYTHIDACEAE)**. 2003. [S. l.], 2003.

CRONIN, Mark T. D. Quantitative Structure–Activity Relationships (QSARs) – Applications and Methodology. *In: Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics*. [S. l.: s. n.]. v. 8p. 3–11. *E-book*. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9783-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9783-6_1)

DAI, Xiaofeng *et al.* Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping. **Journal of Cancer**, [S. l.], v. 8, n. 16, p. 3131–3141, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/jca.18457>

DE ALMEIDA, Evandro Moreira *et al.* Therapeutic potential of medicinal plants indicated by the Brazilian public health system in treating the collateral effects induced by chemotherapy, radiotherapy, and chemoradiotherapy: A systematic review. **Complementary Therapies in Medicine**, [S. l.], v. 49, n. December, p. 102293, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.102293>

DE CARVALHO, Mario Geraldo *et al.* Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Química Nova**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 740–743, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-40421998000600014>

DE CARVALHO, Ricardo Melo *et al.* Retinol palmitate against toxicogenic damages of antineoplastic drugs on normal and tumor cells. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 330, n. August, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109219>

DE FÁTIMA AGRA, Maria; DE FREITAS, Patrícia França; BARBOSA-FILHO, José Maria. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 114–140, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2007000100021>

DE MORAES MELLO BOCCOLINI, Patricia; SIQUEIRA BOCCOLINI, Cristiano.

Prevalence of complementary and alternative medicine (CAM) use in Brazil. **BMC complementary medicine and therapies**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 51, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-020-2842-8>

DE SOUSA, Islandia Maria Carvalho; TESSER, Charles Dalcanale. Traditional and complementary medicine in Brazil: Inclusion in the Brazilian unified national health system and integration with primary care. **Cadernos de Saude Publica**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 1–15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311x00150215>

DE SOUZA, Lilian Christian Domingues *et al.* Composição química e nutrientes em sementes das espécies florestais pente de macaco, flor de paca, itaúba, jatobá e murici manso. **Bioscience Journal**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 478–483, 2012.

DE SOUZA LIMA, M. C. J.; SOTO-BLANCO, Benito. Poisoning in goats by *Aspidosperma pyrifolium* Mart.: Biological and cytotoxic effects. **Toxicon**, [S. l.], v. 55, n. 2–3, p. 320–324, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.08.004>

DEMOLINER, Fernanda *et al.* Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess) and its by-products: A promising and underutilized source of bioactive compounds. Part II: Phenolic compounds profile. **Food Research International**, [S. l.], v. 112, p. 434–442, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.050>

DÍAZ, Lorenza *et al.* Ethical Considerations in Animal Research: The Principle of 3Rs. **Revista de investigacion Clinica**, [S. l.], p. 7–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.24875/ric.20000380>

DUAN, Li *et al.* Comparison of bioactive phenolic compounds and antioxidant activities of different parts of *Taraxacum mongolicum*. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 14, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25143260>

DUTRA, Rafael C. In vitro Assessment of Anti-aging Properties of *Syzygium cumini* (L.) Leaves Extract. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 10185–10191, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.26717/bjstr.2019.13.002447>

ELSYANA, Vida; BINTANG, Maria; PRIOSOERYANTO, Bambang Pontjo. Cytotoxicity and antiproliferative activity assay of clove mistletoe (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) leaves extracts. **Advances in Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 2016, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/3242698>

ESCÓRCIO-DOURADO, Carla Solange *et al.* Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 gene polymorphism and breast cancer risk in women from the Northeastern region of Brazil. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, [S. l.], v. 75, n. 12, p. e2360, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.6061/clinics/2020/e2360>

FAN, Han; DEMIRCI, Utkan; CHEN, Pu. Emerging organoid models: Leaping forward in cancer research. **Journal of Hematology and Oncology**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0832-4>

FIDLER, Miranda M. *et al.* Assessing global transitions in human development and colorectal cancer incidence. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 140, n. 12, p. 2709–2715, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.30686>

FINNEY, D. J. Probit Analysis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 60, n. 9, p. 1432, 1971. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps.2600600940>

FISCHER, Nicolas; SEO, Ean Jeong; EFFERTH, Thomas. Prevention from radiation damage by natural products. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 47, p. 192–200, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.11.005>

FRANCO DE SÁ, Ronice; NOGUEIRA, Julia; GUERRA, Vanessa De Almeida. Traditional and complementary medicine as health promotion technology in Brazil. **Health Promotion International**, [S. l.], v. 34, n. November 2018, p. 174-81, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/heapro/day087>

