

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

**Alexandre Augusto Barros Lataliza**

***Atividade antiproliferativa e toxicidade *in vitro* do extrato seco de *Annona ambotay****  
**(Aubl.)**

**Juiz de Fora**  
**2018**

**Atividade antiproliferativa e toxicidade *in vitro* do extrato seco de *Annona ambotay*  
(Aubl.)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Saúde

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Nádia Rezende Barbosa Raposo

**Juiz de Fora  
2018**

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

Lataliza, Alexandre Augusto Barros.

Atividade antiproliferativa e toxicidade in vitro do extrato seco de *Annona ambotay* (Aubl.) / Alexandre Augusto Barros Lataliza. -- 2018.

79 p.

Orientadora: Nádia Rezende Barbosa Raposo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2018.

1. *Annona ambotay*. 2. Antioxidante. 3. Citotoxicidade. 4. Efeito Antiproliferativo. 5. câncer de mama. I. Rezende Barbosa Raposo, Nádia, orient. II. Título.

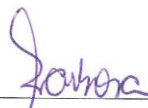
Alexandre Augusto Barros Lataliza

**Atividade antiproliferativa e toxicidade *in vitro* do extrato seco de *Annona ambotay*  
(Aubl.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde - Área de Concentração: Saúde Brasileira

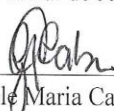
Aprovada em: 03 / 12 / 18

BANCA EXAMINADORA



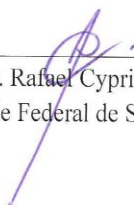
---

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



---

Profª. Dra. Gisele Maria Campos Fabri  
Universidade Federal de Juiz de Fora



---

Prof. Dr. Rafael Cypriano Dutra  
Universidade Federal de Santa Catarina

*Aos meu pais, José Pedro e Maria Eliza, que foram e sempre  
serão personagens fundamentais nos espetáculos da minha  
vida.*

## AGRADECIMENTOS

Com imensa alegria, satisfação e sensação de dever cumprido que chega ao término mais uma fase da minha vida. Dessa forma, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a obtenção desse título, em especial:

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), pela aprovação e possibilidade de realização desse projeto.

À CAPES e à UFJF pelo financiamento da bolsa de estudos durante o período do mestrado.

À professora orientadora Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo, por me aceitar como aluno e proporcionar experiências incríveis. Por acreditar no meu trabalho, pelo incentivo e por ser esse exemplo de mulher, profissional, professora e pesquisadora.

Ao professor Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão, pelo incentivo em enfrentar mais esse desafio de fazer o mestrado, além da contribuição nos diversos projetos realizados no núcleo.

Aos professores Dr. Rafael Cypriano Dutra e Dra. Gisele Maria Campos Fabri, pelo aceite em participarem como membros da banca. Obrigado pela disponibilidade e parceria.

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

Aos amigos e parceiros do Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS). Em especial à Laura Junqueira, pelo apoio em todos os âmbitos, seja na pesquisa ou no pessoal. À Hanny, Molise, Pollyana e Marcela, pelos conselhos, conversas e por se fazerem sempre presente. À Débora, Elisa, Gustavo, Nathália, José Márcio e José Ângelo pela disposição em ajudar e pró-atividade. Às amigas, e agora técnicas, Lorena e Lívia por serem tão queridas, pelas conversas e injeção de ânimo nos momentos difíceis. Saibam que vocês todos são muito especiais e foram essenciais para a realização desse projeto.

Às amigas Stephane e Ana Caroline, da graduação e que permaneceram sempre presente. Obrigado pelo carinho, incentivo, momentos de descontração e por acreditarem na realização dessa conquista junto comigo.

Aos amigos de modo geral, em especial à Fernanda, amiga de longa data e tão querida, Greiciane, Geovany, Samuel, João Paulo, Luiz, Raphaela Oliveira, Taís, Rafaela

Ferreira e tantos outros. Meu mais sincero agradecimento por todos os momentos vividos nesse período. Saibam que vocês desempenharam papel fundamental nessa conquista.

Aos grandes pilares que sustentam minha vida, meus pais: José Pedro e Maria Eliza. Obrigado por serem as referências em todos os âmbitos da minha vida e por me apoiarem em minhas decisões. Aos meus irmãos, Lucas e André, cunhadas Carla e Samanta, e sobrinhas Manuelle, Larissa e Gabriella, pelo apoio. E à Tia Suely pela grande torcida pelo meu sucesso, mesmo estando longe fisicamente. Obrigado a todos vocês por entenderem minha ausência em alguns momentos e pelo amor incondicional.

Por fim agradeço ao principal personagem dessa grande conquista: Deus. Agradeço por sempre se fazer presente em minha vida, guiando meus caminhos e escolhas. Obrigado Deus por nunca me desamparar e nunca me deixar desistir diante dos obstáculos. Obrigado pela força e coragem para conseguir trilhar esse caminho e pelo crescimento, tanto profissional quanto pessoal, que o mestrado me proporcionou.

*“Cada um de nós compõe a sua história*

*Cada ser em si*

*Carrega o dom de ser capaz*

*E ser feliz”*

Tocando em frente – Almir Sater



## RESUMO

O Brasil é detentor de uma grande biodiversidade natural e, conseqüentemente, se torna um importante nicho de investimento para indústria farmacêutica e pesquisadores para a descoberta de novos compostos bioativos e possíveis abordagens terapêuticas inovadoras. Devido à escassez de dados na literatura sobre as atividades biológicas de *Annona ambotay* (Aubl.), o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antioxidante e citotóxica *in vitro* frente às linhagens celulares sadias de fibroblastos murino (L929) e queratinócitos humano (HaCaT), bem como o efeito antiproliferativo frente às linhagens tumorais de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-231 e MCF7) e murina (4T1). Adicionalmente, avaliar a toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* do extrato seco das cascas de *Annona ambotay*. Para a avaliação da atividade antioxidante foi empregado o método de sequestro de espécies reativas de oxigênio do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). O efeito citotóxico e antiproliferativo foram realizados de acordo com o método de redução do sal de brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio (MTT) e, por fim, foi realizado o ensaio de letalidade em *Artemia salina*, de acordo com Meyer e colaboradores (1982) com modificações. Os resultados para o extrato seco demonstraram ótima atividade antioxidante com concentração que inibe 50% do DPPH (CI<sub>50</sub>) de 8,30 µg mL<sup>-1</sup>. Em relação à citotoxicidade em linhagens de fibroblastos e queratinócitos, foi verificada viabilidade de celular de 16% a 57% e de 28% à 68%, respectivamente, dos tratamentos comparados ao grupo controle. O efeito antiproliferativo também foi evidenciado frente às linhagens tumorais de câncer de mama (MDA-MB231, MCF7 e 4T1), com CI<sub>50</sub> de 116,32 µg mL<sup>-1</sup>, 126,87 µg mL<sup>-1</sup> e 11,04 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. O efeito tóxico em *Artemia salina* foi observado com CL<sub>50</sub> de 296,78 µg mL<sup>-1</sup>. A análise conjunta dos dados permite concluir que o extrato seco de *Annona ambotay* apresentou atividades biológicas promissoras, devido à boa atividade antioxidante aliada a um efeito antiproliferativo em linhagens tumorais de adenocarcinoma de mama e a toxicidade em *A. salina*.

