



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LAÍS ARAÚJO SOUZA WOLFF

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO EXTRATO DA SEMENTE DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*
Mart.) EM MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE CÂNCER DE MAMA**

SÃO LUIS

2022



LAÍS ARAÚJO SOUZA WOLFF

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO EXTRATO DA SEMENTE DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*
Mart.) EM MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE CÂNCER DE MAMA**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do
Maranhão para a obtenção do grau de
Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Esp. Marcos Antonio Custódio
Neto da Silva

SÃO LUIS
2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Araújo Souza Wolff, Laís.

ANÁLISE DOS EFEITOS DO EXTRATO DA SEMENTE DE AÇAÍ
(Euterpe oleracea Mart.) EM MODELOS IN VITRO E IN VIVO
DECÂNCER DE MAMA / Laís Araújo Souza Wolff. - 2022.

76 f.

Orientador(a): Marcos Antonio Custódio Neto da Silva.
Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

1. Açaí. 2. Câncer de mama. 3. Euterpe oleracea
Mart. 4. Tratamento. I. Custódio Neto da Silva, Marcos
Antonio. II. Título.



LAÍS ARAÚJO SOUZA WOLFF

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO EXTRATO DA SEMENTE DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*
Mart.) EM MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE CÂNCER DE MAMA**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do
Maranhão para a obtenção do grau de
Licenciatura em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 22/07/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Esp. Marcos Antonio Custódio Neto da Silva (Orientador)

Universidade Federal do Maranhão

Prof.(a) Dr.(a) Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

Universidade Federal do Maranhão

Prof.(a) Dr.(a) Geusa Felipa de Barros Bezerra

Universidade Federal do Maranhão

Dedico este trabalho aos meus pais, Tatiana e José Raimundo. O alicerce da minha vida. Por tudo que fizeram por mim, dando amor, apoio e estudos. Se eu consegui esse êxito, vocês foram essenciais. Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida e por ser o meu guia que me deu discernimento e sabedoria, esteve comigo em todas as horas nos obstáculos, nas superações e nas alegrias.

Aos meus pais os amores da minha vida, Tatiana e José Raimundo (Wolff), que estiveram sempre ao meu lado e nunca duvidaram da minha capacidade.

Ao meu irmão Lucas e ao meu tio Marcos, pelo carinho, afeto e amizade.

A Liz a minha doce e esquentadinha gata de estimação que esteve sempre ao meu lado.

Aos meus familiares que estiveram presentes na minha jornada e torceram por mim.

Agradeço *in memoriam* ao meu avô, José Carlos, ao meu tio, Carlos, a tia Maria, a tia Lourença e a freira franciscana, a minha doce Irmã Rosa, mesmo não estando no mundo carnal, mas em vida vocês foram muito importantes na minha jornada, os meus sinceros agradecimento e gratidão.

Aos meus amigos de longa caminhada da igreja Camila, Alana, Andressa, Luiz, ao Grupo Franciscano e as Freiras, e aos grupos que estive os acólitos e os cerimoniaários, os meus sinceros agradecimentos e gratidão.

As minhas amigas de longa data da escola Maria Isabelle, Mariana e Maria (Bequinha), pelo carinho, amizade e amor.

Ao meu orientador, Marcos Antonio Custódio, por ser o meu primeiro orientador no mundo científico, agradeço por me receber e proporcionar a oportunidade de fazer parte deste trabalho, também obrigada pela sua gentileza, paciência e ser uma fonte de inspiração, os meus sinceros agradecimentos.

A professora Kátia Borges, por ser uma benção e luz na minha vida científica, obrigada pelo carinho e afeto.

Ao laboratório que participo no Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada - NIBA deste os professores, aos técnicos, em especial Rita e Carlene, e a minha amiga Dona Edna. Aos meus amigos e colegas de laboratório Lila, Allyson, Fernanda, Carol e Marrieth.

A minha turma de 2018.2 que a UFMA presenteou e em especial o meu grupo Isaías, Rayssa, Larissa, Soraia, Davi, Arthur, Karine, Leonam, Anna Letícia e Thaylenne. Agradeço, em especial, à minha amiga de caminhada acadêmica Jonaina Ferreira (Jana), presente desde o primeiro período fielmente ao meu lado nas horas de tristezas e alegrias, dando força, carinho e apoio. Obrigada.

Ao meu primeiro programa de docência, o PIBID, ao meu tutor, Carlos Erick, e à supervisora, Mônica, agradeço-lhes pelos seus ensinamentos e experiências no mundo da docência, e aos meus colegas pelo afeto e carinho.

Ao Pibic que foi uma oportunidade para o meu crescimento no âmbito acadêmico-científico e onde foram os primeiros passos nesta jornada científica.

A minha banca examinadora Prof.(a) Maria do Desterro, Prof.(a) Geusa Felipa e Prof.(a) Kátia Borges.

A FAPEMA pelo apoio financeiro durante a execução do trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que diretamente ou indiretamente estiveram comigo e foram importantes nessa jornada.

RESUMO

A *Euterpe oleracea* Mart. (EO), têm diversas atividades farmacológicas presentes na casca, polpa e sementes. O câncer de mama é o tipo de câncer com maior incidência no mundo e no Brasil entre as mulheres. Apesar dos avanços terapêuticos, o tratamento do câncer ainda é um desafio. Nesse sentido, estudos evidenciam a importância dos produtos naturais como fontes de compostos bioativos que possam atuar na quimioprevenção do câncer. O açaí possui componentes polifenólicos com atividades antioxidantes, além de ácidos fenólicos, lignanas e flavonoides com atividades anti-inflamatória e antitumoral. O objetivo do trabalho é a análise dos efeitos do extrato da semente do açaí em modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer de mama. O fruto foi coletado no Parque da Juçara (Maracanã, São Luís, Maranhão). O extrato foi obtido e caracterizado através de análise fitoquímica. Foram analisados viabilidade celular, morfologia, apoptose e autofagia nos ensaios *in vitro* nas células de adenocarcinoma de mama (MCF-7). A linhagem de MCF-7 foi tratada em quatro concentrações (0,25, 2,5, 25 e 250 µg/mL) em 24, 48 e 72 horas e analisadas. O ensaio de MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) demonstrou redução na viabilidade celular. Através do ensaio clonogênico, observou-se que o extrato da semente de açaí reduziu a formação de colônias. Através do ensaio Anexina V não houve morte celular por apoptose. O tratamento com extrato aumentou a produção de radicais livres. O ensaio de laranja de acridina evidenciou aumento na formação de vesículas ácidas, sugestivas de autofagia. A microscopia eletrônica de transmissão confirmou a formação de vesículas autofágicas. No segundo momento, analisou os efeitos do extrato da EO por modelo experimental *in vivo*. O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário de camundongos agressivo que encontramos de forma ascítica e sólida. O modelo experimental utilizou-se camundongos Swiss machos que foram divididos em 8 grupos (n=4/grupo): Grupo controle negativo(tratamento com salina), Grupo controle positivo (tratamento com ciclofosfamida 20mg/Kg após inoculação do tumor), Grupo preventivo 100mg/Kg (tratado com extrato EO), Grupo preventivo 300mg/Kg (tratado com extrato EO), Grupo 1000mg/Kg (tratado com extrato EO), Grupo terapêutico 100mg/Kg (tratado com EO após inoculação do tumor), Grupo terapêutico 300mg/Kg (tratado com extrato EO após a inoculação do tumor) e Grupo terapêutico 1000mg/Kg (tratado com extrato EO após a inoculação do tumor). O tratamento preventivo com extrato de açaí iniciou 30 dias antes da inoculação, assim como o controle negativo com salina por gavagem. As células do inóculo com tumor sólido de Ehrlich foram preparadas com densidade de $2,5 \times 10^6$ células/60µL/animal em PBS (inóculo no dorso). Após o inóculo, o tratamento preventivo e terapêutico foi mantido por 15 dias de gavagem do extrato EO, assim com o controle negativo por gavagem de salina. O controle positivo iniciou os demais dias com a quimioterapia ciclofosfamida via intraperitoneal. Os resultados mostraram que o extrato de açaí não demonstrou toxicidade, assim como não houve variação de peso corporal e nem peso dos órgãos (fígado e rim) após indução com tumor sólido de Ehrlich induzida. No entanto, grupo controle positivo houve redução de peso, assim como reduções de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos. Também houve o aumento de TNF nos grupos preventivos 1000mg/Kg. O extrato do açaí mostrou uma redução significativa no tamanho do tumor no grupo preventivo com tratamento na concentração 1000mg/Kg, desta forma evidenciando a efetividade em efeitos antiproliferativos e antitumorais com o açaí. Com isso, o açaí tem potencial farmacológico terapêutico promissor no tratamento adjuvante do câncer de mama.

Palavras-Chave: *Euterpe oleracea* Mart., açaí, Câncer de mama, Tratamento.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Anatomia da glândula mamária. * 20
- Figura 2.** Distribuição proporcional dos dozes dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2020). 22
- Figura 3.** Zoom na análise MS/MS dos extratos de sementes, polpas e frutos totais de *E. oleracea* Mart. 35
- Figura 4.** Avaliação da citotoxicidade do extrato da semente de açaí em linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7 através do ensaio de viabilidade com MTT. 38
- Figura 5. (A, B).** Ensaio clonogênico da linhagem celular MCF-7 de câncer de mama tratada com extrato de semente de açaí realizado após 15 dias de cultivo. 39
- Figura 6 (A, B).** O extrato da semente não causou apoptose nas células MCF-7. 40
- Figura 7.** Efeito do extrato nos níveis de NO expressos como diferença percentual de fluorescência na linhagem celular de câncer de mama MCF-7 (1×10^5 céls/mL) usando DAF-2DA ($10 \mu\text{M}$) incubado por 30 minutos. 41
- Figura 8.** As células MCF-7 semeadas em placas de fundo de vidro de 3 cm foram tratadas com $1 \mu\text{g/mL}$ AO por 45 minutos e, em seguida, as imagens foram registradas em microscopia de fluorescência. 42
- Figura 9.** Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão das células MCF-7 após tratamento com o extrato da semente de açaí. 44
- Figura 10.** Efeito do extrato da semente de açaí no desenvolvimento do tumor de Ehrlich. 45
- Figura 11.** Efeito do extrato da semente de açaí no peso absoluto (A) e relativo (B) do tumor de Ehrlich. 46

- Figura 12.** Efeito do extrato da semente de açaí na variação do peso dos animais ao final do tratamento (A) e cinética do peso ao longo do tratamento (B). 47
- Figura 13.** Efeito do extrato da semente de açaí na variação do peso dos órgãos: baço (A), fígado (B e C) e rim (D e E). 49
- Figura 14.** Efeito do extrato da semente de açaí nos valores hematimétricos, contagem de leucócitos e plaquetas. Resultados expressos como média + desvio-padrão. 51
- Figura 15.** Efeito do extrato da semente de açaí na celularidade do baço (A) e da medula óssea (B). One-way ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$. 53
- Figura 16.** Efeito do extrato da semente de açaí na expressão de citocinas TNF (A) e MCP-1 (B) One-way ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0.05$. 54
- Figura 17.** (A) Neoplasia invasora caracterizada por massas compactas de células com acentuado pleomorfismo nuclear e nucléolos proeminentes infiltrando o tecido conjuntivo subcutâneo. 55
- Figura 18.** (A e B) Fotomicrografias de fígado apresentando arquitetura lobular preservada e tratos portais discretamente alargados. 57
- Figura 19.** (A e B) Fotomicrografias de rim apresentando arquiteturas cortical e medular preservadas, com glomérulos e túbulos viáveis. 58

TABELAS

Tabela 1. Tabela identificação e descrição histopatológica.	32
Tabela 2. Identificação dos compostos químicos presentes na semente de açaí por LC-ESI-MS.	36

QUADRO

Quadro 1. Divisão dos grupos experimentais.

30

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - por cento
°C – Grau Celsius
µg/mL- Micrograma por mililitro
AH- Arquitetura histológica
AVOs – Organelas Vesiculares Ácidas
AO – Laranja de acridina
Bax – Proteína X associada a BCL-2
Bcl-2 – Linfoma de células B2
BSA– Albumina bovina
CBA – Ensaio citométrico de esferas ordenadas
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular médio
CM – Câncer de mama
CO₂ – Dióxido de carbono
COX-2 – Ciclooxigenase-1
CPA – Ciclofosfamida
CTL(+) – Tratado com ciclofosfamida
CTL(-) – Tratado com salina
DAB – Diaminobenzidina
DAF-2-DA – (5,6 -Diaminofluorescein diacetat)
DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO-Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
EO – *Euterpe oleracea* Mart.
g – Gramas
h – Horas
H&E – Hematoxilina e eosina
HCM – Hemoglobina corpuscular médio
i.p – Inoculação intraperitoneal
IIP – Infiltrado inflamatório peritumoral
IFN γ – Interferon Gama
IL-10 – Interleucina -10
IL-6 – Interleucina-6
IP – Índice interativo
mg - Miligrama
mg/Kg – Miligrama por quilo
ml – Mililitro
µl – Microlitro
MCP-1 – Proteína quimioatraente de monócitos-1
MCF-7 – Linha de células do adenocarcinoma humano mamário
MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MTT – (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
MX – Metástase
N – Necrose
NO – Óxido nítrico
PBS – Tampão fosfato-salino
PI – Iodeto de propídio
ROS – Espécies relativas de oxigênio
RTW – Peso relativo do tumor
SFB – Soro Fetal Bovino
STAT-3 – Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TBS-T – Salina tamponada com tris
TNF- α – Fatores de Necrose Tumoral Alfa
TT – Tamanho do tumor
v.o – Administração via oral
VCM – Volume corpuscular médio
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 <i>Euterpe oleracea</i> Mart	17
2.2 Flavonoides	18
2.3 Câncer de Mama	19
2.4 Epidemiologia.....	21
2.5 Diagnóstico e tratamento do câncer de mama.....	22
2.6 Fármacos Naturais.....	23
3. OBJETIVO.....	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específico.....	25
4. MATERIAIS E METÓDOS	25
4.1 Obtenção do extrato liofilizado do fruto total, caroço e fruto total de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	25
4.2 Linhagem celular.....	26
4.3 Ensaio de viabilidade celular – MTT.....	26
4.4 Ensaio clonogênico.....	26
4.5 Quantificação de apoptose por citometria de fluxo.....	27
4.6 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo (DCF-2DA).....	27
4.7 Laranja de Acridina.....	28
4.8 Microscopia eletrônica de transmissão.....	28
4.9 Local de experimentação	29
4.10 Animais e Aspectos éticos.....	29
4.11 Inoculação do tumor e tratamento dos animais.....	29
4.12 Procedimentos experimentais.....	31
4.13 Avaliação da celularidade nos órgãos linfóides.....	31
4.14 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica.....	32
4.15 Avaliação clínica dos animais e macroscópica do tumor.....	33
4.16 Quantificação de citocina por CBA.....	33
4.17 Destino das carcaças.....	34
4.18 Análise estatístico.....	34

5.RESULTADOS	34
5.1 Caracterização Química do Extrato (LC M/S-M/S).....	34
5.2 Triagem Farmacológica – Ensaio de Viabilidade Celular com MTT.....	38
5.3 Ensaio clonogênico.....	39
5.4 Caspase 3/7.....	39
5.5 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	40
5.6 Laranja de Acridina.....	41
5.7 Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão das células MCF-7	43
5.8 Avaliação do efeito do extrato da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. no desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich.....	45
5.9 Avaliação do efeito do extrato da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. no peso dos animais	46
5.10 Avaliação do efeito do extrato da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. no peso dos órgãos.....	47
5.11 Avaliação do efeito do extrato da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. em parâmetros hematológicos.....	50
5.12 Avaliação da celularidade dos órgãos linfoides.....	52
5.13 Efeito do extrato da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. sobre as citocinas inflamatórias.....	53
5.14 Avaliação histopatológica após tratamento com extrato da semente de açai.....	54
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO	74

1 INTRODUÇÃO

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), uma palmeira nativa do Brasil, que pode ser encontrado em terras baixas e em terras florestais inundadas do estuário do rio Amazonas, pertence à família *Arecaceae*, do gênero *Euterpe*. (YAMAGUCHI; PEREIRA; LAMARÃO; LIMA; & DA VIEGA-JUNIOR, 2015, KANG *et al.*, 2012). Conforme Cedrim *et al.* (2018), em sua constituição botânica o açaí possui uma forma globosa, em sua camada mais externa o epicarpo pode ser de tonalidade roxa, branca ou verde e comumente não é consumido de forma *in natura* necessitando um processamento da polpa.

Essa fruta com alto valor energético e nutritivo contém substâncias que ajudam a prevenir e tratar enfermidades como o câncer, possui propriedades nutricionais muito importantes, sendo uma ótima fonte de proteínas, lipídios, fibras, vitamina E, minerais e uma excelente fonte de antocianinas (EMBRAFARMA, 2010).

O açaí contém quantidades significativas de antocianinas que pertencem ao grupo dos flavonoides que por sua vez pertencem ao grupo dos compostos fenólicos (SOARES, 2002).

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Os fatores de risco para seu desenvolvimento dependem do meio ambiente e do estilo de vida. A carcinogênese é um processo na qual a célula normal, quando exposta um carcinógeno, se torna neoplásica. É um processo de várias etapas que vai desde proliferação autônoma até a geração de um processo inflamatório e instabilidade de seu material genético (RAMÍREZ *et al.*, 2017).

Fatores extrínsecos e intrínsecos são os responsáveis pela alta incidência do câncer. A sua relação são o acaso de fatores intrínsecos são geneticamente pré-determinados e os fatores extrínsecos são causas externas, tais como alimentação, álcool, tabagismo, radiações, classes socioeconômicas e entre outros, logo tornam-se agravantes para o desenvolvimento do câncer e assim corroborando que o estilo de vida é crucial tanto para retardação ou progressão.

O câncer de mama é uma das neoplasias malignas que mais acomete as mulheres no mundo. O crescimento anormal de células mamárias obtém características causadas por mutações genéticas alterando a capacidades de divisão e reprodução celular e o acúmulo resulta no desenvolvimento do tumor, estes sendo comum originam nas células epiteliais do ducto mamário. Apesar de ocorrerem casos frequentes entre as mulheres, os homens também podem desenvolver o câncer de mama.

No entanto, apesar da eficácia desses tratamentos, o uso de quimioterápicos também promovem diversos efeitos adversos, no quais incluem mielossupressão, náuseas, vômitos, diarreia e alopecia (MARELLI *et al.*, 2018).

Em um estudo *in vitro* com células microgлияis de murino tratados com frações da polpa do açaí, observou-se uma redução da expressão de COX-2 induzida por lipopolissacarídeo (LPS) analisado por Western Blot (POULOSE *et al.*, 2012). Em modelo experimental, *in vivo* de câncer de esôfago induzido por N-nitrosometilbenzilamina (NMBA) foi observado que a polpa do açaí reduziu a proliferação celular e o tamanho dos tumores podendo atuar como um agente quimiopreventivo (STONER *et al.*, 2010).

Nicoletti *et al.* (2010) relataram que, as plantas medicinais apesar do uso tradicional e popular não se difere de qualquer outro tipo de medicamento sintético, na qual para utilização em fins terapêuticos necessita de evidências experimentais conclusivas, a partir dos efeitos comprovados e o potencial de letalidade analisados cientificamente para assim obter uma autorização oficial.

Para isto, é necessária uma ratificação ética do uso das plantas medicinais das quais a viabilização ocorre por experimentos *in vitro* e *in vivo*, os dois métodos são de grande importância para um melhor entendimento dos compostos bioativos em diversas aplicabilidades, como análises de experimentos citotoxicidade em triagens *in vitro* que possibilita observar as suas composições fitoquímicas nos aspectos antioxidantes, antiinflamatórios, antiproliferativos e entre outros. Desta forma, tais ensaios permitem aos avanços em teste *in vivo* em que reduz grande parte do tempo como direciona a elucidar o mecanismo de ação das plantas medicinais quanto a toxicidade e/ou inibição de proliferação celular, com isso sendo possível a utilização em tratamento anticancerígenos.

Desse modo, acredita-se que analisar os efeitos do extrato da semente do açaí em combinação com terapias atuais ou outros biocompostos pode-se instaurar como novas terapias para o tratamento do câncer.

O tratamento utilizado comumente com esteróides que ao longo prazo são prejudiciais. Estudos recentes apontam que a eficiência do extrato da semente do açaí produz o alto potencial antioxidante do uso em alimentos como produtos para a saúde. A preservação é a principal atividade para retardar o progresso da evolução de carcinogêneses e a redução de tumores.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Euterpe oleracea* Mart.

Euterpe oleracea Mart. é uma palmeira tropical, tipicamente encontrada na região amazônica. Seu fruto é amplamente conhecido como açaí, cujo consumo é identificado como um hábito comum no Norte e Nordeste do Brasil. O mercado internacional de alimentos tem demonstrado maior interesse por essa fruta nas últimas décadas, aumentando a produção e as exportações brasileiras. Além das propriedades antioxidantes, o açaí também possui uma interessante composição nutricional de ácidos graxos, fibras e micronutrientes. Por esse motivo, é considerado um alimento funcional, atualmente consumido não só como suco, mas também como energético, sorvete e até mesmo como suplemento em pó (YAMAGUCHI, 2015).

Sobre a composição nutricional do açaí, cabe ainda destacar que ele tem sido considerado uma “superfruta” pelos cientistas, pois além de níveis elevados de vitaminas, minerais e fibras, contém ainda uma ampla gama de fitoquímicos bioativos, como ácidos fenólicos e flavonoides, com atividades biológicas importantes como propriedades antioxidante, anti-inflamatória, cardioprotetora, antiproliferativa e anticarcinogênica (CHANG; ALASALVAR; SHAHIDI, 2018).