FRANZOI, Maria Alice *et al.* Advanced stage at diagnosis and worse clinicopathologic features in young women with breast cancer in Brazil: A subanalysis of the amazona III study (GBECAM 0115). **Journal of Global Oncology**, [S. l.], v. 2019, n. 5, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JGO.19.00263>

FREIRES, Irlan Almeida *et al.* Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 681–686, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11095-016-2069-z>

GALL, Alana *et al.* Traditional and Complementary Medicine Use Among Indigenous Cancer Patients in Australia, Canada, New Zealand, and the United States: A Systematic Review. **Integrative Cancer Therapies**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 568–581, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1534735418775821>

GHOSH, Pooja; THAKUR, Indu Shekhar; KAUSHIK, Anubha. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 141, n. January, p. 259–270, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.023>

GIULIANO, Armando E.; EDGE, Stephen B.; HORTOBAGYI, Gabriel N. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, [S. l.], v. 25, n. 7, p. 1783–1785, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6486-6>

GODOY-ORTIZ, Ana *et al.* Deciphering her2 breast cancer disease: Biological and clinical implications. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 9, n. OCT, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01124>

GOEL, Shom *et al.* CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest. **Trends in Cell Biology**, [S. l.], v. 28, n. 11, p. 911–925, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.07.002>

GOMBOS, Andrea. Selective oestrogen receptor degraders in breast cancer: A review and perspectives. **Current Opinion in Oncology**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 424–429, 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000567>

GONÇALVES, Edna Oliveira. INCIDÊNCIA DE *Eschweilera ovata* ( Cambess ) Mart ., *Apuleia ferrea* ( Mart .) Baill E *Protium heptaphyllum* ( Aubl .) March NA RESERVA LEGAL DE MATA ATLÂNTICA RIACHO PAU-BRASIL - DESTILARIA MIRIRI / PB. *[S. l.]*, p. 51, 2010.

GORRINI, Chiara; HARRIS, Isaac S.; MAK, Tak W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**, *[S. l.]*, v. 12, n. 12, p. 931–947, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd4002>

GRAIDIST, Potchanapond; MARTLA, Mananya; SUKPONDMA, Yaowapa. Cytotoxic activity of *Piper cubeba* extract in breast cancer cell lines. **Nutrients**, *[S. l.]*, v. 7, n. 4, p. 2707–2718, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu7042707>

GULCIN, İlhami. **Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview**. *[S. l.: s. n.]*. v. 94E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>  
GURER-ORHAN, Hande *et al.* The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. **Current Medicinal Chemistry**, *[S. l.]*, v. 25, n. 33, p. 4084–4101, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929867324666170711114336>

GUSSON, Eduardo. USO E DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE BIRIBA ( *ESCHWEILERA OVATA* [ Cambess .] Miers ): SUBSÍDIOS AO MANEJO E CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE USO E DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE BIRIBA ( *ESCHWEILERA OVATA* [ Cambess .] Miers ): EDUA. **Ecologia**, *[S. l.]*, 2003.  
HAN, Hedong *et al.* Hypertension and breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, *[S. l.]*, v. 7, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep44877>

HARBECK, Nadia; GNANT, Michael. Breast cancer. **The Lancet**, *[S. l.]*, v. 389, n. 10074, p. 1134–1150, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)

HUSSIN, N. M. *et al.* Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Barringtonia racemosa* L. (Lecythidaceae). **African Journal of Biotechnology**, *[S. l.]*, v. 8, n. 12, p. 2835–2842, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/AJB09.450>

IKUMAWOYI, Victor; AGBAJE, Esther; AWODELE, Olufunsho. Antigenotoxic and antioxidant activity of methanol stem bark extract of *Napoleona Vogelii* Hook & Planch (Lecythidaceae) in cyclophosphamide-induced genotoxicity. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, *[S. l.]*, v. 5, n. 7, p. 866–874, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2017.210>

INCA. **Diretrizes para a Detecção Precoce do Câncer de Mama no Brasil**. *[S. l.: s. n.]*. v. 32E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311XCO010516>

INCA. **A situação do câncer de mama no Brasil : Síntese de dados dos sistemas**. *[S. l.: s. n.]*. E-book. Disponível em: [https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//a\\_situacao\\_ca\\_m](https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//a_situacao_ca_m)

ama\_brasil\_2019.pdf

INCA. **O que é câncer?**. [s. l.], 2019b. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>.