Palavras-chave: *Annona ambotay*, antioxidante, citotoxicidade, efeito antiproliferativo, câncer de mama

## ABSTRACT

Brazil has a great natural biodiversity and, consequently, to become a important country for the investment of pharmaceutical industry and researchers, aiming the discovery of new bioactive compounds and possible innovate therapeutic approaches. Due to the scarcity of data on the biological activities of the *Annona ambotay* (Aubl.), the objective of this study was to evaluate the antioxidant activity and cytotoxicity activity *in vitro* against normal cell lines of murine fibroblast (L929) and human keratinocyte (HaCaT), as well as the antiproliferative effect against tumoral cell lines of human breast cancer (MDA-MB-231 and MCF7) and murine breast cancer (4T1). Additionally, to evaluate the toxicity against *Artemia salina* of the dried extract of *A. ambotay*. The antioxidant activity was evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) free radical scavenging method. The cytotoxicity and antiproliferative effect was performed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay and, finally, the lethality assay in *Artemia salina* was performed according with Meyer et al. (1982) with some modifications. The results of the dried extract showed great antioxidant activity with extract concentration that inhibits 50% of DPPH radical ( $IC_{50}$ ) equal to  $8.30 \mu\text{g mL}^{-1}$ . In relation to cytotoxicity in cell lines of fibroblast and keratinocyte, was established cell viability variation of 16% to 57% and 28% to 68%, respectively, when compare the treatment with the control group. The antiproliferative effect was also evidenced against tumor cell lines of breast cancer MDA-MB-231, MCF7 and 4T1, with  $IC_{50}$  of  $116.32 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $126.87 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $11.04 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. A toxic effect was evidenced in the *Artemia salina* assay with a  $LC_{50}$  of  $296.78 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The joint analysis of the results allows to conclude that the dried extract of *Annona ambotay* presented promising biological activities, because of the good antioxidant activity and the antiproliferative effect against the tumor cell lines of breast cancer and the toxicity in *Artemia salina*.

Keywords: *Annona ambotay*, antioxidant, cytotoxicity, antiproliferative effect, breast cancer.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Estrutura anatômica da mama feminina humana.	17
Figura 2.	Cascata de invasão metastática.	18
Figura 3.	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto o de pele (não melanoma).	19
Figura 4.	Ilustração do procedimento de realização da mamografia.	22
Figura 5.	Cultivo de células em laboratório.	30
Figura 6.	Reação de redução do sal de MTT a formazana.	33
Figura 7.	Atendimentos individuais com oferta de práticas integrativas e complementares por gênero e idade no ano de 2016.	37
Figura 8.	Estrutura química dos alcaloides Vimblastina (1) e Vincristina (2) isolados das folhas de <i>Catharanthus roseus</i> .	39
Figura 9.	Estrutura química do paclitaxel.	40
Figura 10.	Viabilidade celular de fibroblastos murino (L929) (A) e queratinócitos humano (HaCaT) (B) em função dos tratamentos com extrato seco de <i>Annona ambotay</i> por um período de 48 horas.	51
Figura 11.	Avaliação do efeito antiproliferativo frente às linhagens tumorais de câncer de mama humano MDA-MB-231 (A), MCF7 (B) e murino 4T1 (C) em função dos tratamentos com extrato seco de <i>Annona ambotay</i> pelo período de 48 horas.	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Vantagens da cultura de tecidos, segundo Freshney (2000).	31
Tabela 2.	Indicadores e métodos para avaliação da viabilidade celular e citotoxicidade	34
Tabela 3.	Atividade Antioxidante do extrato de <i>A. ambotay</i> e do resveratrol.	49
Tabela 4.	Valores de CL <sub>50</sub> para o extrato seco <i>Annona ambotay</i> e controle positivo referente ao ensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i> após 24 horas de tratamento.	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
5-FU	5-fluorouracil
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> )
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BRCA 2	Câncer de mama 2 (do inglês <i>breast cancer 2</i> )
BRCA1	Câncer de mama 1 (do inglês <i>breast cancer 1</i> )
CDK4	Ciclina dependente de quinase 4
CDK6	Ciclina dependente de quinase 6
CI <sub>50</sub>	Concentração de inibição em 50%
CL <sub>50</sub>	Concentração letal de 50%
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
ECM	Exame clínico das mamas
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidermal (do inglês <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HEPES	Ácido [4-(2-hidroxietil)]-1-piperazinaetanolsulfônico
HER2	Receptor de fator de crescimento epidermal humano 2 (do inglês <i>human epidermal growth factor receptor</i> )
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	MiliMolar

mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio
NO <sup>-</sup>	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Dióxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
P. A.	Para Análise
p/p	Peso por peso
PARP	<i>Poly (adenosine diphosphate–ribose) polymerase</i>
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PICs	Práticas Integrativas e Complementares
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
SFB	Soro Fetal Bovino
SISAB	Sistema de Informação em Saúde para a Atenção Básica
SUS	Sistema Único de Saúde
TS	Timidilato intase
v/v	Volume por volume



3.2 Específico.....	43
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
4.1 Material vegetal .....	44
4.1.2 Preparo do extrato.....	44
4.2 Atividade antioxidante .....	44
4.3 Cultura de células .....	45
4.3.1 Linhagens celulares .....	45
4.3.2 Ensaio de viabilidade celular.....	46
4.3.3 Atividade antiproliferativa do extrato seco de <i>A. ambotay</i> em células de carcinoma mamário .....	47
4.4 Ensaio de letalidade para <i>Artemia salina</i> .....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
5.1 Atividade antioxidante .....	49
5.2 Viabilidade celular.....	51
5.3 Atividade antiproliferativa .....	52
5.4 Letalidade em <i>Artemia salina</i> .....	55
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>



## INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um dos tipos de câncer de maior acometimento entre as mulheres e, quando diagnosticado nos estágios iniciais, apresenta grande probabilidade de cura. Alguns fatores de risco para o desenvolvimento desse câncer incluem: idade, exposição a estrógeno, mutação em genes específicos como câncer de mama 1 (BRCA1, do inglês *breast cancer 1*) e câncer de mama 2 (BRCA2), estilo de vida, ingestão de álcool e o histórico familiar de câncer (OLIN e PIERRE, 2014). O câncer de mama pode ser classificado de acordo com os aspectos patológicos, como o tamanho do tumor, o acometimento do linfonodo e a capacidade de provocar metástase (TAHERIAN-FARD, SRIHARI e RAGAN, 2014). Além disso, pode ser dividido de acordo com os marcadores celulares, como a expressão de receptor de estrógeno (RE), de receptor de progesterona (RP) e de receptor de fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2, do inglês *human epidermal growth factor receptor*) (SOTIRIOU e PUSZTAI, 2009).

O diagnóstico da doença pode ser realizado por exame clínico das mamas (ECM) (BRASIL, 2013), seguido de confirmação por métodos de imagens, sendo eles mamografia, ultrassonografia ou ressonância magnética (CHALA e BARROS, 2007) e por biópsia da lesão para classificação histopatológica e molecular do câncer (BRASIL, 2014).

Em relação às opções de tratamento para o câncer de mama, são incluídas a cirurgia do tumor primário, avaliação do acometimento axilar e radioterapia para tratamentos locais (BRASIL, 2014). Já a quimioterapia é utilizada de forma sistêmica, como adjuvante, após cirurgia, ou como neoadjuvante, prévio ao procedimento cirúrgico (MAURI, PAVLIDIS E IOANNIDIS, 2005). Uma das alternativas terapêuticas difundida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é o emprego da chamada Medicina tradicional e complementar. No Brasil, essa está inserida na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e, dentre as práticas integrativas disponibilizadas nessa política e ofertada pelo Sistema Único de Saúde (SUS), está a Fitoterapia (BRASIL, 2006).

Devido à grande diversidade de compostos bioativos, as plantas constituem uma importante fonte substâncias que podem ser utilizadas como agentes terapêuticos (FILHO, 2010). Algumas substâncias originadas do metabolismo secundário das plantas já são utilizadas na terapia antitumoral, como os alcaloides vimblastina e vincristina, extraídos da *Catharanthus roseus* (L.) (BRANDÃO et al., 2010) e o diterpeno paclitaxel, originado das cascas de *Taxus brevifolia* (MARUPUDI et al., 2007). Portanto, a

descoberta de novos compostos ativos para o tratamento do câncer, que sejam menos invasivos e mais específicos, se faz necessária.