Conforme Bessa *et al.* (2013), propriedades fitoquímicas são de grande relevância e tem como objetivo a identificação dos compostos bioativos das diversas espécies vegetais, assim possibilitando o conhecimento de grupos de metabolismos secundários tendo papéis importantes nos estudos de fármacos medicinais, tais como marcadores químicos que além de serem úteis podem contribuir em princípios ativos a várias doenças. Também, Darnet *et al.* (2011), afirma que compostos bioativos das classes flavonoides, a exemplo polifenóis, destacam-se em sua composição agregando as antocianinas.

As antocianinas são responsáveis pelas cores: vermelhas, violetas e azulada do açaí (RIBEIRO *et al.*, 2011). Muitos pesquisadores estabeleceram que o consumo de frutas, contendo antocianinas, intituladas de berry, tem um impacto positivo e profundo sobre a saúde humana e desempenha sobre doenças (SEERAM, 2008 a).

As antocianinas são pigmentos polifenóis com o principal fator que desencadeia a sua degradação a instabilidade e temperatura, como as cianidina 3-O-glucosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo. Assim como outros fatores ligados ao pH, radiação, íons, enzimas, solventes e oxigênios que a degradam.

Com isso, o tratamento utilizado comumente com esteróides que ao longo prazo prejudica. Estudos recentes apontam que a eficiência do extrato produz o alto potencial de antioxidante do uso em alimentos como produtos para a saúde.

O extrato de açaí é comumente consumido pela população devido às suas propriedades biológicas, principalmente no tratamento de inflamações. A quantidade de estudos realizados com frutos, folhas, sementes ou óleo mostra a importância e o interesse dos pesquisadores por essa planta, principalmente devido à sua composição química e atividades biológicas descobertas em experimentos científicos. No entanto, entende-se como contraditório o número de patentes localizadas, cuja finalidade sugere sua aplicação farmacológica (MARTIZ R.M., 2018).

Em um estudo *in vitro* com linhagem de macrófagos J774A.1, o açaí apresentou uma atividade inibitória para as enzimas COX-1 (ciclo-oxigenase 1) e COX-2, assim como inibiu a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) mesmo na dose mais baixa de 0,1 ppt (SCHAUSS *et al.*, 2006a).

2.2 Flavonoides

Atualmente, o grupo dos flavonoides tem 6 subclasses, conhecidas como: flavonóis (kaempferol e quercetina); flavano-3-ol (catequina e proantocianidina); flavonas (luteolina e Apigenina); antocianinas (cianidina); flavonas (hesperetina e naringenina); flavononóis (taxifolina).

Leong *et al.* (2010) demonstra que os flavonoides possuem elevada atividade antioxidantes em ensaio *in vitro*, além de propriedades antiinflamatórias em humanos.

Segundo Barcellos *et al.* (2017), vários estudos têm relatado as propriedades dos flavonoides (compostos polifenólicos) que fornecem substâncias importantes e possuem propriedades anti-inflamatórias, anti-alérgicas e aumento das respostas do sistema imunológico. O açaí foi estudado em um modelo animal de dor aguda e neuropática, sendo observada uma redução significativa das respostas nociceptivas a dor inflamatória aguda, indicando que o extrato pode ser útil no desenvolvimento de um tratamento analgésico (SUDO *et al.*, 2015).

Eles também têm um bom efeito antioxidante, melhoram a circulação sanguínea, têm um efeito importante sobre vírus, toxinas hepáticas, úlceras, tumores e podem reduzir trombozes e doenças relacionadas ao sistema circulatório. (BARCELLOS, 2017).

Para Bobbio (2000) quanto Barcellos (2017) ressaltam o elevado teor de antocianinas e afirmam que em seus estudos na literatura a *Euterpe oleracea* Mart. não comprovam teores tóxicos.

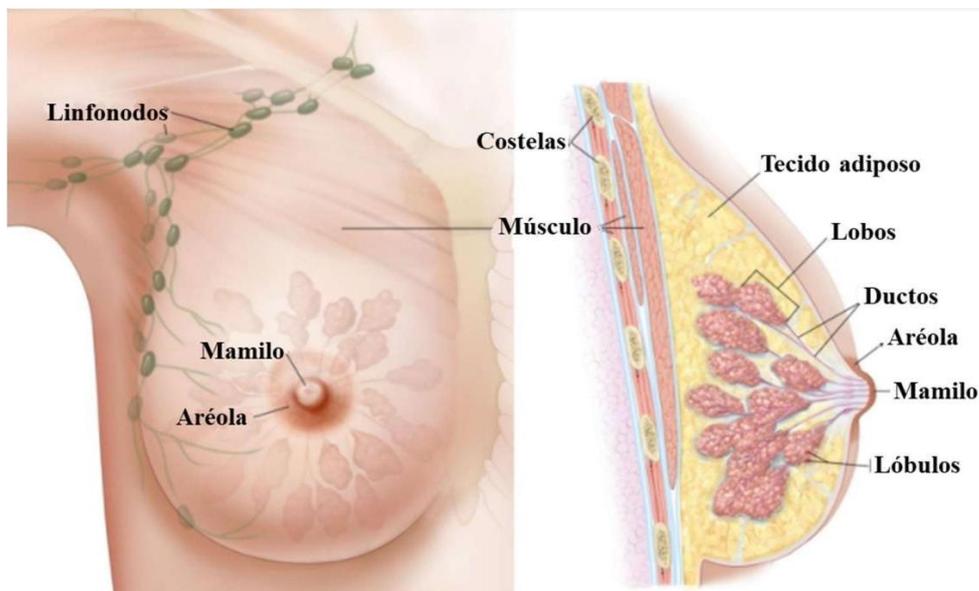
O estudo de Barcellos *et al.* (2017) abordou uma comparação entre os tratamentos com e sem o fruto do açaí em grupos de camundongos, sendo administrado em três grupos as concentrações de 100, 500 e 1000 mg/kg do peso do animal, o tratamento ocorreu em 60 dias. Contabilizou-se um aumento de colesterol do grupo que recebeu 500 mg/kg ao longo dos 60 dias, porém não houveram alterações enquanto ao peso da gordura retroperitoneal e epididimal, mas houve um aumento de peso nos linfonodos dos grupos que foram administrados com os tratamentos de 500mg/kg e 1000mg/kg, assim elucidando uma análise significativa no sistema imune.

2.3 Câncer de Mama

O câncer de mama (CM) é a maior causa de incidência e mortalidade entre mulheres no mundo, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma. Atualmente, é apontado um problema de saúde global, sendo comum e mais frequente na população feminina em populações de países mais desenvolvidos e menos desenvolvidos.

A doença é causada pela multiplicação desordenada das células mamárias levando ao desequilíbrio da proliferação e da morte celular, tais formas promovem nestes processos alterações no crescimento celular e/ou apoptose resultando no surgimento de tumores. A glândula mamária feminina é composta por lóbulos (glândulas produtoras de leite), por ductos (pequenos tubos que transportam o leite dos lobos ao mamilo) e por estroma (tecido adiposo e conjuntivo que envolve os ductos e lóbulos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos) (Figura 1) (ACS, 2020a).

Figura 1. Anatomia da glândula mamária. *



*Extraído e modificado (NCI, 2020b)

O CM surge nas células de revestimento (epitélio) dos ductos (85%) ou lóbulos (15%) no tecido glandular da mama. Com o tempo, os cânceres in situ (estágio 0) podem progredir e invadir o tecido mamário circundante (câncer de mama invasivo) e se espalhar para os linfonodos próximos (metástase regional) ou para outros órgãos do corpo (metástase distante) (OMS, 2020), isto ocorre devido o câncer de mama ter a caracterização de um grupo heterogêneo, ou seja, existindo subtipos de carcinomas a partir de classificações histológicas, como o tubular, o lobular, o medular, o mucinoso, o apócrino, o papilar, o linfoma e o sarcoma.

Entretanto, as mulheres devem estar cientes de que as mamas nem sempre são precisamente iguais e de que um nódulo mamário nem sempre é indicação de uma neoplasia maligna (FERNANDES, 2014).

A metástase é um tumor secundário que se desenvolve separadamente do tumor primário, origina-se de células que se destacaram do tumor primário e foram transportadas para outras regiões do corpo. Esse transporte é realizado através de vias sanguíneas ou linfáticas (MONTENEGRO, 2004). A maioria dos tumores sólidos, incluindo o câncer de mama, necessitam da neovascularização para suprir suas necessidades metabólicas e também para disseminação do tumor e metástase (FOLKMAN, 2007).

Condições endócrinas moduladas pela função ovariana, como a menarca precoce, menopausa e gestação tardia, assim como a utilização de estrógenos exógenos, são componentes relevantes de risco de desenvolvimento do câncer de mama (VIEIRA, 2012).

Assim como, os radicais livres são outro fator endógeno que contribuem para o aparecimento das neoplasias. Os radicais livres estão presentes principalmente na fase de iniciação e progressão, alterando genes chaves do controle do ciclo celular desencadeando um descontrole na proliferação destas células (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Também fatores ligados à vida reprodutiva da mulher que acometem para o evento, bem como o álcool, obesidade, sedentarismo, radiação, aumentam o risco de desenvolver a doença. Por outro lado, as neoplasias mamárias do tipo hereditário correspondem de 5% a 10% dentre os casos de mama, sendo este grupo muito relacionado a alterações de genes supressores de tumor como os genes BRCA 1 e BRCA 2 e o P53 (VIEIRA, 2012).

O envelhecimento dos seres humanos são fatores naturais para suscetibilidade das células se transformarem em malignas. A amamentação é um fato comportamental que ajuda as mulheres (mães) a diminuir o risco do câncer de mama devido às taxas de hormônios que ajudam a proliferação celular caem durante o período.

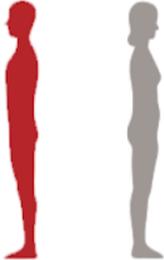
2.4 Epidemiologia

Segundo dados do International Agency for Research on Cancer em 2020 a incidência do câncer de mama entre as mulheres era aproximadamente 2,3 milhões de casos novos, representando 24,5% dos casos de câncer (IARC, 2020). No Brasil, o câncer de mama é também o tipo de câncer mais incidente em mulheres de todas as regiões, após o câncer de pele não melanoma. As taxas são mais elevadas nas regiões mais desenvolvidas (Sul e Sudeste) e a menor é observada na região Norte. Em 2022, estima-se que ocorrerão 66.280 casos novos da doença (INCA, 2020).

Este tipo tumoral ocorre em mulheres de todas as idades, embora, quanto maior a idade, mais alto é o risco do surgimento. As mulheres com as idades entre 20 e 29 anos representam apenas 0,3% dos casos de câncer de mama. Já entre mulheres de idade entre 30 e 50 anos este índice aumenta para 20%, e em mulheres com 65 anos ou mais a incidência chega à 50% (MILLER *et al.*, 2012).

Estima-se que a incidência do câncer na população feminina no triênio 2020-2022 foi de mama (29,7%), cólon e reto (intestino) (9,2%), colo de útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%). No ano de 2018 no Brasil a taxa de mortalidade acometida pelo câncer foi de mama (16,4%), traqueia, brônquios e pulmões (11,5%) e cólon e reto (9,3%) (Figura 2).

Figura 2. Distribuição proporcional dos dozes dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2020). *

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%			Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	5,0%			Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%

* Extraído de (BRASIL, 2020b)

2.5 Diagnóstico e tratamento do câncer de mama

Atrasos tanto no diagnóstico quanto no início do tratamento do câncer de mama aumentam a incidência aos anos. O diagnóstico precoce do câncer de mama permite alto índice de cura, com manutenção da própria mama e tratamentos menos agressivos (SPENCE; JOHNSON, 2012). No Brasil, infelizmente cerca de 60% dos tumores malignos da mama são diagnosticados em estágios avançados (ABC, 2020). As principais formas de detecção precoce é o autoexame e a mamografia, o diagnóstico eventualmente é baseado pelo exame de mamografia que estudos científicos comprovam eficiências nas detecções iniciais, impalpáveis e pequenas. Os nódulos são os principais sintomas, com o toque é possível senti-los na mama ou próximos às axilas, é possível notar também alterações na pele e dor na mama (SILVA; RIUL, 2011).

A metástase constitui a principal causa de morte para 90% dos pacientes com câncer, portanto, compreender a dinâmica de todo o processo ajudará a identificar possíveis alvos para terapias moleculares com o objetivo de interromper ou reverter o crescimento do tumor e metástase (FARES; FARES; KHACHFE; SALHAB *et al.*, 2020).

O tratamento ideal será escolhido levando em conta a saúde do paciente em questão; um paciente jovem e saudável terá um tratamento diferente, provavelmente mais forte e agressivo, quando comparado com um paciente de idade avançada e com a saúde instável, ou ainda pacientes que tomam algum tipo de medicação para alguma enfermidade (PORIE; MOSES; LOTZ, 2009).

As modalidades terapêuticas disponíveis atualmente são a cirúrgica e a radioterápica para o tratamento locorregional, e a hormonioterapia e a quimioterapia para o tratamento sistêmico (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2015). A cirurgia é uma ótima chance para a cura de muitos tipos de câncer, em especial àqueles que ainda não sofreram metástase, e àqueles em estágio inicial da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

No entanto, tais modalidades individualmente não têm eficácia eficiente, sendo necessário parcerias entre tratamentos existentes.

Lobo *et al.* (2016), o tratamento quimioterápico pode ser tanto único ou combinatório com o alvo de inibir o crescimento e a proliferação das células tumorais, tais agentes são frequentemente utilizados em tratamentos do carcinoma mamário em estágio bem como iniciais ou avançados, a exemplo quimioterápicos as antraciclinas (doxorubicina e epirrubicina) e os taxanos (paclitaxel e docetaxel). O mecanismo de ação das antraciclinas está relacionado à inibição da topoisomerase II, devido à intercalação da droga entre os pares de bases adjacentes do DNA, e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) resultando em apoptose. Os taxanos têm como principal mecanismo de ação a inibição da mitose, pois se ligam aos microtúbulos estabilizando-os, promovendo a parada do ciclo celular e apoptose (MORENO-ASPITIA; PEREZ, 2009). Também, Bartsch; Bergen, Galid (2018), o tratamento padrão do câncer de mama tem como combinação terapêutica antraciclina e ciclofosfamida seguida de taxanos.

2.6 Fármacos Naturais

A alimentação é conhecida, cientificamente, como umas das principais aliadas no tratamento de neoplasias, o binômio dieta-saúde com a compreensão de que o conhecimento nutricional representa um processo cognitivo individual, com orientações dietéticas pertinentes à melhoria dos hábitos alimentares, associado à prevenção primária, aumento da sobrevivência e diminuição no risco de recidiva da doença (RUBIN, 2010).

Estudos relacionam os hábitos alimentares com o gênese e progresso do câncer de mama, a literatura reconhece que certos componentes encontrados nos alimentos podem agir de forma preventiva (PADILHA; PINHEIRO, 2004).

Essa ligação de alimentação e saúde deve ser refletida por grupos de todas as classes com o intuito de estimular as pessoas a ingerirem alimentos saudáveis como forma de prevenção e tratamento (CARVALHO *et al.*, 2006).

Bretas (2011) relataram que, o uso de linhagens celulares para a avaliação da toxicidade de plantas medicinais, foram umas das maiores evoluções históricas do cultivo celular.

A grande diversidade vegetal do Brasil possibilita a contribuição como fonte natural de fármacos e também a utilização de plantas medicinais como um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e que vem crescendo junto à comunidade médica como fonte de pesquisa para a quimioterapia do câncer e outras patologias (NEWMAN; CRAGG, 2007). Os tratamentos terapêuticos combinatórios são capazes de curar as neoplasias, mas provocam efeitos adversos, como efeitos colaterais tóxicos.

Em contrapartida, atualmente, existem evidências que as atividades antitumorais de medicamentos à base de plantas ou compostos de origem vegetal são obtidos, principalmente, por modulação do estresse oxidativo e/ou reprogramação do ambiente extra celular tumoral em vários tipos de câncer (CHENG *et al.*, 2016).

A quimioprevenção é definida como o uso de compostos naturais da dieta e / ou substâncias sintéticas para retardar, prevenir ou mesmo reverter o desenvolvimento de adenomas, bem como a progressão de adenoma para carcinoma. Os mecanismos moleculares de sua ação quimio-preventiva estão associados à modulação de cascatas de sinalização e expressões gênicas envolvidas na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular e na supressão de inflamação crônica e metástase (CHUNG, 2018).

Estudos experimentais *in vitro* sobre o efeito dos extratos de alguns frutos amazônicos na inibição do crescimento e na promoção de efeitos pró-apoptóticos de linhagens de células cancerígenas têm sido realizados com sucesso (Martinez *et al.*, 2018; de Souza *et al.*, 2019; Fidelis *et al.*, 2019).

O açaí é um fruto considerado funcional devido à presença de nutrientes que beneficiam o organismo, como as antocianinas, fibras, alfa tocoferol, lipídios (monoinsaturadas), que podem ajudar na prevenção e tratamento do câncer (PAULA, 2007).

Embora tenham sido identificados alguns fatores ambientais ou comportamentais associados a um risco aumentado de desenvolver o câncer de mama, estudos epidemiológicos não fornecem evidências conclusivas que justifiquem a recomendação de estratégias específicas de prevenção (ABC, 2020).

Segundo Cavalcante *et al.* (2021), compostos naturais ou derivados sintéticos estão constantemente sendo utilizados como métodos de reversão e redução da formação de neoplasias e atualmente estão evoluindo em conjunto de tratamentos terapêuticos do câncer. Além disso, a biodiversidade brasileira de plantas medicinais permite uma gama de

variedades de substâncias com o potencial terapêutico e futuramente de novos fármacos anticâncer eficazes e menos toxicidade nas células saudáveis.

A presença de polifenóis, destacando os da classe antocianinas já citadas, é um dos motivos do aumento da demanda no consumo de açaí no que diz respeito à prevenção e tratamento de distúrbios relacionados à síndrome metabólica, o que dispara o número de exportações para utilização tanto na indústria alimentícia quanto farmacêutica (CEDRIM *et al.*, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito do extrato do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) em modelo *in vitro* e *in vivo* de câncer.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter e caracterizar o extrato do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.);
- Avaliar a viabilidade das células, morfologia e morte celular da linhagem sob o extrato da semente do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) em *in vitro*;
- Avaliar a atividade antitumoral do extrato da semente do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) rico em flavonoides em modelo *in vivo* de tumor sólido de Ehrlich, em esquema preventivo.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção do extrato liofilizado do fruto total, caroço e fruto total de *Euterpe oleracea* Mart.

Os frutos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart) utilizados neste estudo foram coletados no Parque da Juçara (São Luís, Maranhão, Brasil). Os frutos foram coletados e acondicionados sob refrigeração a -20°C. Após descongelamento em temperatura ambiente, a amostra foi separada em três porções: casca, caroço e fruto total (casca+caroço). O processo de extração seguiu de acordo com a metodologia desenvolvida por Soares de Moura *et al.* (2011) e Soares de Moura *et al.* (2012). Brevemente, aproximadamente 350 g de juçara foram lavadas em água corrente e fervidas em água destilada por 5 a 10 minutos. Posteriormente, as porções

foram trituradas e em seguida, homogeneizadas com 400 ml de etanol + ácido cítrico sob agitação por 2h. Os extratos resultantes foram armazenados a 4°C protegidos da luz por 10 dias. Após esse período de maturação, os extratos foram filtrados em papel filtro #1 Whatman e a fase líquida concentrada em um evaporador rotatório de baixa pressão (Fisatom Equipamentos Científicos Ltda. São Paulo, São Paulo, Brasil) a aproximadamente 40°C então liofilizados (LIOTOP modelo 202, Fisatom Equipamentos Científicos Ltda. São Paulo, São Paulo, Brasil) em temperatura entre -30 a -40 e vácuo de 200mmHg. Os extratos foram mantidos a -20°C até o dia do uso.

Triagem Farmacológica

4.2 Linhagem celular

A linhagem celular MCF-7, derivada de adenocarcinoma mamário humano, foi cultivada em meio Dulbecco's modificado (DMEM) (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina G (60 mg/L) e estreptomicina (100 mg/L) a 37 ° C em atmosfera umidificada de 5% de CO₂.

4.3 Ensaio de viabilidade celular - MTT

As linhagens celulares foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer, e, uma alíquota de 1×10^4 células/ml cultivados em placas de 96 poços na presença ou não dos extratos. Após 24 e 48 horas de tratamento, 200µl de meio novo contendo 10µl de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) adicionado à cultura. As células foram reincubadas em estufas de CO₂ por 3 horas protegidas da luz. Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 1200 rpm, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 100 µl de DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados a cada poço. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro de placa Spectra Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) utilizando um comprimento de onda de 538 nm.

4.4 Ensaio clonogênico

Células MCF-7 (7×10^2 células/mL) foram tratadas com 10 e 15 µg/mL de extrato de semente de açaí e cultivadas por 15 dias em placas de 12 poços para determinar os efeitos do

tratamento sobre o potencial clonogênico das células. As colônias formadas foram fixadas com etanol (200 µL) por 10 min, coradas com uma solução de cristal violeta (0,05% de violeta de cristal e 20% de etanol) por 10 min, lavadas duas vezes com água destilada e solubilizadas com ácido acético 33%. A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro Spectra Max 190 com comprimento de onda de 595 nm.