INCA. **Fatores de risco para o câncer de mama**. [s. l.], 2019c. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-de-mama/fatores-de-risco>. Acesso em: 4 fev. 2021.

INCA. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. [S. l.: s. n.]. *E-book*.

INCA. **Câncer de mama**. [s. l.], 2020b. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>. Acesso em: 15 out. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Atlas On-line de Mortalidade**. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo03/consultar.xhtml#panelResultado>.

JASRA, Sakshi; ANAMPA, Jesus. Anthracycline Use for Early Stage Breast Cancer in the Modern Era: a Review. **Current Treatment Options in Oncology**, [S. l.], v. 19, n. 6, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11864-018-0547-8>

JERÔNIMO, Aline Ferreira de Araújo; FREITAS, Ângela Gabrielly Quirino; WELLER, Mathias. Risk factors of breast cancer and knowledge about the disease: An integrative revision of Latin American studies. **Ciencia e Saude Coletiva**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 135–149, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1413-81232017221.09272015>

JESINGER, Robert A. Breast anatomy for the interventionalist. **Techniques in Vascular and Interventional Radiology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 3–9, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.tvir.2013.12.002>

JOHN, Jenny A.; SHAHIDI, Fereidoon. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 196–209, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.04.008>

KANADASWAMI, Chithan *et al.* The antitumor activities of flavonoids. **In Vivo**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 895–910, 2005.

KARCHESY, Yvette M. *et al.* Biological screening of selected Pacific Northwest forest plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity bioassay. **SpringerPlus**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2145-1>

KATT, Moriah E. *et al.* In vitro tumor models: Advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 4, n. FEB, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012>

KAUR, Tarandeep *et al.* Evaluation of Nutritional and Antioxidant Status of *Lepidium latifolium* Linn.: A Novel Phytofood from Ladakh. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 1–

9, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069112>

KUMAR, R. *et al.* a Review on Antiproliferative Activity of Plant Extracts Against Breast Cancer Cell Lines. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 3144–3154, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(7\).3144-54](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(7).3144-54)

LAGARTO PARRA, A. *et al.* Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. And the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 395–400, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00044>

LAGE, Leonardo Bastos *et al.* Evaluation of ionizing radiation as a risk factor for the incidence of breast cancer: Long-term analysis after the cesium-137 accident in Goiânia, Brazil. An ecological study. **Sao Paulo Medical Journal**, [S. l.], v. 138, n. 4, p. 297–304, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2020.0041.r1.04052020>

LEANDRO, Renata Ingrid Machado *et al.* Elementary, chemical and energy characteristics of Brazil nuts waste (*Bertholletia excelsa*) in the state of Para. **Floresta e Ambiente**, [S. l.], v. 26, n. Specialissue2, p. 2–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2179-8087.043618>

LEE, Su Yeon *et al.* Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. **Molecular Cancer**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–25, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0577-4>

LI, Fu Shuang; WENG, Jing Ke. Demystifying traditional herbal medicine with modern approaches. **Nature Plants**, [S. l.], v. 3, n. July, p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.109>

LIBSON, Shai; LIPPMAN, Marc. A review of clinical aspects of breast cancer. **International Review of Psychiatry**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 4–15, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/09540261.2013.852971>

LIMA, Wenderson Pinheiro de *et al.* Ethnopharmacological Study in Faith Healers of Colina Do Horto, in Juazeiro Do Norte-Ce, Brazil. **Científic@ - Multidisciplinary Journal**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 68–86, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.29247/2358-260x.2019v6i1.p68-86>

LIU, LILI *et al.* Proliferation, migration and invasion of triple negative breast cancer cells are suppressed by berbamine via the PI3K/Akt/MDM2/p53 and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways. **Oncology Letters**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 1–10, 2021 a. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12331>

LIU, Tingting *et al.* Small-molecule inhibitors of breast cancer-related targets: Potential therapeutic agents for breast cancer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 210, n. 1, p. 112954, 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112954>

LIU, Xiao *et al.* Epithelial-type systemic breast carcinoma cells with a restricted

mesenchymal transition are a major source of metastasis. **Science Advances**, [S. l.], v. 5, n. 6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav4275>

LOPES, C. M.; DOURADO, A.; OLIVEIRA, R. Phytotherapy and Nutritional Supplements on Breast Cancer. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2017, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/7207983>

MAHTO, Sanjeev Kumar; CHANDRA, Prakash; RHEE, Seog Woo. In vitro models, endpoints and assessment methods for the measurement of cytotoxicity. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 87–93, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF03216487>

MANCHANDA, Ranjit *et al.* Economic Evaluation of Population-Based. **Cancers**, [S. l.], p. 1–38, 2020.