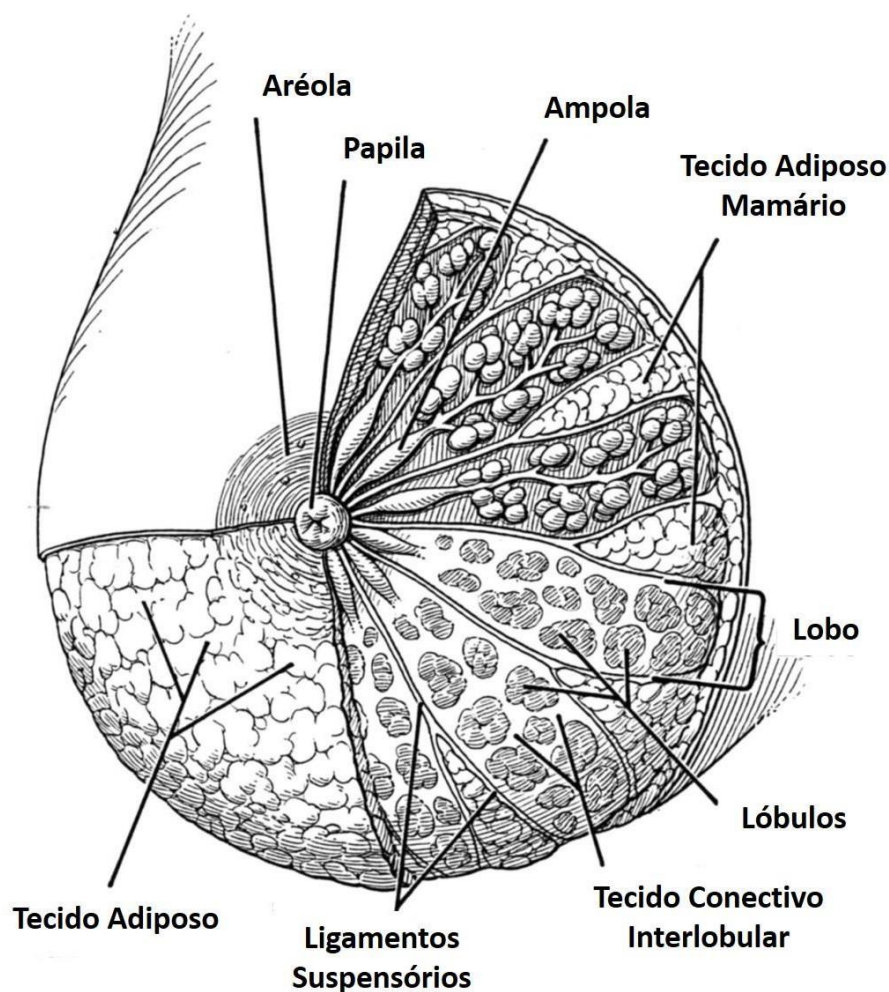
Dentro deste contexto, uma opção de pesquisa é a a espécie vegetal *Annona ambotay* (Aubl.). Essa pertence à família Annonaceae e é considerada um arbusto, o qual encontra-se distribuído na América do Sul. Também denominada como envira-caju ou envira-taia (MAAS et al., 2007), é uma planta utilizada na medicina popular boliviana para o tratamento de entorses (BRAVO et al., 2002). Em relação ao gênero *Annona*, diversas atividades biológicas são descritas na literatura como inseticida (BRAVO et al., 2002; RAVAOMANARIVO et al., 2014), antitumoral (PIMENTA et al., 2003), antibacteriana, citotóxica (RINALDI et al., 2016) e anticolinesterase (FORMAGIO et al., 2015).

Devido à escassez de estudos referente ao potencial farmacológico da *Annona ambotay*, o objetivo desse projeto foi avaliar as possíveis atividades biológicas do extrato hidroalcoólico das cascas de *Annona ambotay* (Aubl.). Para isso, foi realizado o ensaio para obtenção da atividade antioxidante e citotóxica frente às linhagens celulares sadias de fibroblasto murino (L929) e queratinócito humano (HaCaT). Ainda, foi estabelecido o efeito antiproliferativo frente a linhagens celulares tumorais de adenocarcinoma humano (MDA-MB-231 e MCF7) e murino (4T1) e o efeito tóxico em *Artemia salina*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A mama

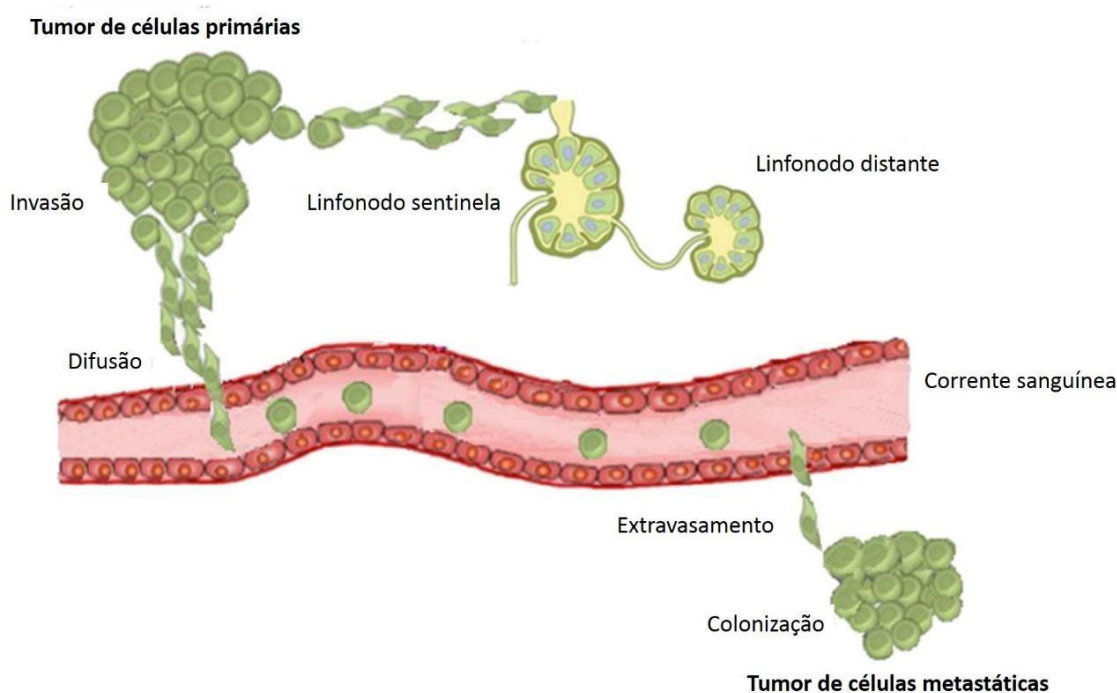
A mama feminina é caracterizada por um corpo glandular fixado na parede do tórax. Pode ser dividida em dois sistemas: o ductal, formado por ductos responsáveis pelo transporte do leite até à exteriorização na papila; e o lobular, composto por lóbulos que constituídos de glândulas ramificadas com a função de produção de leite (PANDYA e MOORE, 2011). A mama também é sustentada por um tecido conjuntivo e adiposo, responsáveis pela sustentação, além de ser irrigado por vasos sanguíneos, estruturas sensitivas (nervos) e vasos linfáticos (BRASIL, 2013). A Figura 1 representa uma ilustração da estrutura anatômica da mama humana.



**Figura 1.** Estrutura anatômica da mama feminina humana. Fonte: Adaptado de LEMAINÉ e SIMMONS, 2012.

### 2.1.1 Câncer de mama

O câncer caracteriza-se pela multiplicação descontrolada e desordenada das células, as quais podem ter a capacidade de invadir outros tecidos e espalhar para outras regiões do corpo, provocando metástase (OPPERMANN, 2014). A metástase causa cerca de 90% das mortes por câncer no mundo e é caracterizada por uma sequência de estágios que irão resultar na formação de tumores em órgãos secundários. A sequência de eventos da cascata metastática (Figura 2) pode ser dividida em: invasão, na qual ocorre a penetração de células tumorais nos tecidos circundantes; difusão, onde células tumorais atingem vasos linfáticos e sanguíneos; e extravasamento, na qual as células metastáticas saem do vaso sanguíneo e podem alojar em outros órgãos e formar um tumor secundário (SALEHI et al., 2018).