4.5 Quantificação de apoptose por citometria de fluxo

Para avaliar os mecanismos de morte induzidos pelo extrato da semente de açaí, as células apoptóticas foram coradas com o kit de ensaio Vybrant® FAM Caspase 3 e -7 (Molecular Probes, OR) de acordo com as instruções do fabricante. Células MCF-7 foram tratadas com 25 e 250 µg/mL de extrato de semente de açaí por 6 e 24h. Depois disso, as células foram colhidas e ressuspensas a uma concentração de 1×10^6 células/mL em meio de cultura fresca. Alíquotas (300 µl) de suspensões de células foram transferidas para tubos de fluxo e 10 µl de uma solução de marcação de inibidor fluorescente de caspase (FLICA) foram adicionados a cada tubo, exceto para o controle negativo. As células foram incubadas por 1h a 37°C, lavadas duas vezes e ressuspensas em 400 µl de tampão de lavagem. Será adicionado iodeto de propídio (PI) e os tubos foram incubados por 5–10 min em gelo antes da análise com citômetro de fluxo FACSCalibur (Beckton Dickinson). Canais de fluorescência - 1 e fluorescência - 3 foram usados para detectar os sinais que chegam de FLICA e PI, respectivamente.

As células marcadas com Vybrant FAM Caspase-3 and-7 Assay Kit foram analisadas por citometria de fluxo usando 488 nm de excitação e filtros de emissão apropriados para o corante Alexa Fluor® (sinal FAM) e o corante Texas Red® (sinal de iodeto de propídio).

4.6 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo (DCF-2DA)

Para medir os níveis de ROS, as células MCF-7 foram tratadas com 25 e 250µg/mL de extrato de semente de açaí por 6 e 24h e depois lavadas duas vezes com PBS. As células foram então coradas com 10 µM de diacetato de 4,5-diaminofluoresceína-2 (DAF-2DA, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) por 20 min em temperatura ambiente no escuro.

A fluorescência verde emitida pelo DAF-2DA foi registrada em 515 nm usando um citômetro de fluxo (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), e 10.000 eventos foram contados por amostra (EOM *et al.*, 2015).

4.7 Laranja de Acridina

Laranja de acridina (AO) é um corante lisotrópico que se acumula em organelas ácidas de uma maneira dependente do pH e é comumente usados para identificar organelas vesiculares ácidas (AVOs) (KANZAWA *et al.*, 2003). Sob a coloração, o citoplasma e nucléolos apresentam fluorescência verde, enquanto os compartimentos ácidos, como lisossomos ou autofagolisossomos, fluorescem em vermelho brilhante ou laranja-vermelho com excitação de luz azul (TRAGANOS, DARZYNKIEWICZ, 1994).

As células MCF-7 com ou sem 25 µg/mL de tratamento com extrato de semente de açaí foram semeadas em placas de fundo de vidro de 3 cm por 24 horas e expostas ao meio de coloração AO (1 µg/mL em meio completo) por 45 min. Todos os processos de tratamento foram realizados evitando a iluminação ambiental. As placas foram imediatamente embrulhadas em papel alumínio e submetidas a imagens fluorescentes.

A porcentagem de células vermelhas-AVO positivas foi calculada em 5 fotos de cada condição e os resultados são apresentados no histograma inferior. São mostrados blots e fotos representativas de três experimentos independentes com resultados semelhantes.

As amostras foram examinadas no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) da Universidade Estadual de Campinas, utilizando o microscópio de fluorescência invertida APOTOME (Carl Zeiss AG, Alemanha) equipado com fonte de luz fluorescente de 130 W. O bloco de filtro foi usado contendo um filtro de excitação passa-banda de 465 a 495 nm, espelho dicróico de 505 nm e filtro de barreira de passagem longa de 590 nm.

4.8 Microscopia eletrônica de transmissão

Para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET) as células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² e tratadas por 24 horas com o extrato da semente de açaí na concentração citotóxica de 25 µg/mL. Após o tratamento, as células foram lavadas três vezes

em PBS e fixadas por 24h em fixador Karnovsky. As células foram fixadas com tetróxido de ósmio. Após centrifugação, as células foram lavadas por três vezes em tampão fosfato de Sorensen 0,2M. A pós-fixação foi realizada com uma solução de tetróxido de ósmio 1% por 1-2h em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 3000 rpm e lavadas por três vezes em tampão fosfato de Sorensen. Após nova centrifugação por 3 minutos a 3000 rpm, foi iniciada a desidratação das amostras em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) ficando as células por 5 minutos em cada solução. A infiltração foi iniciada com a incubação das amostras em solução de resina Dr. SPURR e acetona 100% (1:1) overnight. Posteriormente, as amostras foram incubadas em resina pura por 6 horas e incluídas em formas para polimerização em estufa a 60-70°C por 48 horas.

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA *IN VIVO*

4.9 Local de experimentação

Os procedimentos experimentais foram realizados no Biotério Setorial da Pós-graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

A eutanásia e análise do tumor, bem como a coleta de sangue, plasma e dissecação dos órgãos analisados ocorreram no Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer (LIAC) da UFMA sob supervisão da Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo-Santos.

As células de tumor de Ehrlich utilizadas nessa pesquisa foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento do Laboratório de Imunofisiologia da UFMA.

4.10 Animais e Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão sob o número 23115.024027/2020-64 (ANEXO 1).

Foram utilizados camundongos Swiss machos, com peso variando entre 35-50g com 90-120 dias de idade, obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão e mantidos no biotério setorial do prédio da Pós-Graduação do CCBS. Os animais foram

adaptados ao biotério experimental por 7 dias, mantidos em ambiente com controle de temperatura e umidade monitorada e ciclo claro/escuro de 12h cada, com água e ração *ad libitum*.

4.11 Inoculação do tumor e tratamento dos animais

As células tumorais de Ehrlich foram mantidas na forma ascítica, até 20 passagens, por passagens peritoneais em camundongos Swiss machos por transplante semanal de 5×10^5 células tumorais/animal em PBS (pelo menos, dois animais por semana). Para o teste, as células foram preparadas na densidade de $2,5 \times 10^6$ células/60 μ L/animal em PBS após avaliação da viabilidade celular com azul de tripan na câmara de Neubauer.

O experimento foi conduzido de acordo com Kleeb et al.(1997) com algumas modificações, sendo utilizados camundongos da linhagem swiss (n=4/grupo) (BARCELOS *et al.*, 2014).

Para o tumor sólido, as células serão preparadas na densidade de $2,5 \times 10^6$ células/60 μ L/animal em PBS (inóculo no dorso).

O tratamento no grupo preventivo foi iniciado 30 dias antes da inoculação do tumor e mantido por 15 dias após indução e no grupo terapêutico iniciado após 24h da indução e mantido por 15 dias (CUNHA *et al.*, 2019). Após os tratamentos, os animais serão sacrificados por aprofundamento anestésico (cetamina + xilazina) e o tumor removido, pesado, fotografado e aliquoteado para análises histológicas e histoquímicas. Foi determinado o peso relativo tumoral, que é a diferença entre o peso tumoral dividido pelo peso corporal.

Os animais foram separados aleatoriamente em 8 grupos (n=4/grupo) conforme o Quadro 1.

Quadro 1. Divisão dos grupos experimentais.

Grupos	Tratamento	Tumor
Controle negativo (CTL-)	Salina	Com indutor tumoral
Controle positivo (CTL+)	Ciclofosfamida 25mg/kg	Com indutor tumoral

Grupo preventivo com extrato 100mg/Kg	Extrato 100mg/kg	Com indutor tumoral
Grupo preventivo com extrato 300 mg/Kg	Extrato 300mg/kg	Com indutor tumoral
Grupo preventivo com extrato 1000mg/Kg	Extrato 1000mg/kg	Com indutor tumoral
Grupo terapêutico com extrato 100mg/Kg	Extrato 100mg/kg	Com indutor tumoral
Grupo terapêutico com extrato 300mg/Kg	Extrato 300mg/kg	Com indutor tumoral
Grupo terapêutico com extrato 1000mg/Kg	Extrato 1000mg/kg	Com indutor tumoral

4.12 Procedimentos experimentais

Os animais dos grupos veículo e experimental foram tratados por via oral por gavagem e os do grupo ciclofosfamida foram tratados por via intraperitoneal diária durante o período descrito para cada grupo.

Os parâmetros clínicos (locomoção, comportamento, aspecto da pelagem e cianose) foram avaliados a cada dia de tratamento e o peso corporal e o consumo de ração foi avaliado a cada 2 dias antes da indução tumoral e diariamente após indução tumoral.

No 16º dia após a anestesia, amostras de sangue (300 µL, em eppendorfs contendo EDTA 10%, 1 gota/tubo) foram coletadas de cada animal por punção cardíaca. Em seguida, os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia com uma mistura de 120 mg/kg de Ketamina e 150 mg/kg Xilazina.

O sangue foi utilizado para avaliação de parâmetros hematológicos e o plasma para quantificação de citocinas.

As necropsias foram realizadas em cada camundongo para avaliar a toxicidade grosseira para alguns órgãos (rins e fígado) e para remover a massa tumoral. O peso relativo do tumor (RTW) foi calculado como o peso do tumor dividido pelo peso corporal final.

4.13 Avaliação da celularidade nos órgãos linfoides

Células do baço e da medula óssea foram analisadas para avaliação dos efeitos do tratamento com extrato da semente de açaí.

O baço foi retirado, triturado e macerado em 3mL de PBS e o fêmur foi retirado e perfundido com 1mL de PBS para obtenção das células da medula óssea.

Para contagem das células, foram retirados 90 μ L das suspensões celulares e adicionados 10 μ L de cristal violeta. As células foram contadas em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico de luz comum (FIALHO, 2011).

A quantificação das citocinas interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), MCP-1, interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF) foi realizada por citometria de fluxo com o equipamento FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), utilizando o kit de citocinas BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante.

4.14 Avaliação histopatológica e imunohistoquímica

As amostras de rim, fígado e dos tumores induzidos foram fixadas em formaldeído a 10% tamponado (pH=7.0) e incluídas em blocos de parafina. Foram obtidos cortes histológicos com 5 μ m de espessura, que foram corados com hematoxilina e eosina e analisados através de microscópio óptico.

As seguintes variáveis foram analisadas na Tabela 1:

Tabela 1. Tabela identificação e descrição histopatológica .

TT	Tamanho do tumor	Maior diâmetro em milímetro (mm)
IP	Índice proliferativo	Número de mitose por 10 campos de grande aumento (mitose /10CGA)
N	Necrose	Proporção ou percentual de necrose em relação ao tumor viável (%)

IIP	Infiltrado inflamatório peritumoral	Intensidade do infiltrado inflamatório (0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = acentuado)
AH	Arquitetura histológica	Alteração na arquitetura histológica (0 = ausente; 1 = presente)
MX	Metástases	Presença de metástase (0 = ausente; 1 = presente)

Tecidos tumorais, os mesmos utilizados para as análises histopatológicas, serão utilizados para as imunomarcações. Serão obtidos cortes com 5µm de espessura no micrótomo Leica RM 2165 (Leica, Munique, Alemanha), coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica será realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C em micro-ondas ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo. O bloqueio das peroxidases endógenas será obtido com H₂O₂ (0,3% em metanol) com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina do soro bovino (BSA) 3%, em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente.

Estes anticorpos foram aplicados às secções de acordo com as recomendações do fabricante. Os anticorpos primários utilizados serão o p65, STAT-3, b-catenin, F4/80 (macrófagos) (Abcam, Cambridge, MA) e Ki-67 (Biocare Medical, EUA) (modelos de tumor sólido de Ehrlich e AOM/DSS) de acordo com as instruções do fabricante (Bersudsky *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2013). Os cortes serão incubados com anticorpo secundário e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB), contra-corados com Hematoxilina de Harris e avaliados no fotomicroscópio Zeiss Axiophot (Zeiss, Munique, Alemanha).

4.15 Avaliação clínica dos animais e macroscópica do tumor

Os animais foram diariamente avaliados para análise do consumo de alimento e do peso corpóreo. Após a morte e retirada dos órgãos, os tumores macroscópicos foram contados e medidos através do uso de paquímetro. As pequenas porções de tumores e tecido normal adjacente foram processadas para análise bioquímica e histológica.

4.16 Quantificação de citocina por CBA

A quantificação das citocinas interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), MCP-1, interferon-γ (IFN-γ), fator de necrose tumoral (TNF) foi realizada por citometria de fluxo com o equipamento FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), utilizando o kit de

citocinas BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante.

O sistema Cytokine Bead Array (CBA) foi o instrumento para a avaliação da presença de citocinas no sobrenadante obtido da maceração dos fígados dos camundongos. O método baseia-se na captura de um ligante (a exemplo de uma citocina) na amostra por um bead (carreador), e sua subsequente identificação por um sistema de detecção composto por um anticorpo específico acoplado a um corante fluorescente (fluorocromo). A faixa de concentração para a detecção do kit CBA é 20-5000 pg/ml para cada citocina analisada.

4.17 Destino das carcaças

As carcaças foram armazenadas e congeladas em sacos brancos de lixo contaminante, e posteriormente, descartados de acordo com as especificações do Biotério.

4.18 Análise estatístico

Para análise estatística dos dados experimentais, foi realizado o teste one or two-way analysis of variance (ANOVA), seguido pelos pós-testes de Dunnett's ou Sidak's, de acordo com o tipo de análise. As diferenças serão consideradas significativas quando o $p < 0,05$. O programa utilizado para realização da análise estatística foi o GraphPad Prism versão 8.4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização Química do Extrato (LC M/S-M/S)

Para os extratos de *Euterpe oleracea* Mart., a rede molecular identificou 15 compostos, especialmente flavonoides e antocianinas. Os compostos principais foram: (-) - epicatequina (1), cianidina 3-glucosídeo (2), procianidina B2 (3), kaempferol-3-O-rutinosídeo (4), nobiletina (5), dihidrokaempferol (6), diosmetina (7), 3-O-metilquercetina ou isorhamnetina (8) isoorientina (9), genisteína-8-C-glicosídeo (10) e apigenina 6,8-digalactosídeo (11) (Figura 3).

Representação dos compostos estão evidenciadas na Tabela 2.

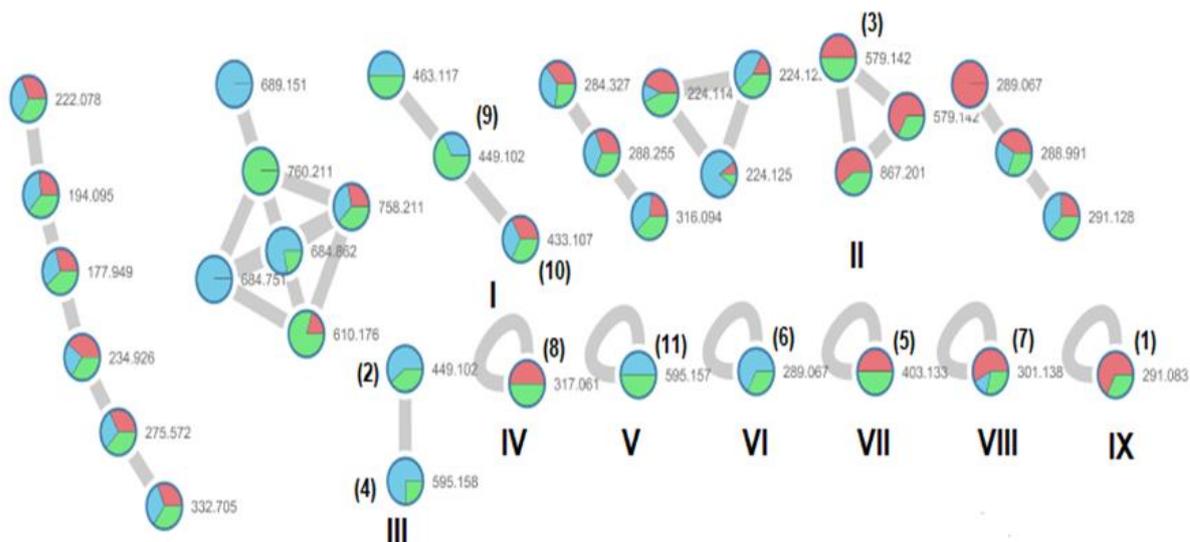
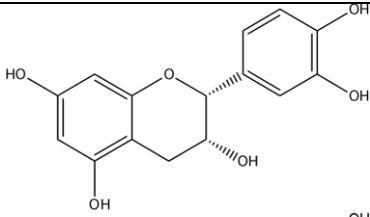
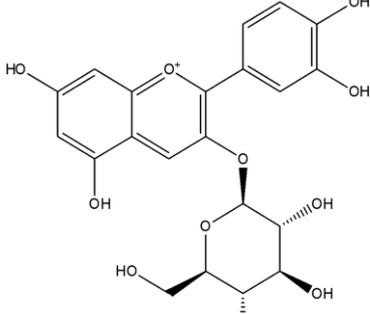
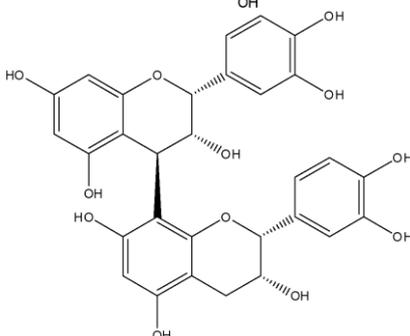
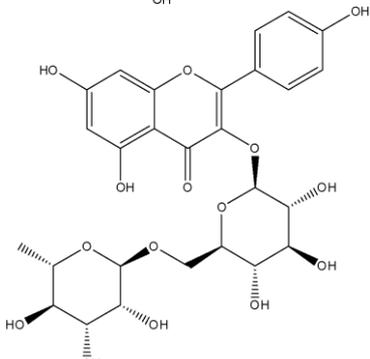
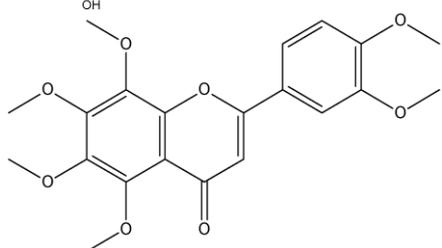
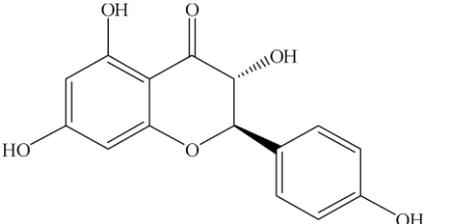
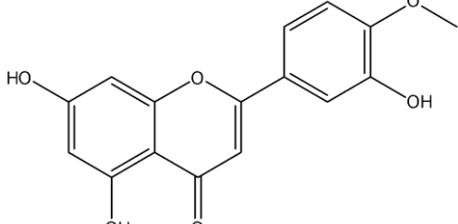
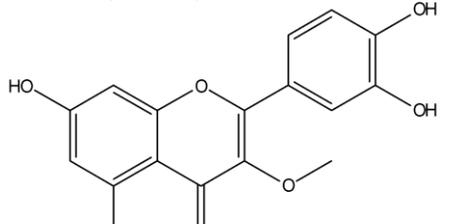
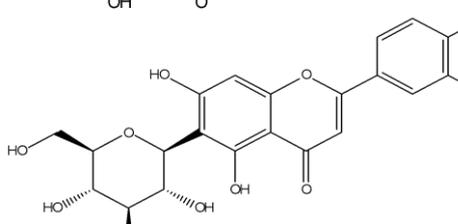
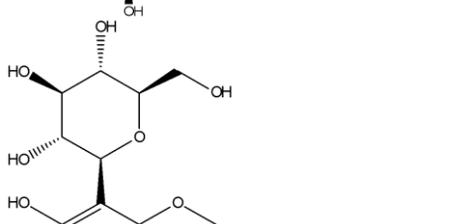
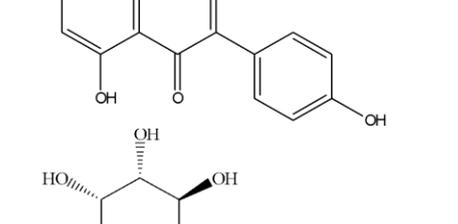


Figura 3. Zoom na análise MS/MS dos extratos de sementes, polpas e frutos totais de *E. oleracea* Mart. As cores indicadas na legenda correspondem aos diferentes extratos (vermelho: semente; azul: polpa e verde: fruto total). Os nós em negrito circundados por linhas azuis representam os compostos com ocorrências na biblioteca do GNP.

Tabela 2. Identificação dos compostos químicos presentes na semente de açaí por LC-ESI-MS.

Composto	Estrutura	m/z calculada	n/z observada	Erro (ppm)	Partes aç Ser e fruto
1		291.0863	291.0848	-5.15	
2		449.1078	449.1056	-4.89	Polpa e to
3		579.1497	579.1481	-2.76	Sement fru to
4		595.1657	595.1628	-4.87	Polpa e to
5		403.1387	403.1371	-3.96	Sement fru to

6		289.0707	289.0695	-4.15	Polpa e to
7		301.0707	301.0695	-3.98	Sement fru to
8		317.0656	317.0643	-4.10	Sement fru to
9		449.1078	449.1060	-4.00	Polpa e to
10		433.1129	433.1110	-4.38	Sement pc fru to
11		595.1657	595.1632	-4.20	Polpa e to

IN VITRO**5.2 Triagem Farmacológica – Ensaio de Viabilidade Celular com MTT**

O efeito da atividade citotóxica do extrato da *E. oleracea* Mart. foi analisada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) na linhagem celular de tumor humano MCF-7. As concentrações obtiveram efeitos diversos em relação ao tempo de tratamento (Figura 4).