MANDAL, Manab *et al.* Physicochemical and elemental studies of *Hydrocotyle javanica* Thunb. for standardization as herbal drug. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 979–986, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.10.001>

MARTINS, Francislene Juliana *et al.* New group of azastilbene analogs of resveratrol: Synthesis, anticandidal activity and toxicity evaluation. **Journal of King Saud University - Science**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 158–163, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.02.003>

MCCANN, Kelly E.; HURVITZ, Sara A. Innovations in targeted therapies for triple negative breast cancer. **Current opinion in obstetrics & gynecology**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 34–47, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000671>

MENDONÇA DE ASSIS, Pollyana *et al.* *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel: toxicological assays, biological activities, and elemental analysis of organic compounds. **Natural Product Research**, [S. l.], v. 0, n. 0, p. 1–5, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1633642>

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 31–34, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>

MIGOWSKI, Arn *et al.* Guidelines for early detection of breast cancer in Brazil. III – Challenges for implementation. **Cadernos de Saude Publica**, [S. l.], v. 34, n. 6, 2018 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00046317>

MIGOWSKI, Arn *et al.* Guidelines for early detection of breast cancer in Brazil. II – New national recommendations, main evidence, and controversies. **Cadernos de Saude Publica**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 1–16, 2018 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00074817>

MITRA, Sarmistha; DASH, Raju. Natural Products for the Management and Prevention of Breast Cancer. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2018, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/8324696>



MOLDOGAZIEVA, Nurbubu T.; LUTSENKO, Sergey V.; TERENCEV, Alexander A. Reactive oxygen and nitrogen species-induced protein modifications: Implication in carcinogenesis and anticancer therapy. **Cancer Research**, [S. l.], v. 78, n. 21, p. 6040–6047, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0980>

MONTICCIOLO, Debra L. *et al.* Breast Cancer Screening for Average-Risk Women: Recommendations From the ACR Commission on Breast Imaging. **Journal of the American College of Radiology**, [S. l.], v. 14, n. 9, p. 1137–1143, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jacr.2017.06.001>

MONTICCIOLO, Debra L. *et al.* Breast Cancer Screening in Women at Higher-Than-Average Risk: Recommendations From the ACR. **Journal of the American College of Radiology**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 408–414, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jacr.2017.11.034>

MOON, Joon-Kwan; SHIBAMOTO, Takayuki. Antioxidant assays for plant and food components. *J Agric Food Chem*. **Bioactive Food Proteins and Peptides: Applications in Human Health**, [S. l.], p. 1655–1666, 2009.

MORI, Scott A. *et al.* Evolution of Lecythidaceae with an emphasis on the circumscription of neotropical genera: Information from combined ndhF and trnL-F sequence data. **American Journal of Botany**, [S. l.], v. 94, n. 3, p. 289–301, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.3732/ajb.94.3.289>

MOSHI, Mainen J. *et al.* Antimicrobial activity, acute toxicity and cytoprotective effect of *Crassocephalum vitellinum* (Benth.) S. Moore extract in a rat ethanol-HCl gastric ulcer model. **BMC Research Notes**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–7, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-91>

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [S. l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

MURRAY, S. *et al.* Taxane resistance in breast cancer: Mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. **Cancer Treatment Reviews**, [S. l.], v. 38, n. 7, p. 890–903, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.02.011>

NAAZ, Fatima *et al.* Anti-tubulin agents of natural origin: Targeting taxol, vinca, and colchicine binding domains. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 171, p. 310–331, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.025>

NAMI, Babak; MAADI, Hamid; WANG, Zhixiang. Mechanisms underlying the action and synergism of trastuzumab and pertuzumab in targeting HER2-positive breast cancer. **Cancers**, [S. l.], v. 10, n. 10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers10100342>

NTUNGWE N, Epole *et al.* Artemia species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 26, n. 24, p. 2892–2908,

2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1381612826666200406083035>

NURHANAN, M. Y. *et al.* Anti-proliferative activities of 32 Malaysian plant species in breast cancer cell LINES. **Journal of Tropical Forest Science**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 77–81, 2008.