**Figura 2.** Cascata de invasão metastática. Fonte: Adaptado de SALEHI e colaboradores, 2018.

O câncer de mama é um dos tipos de câncer de maior prevalência em mulheres (BOMBONATI E SGROI, 2010; SUN et al., 2018) e um dos mais devastadores em todo o mundo (JUNIOR et al., 2017). No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2017), há uma estimativa para 2018 de 59.700 novos casos, sendo mais frequente nas regiões Sul (73,07/100 mil mulheres), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil). A Figura 3

representa a distribuição dos dez tipos de câncer mais prevalentes estimados para 2018 por sexo, excetuando o de pele (não melanoma).

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

**Figura 3.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto o de pele (não melanoma). Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2017.

De acordo com a OMS, os aumentos da expectativa de vida e da urbanização, além da adoção de estilo de vida ocidental são fatores que estão contribuindo para o aumento da incidência desse tipo de câncer na população mundial. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Em relação aos sinais e sintomas, alguns podem ser evidenciados nas fases iniciais do câncer de mama e detectados pelo simples autoexame das mamas. São eles: nódulo palpável, espessamento ou outra irregularidade que possa gerar assimetria entre as mamas; mudanças visuais na pele e mamilo, tais como retração, escamação e ulceração; secreção anormal de líquido, principalmente sangue ou aquoso, que externa ao mamilo; e vermelhidão, inchaço e/ou sensibilidade em rápido desenvolvimento nas mamas (COLEMAN, 2017).

#### 2.1.1.2 Classificação do câncer de mama

O tipo de câncer de mama mais comum é o carcinoma, um tumor que se origina de células epiteliais e, sendo mais específico, pode ser chamado de adenocarcinoma, o qual se inicia no tecido glandular (ductos coletores de leite ou nos lóbulos produtores de leite). Podem ser classificados em adenocarcinoma *in situ*, quando não possui a capacidade de espalhar ou em adenocarcinoma invasivo, quando possui a característica de espalhar no tecido mamário circundante (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018a).

A *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) criou em 1959 um Manual de Estadiamento do Tumor, que auxilia os médicos no desenvolvimento do prognóstico e na estruturação de planos de tratamento para os pacientes. Desde então, oito edições desse manual foram publicadas com sucessivas atualizações em tecnologias e evidência clínica. O sistema descrito nesse manual baseia-se nos atributos patológicos, os quais estão divididos nas categorias: tamanho do tumor (T), acometimento da região do linfonodo (N) e presença ou ausência de metástase (M). Esse sistema é chamado de TNM e tem como objetivo primário fornecer um padrão de classificação para o prognóstico em pacientes nas fases iniciais da doença, além de gerar dados que podem direcionar o planejamento terapêutico já diagnosticados com câncer de mama (HORTOBAGYI et al., 2017).

O câncer de mama também pode ser classificado molecularmente em quatro subtipos, de acordo com a expressão de alguns marcadores. O luminal A é caracterizado pela expressão de RE positivo e histologicamente de baixo grau, possuindo células tumorais similares às normais e com baixo potencial metastático; luminal B, apresentam baixos níveis de receptores hormonais e são frequentemente de alto grau, com células diferentes das normais, com alta taxa de desenvolvimento celular e potencial de espalhar pelo corpo; receptores de fator de crescimento epidermal humano positivo (HER2-positivo, do inglês *human epidermal growth factor receptor 2*) são tumores caracterizados por possuir amplificação e superexpressão do gene ERBB2 e são de alto grau; e o *basal-like* são os que não expressam RE, receptores de progesterona (RP) e HER2, e são também chamados de triplo-negativos (SOTIRIOU e PUSZTAI, 2009; TAHERIAN-FARD, SRIHARI e RAGAN, 2014).

#### 2.1.1.3 Fatores de risco

O câncer de mama é uma doença amplamente estudada e é objeto de inúmeras pesquisas. Sua etiologia ainda é desconhecida, sendo essa atribuída à interação de fatores, que juntos podem desencadear o desenvolvimento da doença (BATISTON et al., 2011).

O histórico familiar de incidência de câncer de mama pode ser considerado um fator de risco para o desenvolvimento da doença. Mulheres que possuem parentes de primeiro grau com câncer de mama têm a probabilidade de desenvolver o câncer duas vezes maior quando comparadas às mulheres sem histórico familiar (BAGLIA et al., 2018). Além disso, as características hormonais também podem ser consideradas como

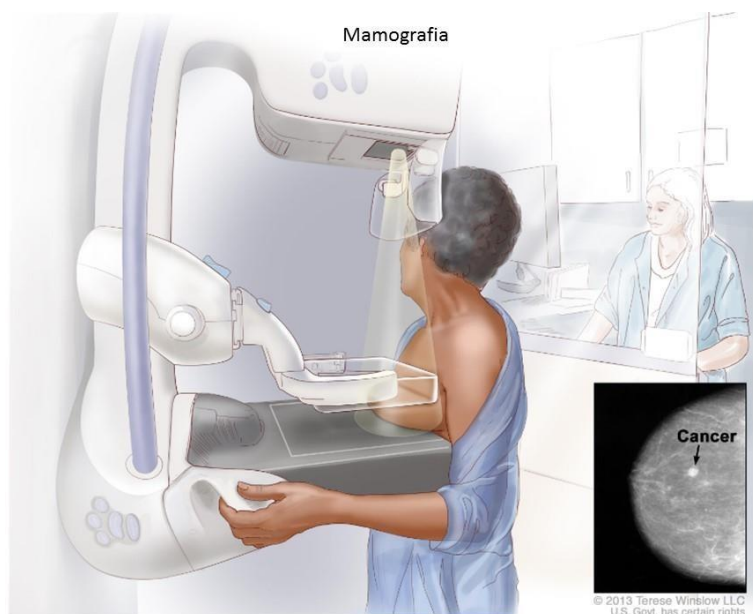
fator de risco, pois o câncer de mama pode ser estrógeno-dependente. Devido às alterações hormonais ocorridas durante o desenvolvimento da mulher, nas fases como a menarca precoce (relatadas aos 11 anos de idade ou menos), menopausa tardia (aos 55 anos ou mais), primeira gestação depois dos 30 anos ou nuliparidade, podem facilitar o desenvolvimento da doença (SILVA e RIUL, 2011).

Outros fatores de risco ainda são relatados, tais como a terapia prolongada de reposição hormonal, prévia exposição terapêutica à irradiação da parede torácica, mutações genéticas nos genes BRCA 1 e BRCA 2 (CARLSON et al., 2009) e maior densidade do tecido mamário (BATISTON et al., 2011).

#### 2.1.1.4 Diagnóstico

A investigação diagnóstica do câncer de mama pode ser realizada pelo ECM. Esse é composto por três etapas: inspeção estática, inspeção dinâmica e palpação das mamas. A primeira tem como objetivo a observação dos aspectos gerais da mama, como o contorno, ulcerações cutâneas e diferenças na tonalidade da pele. A segunda é caracterizada por um procedimento no qual a mulher realiza pequenos movimentos com braços e quadril para contração da musculatura do peitoral, evidenciando possíveis alterações na mama. Na terceira etapa é realizada a palpação das mamas e das cadeias ganglionares axilares e supraclaviculares, afim de examinar todo o tecido mamário e os linfonodos. Pacientes com alguma alteração detectada no ECM devem ser encaminhados para comprovação do diagnóstico em serviços especializados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Os métodos de diagnóstico por imagem também desempenham papel importante na detecção do câncer de mama. A mamografia é considerada um método para o rastreamento do câncer de mama em mulheres assintomáticas e é uma das técnicas que descreve as alterações mamárias, favorecendo a detecção precoce do desenvolvimento da doença (CHALA e BARROS, 2007). Essa técnica tem como objetivo identificação da densidade, presença de microcalcificações e assimetria das mamas, por meio da captura de imagens do tecido mamário (FIORICA, 2016). Para a obtenção dessas imagens, a mama é pressionada entre duas placas e o raio-x é incidido em direção à mama. A ilustração do equipamento e do procedimento de realização da mamografia está descrito na Figura 4.