Para análise de viabilidade celular a linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7) foram incubadas em concentrações de 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/mL e analisadas a incubação no período de 24 h, 48 h e 72 h.

O extrato da semente do açaí foi capaz de reduzir a viabilidade celular a partir de 24h. O tratamento nas concentrações com 0,25 µg/mL e 2,5 µg/mL do extrato da semente do açaí não obteve reduções significativas na viabilidade celular a partir de 24h ($p < 0,05$), assim como comparado com o controle. Nas concentrações de 25 µg/mL e 250 µg/mL o extrato obteve efeitos citotóxicos, em comparação das duas concentrações é perceptível que a concentração em 250 µg/mL continuou constantemente a redução de viabilidade celular.

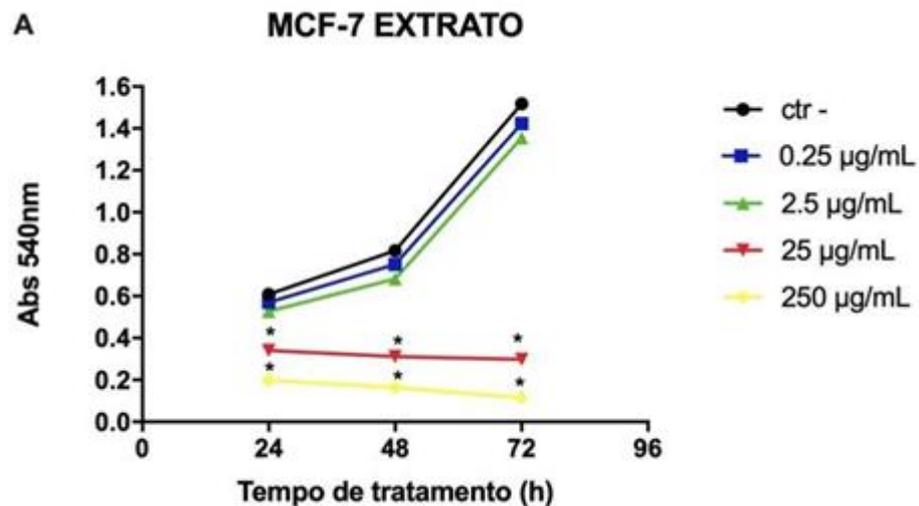


Figura 4. Avaliação da citotoxicidade do extrato da semente de açaí em linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7 através do ensaio de viabilidade com MTT. ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$

5.3 Ensaio clonogênico

Com o objetivo de avaliar a redução da viabilidade celular da linhagem MCF-7 após o tratamento com extrato de semente de açaí, foi realizado ensaio clonogênico para investigar o efeito do extrato na proliferação de células de adenocarcinoma de mama. O tratamento foi realizado com em concentrações de extrato da semente de açaí em 10 $\mu\text{g/mL}$ e 15 $\mu\text{g/mL}$ e mais o controle, dentre os tratamentos o que mais promoveu a acentuação reduzida foi 15 $\mu\text{g/mL}$, mas comparado de 10 $\mu\text{g/mL}$ está dentro dos parâmetros da redução de proliferação celular.

Os resultados do ensaio mostraram que o tratamento com açaí reduziu drasticamente a formação de novas colônias celulares (Figuras 5 A e B).

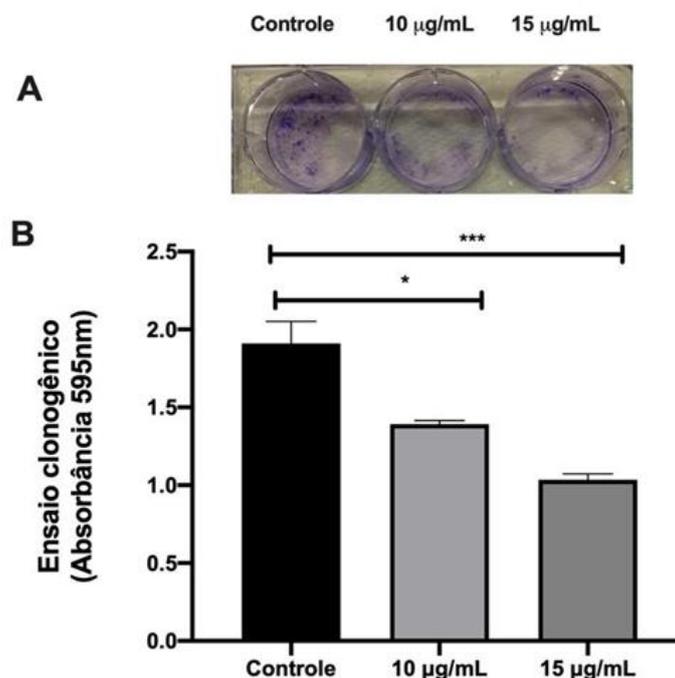


Figura 5 (A, B). Ensaio clonogênico da linhagem celular MCF-7 de câncer de mama tratada com extrato de semente de açaí realizado após 15 dias de cultivo. Os dados foram obtidos como valores de absorvância de 595 nm. One-way ANOVA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.4 Caspase 3/7

Com o propósito de constatar a atividade de morte celular na linhagem MCF-7 complementando os ensaios anteriores, foi realizado um ensaio das caspases 3 e 7 nos

tratamentos das concentrações que melhor resultou nos efeitos de redução celular, ou seja, em tratamentos com 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6 A, B).

Não houve aumento das porcentagens de células apoptóticas após 6 e 24h do tratamento em células de MCF-7.

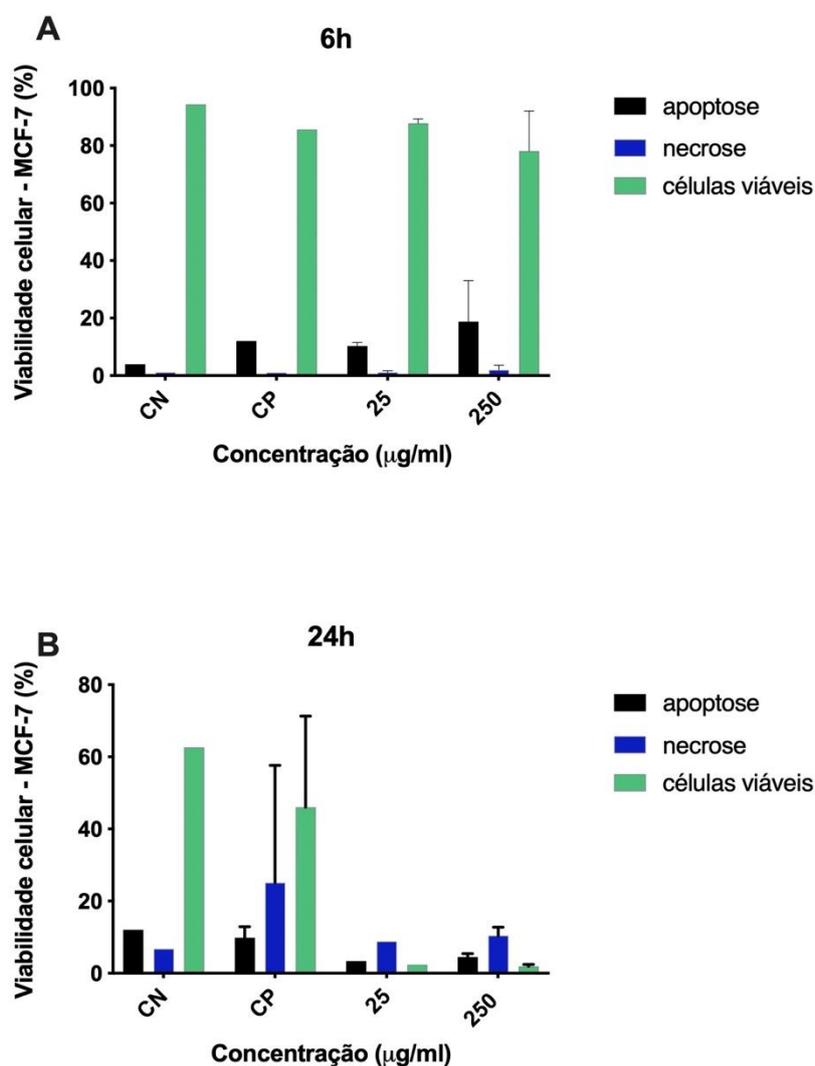


Figura 6 A, B. O extrato da semente não causou apoptose nas células MCF-7. O ensaio das caspases 3 e 7 demonstrou que o extrato da semente não aumentou a atividade da caspase 3 e da caspase 7 quando comparado às células controle após 6h (a) e 24h (b) de tratamento. CN: células com DMEM; CP: DMSO (100 μ). Two-way ANOVA, pós-teste de Tukey.

5.5 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Considerando que a autofagia é o mecanismo de morte de linhagens celulares tratadas com açaí MCF-7, foi utilizado o indicador DAF-2DA-NO fluorescente específico permeável a células para avaliar se havia aumento na quantificação de espécies reativas de

oxigênio e se o aumento na expressão de radicais livres seria o mecanismo indutor de autofagia.

O tratamento com as concentrações 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de semente de açaí respondeu com um aumento na produção de ROS após 6h quando comparado às células controle, o extrato da semente do açaí induziu o aumento de ROS nas células de tratamento, enquanto o controle (Figura 7).

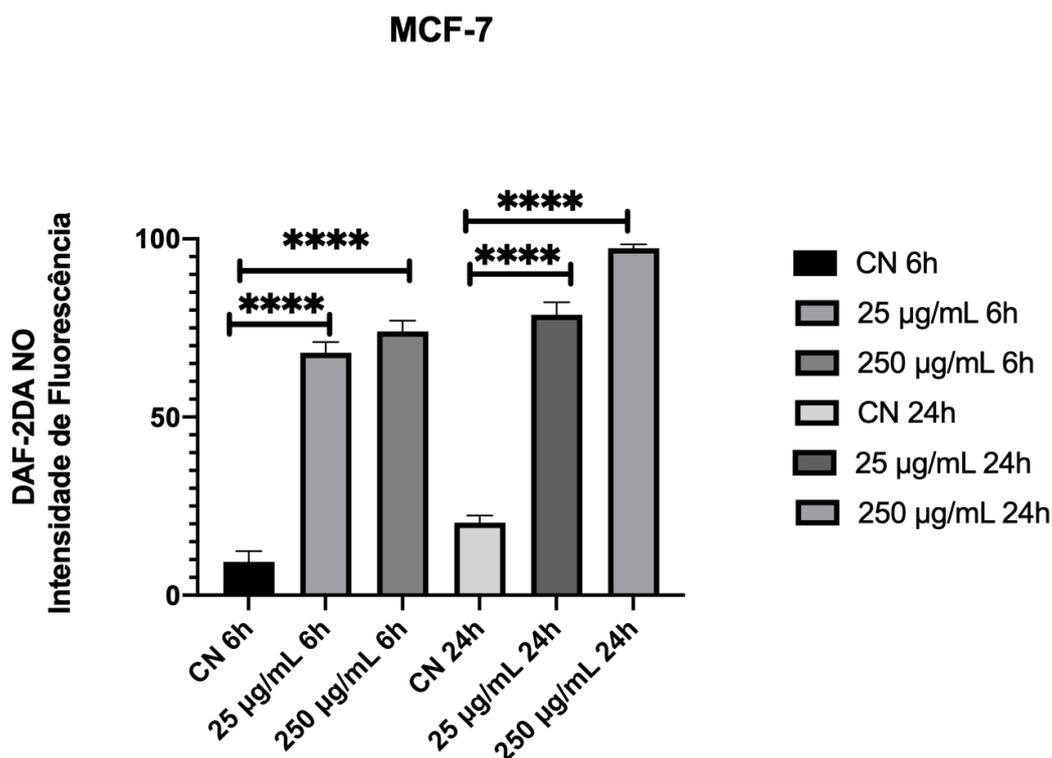


Figura 7. Efeito do extrato nos níveis de NO expressos como diferença percentual de fluorescência na linhagem celular de câncer de mama MCF-7 (1×10^5 céls/mL) usando DAF-2DA ($10 \mu\text{M}$) incubado por 30 minutos. Dados representativos de experimentos em triplicata. A produção basal foi considerada zero e a diferença de fluorescência foi expressa nos tempos de incubação do composto (6h, 24h). Valores expressos como média \pm s.p.m. Two-way ANOVA, pós-teste de Tukey. **** $p < 0,0001$. CN: controle negativo.

5.6 Laranja de Acridina

Considerando que não houve indução de apoptose por aumento da expressão das caspases 3/7 e para avaliar outro mecanismo de morte celular na linhagem MCF-7, foi realizado o ensaio da laranja de acridina por imunofluorescência para avaliar o fluxo da autofagia.

O tratamento com 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato de semente de açaí mostrou diferenças significativas quando comparado com o controle, neste grupo houve um elevado nível de laranja de acridina nas regiões lisossômicas, ou seja, o extrato da semente causou o aumento de acidez, como lisossomas ou o acúmulo citosólica de autofagolisossomos, evidenciado por aumento das vesículas vermelho brilhante ou laranja-vermelho após excitação com luz azul (Figura 8).

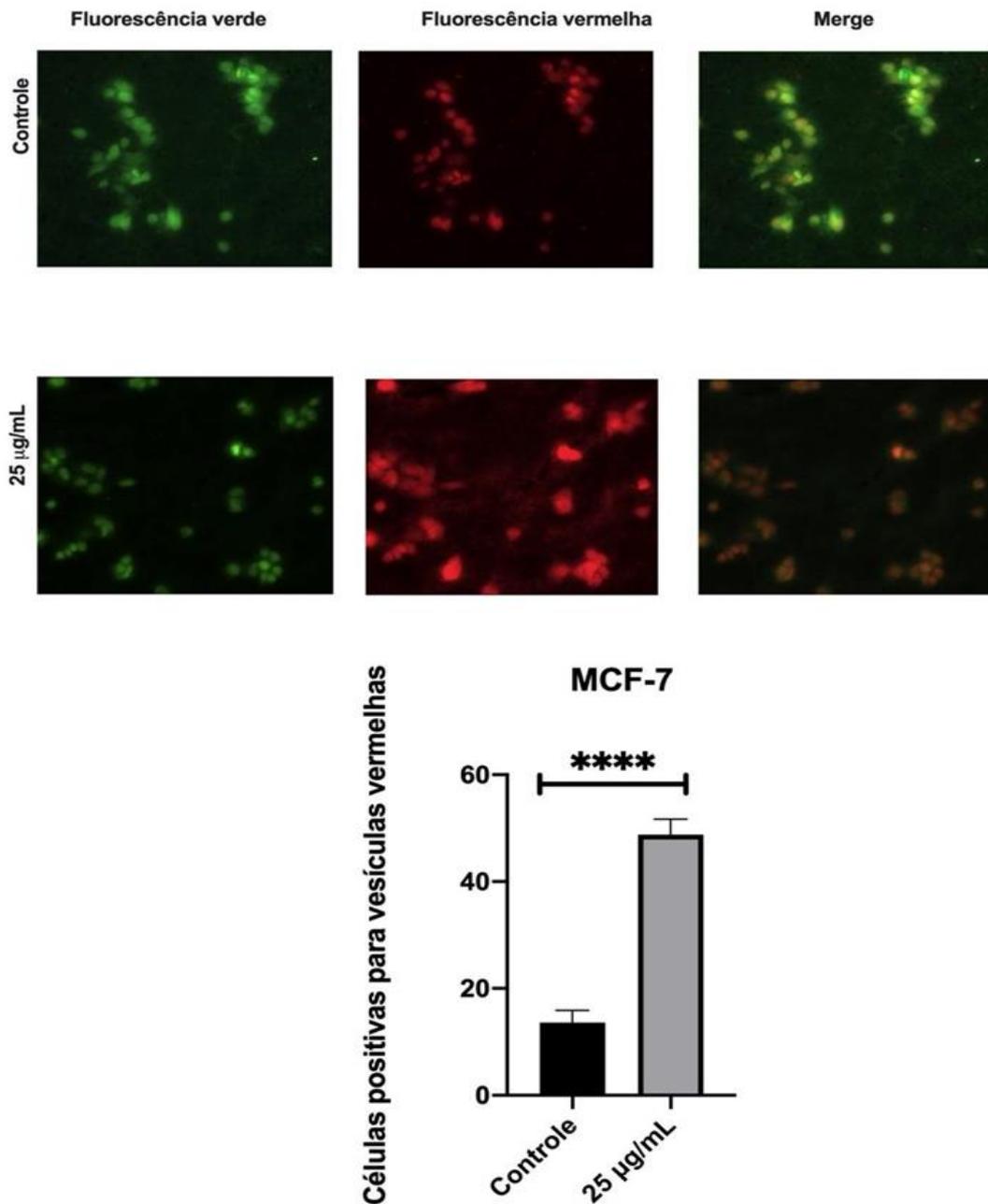


Figura 8. As células MCF-7 semeadas em placas de fundo de vidro de 3 cm foram tratadas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AO por 45 minutos e, em seguida, as imagens foram registradas em microscopia de fluorescência. Houve um aumento de organelas vesiculares ácidas (AVOs) marcadas com laranja-acridina (AO), coradas com vermelho fluorescente positivo após tratamento com extrato de semente de açaí. A fluorescência vermelha indicou os

AVOs corados com AO dentro das células. Os experimentos foram realizados em triplicata. **** p <0,0001. (Teste T não pareado (barras de escala, 50 μm)).

5.7 Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão das células MCF-7

Para análise detalhada da morfologia nuclear e outras organelas, foi realizada análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Células controle apresentavam membrana plasmática e núcleo íntegros assim como a presença de vesículas secretórias no citoplasma (Figura 9 A). Após tratamento com 25 $\mu\text{g/mL}$ do extrato por 24h, observou-se o surgimento de vesículas contendo conteúdo eletrodense, sugestivas de vesículas autofágicas e o aumento no número de mitocôndrias comparada ao controle. Observou-se redução do volume celular, alterações estruturais na membrana plasmática, no núcleo e no nucléolo, caracterizando a morte celular por autofagia. O aumento no número de mitocôndrias corrobora os dados previamente apresentados de aumento na expressão de ROS (Figura 9 B).

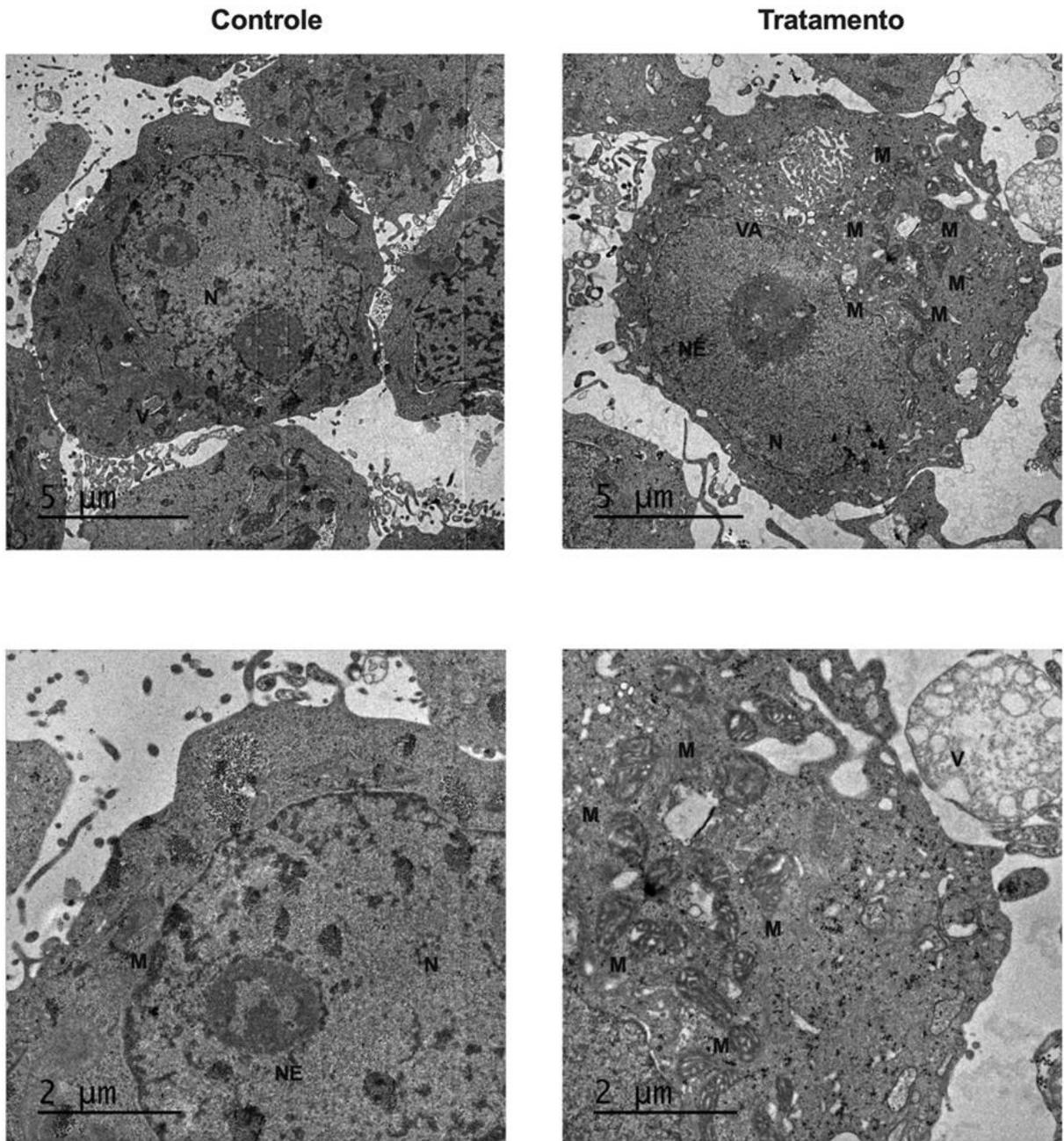


Figura 9. Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão das células MCF-7 após tratamento com o extrato da semente de açaí. Células controle apresentavam membrana plasmática e núcleo íntegros assim como a presença de vesículas secretórias no citoplasma (A). Após tratamento com 25 μg/ml do extrato do por 24 horas, observou-se o surgimento de corpos eletrondensos no citoplasma assim como a presença de vesículas autofágicas, além de aumento do número de mitocôndrias (B). N= núcleo, NE= nucléolo, M= mitocôndria, V= vesícula, VA= vesícula autofágica.