OCANA, Alberto; PANDIELLA, Atanasio. Targeting HER Receptors in Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 808–817, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/13816128130502>

OLIVEIRA, Rute Gregório de *et al.* MORFOLOGIA DO FRUTO, SEMENTE E PLÂNTULA DE *Eschweilera ovata* (Cambess.) Miers. **Ciência Florestal**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 371–377, 2012 a.

OLIVEIRA, Jocélia P. C. *et al.* Chemical constituents of *Lecythis pisonis* and cytotoxic activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 1140–1144, 2012 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000053>

ORABUEZE, Celestina Ifeoma; ADESEGUN, Sunday Adeleke; COKER, Herbert Alexander. Analgesic and antioxidant activities of stem bark extract and fractions of *Petersianthus macrocarpus*. **Pharmacognosy Research**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 181–185, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0974-8490.182912>

ORLANDINI, Leonardo Fleury *et al.* Epidemiological Analyses Reveal a High Incidence of Breast Cancer in Young Women in Brazil. **JCO Global Oncology**, [S. l.], n. 7, p. 81–88, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/go.20.00440>

OUTUKI, Priscila M. *et al.* A high performance liquid chromatography with ultraviolet method for *Eschweilera nana* leaves and their anti-inflammatory and antioxidant activities. **Pharmacognosy Magazine**, [S. l.], v. 11, n. 43, p. 619–626, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0973-1296.160464>

OUTUKI, Priscila Miyuki *et al.* Development of arabic and xanthan gum microparticles loaded with an extract of *Eschweilera nana* Miers leaves with antioxidant capacity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 499, p. 103–112, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.04.006>

OZATES, Neslihan Pınar *et al.* Effects of rapamycin and AZD3463 combination on apoptosis, autophagy, and cell cycle for resistance control in breast cancer. **Life Sciences**, [S. l.], v. 264, n. July, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118643>

PATEL, B. A review of breast cancer and hormonal therapy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 519–527, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.10\(2\).519-27](https://doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.10(2).519-27)

PATEL, Hitisha K.; BIHANI, Teeru. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. **Pharmacology and Therapeutics**, [S. l.], v. 186, p. 1–24, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.12.012>

PEDDI, Parvin F. Hormone receptor positive breast cancer: State of the art. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 51–54, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000424>

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 97, p. 55–74, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

POPOVIĆ, Zorica *et al.* Ethnobotany and herbal medicine in modern complementary and alternative medicine: An overview of publications in the field of I&C medicine 2001-2013. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 181, p. 182–192, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.034>

PREETHA, Devaraj *et al.* Synthesis and characterization of silver nanoparticles using cannonball leaves and their cytotoxic activity against MCF-7 cell line. **Journal of Nanotechnology**, [S. l.], v. 2013, p. 1–5, 2013.

QUIGNARD, Etienne Louis Jacques *et al.* Screening of plants found in Amazonas State for lethality towards brine shrimp. **Acta Amazonica**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 93–104, 2003 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-4392200331104>

QUINTANILHA, Luiz Fernando *et al.* The impact of cancer campaigns in Brazil: A Google Trends analysis. **Ecancermedicalscience**, [S. l.], v. 13, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.963>

REZAEI-SERESHT, Hasan *et al.* Cytotoxic activity of caffeic acid and gallic acid against MCF-7 human breast cancer cells: An in silico and in vitro study. **Avicenna journal of phytomedicine**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 574–586, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.22038/AJP.2019.13475>

RIBEIRO, Luis Henrique Leandro. Análise dos programas de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) sob a perspectiva territorial. **Ciencia & saude coletiva**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 1733–1742, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1413-81232018245.15842017>

RISS, Terry *et al.* Cytotoxicity Assays : In Vitro Methods to Measure Dead Cells Dyes That Selectively Penetrate Dead Cells Trypan blue Fluorescent DNA Binding Dyes That Penetrate Dead Cells. **Assay Guidance Manual**, [S. l.], n. Md, p. 1–15, 2019.