**Figura 4.** Ilustração do procedimento de realização da mamografia. Fonte: Adaptado de NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2018.

Uma das limitações da mamografia se refere à diminuição da sensibilidade de detecção de possíveis alterações em mamas densas. Além disso, o carcinoma lobular infiltrante é de difícil detecção na mamografia, pois estão frequentemente ocultos (HOOLEY, ANDREJEVA e SCOUTT, 2011). Como alternativa, a ultrassonografia e a ressonância magnética são utilizadas juntamente à mamografia para confirmação do diagnóstico (CHALA e BARROS, 2007). Segundo as diretrizes para detecção precoce do câncer de mama, a mamografia é recomendada na faixa etária de 50 a 69 anos com a periodicidade bienal (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2015).

A partir da evidência de alterações mamárias pelo ECM e da confirmação pelos métodos de imagem, a biópsia é necessária para classificação histopatológica e molecular do câncer de mama, auxiliando nas possíveis condutas terapêuticas. A classificação imuno-histoquímica verifica o grau de positividade para RE e RP, além de evidenciar a presença do receptor HER2 (BRASIL, 2014) e, de acordo com a confirmação e quantificação desses biomarcadores, o planejamento terapêutico direcionado pode ser realizado.



### 2.1.1.5 Tratamentos

#### 2.1.1.5.1 Tratamento local

Uma das abordagens para o tratamento local do câncer de mama é a intervenção cirúrgica. Essa pode ser indicada para remoção total do câncer, retirada de tecido para realização de biópsia, reconstituição da mama e atenuar possíveis sintomas do câncer avançado (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018b). A cirurgia pode ser classificada como conservadora, que objetiva a retirada parcial da mama que contém o câncer, bem como o tecido normal que circunda o tumor, ou como mastectomia, na qual ocorre a remoção total da mama (BRASIL, 2014).

Outra forma de tratamento localizado é a radioterapia. Essa consiste na emissão de radiação ionizante produzida por equipamentos ou por radioisótopos. Como as células tumorais apresentam uma taxa de proliferação aumentada em relação às células saudáveis, a radioterapia tem maior capacidade de afetar essas células que estão se multiplicando descontroladamente e, portanto, se tornam mais suscetíveis à radiação (LORENCETTI E SIMONETTI, 2005). A radioterapia pode ser aplicada com a finalidade paliativa para o tratamento do tumor primário ou de metástase, sem interferir na sobrevivência global do paciente. Além disso, pode ser aplicada na fase pré-operatória com objetivo de redução do tamanho do tumor e, conseqüentemente, facilitar o procedimento cirúrgico. Outra forma de aplicação é no pós-operatório, que objetiva a eliminação de possíveis fragmentos tumorais microscópicos restantes (BRASIL, 2015).

#### 2.1.1.5.2 Tratamento sistêmico

##### 2.1.1.5.2.1 Quimioterapia

A quimioterapia é uma forma de tratamento sistêmico que utiliza medicamentos com a função de controlar o desenvolvimento e/ou matar células tumorais, sendo frequentemente consideradas substâncias tóxicas ao organismo (FENG e CHIENG, 2003). A administração dessas substâncias pode ser por via intravenosa ou oral e as doses são ajustadas de acordo com a área de superfície corporal, peso ou apresentam uma dose única que é independente de outros fatores (BRASIL, 2015).

Uma das abordagens terapêuticas para o tratamento do câncer de mama é a quimioterapia neoadjuvante, a qual é aplicada no período que antecede a cirurgia da mama (MAURI, PAVLIDIS e IOANNIDIS, 2005). Essa estratégia apresenta vantagens quando comparada à terapia tradicional (cirurgia acompanhada da quimioterapia adjuvante), como a redução do tamanho do tumor em mais de 80% dos casos, que possibilita uma maior conservação da mama e, além disso, possibilita a avaliação da resposta do tumor em relação a um regime inicial de quimioterapia (BUCHHOLZ et al., 2003). Quando a quimioterapia é administrada posteriormente ao tratamento local, é chamada de quimioterapia adjuvante, que visa a destruição de possíveis fragmentos que tenham ficado no tecido que não são clinicamente evidentes e, dessa forma, evita possível recidiva da doença (ANAMPA, MAKOWER e SPARANO, 2015).

Uma das classes de medicamentos utilizada na quimioterapia do câncer de mama são as antraciclinas. Essas desenvolvem o efeito antitumoral através da estabilização da ligação entre a enzima topoisomerase IIA com o DNA durante o ciclo celular, formando um complexo de clivagem estabilizado. Esse processo resultará na quebra da dupla fita de DNA gerando a inibição da transcrição e replicação, e consequente, a parada do ciclo celular e apoptose. Além disso, as antraciclinas podem modular a expressão de proteínas de membranas responsáveis pela inibição do desenvolvimento celular e podem participar do processo de geração de espécies reativas de oxigênio que culminarão em danos no DNA e peroxidação lipídica (JASRA e ANAMPA, 018). Os exemplos de medicamentos dessa classe utilizadas no tratamento do câncer de mama são doxorrubicina, epirrubicina e daunorrubicina (BERETTA e ZUNINO, 2008).

Outra classe de compostos com atividade antitumoral, também utilizada na quimioterapia do câncer de mama, são aqueles à base de platina representados principalmente pela cisplatina, carboplatina e oxaliplatina (DILRUBA e KALAYDA, 2016). O mecanismo de ação dessas substâncias envolve a absorção por difusão passiva ou transporte ativo através da membrana celular. No citoplasma, a molécula é ativada e se liga ao DNA. Essa interação promove a parada do ciclo celular e consequente apoptose (JOHNSTONE, SUNTHARALIGAM e LIPPARD, 2015).

O composto 5-fluorouracil (5-FU) também apresenta efeito antimetabólico e é empregado como quimioterápico nos esquemas terapêuticos para o tratamento do câncer. O mecanismo de citotoxicidade dessa substância envolve a conversão do 5-FU no meio intracelular em compostos metabolicamente ativos, os quais serão incorporados no DNA e RNA durante a síntese. Esse processo gera danos nessas macromoléculas e prejudica a

função “normal” das mesmas (LONGLEY, HARKIN e JOHNSTON, 2003). Além disso, o 5-FU inibe a enzima timidilato sintase (TS) - responsável pela formação de deoxitimidina monofosfato - importante na síntese de DNA. O bloqueio da TS gera um desequilíbrio entre a proporção intracelular de nucleotídeos e, como consequência, resultará na quebra da dupla fita de DNA (CEILLEY, 2012).

Além dos medicamentos acima citados, existem outras opções terapêuticas para o tratamento do câncer de mama, as quais são empregadas na rotina médica, tais como paclitaxel, docetaxel, ciclosfosfamida e vinorelbina. Também é importante ressaltar que durante o planejamento do esquema terapêutico da quimioterapia, geralmente, são utilizadas a combinação de dois ou mais medicamentos, a depender da classificação do câncer a qual o paciente foi enquadrado (BRASIL, 2014).

#### 2.1.1.5.2.2 Hormonioterapia

A hormonioterapia é uma forma de tratamento sistêmico e, devido à sua maior especificidade, é utilizada em cânceres de mama classificados como hormônio receptores positivos (BENEDICT e BROWN, 2005). Pacientes em estágio avançado do câncer de mama podem apresentar em suas células RE e/ou RP expressos. A molécula de estrógeno, substrato para esses receptores, é considerada um fator importante no desenvolvimento do tumor por possuir forte função mitogênica, contribuindo para iniciação e progressão do câncer (DALMAU et al., 2014).