IN VIVO

5.8 Avaliação do efeito do extrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart. no desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich

No dia 0 foi feito inóculo do tumor de Ehrlich no dorso dos animais, seguido do tratamento intraperitoneal com Ciclofosfamida 25mg/kg (CTL+), PBS oral (CTL -) e extratos nas concentrações de 100, 300 e 1000mg/kg em esquemas preventivo e de intervenção após 24h da indução durante 15 dias.

A figura 10 representa a cinética do volume médio do tumor ao longo do tratamento de 15 dias. A partir do sexto dia houve redução do volume tumoral de forma significativa no grupo preventivo 1000mg/kg quando comparado ao controle negativo.

Quando se comparou o peso do tumor, observou-se que o grupo que recebeu extrato da semente de açaí na dose de 1000mg/kg de forma preventiva teve uma redução significativa do tumor quando comparado ao controle negativo ($p=0,01$) (Figura 11 A). Não houve diferença entre os grupos quando se analisou o peso relativo do tumor (Figura 11 B).

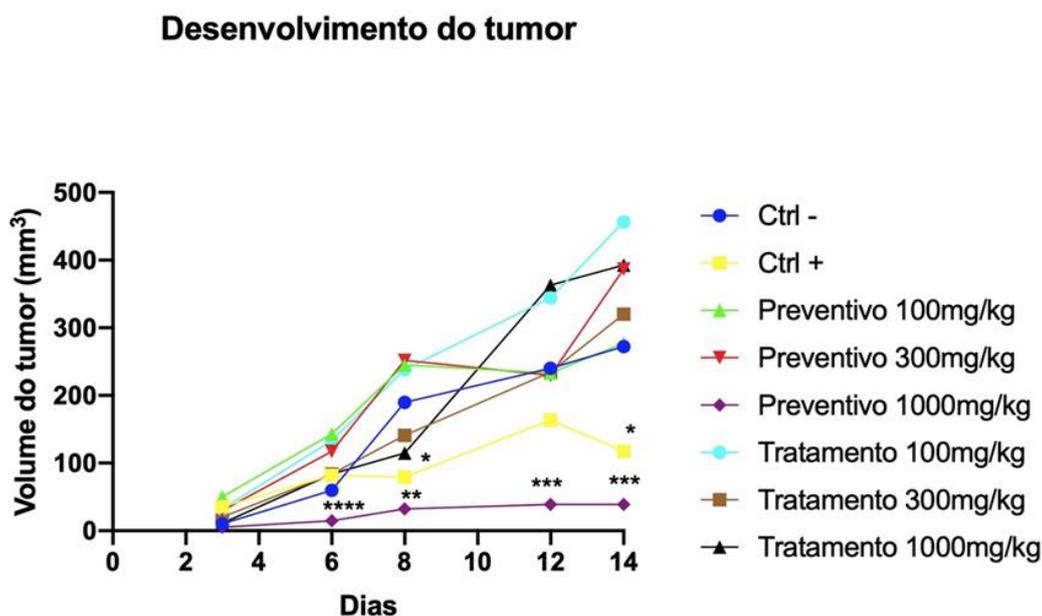


Figura 10. Efeito do extrato da semente de açaí no desenvolvimento do tumor de Ehrlich. A partir do sexto dia houve redução do volume tumoral de forma significativa no grupo preventivo 1000mg/kg quando comparado ao controle negativo. Valores foram expressos como média \pm erro padrão. One-way ANOVA, pós-teste de Sidak's. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

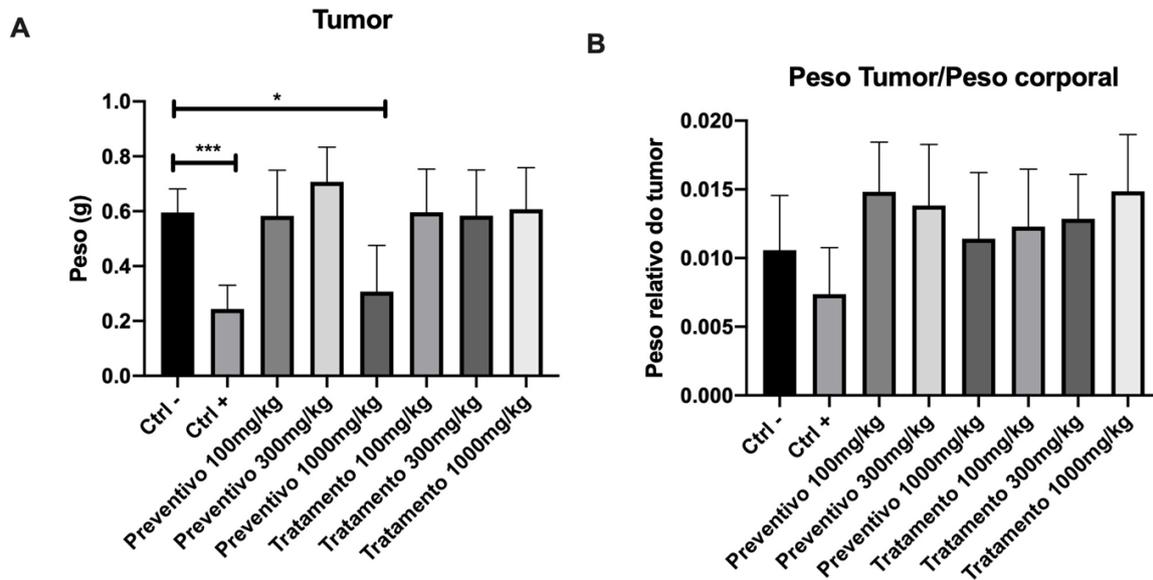


Figura 11. Efeito do extrato da semente de açáí no peso absoluto (A) e relativo (B) do tumor de Ehrlich. Houve redução significativa do peso do tumor no grupo preventivo 1000mg/kg quando comparado ao controle negativo. Valores foram expressos como média \pm erro padrão. One-way ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0.05$.

5. 9 Avaliação do efeito do extrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart. no peso dos animais

Na avaliação do peso dos animais, houve variação negativa do peso corporal ao final do tratamento apenas no grupo que recebeu ciclofosfamida (Figura 12 A).

Na avaliação da variação de peso ao longo do tratamento, não ocorreu variação significativa do peso dos animais após a indução tumoral na maioria dos grupos tratados (Figura 12 B).

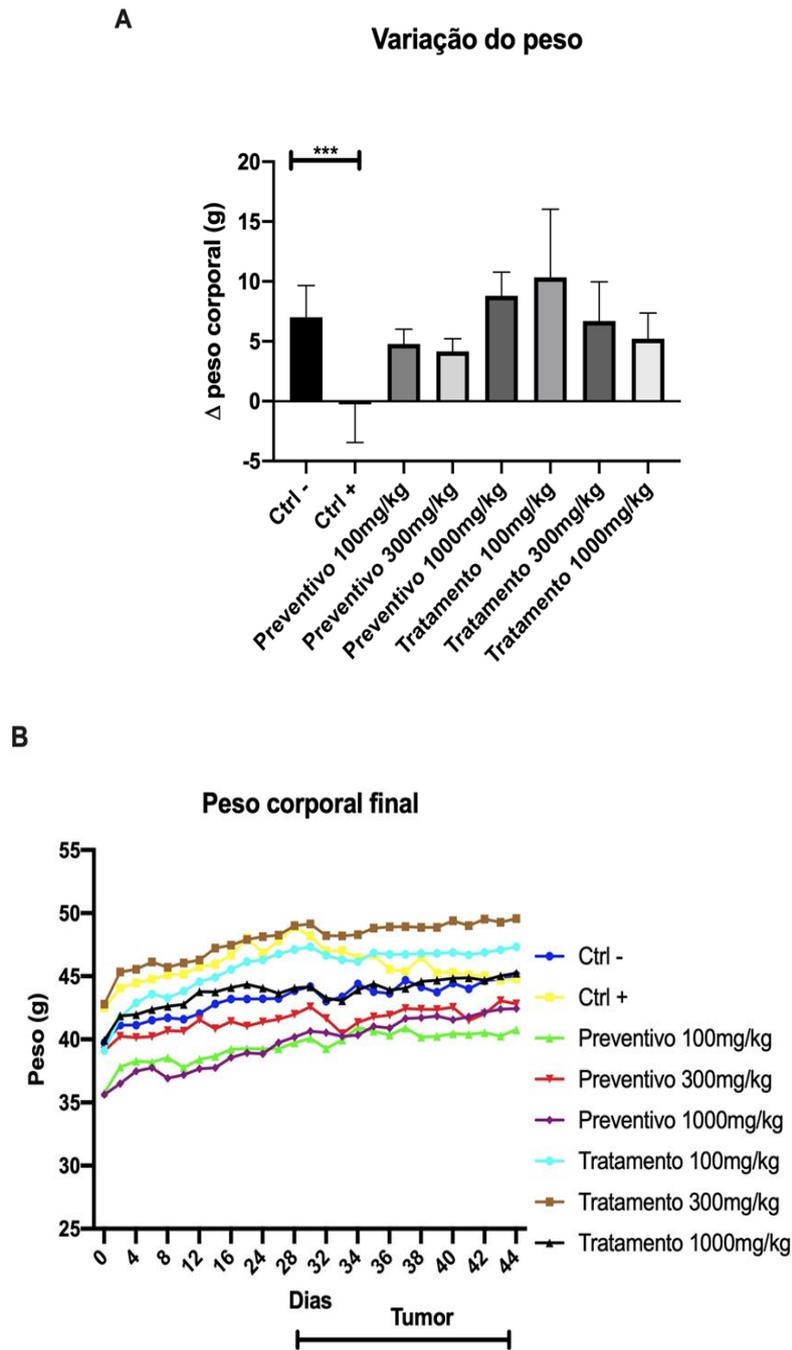


Figura 12. Efeito do extrato da semente de açaí na variação do peso dos animais ao final do tratamento (A) e cinética do peso ao longo do tratamento (B). Houve redução significativa do peso dos animais apenas no grupo que recebeu ciclofosfamida. One-way ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

5.10 Avaliação do efeito do extrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart. no peso dos órgãos

Alguns órgãos foram pesados e observados macroscopicamente para possíveis sinais de toxicidade do tratamento ganho de peso (Figura 13). Em comparação com o grupo controle, o baço dos animais tratados com ciclofosfamida apresentou redução do peso ($p=0,01$) (Figura 13 A). Não houve diferença estatisticamente significativa no peso absoluto e relativo do fígado (Figuras 13 B e C) nem no peso absoluto e relativo do rim (Figura 13 D e E).

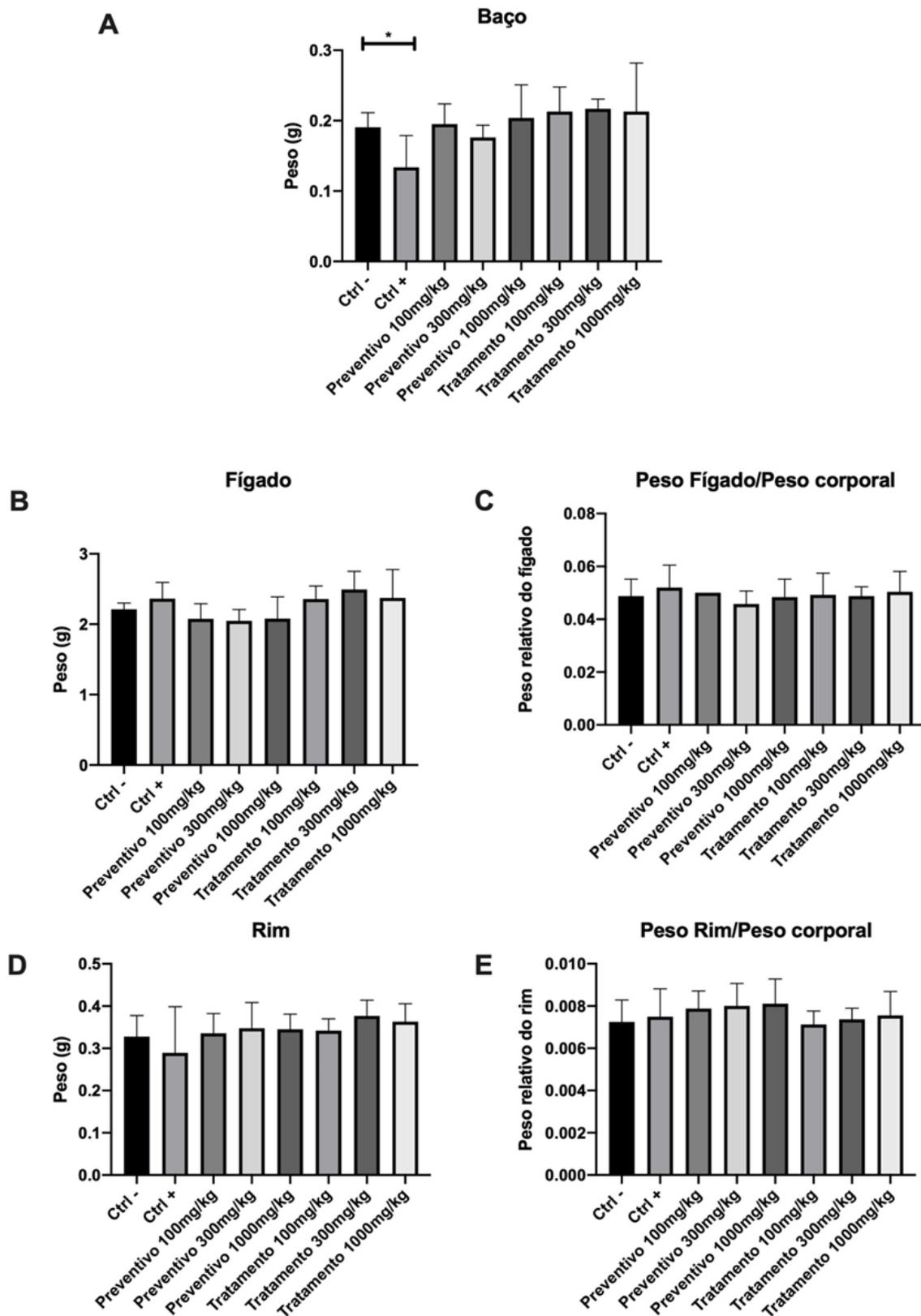
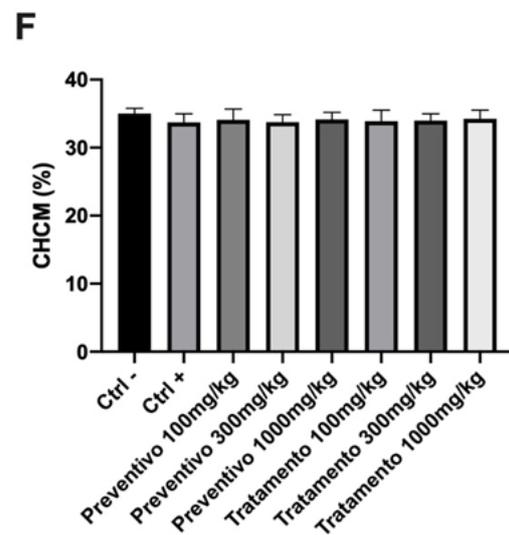
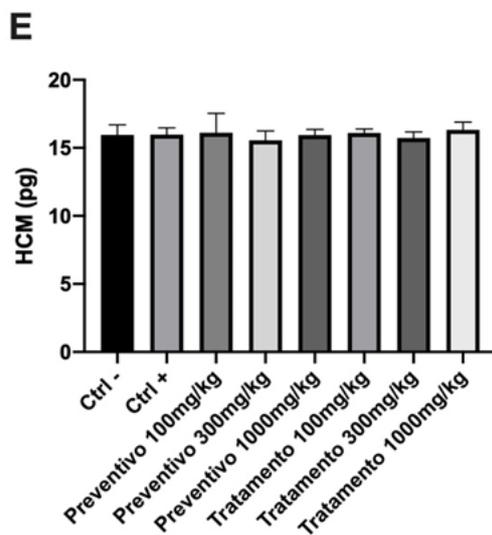
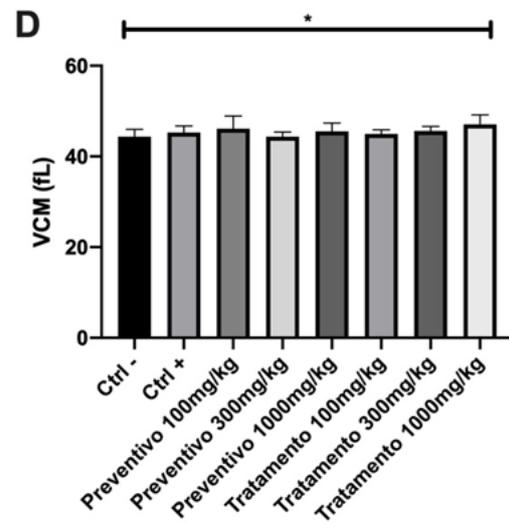
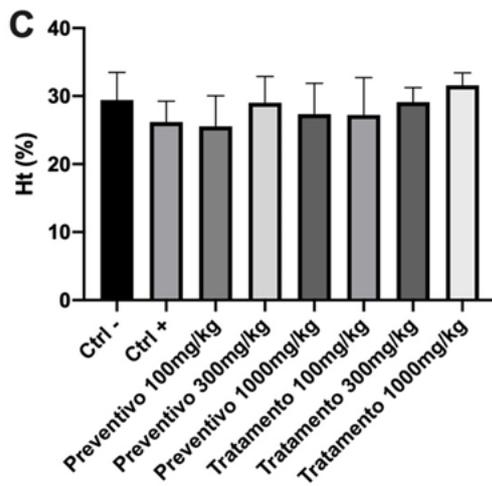
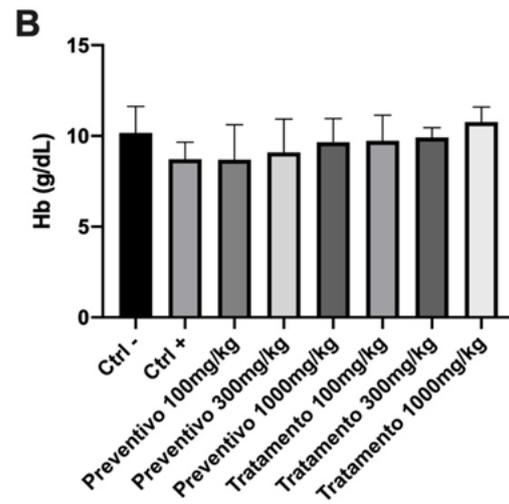
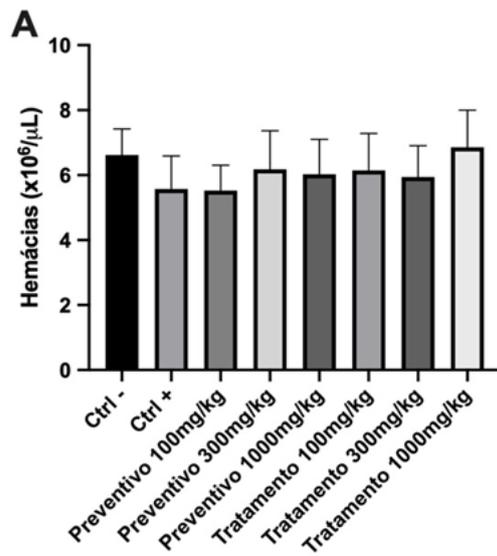


Figura 13. Efeito do extrato da semente de açai na variação do peso dos órgãos: baço (A), fígado (B e C) e rim (D e E). Houve redução do peso do baço no grupo que recebeu ciclofosfamida e aumento do peso do fígado no grupo tratamento 300mg/kg. One-way ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

5.11 Avaliação do efeito do extrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart. em parâmetros hematológicos

Não houve alterações significativas dos valores hematimétricos (hemácias, hemoglobina, hematócrito, HCM, CHCM) entre os grupos. Apenas para o VCM, o grupo tratamento 1000mg/kg apresentou aumento discreto quando comparado ao controle negativo (Figura 14 D).

Houve redução significativa do número de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos entre o grupo tratado com ciclofosfamida (Figuras 14 G-I), devido ao efeito citotóxico deste quimioterápico.