RISS, Terry L. *et al.* Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual**, [S. l.], n. Md, p. 1–25, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>

RODRIGUES, Katiane; *et al.* Antifungal activity of Brazilian amazon plantas extracts against some species of Candida spp. **International Journal of Phytopharmacology**, [S. l.], v. 5, n. 6, p. 445–453, 2014. Disponível em: <http://repositorio.inpa.gov.br/handle/123/3965>

ROGERO, Sizue Ota *et al.* Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1516-14392003000300003>

ROJAS, Kristin; STUCKEY, Ashley. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 59, n. 4, p. 651–672, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000239>

ROSE, Kenneth *et al.* Phenolic compounds isolated and identified from amla (*Phyllanthus emblica*) juice powder and their antioxidant and neuroprotective activities. **Natural Product Communications**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 1309–1311, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1934578x1801301019>

ROSKOSKI, Robert. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 139, n. November 2018, p. 395–411, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.014>

ROSSI, Antonio; DI MAIO, Massimo. Platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: optimal number of treatment cycles. **Expert Review of Anticancer Therapy**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1586/14737140.2016.1170596>

ROVIRA, Ivelisse *et al.* Antimicrobial activity of neotropical wood and bark extracts. **Pharmaceutical Biology**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 208–215, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1076/phbi.37.3.208.6297>

RUSSO, Gennaro *et al.* Oxidative Stress and Diseases. **Oxidative Stress and Diseases**, [S. l.], p. 757–772, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/2535>

SAKAI, Ryuichi *et al.* Soritesidine, a novel proteinous toxin from the okinawan marine sponge spongosorites sp. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 17, n. 4, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md17040216>

SANTANA, Waila Evelyn Lima; NUNEZ, Cecilia Verônica; MOYA, Horacio Dorigan. Antioxidant activity and polyphenol content of some Brazilian medicinal plants exploiting the formation of the Fe(II)/2,2'-bipyridine complexes. **Natural Product Communications**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 1821–1824, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1934578x1501001108>

SANTOS, Carlos E. M. Toxicologia in silico: uma nova abordagem para análise do risco químico. **RevInter Revista de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 47–63, 2011.

SANTOS, Marceli de Oliveira. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 119–120, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.rbc.2018v64n1.115>

SATHISHKUMAR, G. *et al.* Cannonball fruit (*Couroupita guianensis*, Aubl.) extract mediated synthesis of gold nanoparticles and evaluation of its antioxidant activity. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], v. 215, p. 229–236, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.12.043>

SECA, Ana M. L.; PINTO, Diana C. G. A. Plant secondary metabolites as anticancer agents: Successes in clinical trials and therapeutic application. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19010263>

SEMBA, Richard D. The rise and fall of protein malnutrition in global health. **Annals of Nutrition and Metabolism**, [S. l.], v. 69, n. 2, p. 79–88, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000449175>

SENTHILKUMAR, Natesan *et al.* Potent In Vitro Cytotoxic and Antioxidant Activity of *Careya arborea* Bark Extracts. **Phytotherapy Research**, [S. l.], v. 21, p. 492–495, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr>

SHAILAJA D, Wadje; BALAJI G, Wankhede; MADHAV R, Mali. Phytochemical and in-vitro antioxidant activity of *Careya arborea* Roxb . leaves successive extracts. [S. l.], v. 9, p. 53–56, 2019.

SILVA, Daniel Clemente Vieira Rêgo da; POMPÊO, Marcelo; PAIVA, Teresa Cristina Brazil de. A ecotoxicologia no Contexto atual no Brasil. **Ecologia de reservatórios e interfaces**, [S. l.], p. 340–353, 2015. Disponível em: [http://ecologia.ib.usp.br/reservatorios/PDF/Cap.\\_22\\_Ecotoxicologia.pdf](http://ecologia.ib.usp.br/reservatorios/PDF/Cap._22_Ecotoxicologia.pdf)

SILVA, REJANE MARIA DA. **CONSTITUINTES QUÍMICOS DE SEMENTES DE LECYTHIDACEAE OCORRENTES EM PERNAMBUCO E SEU POTENCIAL ECONÔMICO FORTALEZA**. 2014b. [s. l.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

SIMIONI, Carolina *et al.* Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. **Oncotarget**, [S. l.], v. 9, n. 24, p. 17181–17198, 2018.

SIMOES CORREA-GALENDI, Julia *et al.* Economic Modelling of Screen-and-Treat Strategies for Brazilian Women at Risk of Hereditary Breast and Ovarian Cancer. **Applied Health Economics and Health Policy**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 97–109, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40258-020-00599-0>

SINGH, Sudhakar; SINGH, R. P. In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. **Food Reviews International**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 392–415, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/87559120802304269>

SIRISHA, M.; JAISHREE, V. Phytochemical screening, antioxidant and antiproliferative activities of successive extracts of *Couroupita guianensis* aubl. Plant. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 22–27, 2018.