Consequentemente, um dos alvos de fármacos para o tratamento do câncer de mama são os REs. O tamoxifeno é um exemplo de fármaco sintético utilizado como modulador seletivo dos receptores de estrógeno e age por meio do bloqueio da ligação do estrógeno com seu receptor. Esse fármaco pode funcionar, nesse caso, como antagonista, no tratamento do câncer de mama, ou como agonista em células do útero e da mucosa vaginal (YANG et al., 2013). Porém, o tratamento prolongado com tamoxifeno pode gerar resistência. Diversos mecanismos de resistência são propostos, dentre eles, os farmacológicos - exemplificado pela diminuição ou anulação da atividade da enzima citocromo P<sub>450</sub> 2D6 responsável pelo metabolismo do tamoxifeno para sua forma ativa; a diminuição ou modificação dos REs, diretamente relacionado à resposta clínica em terapias antiestrógeno; a alteração em proteínas co-regulatórias, que em condições específicas, geralmente em cânceres com alta atividade HER2, o complexo tamoxifeno-RE gera o recrutamento de proteínas co-ativadoras, revertendo o efeito antagonista do

medicamento; dentre outros mecanismos já descritos na literatura (VIEDMA-RODRÍGUEZ et al., 2014).

Outro medicamento que age nos REs é o fulvestrant, considerado um competidor seletivo dos receptores de estrogênio. Fulvestrant é um análogo do 17 $\beta$ -estradiol e atua através da ligação com o RE, devido à sua alta afinidade, levando à degradação do mesmo e a consequente diminuição da cascata de sinalização gerados através da ligação da molécula de estrogênio. Diferentemente do tamoxifeno, o fulvestrant não apresenta atividade agonista em outros tecidos (SCOTT, BROWN e COME, 2011; AL-MUBARAK et al., 2013).

Os compostos pertencentes à classe de inibidores de aromatase também podem ser empregados no tratamento do câncer de mama. A aromatase é uma enzima presente em diversos órgãos e tecidos, tais como cérebro, vasos sanguíneos, pele, medula, endométrio, tecido adiposo e mamário, sendo responsável por catalisar a conversão de andrógenos em estrogênios (CHUMSRI et al., 2011). O anastrozol é um exemplo de medicamento dessa classe e exerce sua ação através da ligação competitiva com a enzima aromatase, reduzindo a biossíntese de estrogênio na periferia do corpo e nas mamas (KELLY E BUZDAR, 2010).

#### 2.1.1.5.2.3 Terapia direcionada para o câncer de mama

A caracterização dos biomarcadores expressos no câncer de mama se tornou uma importante ferramenta para a detecção e diagnóstico da doença, classificação dos subtipos de câncer, previsão de possíveis agravos da doença, predição da resposta ao tratamento, e, além disso, permitiu o desenvolvimento da terapia personalizada (TOSS e CRISTOFANILLI, 2015).

Um alvo terapêutico para o tratamento do câncer de mama é a superfamília de receptores HER. Nessa família são incluídos quatro membros: receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), HER2, HER3 e HER4 (KÜMLER, TUXEN, e NIELSEN, 2014). O gene *ERBB2* codifica o receptor HER2 e é superexpresso em cerca de 15% até 30% dos diagnósticos de cânceres de mama (LANG et al., 2014). Ainda, está associado ao aumento da agressividade da doença, prognóstico dificultado e diminuição da sobrevivência do paciente (D'AMATO et al., 2015). Este gene codifica um receptor do tipo tirosina quinase que, quando ativado, modula uma cascata de sinalização que resulta na

alteração no padrão de proliferação, sobrevivência, motilidade e adesão celular (KRISHNAMURTI e SILVERMAN, 2014; AHMED, SAMI e XIANG, 2015).

Um medicamento que está disponível para utilização no tratamento de câncer de mama HER2<sup>+</sup> é o trastuzumab, caracterizado por ser um anticorpo monoclonal humanizado contra o domínio extracelular do receptor HER2. Conseqüentemente, por meio dessa interação, a cascata de sinalização gerada pelo ligante original do receptor não será ativada e os efeitos não serão evidenciados (INCORVATI et al., 2013; PINTO et al., 2013).

O lapatinib também é empregado na terapia direcionada para o câncer de mama. Esse medicamento é considerado um inibidor de tirosina quinase do receptor EGFR e HER2, agindo como um competidor do sítio de adenosina trifosfato (ATP). Essa interação evita a subseqüente cascata de sinalização gerada pela ativação dos receptores EGFR e HER2, levando à inibição da proliferação celular e indução da apoptose (D'AMATO et al., 2015).

As ciclinas dependentes de quinases 4 e 6 (CDK4 e CDK6) também são consideradas alvos terapêuticos para o tratamento de câncer de mama. Quando ativadas, as CDK4 e CDK6 promovem a entrada da célula no ciclo celular através da fosforilação e conseqüente inativação da proteína retinoblastoma, responsável pela supressão de tumores (TURNER et al., 2015). Em cânceres de mama, sinais de oncogenes promovem a superexpressão de ciclina D1, substrato para ativação da CDK4 e CDK6 e, conseqüentemente, alteração da taxa de proliferação dessas células tumorais (ROCCA et al., 2013). O palbociclib é um medicamento que atua como um inibidor seletivo das CDK4 e CDK6, gerando o bloqueio da fosforilação da proteína retinoblastoma e acarretando a parada da divisão celular (MANGINI et al., 2015).

Outros dois medicamentos, everolimus e olaparib, apresentam distintos mecanismos de ação e também são aplicados na terapia alvo do câncer de mama. O primeiro age através da inibição da proteína *mammalian target of rapamycin* (mTOR), responsável pela regulação do desenvolvimento celular, proliferação, diferenciação e angiogênese (NG, JOHNSON e CUELLAR, 2014). Já o segundo pertence à classe de compostos que são inibidores da enzima poli (adenosina difosfato-ribose) polimerase (PARP), responsáveis pela reparação do DNA. Cânceres de mama que apresentam mutações nos genes BRCA 1 e BRCA 2 são mais sensíveis a inibidores da PARP. Portanto, danos no DNA resultantes da ação indireta do olaparib, levam à morte da célula e à parada do ciclo celular (ROBSON et al., 2017).

## 2.2 Avaliação de atividades biológicas e toxicidade *in vitro*

### 2.2.1 Métodos alternativos

Os métodos alternativos e testes *in vitro* de avaliação de atividades biológicas e toxicidade são caracterizados pela tentativa de substituição ou diminuição do uso de animais na pesquisa (BEDNARCZUK et al., 2010). Esses testes têm seus objetivos descritos na estratégia dos 3Rs, que consistem na redução (*Redution*) do número de animais em laboratório por meio do planejamento experimental e do suporte estatístico; no refinamento (*Refinement*) descrito como o cuidado com o animal, evitando dor, estresse e desconforto que podem influenciar diretamente nos resultados da pesquisa; e na substituição (*Replacement*) por modelos *in vitro* (CAZARIN, CORRÊA e ZAMBRONE, 2004).

As técnicas alternativas *in vitro* podem utilizar organismos como bactérias, fungos, algas, crustáceos e microcrustáceos, além de frações dos sistemas biológicos, tais como cultivo de células, cultivo de tecidos, enzimas e proteínas (BEDNARCZUK et al., 2010). Modelos computacionais também podem ser considerados como método alternativo, nos quais *softwares* são utilizados para o desenho de novas moléculas e são realizadas simulações que podem predizer um possível efeito biológico e/ou tóxico sem a dissecação de animais (DOKE E DAWHALE, 2013). Portanto, os resultados obtidos nesses ensaios podem direcionar os estudos *in vivo*, os quais contribuirão para o melhoramento da sensibilidade e da especificidade dos estudos com animais (BEDNARCZUK et al., 2010).

#### 2.2.1.1 Atividade antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) são geradas naturalmente durante o metabolismo celular dos seres vivos. Desempenham papel importante nas atividades bioquímicas das células bem como na sinalização de transdução, transcrição de genes, relaxamento e proliferação de células do músculo liso, adesão de leucócitos, agregação plaquetária, angiogênese, dentre outras atividades (UTTARA et al., 2009).