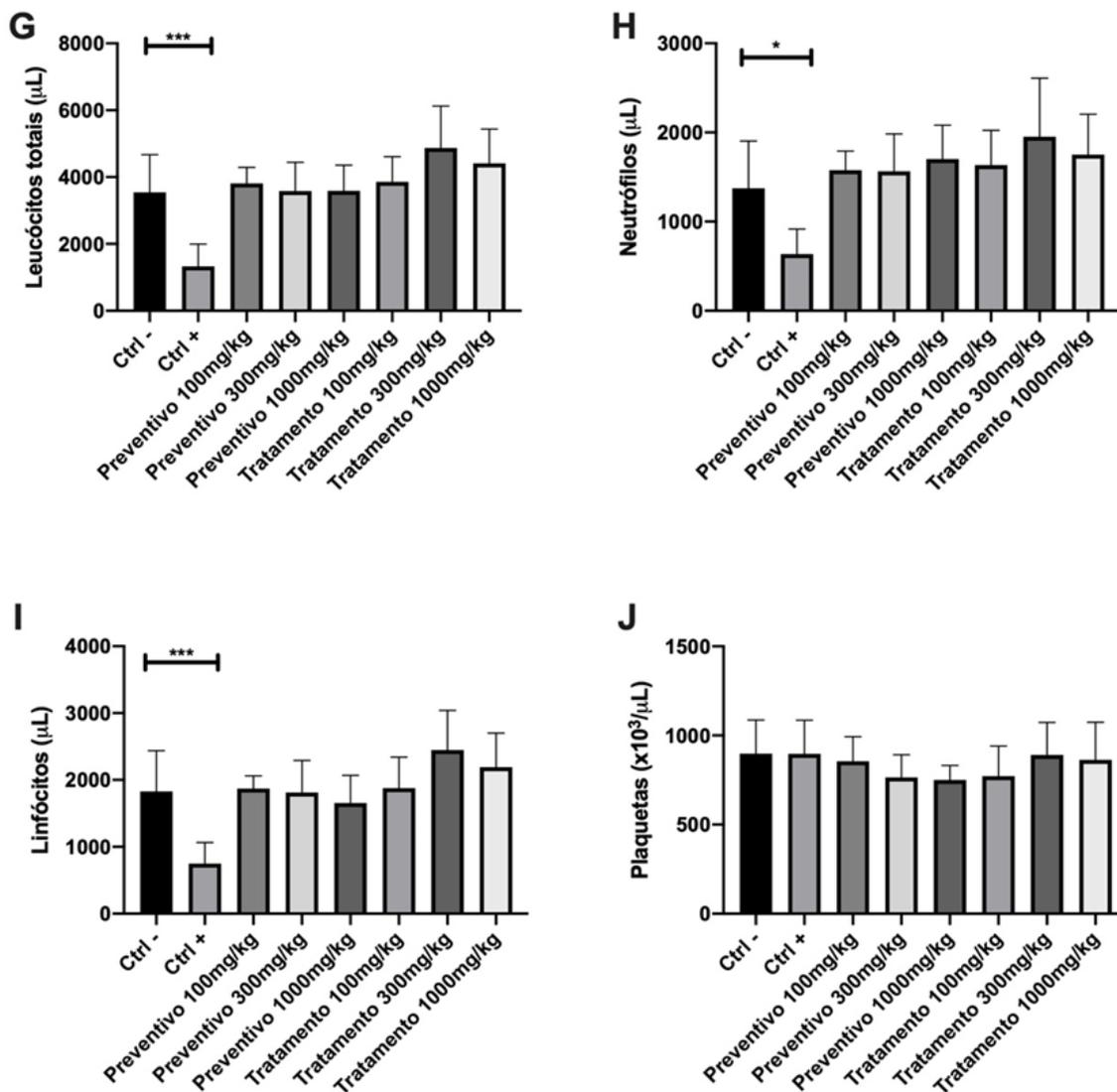


Figura 14. Efeito do extrato da semente de açaí nos valores hematimétricos, contagem de leucócitos e plaquetas. Resultados expressos como média + desvio-padrão. (A) hemácias, (B) hemoglobina, (C) hematócrito, (D) VCM (volume corpuscular médio), (E) HCM (hemoglobina corpuscular média), (F) CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), (G) leucócitos totais, (H) neutrófilos, (I) linfócitos e (J) plaquetas. One-way ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

5.12 Avaliação da celularidade dos órgãos linfoides

Na avaliação da celularidade dos órgãos linfoides: baço e medula óssea, houve redução significativa da quantidade de células no baço no grupo tratado com ciclofosfamida quando comparado ao controle. Houve aumento da celularidade do baço no grupo preventivo 1000mg/kg quando comparado ao controle negativo (Figura 15A). Quanto à celularidade da medula, houve aumento nos grupos tratamento 300mg/kg e 1000mg/kg quando comparados ao controle negativo (Figura 15 B).

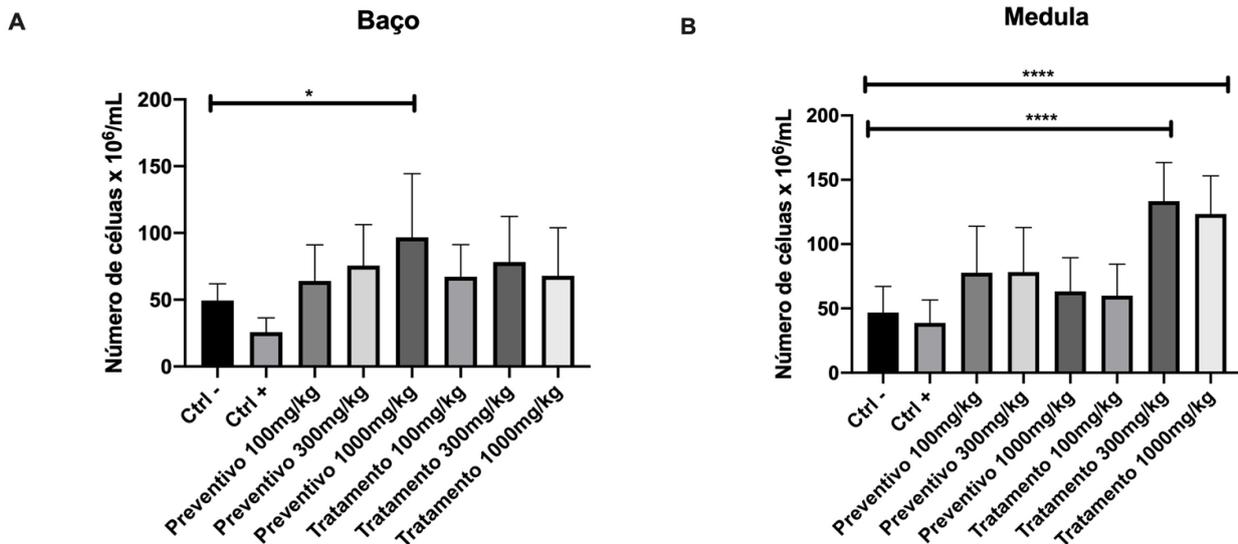


Figura 15. Efeito do extrato da semente de açaí na celularidade do baço (A) e da medula óssea (B). One-way ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

5.13 Efeito do extrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart. sobre as citocinas inflamatórias

Dentre as citocinas testadas, não houve expressão de IL-12p70, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e INF- γ . Houve um aumento da concentração de TNF nos grupos tratados com o extrato nos grupos preventivo 100mg/kg e 1000mg/kg (Figura 16A). Para a MCP-1, houve um aumento significativo da expressão no grupo controle positivo ($p=0.0004$) e no grupo preventivo 100mg/kg quando comparado ao controle negativo ($p=0.01$) (Figura 16 B).

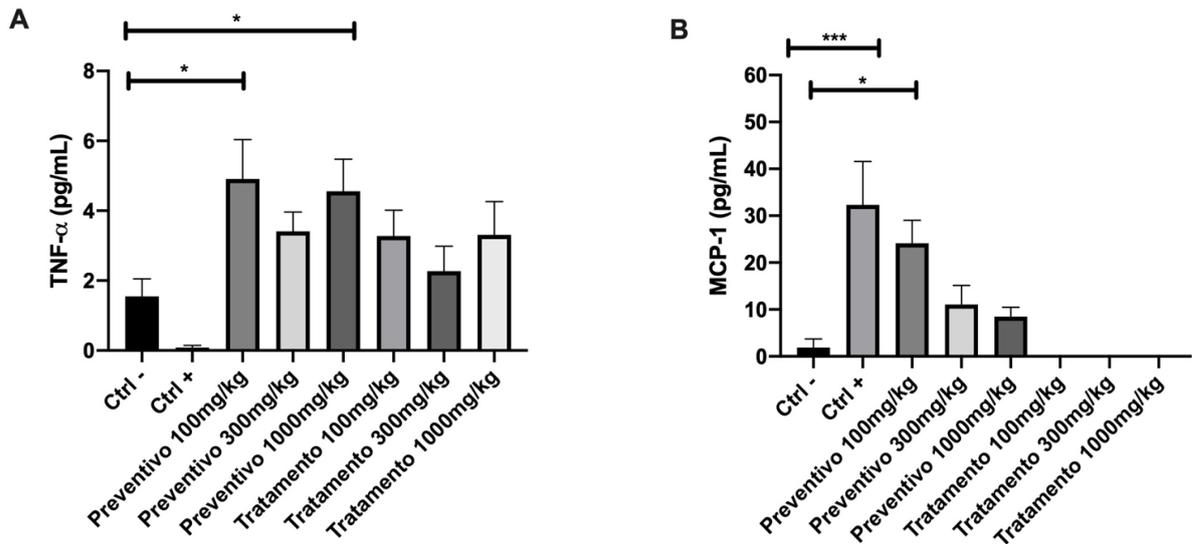


Figura 16. Efeito do extrato da semente de açaí na expressão de citocinas TNF (A) e MCP-1 (B) One-way ANOVA, pós-teste de Dunnett's. * $p < 0.05$.

5.14 Avaliação histopatológica após tratamento com extrato da semente de açaí

A análise histopatológica mostrou a presença de massas tumorais no dorso dos animais dos grupos com tumor sólido de Ehrlich. As massas tumorais apresentavam alta celularidade, algumas com pronunciada vacuolização citoplasmática, além de acentuado pleomorfismo nuclear e nucléolos proeminentes infiltrando o tecido conjuntivo subcutâneo. Nenhum dos grupos apresentou metástase. O grupo preventivo na dose de 1000mg/kg reduziu significativamente o tamanho do tumor. A amostra apresentou menor índice proliferativo (1) e também apresentou necrose em 95% da amostra em comparação ao controle negativo (Figura 17 E).

As análises histopatológicas do rim e fígado não evidenciaram alterações nos diferentes grupos tratados. Não houve evidência de toxicidade do extrato nem presença de invasão tumoral nestes órgãos. (Figuras 18 e 19).

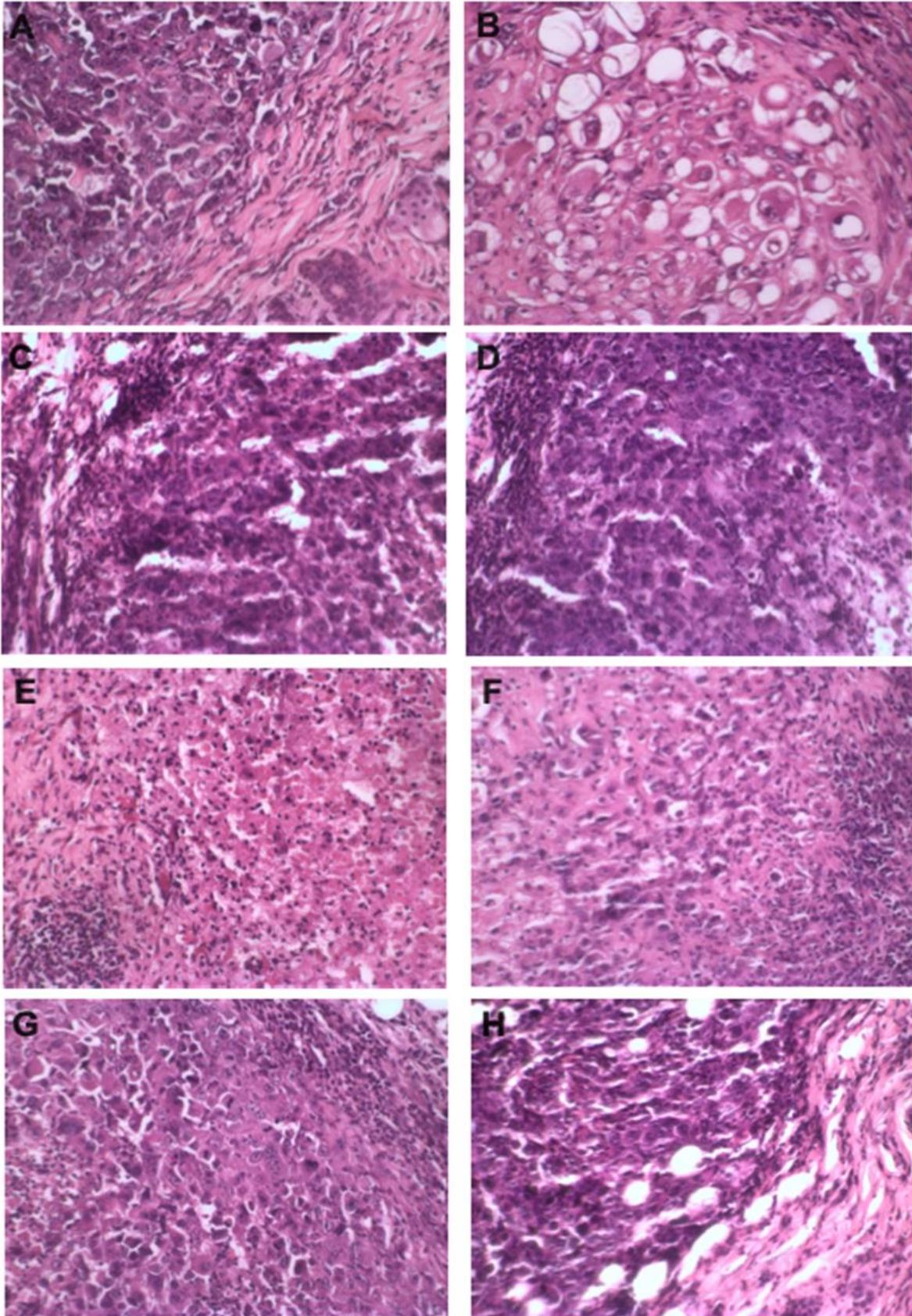


Figura 17. (A) Neoplasia invasora caracterizada por massas compactas de células com acentuado pleomorfismo nuclear e nucléolos proeminentes infiltrando o tecido conjuntivo subcutâneo. Observam-se também escasso infiltrado linfocitário na periferia da neoplasia e anexos cutâneos preservados no canto inferior esquerdo (H&E x40). (B) neoplasia invasora caracterizada por conjunto de células com pronunciada vacuolização citoplasmática,

além acentuado pleomorfismo nuclear e nucléolos proeminentes infiltrando o tecido conjuntivo subcutâneo. Observa-se também escasso infiltrado linfocitário na periferia da neoplasia (H&E x40). (C) neoplasia invasora caracterizada por massas compactas de células com acentuado pleomorfismo nuclear e nucléolos proeminentes infiltrando o tecido conjuntivo subcutâneo. Observam-se também agregados periféricos de células linfocitárias no canto superior esquerdo e focos com necrose no canto inferior direito da imagem (H&E x40). (D) neoplasia invasora caracterizada por massas compactas de células com acentuado pleomorfismo nuclear e nucléolos proeminentes infiltrando o tecido conjuntivo subcutâneo. Observam-se também agregados periféricos de células linfocitárias no canto superior esquerdo e grande área com necrose ocupando a metade inferior direita da imagem (H&E x40). (E) células individuais com acentuado pleomorfismo nuclear e nucléolos proeminentes em meio à extensa área com necrose e hemorragia. Observa-se também agregados periféricos de células linfocitárias no canto inferior esquerdo (H&E x40). (F) neoplasia invasora caracterizada por conjunto de células com pronunciada vacuolização citoplasmática, além acentuado pleomorfismo nuclear e nucléolos proeminentes infiltrando o tecido conjuntivo subcutâneo. Observa-se também moderado infiltrado linfocitário no quarto lateral direito da neoplasia (H&E x40). (G) neoplasia invasora caracterizada por massas de células com acentuado pleomorfismo nuclear, nucléolos proeminentes e elevado índice mitótico infiltrando o tecido conjuntivo subcutâneo. Observam-se também agregados periféricos de células linfocitárias no canto superior direito e foco com necrose ocupando o canto inferior esquerdo da imagem (H&E x40). (H) neoplasia invasora caracterizada por massas compactas de células com acentuado pleomorfismo nuclear e nucléolos proeminentes infiltrando o tecido conjuntivo subcutâneo. Observa-se também discreto infiltrado linfocitário na periferia da neoplasia (H&E x40).

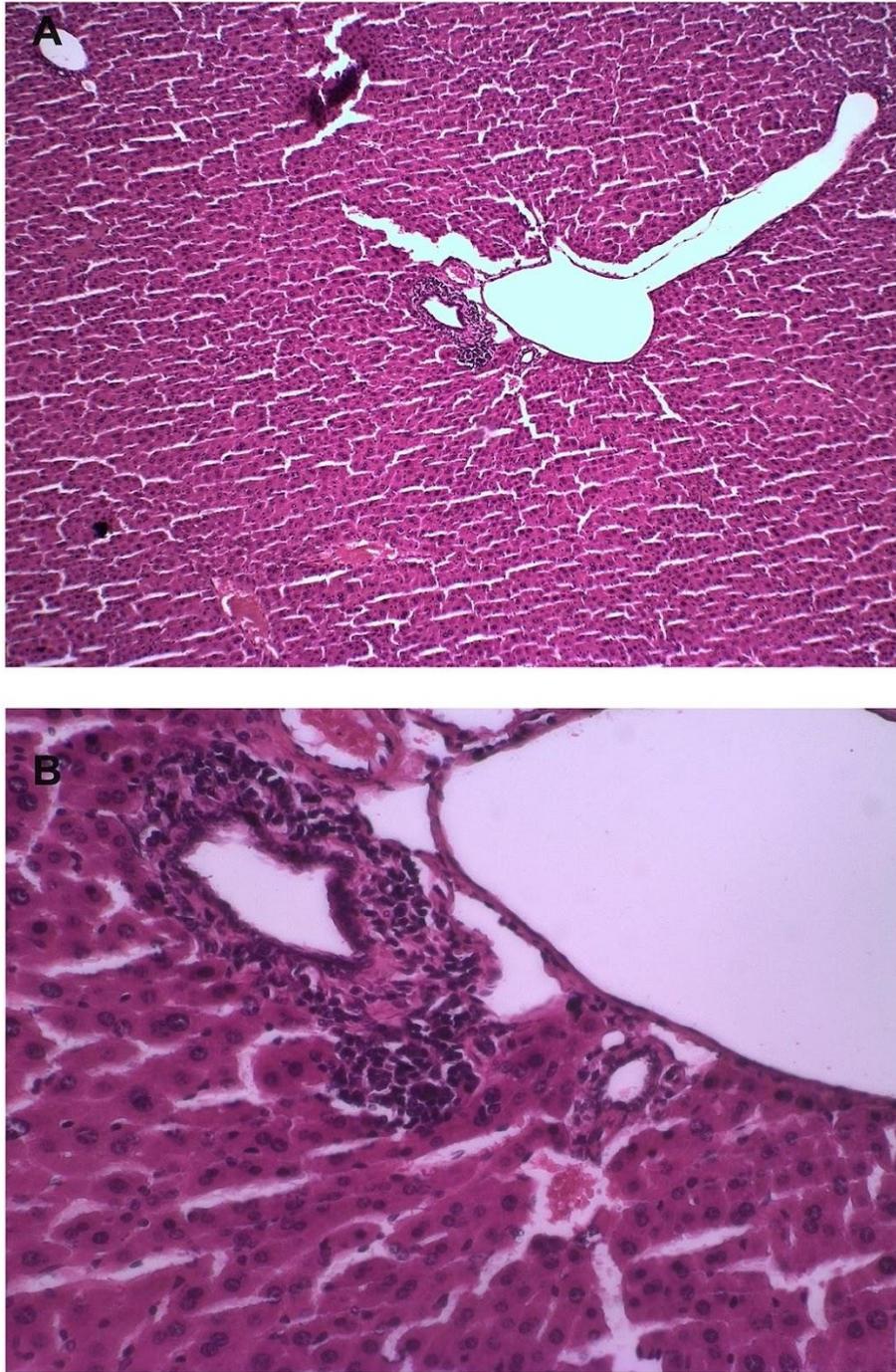


Figura 18. (A e B) Fotomicrografias de fígado apresentando arquitetura lobular preservada e tratos portais discretamente alargados. Observa-se a presença de infiltrado inflamatório linfocitário portal. Não foram observados sinais de neoplasia (H&E x10 e x40).