SIU, Albert L. Screening for breast cancer: U.S. Preventive services task force recommendation statement. **Annals of Internal Medicine**, [S. l.], v. 164, n. 4, p. 279–296, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.7326/M15-2886>

SMITH, Tyler A. *et al.* Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation. **Journal of Translational Medicine**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–18,

2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1338-x>

SREEJAYAN, N.; RAO, M. N. Free radical scavenging activity of curcuminoids. **Arzneimittel-Forschung**, [S. l.], 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.3923/jas.2006.2251.2256>

SUBRAMANI, Ramadevi; LAKSHMANASWAMY, Rajkumar. **Complementary and Alternative Medicine and Breast Cancer**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. v. 151E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.008>

SUN, Yi Sheng *et al.* Risk factors and preventions of breast cancer. **International Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 1387–1397, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>

TANASE, Corneliu; COSARCĂ, Sanda; MUNTEAN, Daniela Lucia. A critical review of phenolic compounds extracted from the bark of woody vascular plants and their potential biological activity. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24061182>

TAVARES, Chanderlei de Castro. **CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS, GALHOS E FRUTOS DE *Eschweilera ovalifolia* (DC) Nied. (Lecythidaceae)**. 2014. [s. l.], 2014.

TAYLOR, Peter *et al.* Evaluation of Venezuelan medicinal plant extracts for antitumor and antiprotease activities. **Pharmaceutical Biology**, [S. l.], v. 44, n. 5, p. 349–362, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13880200600748119>

TEIXEIRA, Henrique Couto *et al.* Proteínas de checkpoint imunológico como novo alvo da imunoterapia contra o câncer: revisão da literatura. **HU Revista**, [S. l.], v. 45, n. 3, p. 325–333, 2019 a. Disponível em: <https://doi.org/10.34019/1982-8047.2019.v45.28820>

TEIXEIRA, Nayane *et al.* Edible fruits from Brazilian biodiversity: A review on their sensorial characteristics versus bioactivity as tool to select research. **Food Research International**, [S. l.], v. 119, n. October 2018, p. 325–348, 2019 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.058>

THANGARAJ, Parimelazhagan. In vitro antioxidant assays. *In: Progress in Drug Research*. [S. l.: s. n.]. v. 71p. 57–72. E-book. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-26811-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-26811-8_9)

VALDÉS, Karina *et al.* Potential use of nanocarriers with pentacyclic triterpenes in cancer treatments. **Nanomedicine**, [S. l.], v. 12, n. 23, p. 3139–3156, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/nmm-2016-0251>

VALENCIA, Olivia M. *et al.* The role of genetic testing in patients with breast cancer a review. **JAMA Surgery**, [S. l.], v. 152, n. 6, p. 589–594, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2017.0552>

VICTAL, Julia Costa *et al.* Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares

e substitutivos à experimentação animal. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 36–57, 2014.

WAKS, Adrienne G.; WINER, Eric P. Breast Cancer Treatment: A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [S. l.], v. 321, n. 3, p. 288–300, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>

WATKINS, Elyse J. Overview of breast cancer. **Journal of the American Academy of Physician Assistants**, [S. l.], v. 32, n. 10, p. 13–17, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000580524.95733.3d>

WINTERS, Stella *et al.* **Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. v. 151E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.002>

WOJDYŁO, Aneta *et al.* Polyphenol compounds and biological activity of caper (*Capparis spinosa* L.) flowers buds. **Plants**, [S. l.], v. 8, n. 12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants8120539>

YANG, Geniey *et al.* Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. **Pharmacology and Therapeutics**, [S. l.], v. 139, n. 3, p. 392–404, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.05.005>

YANG, Hongbin *et al.* In Silico Prediction of Chemical Toxicity for Drug Design Using Machine Learning Methods and Structural Alerts. **Frontiers in Chemistry**, [S. l.], v. 6, n. February, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00030>

YANG, Shu Wei *et al.* Three new ellagic acid derivatives from the bark of *Eschweilera coriacea* from the suriname rainforest. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 61, n. 7, p. 901–906, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np980046u>

ZANK, Sofia; HANAZAKI, Natalia. The coexistence of traditional medicine and biomedicine: A study with local health experts in two Brazilian regions. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 1–17, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174731>