Entretanto, quando o organismo não consegue neutralizar essas moléculas, ocorre um desequilíbrio entre a taxa de produção de agentes oxidantes e sua degradação

(VICENTINO e MENEZES, 2007). Conseqüentemente, há o acúmulo de EROs/ERNs no corpo, gerando o fenômeno chamado estresse oxidativo (SIMIONI et al., 2018). Os ânions superóxidos ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e os radicais hidroxilas ( $OH^\cdot$ ) são exemplos de EROS (CHOI et al., 2002). Em relação às ERNs, as moléculas mais comuns são o óxido nítrico ( $NO^\cdot$ ) e o dióxido nítrico ( $NO_2^\cdot$ ) (SHARMA e AGARWAL, 2004). O estresse oxidativo pode gerar danos ao organismo, podendo levar a degradação de biomoléculas, como lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA), que contribuirá para o desenvolvimento de doenças crônicas, tais como: aterosclerose, câncer, diabetes, artrite reumatoide, doenças cardiovasculares, inflamação, envelhecimento, doenças degenerativas, dentre outras (UTTARA et al., 2009).

Um dos mecanismos de neutralização de EROs/ERNs é através da ação de substâncias antioxidantes, as quais agem em baixas concentrações quando comparada ao substrato oxidável e têm a função de atrasar ou inibir a oxidação desse substrato de forma eficaz (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Os antioxidantes podem ser divididos como aqueles presentes no próprio organismo, aqui exemplificado pela glutatona, melatonina e bilirrubina ou aqueles obtidos pela dieta, como  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico e os micronutrientes zinco e selênio (LEE et al., 2003).

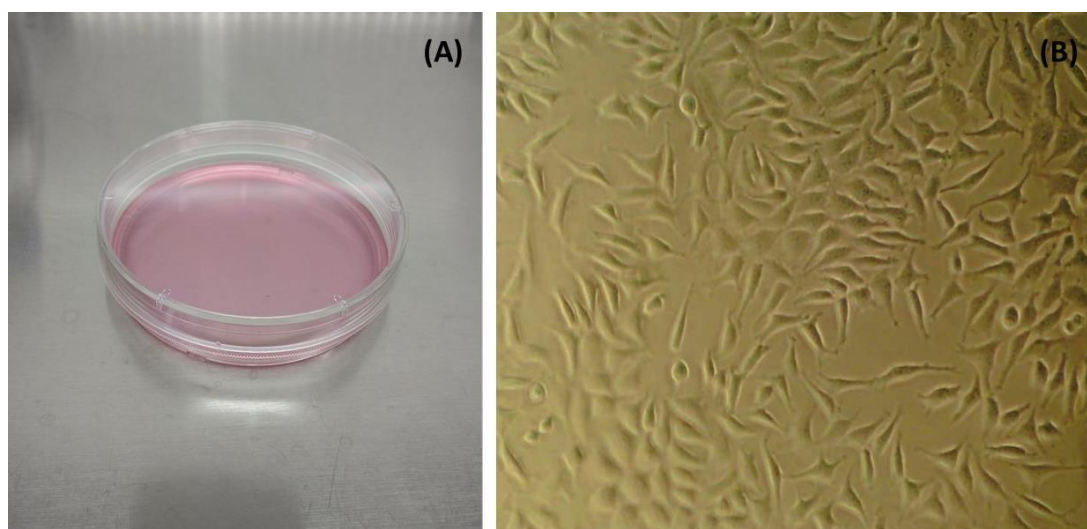
#### 2.2.1.1.1 Método de sequestro de espécies reativas pelo 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

O método de sequestro do radical livre - DPPH - baseia-se na capacidade de uma determinada substância em doar elétrons, promovendo a redução do DPPH e formando o composto hidrazina. Essa redução é evidenciada através da mudança da coloração de violeta para amarela pálido, alteração a qual pode ser medida por meio da obtenção da absorvância utilizando um espectrofotômetro. Portanto, a absorvância do DPPH obtida pelo espectrofotômetro é inversamente proporcional à concentração do ativo antioxidante testado (ALVES et al., 2010).

A análise da atividade antioxidante por esse método é simples, sensível e rápida, o que o torna uma ferramenta rotineiramente empregada na pesquisa. Os resultados são expressos como concentração de antioxidante que causa 50% de redução da absorvância do DPPH (CHEN, BERTIN e FROLDI, 2013).

### 2.2.1.2 Cultura de células

A cultura de células é caracterizada pela manutenção e multiplicação de células vivas em um determinado meio de cultura (LUISI et al., 2004), o qual fornece nutrientes e fatores de crescimento para a sobrevivência das células fora do organismo vivo. Fatores como temperatura e umidade controladas, conhecimento da morfologia celular e técnicas assépticas são essenciais para a correta manutenção do cultivo celular (MIGITA, 2012). Portanto, devido ao fato de as células em cultivo manterem o genoma do tecido vivo original e os mecanismos fundamentais de proliferação (mitoses), esse modelo pode ser considerado uma técnica alternativa aos modelos *in vivo* (ASSIS et al., 2007). A Figura 5 ilustra o cultivo de células em laboratório.



**Figura 5.** Cultivo de células em laboratório. Placa de Petri específica para cultivo de células contendo meio *Dubelcco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (A) e imagem de fibroblasto murino (L929) fotografada em microscópio invertido empregando a objetiva de 20X (B). Fonte: O autor.

Células em cultivo são modelos mais simples do que a experimentação animal e, em alguns casos, podem fornecer respostas mais direcionadas para problemas complexos de pesquisa (MIGITA, 2012). Assis e colaboradores (2007) citam diversas vantagens para utilização do cultivo de células, as quais encontram-se descritas na Tabela 1.



**Tabela 1.** Vantagens da cultura de tecidos, segundo Freshney (2000).

CATEGORIA	VANTAGENS
Parâmetro físico-químico ambiental	Controle do pH, temperatura, osmolaridade, gases dissolvidos
Condições fisiológicas	Controle de hormônios e concentração de nutrientes
Microambiente	Regulação da matriz, interação célula-célula, difusão de gases
Homogeneidade da linhagem celular	Disponibilidade de seleção de meio, clonagem
Caracterização	Citologia e imunocolorações são realizadas facilmente
Preservação	Podem ser estocadas em nitrogênio líquido
Validade e credibilidade	Origem, histórico, pureza, podem ser registrados
Replicação e variabilidade	Fácil quantificação
Economia dos reagentes	Volumes reduzidos, acesso direto, baixo custo
Controle de concentração x tempo	Habilidade para definir dose, concentração e tempo
Mecanização	Disponível para microtitulação e bioinformática
Redução do uso animal	Citotoxicidade e triagem de substâncias químicas candidatas a fármacos, cosméticos etc.

Fonte: Adaptado de ASSIS e colaboradores, 2007.

Os resultados obtidos por meio de estudos com células mantidas em cultura estão se tornando ferramentas fundamentais na pesquisa médica e na biotecnologia industrial. Esses dados podem informar aspectos funcionais, bioquímicos e moleculares, como também ser aplicados em análise de alvos farmacológicos e na produção de produtos biológicos, tais como vacinas e anticorpos (MIGITA, 2012).