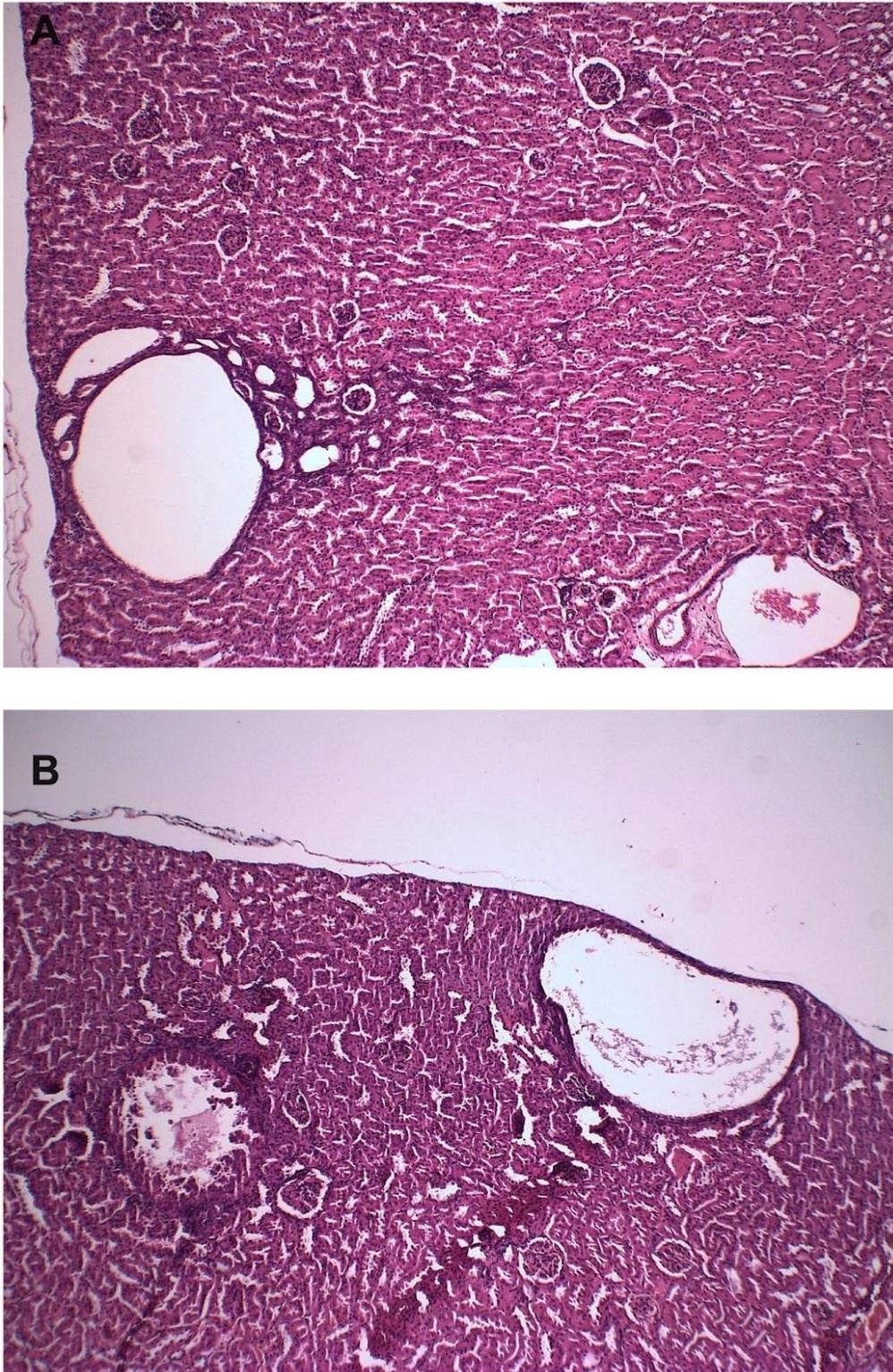


Figura 19. (A e B) Fotomicrografias de rim apresentando arquiteturas cortical e medular preservadas, com glomérulos e túbulos viáveis. Observam-se pequenos cistos epiteliais simples na camada cortical. Não foram observados sinais de neoplasia (H&E x10).

6 DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma neoplasia causada pela multiplicação desordenada de células da mama ocasionadas por fatores genéticos e ambientais, por consequência formando neoplasias malignas. É uma das doenças que mais acomete as mulheres e apesar dos avanços nas pesquisas, ainda é um grande desafio seu diagnóstico e tratamento (POURTEIMOOR; MOHAMMADI-YEGANEH; PARYAN, 2016).

O açaí possui componentes polifenólicos com atividades antioxidantes, dentre elas as antocianinas cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinósido, além de ácidos fenólicos, lignanas e flavonoides. Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado o potencial antioxidante, anti-inflamatório, anti-proliferativo e cardioprotetor da polpa de açaí (YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

Os flavonoides são uma classe de compostos apresentados amplamente distribuídos na natureza (WANG *et al.*, 2018). Entre as atividades biológicas dos flavonoides estão à atuação contra os radicais livres, alergias, inflamações, úlceras, viroses e tumores (GERMAN; DILLARD, 2000).

Por exemplo, estudos *in vitro* têm reportado a atividade farmacológica do açaí, mostrando sua ação antiproliferativa, anti-inflamatória e cardioprotetora (HEINRICH *et al.*, 2011).

Com os estudos presentes na literatura apontam resultados benéficos do potencial biológico e químico agindo como antioxidante (XIAO *et al.*, 2018), antitumoral (Kim *et al.*, 2018), anticancerígeno e anti-inflamatório (KU *et al.* 2014), exercendo um papel importante e seus progressos são úteis para o desenvolvimento de novas terapias oncológicas. Segundo Kelepouri *et al.* (2018), sobre as atividades anti-inflamatórias os flavonóides têm efeitos no mecanismo de inibição direta ou indireta de citocinas pró-inflamatórias que são permitidos através de imunomodulação das cascatas de sinalização inflamatórias, ou seja, ela tem a capacidade de reduzir o fluxo destas células e conseqüentemente aumenta atividades de mecanismo de anti-oxidante e imunorreguladores.

Atividades antiproliferativas têm sido relacionadas com propriedades anti-estrogênicas de certos flavonoides (isoflavonoides, quercetina). Genistéina e quercetina inibiram a proteína tirosina quinase que está envolvida na proliferação celular. A apigenina, luteolina e quercetina estão relacionadas com a inibição do ciclo celular e apoptose por mecanismos dependentes de p-53 (2006). Também, a apigenina, Siddique *et al.* (2010) tem funções protetoras enquanto a efeitos genotóxicos. Acredita-se que esses efeitos benéficos sejam devidos às propriedades

anticancerígenas, antioxidantes e anti-inflamatórias dos compostos polifenólicos (catequinas) presentes no chá verde.

Sandoval-Acuña *et al.* (2014) diz que polifenóis específicos são capazes de modular vias como: potencial de membrana mitocondrial, cadeia de transporte de elétron mitocondrial, síntese de ATP e remover ou inibir a formação de enzimas formadoras de ROS.

Silva *et al.* (2011), o ensaio de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), apontado pelo pesquisador Mosmann, tem como objetivo em avaliar a viabilidade celular seguido da exposição dos compostos proposto. Segundo Slater (2001), tais a aplicabilidade destes efeitos antioxidantes e testes *in vitro* pode identificar substâncias tóxicas quanto avaliar atividades citotóxicas e de mecanismo de ações úteis de finalidade anticancerígena, com base teoria na inibição da proliferação celular.

Foi observado pelo extrato da semente de açaí a redução da viabilidade celular na linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF-7. O ensaio de MTT mostra a redução após o tratamento com o extrato de açaí, uma possível explicação dessa discrepância dar-se pelo composto ácido. O ensaio clínico constatou que o extrato do açaí diminui a formação de novas colônias.

Silva *et al.* (2014) obteve resultados benéficos quanto os efeitos antitumorais do extrato do açaí em estudo, *in vitro*, e constatou que as concentrações de polifenóis dos ensaios presentes na *Euterpe oleracea* Mart. representava em 28,3% na semente, 25,5% no fruto total e 15,7% na casca. E dentre as linhagens celulares a melhor resposta foi obtida nas células MCF-7, no qual os extratos reduziram na viabilidade celular, nos tempos e nas concentrações distintas e quanto a autofagia o extrato foram eficazes em concentrações de 20 e 40 µg/mL (SILVA *et al.*, 2014).

Sobre a avaliação da morte celular, usamos ensaio morfológico e ensaio de caspase 3 e 7. O tratamento com extrato de semente de açaí não induziu apoptose e não houve diferença na atividade de caspase 3 e caspase 7 entre as células controle e tratadas.

Apesar disso, um ensaio de laranja de acridina foi realizado e o tratamento com extrato de semente de açaí em concentração de 25 µg/mL resultou em aumento de componentes ácidos. Devido à característica de acumular em ambientes ácidos, AO é utilizado para monitorar autofagia, sendo capaz de detectar o aumento do volume de compartimentos ácidos na célula, como os autolisossomos (THOMÉ, 2015).

No ensaio com DAF-2A, o tratamento foi realizado com concentrações de 25 e 250 µg/mL que após 6h houve um aumento da produção de ROS em comparação às células

controle, indicando a indução de autofagia foi ocasionada pelo aumento de ROS nas células tratadas com o extrato de açaí.

Segundo Pacheco-Palencia *et al.* (2008), considera-se que a capacidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelo açaí atribui-se pela presença de polifenóis, devido as suas concentrações baixas, apresentam propriedades de gerações de ERO, contudo em suas concentrações altas, apresentam propriedades antioxidantes.

O processo de autofagia em células de MCF-7 não é detalhado no presente trabalho. Visto que para o acúmulo do fluxo é necessário o aumento das estruturas, tais como membrana de isolamento, autofagossomo e autolisossomo forem bloqueadas antes da formação o número do fluxo diminui, ao contrário de do bloqueio ocorrer posteriormente o fluxo aumenta (THOMÉ, 2015).

A fagocitose de corpos apoptóticos por macrófagos suprime a inflamação pela inibição da produção de citocinas inflamatórias e leva a indução da produção de fatores anti-inflamatórios (HENSON; BRATTON, 2013). Os tratamentos anticarcinogênicos podem causar a autofagia excessiva e atuar como um processo precedente ao mecanismo de apoptose em células MCF-7 (CUI *et al.*, 2007).

Dornas *et al.* (2007), os antioxidantes têm grande frequências de danificação por ROS que danifica a multiplicação das células assim como o DNA, desta forma interferindo o crescimento celular e a sinalização. No entanto, estudo comprovam que apigenina suprime em grandes efeitos antiproliferativos sobre vários de tipos de câncer, assim como o crescimento e formação de clones celulares que estão associados pelo efeito indutor apoptótica (GUPTA *et al.*, 2001; KUO & YANG, 1995; WU *et al.*, 2005).

Com isso, Silva *et al.* (2014), sugere que os extratos providos tanto do caroço quanto do fruto têm maior eficácia devido às concentrações de polifenóis serem maiores comparada a fração da casca. Compostos bioativos das classes dos flavonóides como os polifenóis se destacam na composição agregando também as antocianinas (DARNET *et al.*, 2011).

Após confirmada a efetividade do extrato do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) *in vitro* quanto a sua citotoxicidade, morfologia e morte celular, passou-se aos testes *in vivo*.

Assim, para o combate ao câncer se torna cada vez mais importante a testagem das novas substâncias, sendo a forma mais adequada a utilização de tumores experimentais como o tumor de Ehrlich, o qual desponta como uma boa alternativa à testagem de substâncias no combate ao câncer (PERINI, 2017).

O estudo atual foi feito no tumor sólido de Ehrlich devido à sua simples capacidade de indução em camundongos; também, este tipo de tumor de Ehrlich que apareceu originalmente

como um carcinoma espontâneo de mama em um camundongo pode se assemelhar ao câncer de mama (PERINI, 2017). O tumor desenvolve-se na forma sólida desde que seja inoculado por via subcutânea ou intramuscular em camundongos (MATSUZAKI *et al.*, 2003).

Em relação ao tumor de sólido, sabe-se que por volta de sete dias da inoculação das células tumorais via subcutânea ou intramuscular, ele já possui aspecto palpável e consistência firme. Ao realizar uma incisão no tumor, nota-se áreas esbranquiçadas, características de necrose e áreas de hemorragia (NERY, 2004).

A forma sólida caracteriza-se histologicamente por apresentar células pleomórficas, com citoplasma abundante, com presença ou não de vacúolos, escassez de estroma, poucas células inflamatórias e alto índice mitótico (PORTUGAL, 2012).

Para Sellers *et al.* (2017) e Antonelli-Ushirobira *et al.* (2010) ressalta que a perda da massa corpórea comparado com ao peso relativo nos grupos tratados ou não tratados são parâmetros de ensaio toxicológicos para averiguar quanto a toxicidade dos compostos testes. Também, Chapman *et al.* (2013) diz que a observação quando comparado deste parâmetro de sinais clínicos da diminuição de consumo de ração e água predispõem entendimentos das ações de toxicidade das substâncias testes que permite nos ensaios clínicos modificações tais como as doses.

Neste estudo, as concentrações administradas com o extrato da semente do açaí não apresentaram efeitos tóxicos aos animais dos grupos preventivos, terapêuticos e controle (negativo).

O suco do fruto de *M. citrifolia* isoladamente ou associado ao quimioterápico doxorrubicina apresentou potencial citotóxico em carcinoma mamário de camundongos BALB/c. De acordo com os autores essa atividade antineoplásica foi induzida via ativação de caspase-3 (ABREU, 2017; TASKIN *et al.*, 2009).

Wolfsegger (2009), a comparativa de pesos relativos dos órgãos tratados e não tratados a partir do composto teste possibilita a identificação de órgãos-alvo afetados pela exposição. A administração crônica de diferentes doses (100, 500, 1000 mg/kg p.c., via oral) do extrato aquoso da polpa do fruto de *Euterpe oleraceae* (açaí) em camundongos Swiss não causou variações detectáveis na massa corpórea e no peso relativo de fígado e rins quando comparado ao grupo controle (BARCELLOS *et al.*, 2010). Testes realizados por Ribeiro *et al.* (2010), investigou a genotoxicidade do açaí em conjunto com um quimioterápico extremamente tóxico que afeta o DNA, a doxorrubicina (16mg/kg). Nos testes foram administradas três doses de concentrações de açaí em 3,3, 10 e 16,7 g/kg, respectivamente os grupos foram administrados por gavagem, sozinho ou após a injeção de doxorrubicina.

Posteriormente, foram avaliados os efeitos do açaí quanto às concentrações, os danos no DNA e nos órgãos alvos (fígado e rim) apresentou que o açaí tem resposta protetoras quanto aos danos do DNA acometido tanto pelo quimioterápico assim como a própria progressão tumoral comparado com os grupos controles. Alguns estudos já demonstraram o potencial genotóxico de compostos fenólicos como os flavonoides (LEÓN-GONZÁLEZ *et al.*, 2015).

Em análise ao peso dos animais tratados com o extrato do açaí não foram detectadas variações significativas que afetem os dados de antes e depois da indução tumoral entre os grupos. No entanto, o grupo controle positivo no presente estudo houve variação do peso no final dos testes alguns dias após o inóculo sendo tratado com o quimioterápico a ciclofosfamida.

A ciclofosfamida [(R,S)-CPA] é um dos fármacos mais empregados no tratamento quimioterápico adjuvante do câncer de mamário (TREND *et al.*, 2003). De Jorge *et al.* (2005), a CPA é um fármaco que não está isento quanto aos efeitos tóxicos, como a mielossupressão ou leucopenia, isto ocasiona dependendo quantidades que são tratadas nos pacientes, logo quanto maior sua dosagem com mais frequência terá efeito tóxicos no tratamento, sendo a ausência dos efeitos colaterais só cessará quando ocorrer a suspensão da terapia.

Há vários relatos de que a quimioterapia prejudica a função cognitiva dos pacientes com câncer de mama (LIM *et al.*, 2016). Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar o dano cognitivo relacionado à quimioterapia, incluindo a liberação de citocinas do tecido tumoral (interleucina 1,2, 6, interferon e fator de necrose tumoral) (REIRIZ, 2008; MCEWEN, 1999).

Dias *et al.* (2014), avaliaram os mecanismos inibitórios do extrato polifenólico de açaí em linhagens tumorais de adenocarcinoma de cólon (HT-29 e SW-480) e fibroblastos de colón não maligno (CCD-18Co) resultou que a o açaí inibiu o crescimento celular de forma significativa e inibiu a expressão de VEGF. Desta forma, sugere que os flavonoides no açaí são apontados como os responsáveis pelo mecanismo de antiangiogênica em VEGF.

Estudos de Tomasin (2001), avaliou os efeitos do extrato de *Aloe vera* e evidenciou que as substâncias foram capazes de reduzir a proliferação celular, aumentar atividades apoptóticas, além de analisar a expressão do BAX/Bcl-12.

Desta forma, a terapia combinatória pode aumentar a eficácia acima dos níveis alcançados pelas terapias tradicionais, ou aumentar o tempo de janela terapêutica (O'COLLINS *et al.*, 2012).

Os dados obtidos tanto pelo modelo *in vitro* e *in vivo* com o propósito da análise dos efeitos do extrato da semente do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) evidenciou assim como comprovou dados na literatura das respostas da composição fitoquímica do açaí em promover a redução da viabilidade celular, proliferação e indução de autofagia. O extrato na linhagem de adenocarcinoma mamário MCF-7 não evidenciou efeitos citotóxicos. Assim como, no teste em modelo experimental de mama é perceptível que a ingestão do extrato da semente do açaí não sinalizou efeitos toxicidade e nem variação de peso antes e depois da inoculação do tumor de mama.

Desse modo, acredita-se que analisar os efeitos do extrato da semente do açaí em combinação com terapias atuais ou outros biocompostos pode-se instaurar como novas terapias para o tratamento do câncer. Os fármacos providos de compostos do extrato da semente do açaí têm potencialidade em tratamento antitumoral.

7 CONCLUSÃO

- O extrato da semente de açaí apresentou em sua composição grande quantidade de flavonoides e antocianinas;
- O extrato da semente de açaí em linhagens de adenocarcinoma de mama MCF-7 apontou a redução da viabilidade celular, o aumento de radicais livres e indução de autofagia;
- O extrato da semente de açaí em modelo *in vivo* demonstrou não ser tóxico e não houve variação do peso no experimento;
- O extrato da semente de açaí mostrou uma redução do tumor no grupo preventivo 1000mg/Kg;
- O açaí tem potencial farmacológico terapêutico promissor no tratamento adjuvante do câncer de mama.

REFERÊNCIAS

ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – 6. Ed. Ver. Atual.- Rio de Janeiro: INCA, 2020.

ABREU, L. De. Estudo do poder antioxidante em infusões de ervas utilizadas como chás. 2013. 88f - Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Maria. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Santa Maria- RS. 2013.

ACS. American Cancer Society. Cancer Treatment & Survivorship. **Facts & Figures**, 2020a.

BARBOSA, FREDERICO CELESTINO B238N Nutrição em Foco: uma abordagem holística / Frederico Celestino Barbosa. – Piracanjuba-GO. **Editora Conhecimento Livre**, pg. 486, cap33, 2020.

BARCELLOS, Priscila Sousa et al. Avaliação bioquímica e toxicológica do extrato dos frutos de Euterpe Oleracea Mart (açai). **Revista do centro de ciências da saúde**, v. 12, n. 2, 2017.

BARTSCH, R.; BERGEN, E.; GALID, A. Current concepts and future directions in neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. **Memo**, v. 11, n. 3, p. 199-203, 2018.

BATISTA, G. V. .; MOREIRA, J. A. .; LEITE, A. L. .; MOREIRA, C. I. H. . Breast cancer: risk factors and prevention methods. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 12, 2020. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/11077>>.

BESSA, N. G. F. D., BORGES, J. C. M., BESERRA, F. P., CARVALHO, R. H. A. PERREIRA, M. A. B., FAGUNDES, R., CAMPOS, S. L.; RIBEIRO, L. U.; QUIRINO, M. S.; CHAGAS, A. F, J.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2013.

BRAY, F. *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, Hooken**, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018.

Breast Cancer Metastasis. **Cancer Genomics & Proteomics**, 2012.

BRENTON, J. D.; CAREY, L. A.; AHMED, A. A.; CALDAS, C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? **J Clin Oncol**, 23, n. 29, p. 7350-7360, 2005.

BUSHATSKY, M.; SILVA, R. A.; LIMA, M. T. C.; BARROS, M. B. S. C.; NETO, J. E. V. B.; RAMOS, Y. T. DE M. Qualidade de vida em mulheres com câncer de mama em tratamento quimioterápico/ Quality of life in women with breast cancer in chemotherapeutic treatment. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 16, n. 3, 25 out. 2017.

CARVALHO, G.; PERUCHA, V. P. Anuário Nutrição Clínica Funcional da Teoria à Prática. **Rev Nutrição Saúde e Performance**, São Paulo, v.7, n.29, 2006.

CAVALCANTE, G. M.; BARBOSA, P. L.; SILVA, A. A. Atividade antitumoral in vitro de *Prosopis juliflora* frente a células cancerígenas do tipo melanoma. **Research, Society and Development**, 2021.

CEDRIM, P.C.A.S.; BARROS, E.M.A.; NASCIMENTO, T.G.D. Antioxidant properties of acai (*Euterpe oleracea*) in the metabolic syndrome. **Braz. J. Food Technol.** 2018.

CESAR, L. T.; CABRAL, M. F.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R.W.; MIRANDA, M. R.; SOUSA, P. H.; BRASIL, I. M.; GOMES, C.L. Effects of clarification on physicochemical characteristics, antioxidant capacity and quality attributes of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 11, p. 3293-3300, 2014.

CEZAR, K.; NASCIMENTO, A. P. C. Qualidade de Vida de Pacientes Pós-Mastectomizadas em Reabilitação Oncológica. **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 1, 2014.

CHANG, S. K.; ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F.. Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects. **A comprehensive**. 2018.

CHAPMAN, S. E.; HOSTUTLER, R. A. A laboratory diagnostic approach to hepatobiliary disease in small animals. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 43, n. 6, p. 1209-1225, 2013.

CHEN, S. et al. Targeting tumor microenvironment with PEG-based amphiphilic nanoparticles to overcome chemoresistance. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 12, n. 2, p. 269-286, 2016.

CHENG, Y. T.; YANG, C. C.; SHYUR, L. F. Phytomedicine—Modulating oxidative stress and the tumor microenvironment for cancer therapy. **Pharmacological research**, v. 114, p. 128-143, 2016.

CHUNG, K. S. et al. Chemopreventive effect of *aster glehni* on inflammation-induced colorectal carcinogenesis in mice. **Nutrients**, v. 10, n. 2, p. 202, 2018.

CUI, Y. et al. Multiple template-based fluoroscopic tracking of lung tumor mass without implanted fiducial markers. **Physics in Medicine & Biology**, v. 52, n. 20, p. 6229, 2007.

DARNET, S.; SERRA, J. L.; RODRIGUES, A. M. C.; SILVA, L.H. M. A high-performance liquid chromatography method to measure tocopherols in açai pulp (*Euterpe oleracea*). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2107-2111, 2011.

DE SOUZA, D. V. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) apresenta anti-neuroinflamatória capacidade em células microglia ativadas por LPS. **Nutricional Neuroscience**, v. 0, n. 0, p. 1-12, 2020.

DIAS, M. M. dos S.; NORATTO, G.; MARTINO, H. S. D.; ARBIZU, S.; PELUZIO, M. do C. G.; TALCOTT, S.; et al. Pro-Apoptotic Activities of Polyphenolics From Açai (*Euterpe Oleracea* Martius) in Human SW-480 Colon Cancer Cells. **Nutri Cancer**, v. 66, n. 8, p. 1394-405, 2014.

DORNAS, W. C. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, 2007.

- EHRlich, P. Collected studies on immunity. Wiley, 1906.
- EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen über maligne Mäusetumoren. L. Schumacher, 1905.
- EHRlich, P.; APOLANT, H. Experimentelle carcinomstudien an Mäusen. Fischer, 1906.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). 2006. Sistema de Produção do Açaí. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/index.htm>.
- FARES, J.; FARES, M. Y.; KHACHFE, H. H.; SALHAB, H. A. et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of câncer revisited. **Signal Transduct Target Ther**, v. 5, n. 1, p. 28, 2020.
- FEDERAL, B. et al. Serviço público Federal Universidade Federal do Pará instituto de tecnologia programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos. 2013.
- FERNANDES, A. F. et al. Social support provided to women undergoing breast cancer treatment: A study review. *Advances in Breast Cancer Research*, v. 2014, 2014.
- FIDELIS, E. M. et al. Curcumin-loaded nanocapsules reverses the depressant-like behavior and oxidative stress induced by β -amyloid in mice. **Neuroscience**, v. 423, p. 122-130, 2019.
- FIGUEIREDO, N.G.; SILVA, A.S. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activities of açai seed (*Euterpe oleracea* Mart.) extracts containing A- and B-type procyanidins. **LWT**, v. 132, 2020.
- FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature reviews. Drug discovery*, v. 6, n. 4, p. 273-286, 2007.
- GERMAN, B.; DILLARD, C. J. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S.l.], v. 80, p. 1744-1756, 2000.
- GHOSH, R. Possible Treatment Options for HER2 Positive & HER2 Negative Breast Cancer: A Review. Tese de Doutorado. **East West University**, 2017.
- GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; KUMAR, R. S.; SIVAKUMAR, T.; VAMSI, M. L. M. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Journal of pharmacological sciences**, v. 94, n. 2, p. 177-184, 2001.
- HEINRICH, M.; DHANJI, T.; CASSELMAN, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) — A Phytochemical and Pharmacological Assessment of the Species' Health Claims. **Phytochem Lett**, v 4, n 1, p 10-21, 2011.
- HENSON, P. M. et al. Antiinflammatory effects of apoptotic cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 7, p. 2773-2774, 2013.

IARC. World Cancer Day 2021: Breast cancer overtakes lung cancer as leading cause of cancer worldwide. 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura: quantidade produzida e valor da produção na extração vegetal, por tipo de produto extrativo. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289>>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **A situação do câncer de mama no Brasil**: síntese de dados dos sistemas de informação. Rio de Janeiro: INCA, 2019b. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/situacao-do-cancer-de-mama-no-brasil-sintese-de-dados-dos-sistemas-de-informacao>> .

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Tipos de câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER: Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil. **Ministério da Saúde: INCA**, 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KANG, J.; THAKALI, K.M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONGO, Y.; OU, B.; JENSEN, G.S.; MEDINA, M.B.; SCHAUSS, A.G.; WU, X. Bioactivities of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and inflammatory properties to *Euterpe precatória* Mart.). **Food Chemistry**, v. 133, p. 661- 667, 2012.

KELEPOURI, D. et al. The role of flavonoids in inhibiting Th17 responses in inflammatory arthritis. **Journal of Immunology Research**, v. 20, 2018.

KIM, S.J.; PHAM, T.H.; RYU, H.W.; OH, S.R.; YOON, D.Y.; Orientin inhibits invasion by suppressing MMP-9 and IL-8 expression via the PKC α /ERK/AP-1/STAT3-mediated signaling pathways in TPA-treated MCF-7 breast cancer cells. **Phytochemistry**, v. 50, p. 35-42, 2018.

KU, S.K.; KWAK, S.; BAE, J. S. Orientin inhibits high glucose induced vascular inflammation in vitro and in vivo. **Inflammation**, v. 37, p. 2164-2173, 2014.

Kuo ML, Yang NC. Reversion of v-H-ras-transformed NIH 3T3 cells by apigenin through inhibiting mitogen activated protein kinase and its downstream oncogenes. **BiochemBiophys Res Commun**, v. 212 n3, p.767-75, 1995.

LEÓN-GONZÁLEZ, A.J.; AUGER, C.E.; SCHINI-KERTH, V.B. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. **Biochem Pharmacol**, 2015.

LEONG, A.; CHENG-NING; et al. Flavonoid glycosides in the shoot system of Okinawa Taumu (*Colocasia esculenta* S.). **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 630-635, 2010.

LIM, I.; JOUNG, H.Y., YU, A.R.; SHIM, I.; KIM, J.S. Evidence of the Effect of Donepezil on Cognitive Performance in an Animal Model of Chemobrain. **BioMed Research International**, v. 20, 2016.

LOBO, R. A. et al. Back to the future: hormone replacement therapy as part of a prevention strategy for women at the onset of menopause. **Atherosclerosis**, v. 254, p. 282-290, 2016.

MARELLI, G.; HOWELLS, A.; LEMOINE, N.R.; WANG, Y. Oncolytic Viral Therapy and the Immune System: A Double-Edged Sword Against Cancer. **Front Immunol**, v. 26, p. 866, 2018.

MARTINEZ, R.; GUIMARÃES, D.; BERNIZ, C.; ABREU, J.; ROCHA, A.; MOURA, R.; RESENDE, A.C.; TEODORO, A. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma cells. **Foods**, n.7, e178, 2018.

MARTINS, G.R.; AMARAL, F.R.L.; BRUM, F.L.; MOHANA-BORGES, R.; MOURA, S.S.T.; FERREIRA, F.A.; SANGENITO, L.S.; SANTOS, A.L.S.; FIGUEIREDO, N.G. SILVA, A.S. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activities of açai seed (*Euterpe oleracea* Mart.) extracts containing A- and B-type procyanidins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 132, 2020.

MATSUZAKI, P.; AKISUE, G.; OLORIS, S.C.S.; GORMIAK, S.L.; DAGLI, M.L.Z. Effect of *pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascit from. **Life sciences**, v. 74, p. 573-579, 2003.

McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. **Endocr. Rev**, v. 20, p. 279-307, 1999.

MILLER, Donald M. et al. c-Myc and cancer metabolism. **Clinical cancer research**, v. 18, n. 20, p. 5546-5553, 2012.

MONTENEGRO, M. R. Neoplasias. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Patologia Processos Gerais. 4ª edição, São Paulo: **Editora Atheneu**, p. 241-254, 2004.

MORENO-ASPITIA, A.; PEREZ, E. A. Treatment options for breast cancer resistant to anthracycline and taxane. In: **Mayo Clinic Proceedings**, Elsevier, 2009.

NASSIR, A.M. et al. Resveratrol-loaded PLGA nanoparticles mediated programmed cell death in prostate cancer cells. **Saudi Pharm J**, v. 26, n. 6, p. 876-885, 2018.

NCI. National Cancer Institute. **Cancer types**. 2020b.

NERY, L.H.R. Eficácia da dexametasona e da doxorubicina no tumor de Ehrlich transplantado em camundongos BALB/c, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NICOLETTI, A.M.; CARVALHO, K.C.; JÚNIOR, M.A.O.; BERTASSO, C.C.; CAPOROSSI, P.Y.; TAVARES, A.P.L. Uso popular de medicamentos contendo drogas de origem vegetal e/ou plantas medicinais: Principais interações decorrentes. **Revista Saúde - UnG**, v. 4, 2010.

O'COLLINS, V.E. et al. Evaluation of combination therapy in animal models of cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 32, n. 4, p. 585-97, 2012.

OLIVIA, J. S.; BOON-HUAT, B.; GEORGE, Y.; YINGNAN, Y.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Caspases and cancer. *Cell Death Differ*, 2011.

OLIVIA J. S.; BOON-HUAT, B.; GEORGE, Y.; YINGNAN, Y. Breast Cancer Metastasis. *Cancer Genomics & Proteomics*, 2012.

Olsson, M., Zhivotovsky, B. Caspases and cancer. *Cell Death Differ* v.18, p.1441–1449, 2011.

PACHECO, L. et al. Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and oil in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56., 2009.

PACHECO-PALENCIA L.A., TALCOTT S.T., SAFE S., MERTENS-TALCOTT S. Absorption and Biological Activity of Phytochemical-Rich Extracts from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Pulp and Oil in Vitro. *J. Agric. Food Chem*, v. 56, p. 3593– 3600, 2008.

PADILHA, P. C. DE; PINHEIRO, R. L. O Papel dos Alimentos Funcionais na Prevenção e Controle do Câncer de Mama. *Revista Brasileira de Cancerologia*, n. 50, v. 3, p. 251-260, 2004. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_50/v03/pdf/REVISAO3>.

PAULA, G. A. Caracterização físico-química e estudo do escurecimento enzimático em produto derivados de açai. 2007.

PERINI, J.A.; ANGELI-GAMBA, T.; ALESSANDRA-PERINI, J.; FERREIRA, L.C.; NASCIUTTI, L.E.; MACHADO, D.E. Topical application of Achetlan on rat skin injury accelerates wound healing: a histopathological, immunohistochemical and biochemical study. *BMC Complement Altern Med*, v. 30, p. 203, 2015.

PERINI, J. A. Estudo do efeito farmacológico e da toxicidade do extrato de *Euterpe oleracea* em modelo experimental de câncer de mama. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, **Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2017.

PORIES, S.; MOSES, M. A.; LOTZ, M. M. *Cancer*. ABC-CLIO, 2009.

PORTINHO, José A. et al. Efeitos Benéficos do Açai. *International Journal of Nutrology*, [s. l.], 2012. Disponível em: <<http://www.medicinacomplementar.com.br/biblioteca/pdfs/Fitoterapia/fi-0429.pdf>>.

PORTUGAL, L. M. Avaliação da eficácia antitumoral e toxicidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina no tratamento de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich. 2012. **Tese de Doutorado**.

POULOSE, S.M.; FISHER, D.R.; LARSON, J.; BIELINSK, D.F.; RIMANDO, A.M.; CAREY, A.N; et al. Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* MArt.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. *JAgric Food Chem*, v. 60, p. 1084-93, 2012.

POURTEIMOOR, V.; MOHAMMADI-YEGANEH, S.; PARYAN, M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. **Tumour Biol**, v. 37, n. 11, p. 14479-14499, 2016.

RAMIREZ, A. I. et al. The role of microglia in retinal neurodegeneration: Alzheimer's disease, Parkinson, and glaucoma. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, p. 214, 2017.

REIRIZ, A.B.; ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G.; et al. Cancer chemotherapy and cognitive function in rodent models: memory impairment induced by cyclophosphamide in mice. **Clin Cancer Res**, 2008.

RIBEIRO, J. C.; ANTUNES, L. M.; AISSA, A. F., DARIN, J., VERA DE ROSSO, V., MERCADANTE, A. Z. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart) on mice using erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research**, v. 695, p. 22–28, 2010.

RUBIN, B.A.; STEIN, A.T.; ZELMANOWICZ, A.M.; ROSA, D.D. Perfil antropométrico e conhecimento nutricional de mulheres sobreviventes de câncer de mama do Sul do Brasil. **Rev Bras Cancerol**, v. 56, n. 3, p. 303-9, 2010.

SAFWAT, M. A.; KANDIL, B. A.; ELLBBESY, M. A.; SOLIMAN, G. M.; ELERAKY, N. E. Nanopartículas de ouro carregadas com epigallocatequina-3-galato: Preparação e avaliação da eficácia anticancerígena em camundongos portadores de tumor de Ehrlich. **Produtos farmacêuticos**, v. 13, p. 254, 2020.

SANDOVAL-ACUÑA, C.; FERREIRA, J., SPEIKSKY, H. Polyphenols and mitochondria: an update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 559, p. 75-90, 2014.

SCHAUSS, A.G.; WU, X.; PRIOR, R.L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; et al. Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí). **J Agric Food Chem**. v. 54, p. 884-10, 2006a.

SEERAM, N.P. Berry fruit for cancer prevention: current status and future prospects. **Agric Food Chem**, v. 13, n. 56, p. 630-635, 2008a.

SIDDIQUE, Y.H., ARA, G., BEG, T., AFZAL, M. Anticlastogenic effect of apigenin in human lymphocytes treated with ethinylestradiol. **Fitoterapia**, v. 81, p. 590–594, 2010.

SILVA, C.B.; ALBUQUERQUE, V.; LEITE, J. Qualidade de vida em pacientes portadoras de neoplasia mamária submetidas a tratamentos quimioterápicos. **Rev bras cancerol**, v. 56, n.2, p. 227-36, 2010.

SILVA, D. F. Universidade do Estado do Rio de Janeiro Centro Biomédico Faculdade de Ciências Médicas Dulcelena Ferreira Silva Análise da citotoxicidade do extrato do fruto de juçara (*Euterpe oleracea* Mart.) do Maranhão em células malignas humanas. **Rio de Janeiro**; p. 0–102, 2013.

SILVA, D.; VIDAL, F. C.; SANTOS, D.; COSTA, M. C.; MORGADO-DÍAZ, J.; DO DESTERRO SOARES BRANDÃO NASCIMENTO, M.; DE MOURA, R. Cytotoxic Effects

of *Euterpe Oleracea* Mart. in Malignant Cell Lines. **BMC Complement Altern Med**, v 14, n 1, p 175, 2014.

SILVA, P. A. DA; RIUL, S. S. Breast cancer: risk factors and early detection. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 64, p. 1016-1021, 2011.

SLATER, K. Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 70-74, 2021.

SNUSTAD, P; SIMMONS, M.J. Base genética do câncer. In: **Fundamentos de Genética**. 6ª Edição. Ed. Guanabara Koogan, cap. 21p. 574-590, 2013.

SOARES, M.R; DA COSTA, G.F.; MOREIRA, A.S.; QUEIROZ, E.F.; MOREIRA, D.D.; GARCIA-SOUZA, E.P.; RESENDE, A.C.; MOURA, A.S.; TEXEIRA, M.T. Vitis vinifera L. grape skin extract activates the insulin-signalling cascade and reduces hyperglycaemia in alloxan-induced diabetic mice. **J Pharm Pharmacol**, v. 64, n. 2, p. 268-72, 2012.

SOARES, M.R; PIRES K.M.; SANTOS T.F.; LOPES, A.A; NESI, R.T.; RESENDE, A.C.; SOUSA, P.J.; DA SILVA, A.J.; PORTO, L.C.; VALENCA, S.S. Addition of acai (*Euterpe oleracea*) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. **Food Toxicol**, v. 49, n. 4, p. 855-63, 2011.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SPENCE, R. A. J.; JOHNSON, P.G. **Oncologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

STONER, G. D.; WANG, L.-S.; SEGUIN, C.; ROCHA, C.; STONER, K.; CHIU, S.; et al. Multiple Berry Types Prevent N-Nitrosomethylbenzylamine-Induced Esophageal Cancer in Rats. **Pharm Res**, v 27, n 6, p 1138-45, 2010.

STONER, G.D., Food stuffs for preventing cancer: the preclinical and clinical development of berries. **Cancer Prev. Res.**, v. 2, p. 187-94, 2009.

SUDO, R.; et al. Efeitos antinociceptivos do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) em modelo de roedor de dor aguda e neuropática. **Medicina Alternativa e Complementar da BMC**. 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/s12906-015-0724-2>>.

SUN, Y. S., ZHAO, Z., YANG, Z. N., XU, F., LU, H. J., ZHU, Z. Y., SHI, W., JIANG, J., YAO, P. P., & ZHU, H. P. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **International journal of biological sciences**, 2017.

TAŞKIN, E. İ., AKGÜN-DAR, K., KAPUCU, A., OSANÇ, E., DOĞRUMAN, H., ERALTAN, H., ULUKAYA, E. Apoptosis-inducing effects of *Morinda citrifolia* L. and doxorubicin on the Ehrlich ascites tumor in Balb-c mice. **Cell biochemistry and function**, v. 27, n. 8, p. 542-546, 2009.

TEODORO, A. J. Bioactive Compounds of Food: Their Role in the Prevention and Treatment of Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.1-4, 2019.

THOMÉ, M. P. Nova abordagem para análise de autofagia com o marcador Laranja de acridina. 2013.

TIETBOHL, LUIS AC et al. Atividade antiproliferativa em linhagens tumorais, capacidade antioxidante e teores de fenólicos, flavonóides e taninos totais de *Myrciaria floribunda*. **A. Acad. Bras. Ciênc.** Rio de Janeiro, v. 89, n. 2, pág. 1111-1120, junho de 2017. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652017000301111&lng=en&nrm=iso>.

TOMASIN, R; CINTRA, GM. Oral administration of Aloe vera and honey reduces walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumour tissue. **Phytother.Res.**, 2011.

TOMAZZONI, M. I., NEGRELLE, R. R. B. & CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto: Enfermagem**, 2006.

TREND, R. M. et al. Palladium-catalyzed oxidative Wacker cyclizations in nonpolar organic solvents with molecular oxygen: a stepping stone to asymmetric aerobic cyclizations. **Angewandte Chemie**, v. 115, n. 25, p. 2998-3001, 2003.

TRUFELLI, D. C., et al. Análise do atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de mama em um hospital público. **Revista da Associação Médica Brasileira [online]**. 2008, v. 54, n. 1, pp. 72-76. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0104-42302008000100024>>.

VIEIRA, C.S., et al. **Oncologia Básica**. Teresina, PI: Fundação Quixote, 2012.

Visvader, J. Cells of origin in cancer. **Nature**, v. 469, p. 314–322, 2011.

WANG, T. et al. JAK/STAT3-regulated fatty acid β -oxidation is critical for breast cancer stem cell self-renewal and chemoresistance. **Cell metabolism**, v. 27, n. 1, p. 136-150. e. 5, 2018.

WILD, C. P., WEIDERPASS, E., STEWART, B. W. World Cancer Report 2020: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**. Disponível em: <<http://publications.iarc.fr/586>>.

WOLFSEGGER, M.J.; JAKI, T., DIETRICH, B.; KUNZLER, L.A.; BARKER, K. A note on statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 240, n. 1, p. 117-122, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Cancer Observatory. **International Agency for Research on Cancer**, 2021. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today>>.

WU K., YUAN L.H., XIA W. Inhibitory effects of apigenin on the growth of gastric carcinoma SGC-7901 cells. **World Journal of Gastroenterology**, 2005.

XIAO, Q.; PIAO, R.; WANG, H.; LI, C.; SONG, L. Orientin-mediated Nrf2/HO-1 signal alleviates H₂O₂-induced oxidative damage via induction of JNK and PI3K/AKT activation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 747-755, 2018.

YAMAGUCHI, H.; SAKAI, R. Direct interaction between carcinoma cells and cancer associated fibroblasts for the regulation of cancer invasion. **Cancers**, v. 7, n. 4, p. 2054-2062, 2015.

ANEXO

Carta de Aprovação do Projeto na Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA)

 <p>Comissão de Ética no Uso de Animais</p>	COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS CIAEP: 02.0341.2019	
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO		
CERTIFICADO (07/2021)		
<p>Certificamos que a proposta intitulada: "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA JUÇARA (<i>Euterpe oleracea</i> MART.) EM MODELOS IN VITRO E IN VIVO DE CÂNCER", Processo n. 23115.024027/2020-64, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria do Carmo Lacerda Barbosa, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 09/10/2020.</p>		
<p>We certify that the proposal: "EVALUATION OF ANTITUMORAL ACTIVITY OF JUÇARA (<i>Euterpe oleracea</i> MART.) IN IN VITRO AND IN VIVO CANCER MODELS", Process n. 23115.024027/2020-64, under the responsibility of Prof. Dr. Maria do Carmo Lacerda Barbosa, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was APPROVED by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of 10/09/2020.</p>		
PROPOSTA		
Finalidade:	Pesquisa	Área: Ciências da Saúde
Vigência:	17/03/2021 a 01/07/2022	
ANIMAIS		
Origem:	Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão	
Espécie:	Camundongos	Sexo: Machos
		Fêmeas
	Idade: 60 dias	AMOSTRA 141 05
	Peso: 25 - 30g	
Local do experimento: Biotério Setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão – CCBS/UFMA.		
São Luís, 16 de março de 2021.		
 Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA/UFMA		