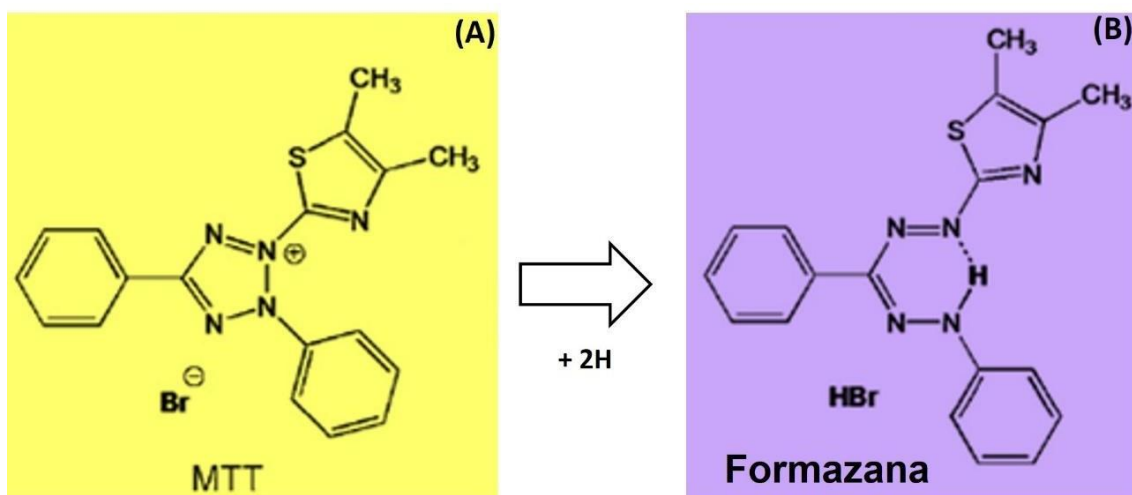
Considerada uma importante estratégia utilizada por laboratórios de pesquisa, a cultura de células possui um vasto campo de aplicação, tais como para a avaliação da citotoxicidade de compostos (PAES et al., 2012; NI et al., 2018; ADEM et al., 2018), para avaliar a biocompatibilidade de materiais (HERNANDEZ, KUMAR e JODDAR, 2017; ERIONE et al., 2017), para o desenvolvimento de terapia antitumoral (ACEVEDO et al., 2018; MANATUNGA et al., 2018; KIM e GILBERT, 2018), dentre outras aplicações.

### 2.2.1.2.1 Métodos *in vitro* de avaliação da citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade podem ser considerados padrões para a avaliação primária de atividades biológicas de substâncias ativas que poderão ser destinadas ao cuidado da saúde. Nesses ensaios são avaliados parâmetros como desenvolvimento, replicação e morfologia de células expostas a determinado ativo (LIU et. al., 2018).

Os métodos colorimétricos utilizados para obtenção da citotoxicidade são caracterizados pela conversão de um substrato para um produto colorido por enzimas intracelulares presente em células metabolicamente ativas. Dessa forma, a cor final obtida é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Dentre os ensaios colorimétricos estabelecidos na literatura, dois são destacados: o ensaio de redução do brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio (MTT) e o ensaio que emprega resazurina (EDIRIWEERA, TENNEKOON e SAMARAKOON, 2018).

O método de redução do sal de MTT é uma técnica constantemente utilizada para avaliação da citotoxicidade e pode ser considerado padrão-ouro para a avaliação da viabilidade e proliferação celular (VAN TONDER, JOUBERT, e CROMARTY, 2015). Essa metodologia se baseia na redução do sal de MTT, que inicialmente apresenta-se como uma solução aquosa de coloração amarelada, por enzimas desidrogenases e agentes redutores presente em células metabolicamente ativas (STOCKERT et al., 2012). O produto dessa reação é um composto insolúvel em água e de coloração roxa/azul, chamado formazana (Figura 6) (SCHERLIE, 2011). A formazana quando solubilizada com algum solvente, forma uma solução homogênea, cuja absorvância pode ser medida em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).



**Figura 6.** Reação de redução do sal de MTT a formazana. Estrutura química do MTT (A) e o produto insolúvel da reação de redução do MTT (formazana) (B). Fonte: Adaptado de STOCKERT e colaboradores, 2012.

Essa técnica avalia a função mitocondrial, a qual está diretamente relacionada ao metabolismo das células vivas (LOBNER, 2000); sendo a quantidade de células vivas diretamente proporcional à formação dos cristais de formazana (SYLVESTER, 2011).

O método de redução da Resazurina também é considerado uma técnica colorimétrica na qual se avalia a função metabólica de células vivas. Em solução, a resazurina apresenta uma coloração azul não fluorescente na qual, ao entrar em contato com células viáveis, sofre redução formando o composto resofurina de coloração rosa/vermelha fluorescente (RAMPERSAD, 2012; BONNIER et al., 2015).

Além dessas metodologias acima citadas, na literatura são referenciados outros métodos para a determinação da viabilidade e proliferação celular por meio da análise de diferentes indicadores, sendo listados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Indicadores e métodos para avaliação da viabilidade celular e citotoxicidade

<b>Indicador</b>	<b>Método para determinação da toxicidade</b>
Diferenciação células	Análise de PCR para marcadores gênicos
Divisão celular	Eficiência de revestimento, formação clonal
Membrana celular	Enzima de rompimento (LDH), absorção de corante na qual a célula normalmente é impermeável (azul de <i>Trypan</i> , eritrosina, preto naftaleno, iodeto de propídio)
Metabolismo celular	Absorção de precursores fluorescentes ou isótopos, ensaios para atividade enzimática
Lisossomos	Coloração de células viáveis, ensaio de absorção do vermelho neutro
Mitocondria	Ensaio de redução do sal de MTT

Adaptado de MCGAW, ELGORASHI E ELOFF, 2014.

Os estudos computacionais (análises *in silico*) também são utilizados para avaliação da toxicologia de compostos e utilizados para complementar os estudos *in vitro* e *in vivo*. Os métodos *in silico* utilizam ferramentas computacionais tais como modelos, algoritmos, *softwares* e dados, com o objetivo de organizar, simular, visualizar ou prever a toxicidade de substâncias. Além disso, contribuem para a diminuição do uso de animais, redução dos custos em testes toxicológicos e melhorar a predição e segurança quanto à avaliação da toxicidade (RAIES e BAJIC, 2016).

### 2.2.1.3 Avaliação da toxicidade através da utilização de bioensaios

A avaliação da toxicidade de compostos químicos é necessária para garantir a segurança quanto ao seu uso. Vários testes de toxicidade são padronizados nacionalmente pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (COSTA et al., 2008) e aplicados para avaliar a qualidade das águas, a toxicidade relativa de agentes químicos, efluentes líquidos, lixiviados de resíduos sólidos, dentre outros. A caracterização da toxicidade de compostos ativos pode ser realizada pela combinação de pesquisas *in vitro*, *in silico* e *in vivo*, sendo os dois primeiros considerados ensaios preditivos, os quais

auxiliam e limitam o uso de animais, respeitando o princípio dos 3Rs (CHAPMAN et al., 2013).

Uma das formas de avaliação da toxicidade pode ser através da realização de bioensaios. Esses são caracterizados pela exposição de determinado agente, em diferentes concentrações, a um organismo vivo, nos quais são observados efeitos no comportamento e na sobrevivência. Os bioensaios podem utilizar como organismos vivos as bactérias luminescentes (*Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium phosphoreum* e *Pseudomonas fluorescens*), as algas (*Raphidocelis subcapitata*), os organismos invertebrados (*Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus* e *Artemia salina*) e os organismos aquáticos como peixes e mexilhões (GHOSH, THAKUR e KAUSHIK, 2017).

O bioensaio que emprega o microcrustáceo *Artemia salina* é considerado uma ferramenta útil para a avaliação preliminar da toxicidade aguda (FERRAZ FILHA et al., 2012) e sua metodologia encontra-se descrita na Norma Brasileira, emitida e divulgada pela ABNT – NBR 16530 de 09/2016. O gênero *Artemia* apresenta ampla distribuição geográfica e possui características que o classifica como um organismo para o uso na ecotoxicologia, tais como cultura e manutenção simples em laboratório; resistência quanto à manipulação; ciclo de vida curto; e alta taxa de reprodução. Além disso, sobrevive às condições ambientais extremas, tais como alta taxa de salinidade (5-250 g L<sup>-1</sup>) e temperatura (6-35 °C), sendo um organismo adaptável às diversas condições ambientais (NUNES et al., 2006). Apesar dessa adaptabilidade, esse organismo é considerado um bioindicador em experimentos laboratoriais, apresentando uma resposta visível a pequenas variações no microambiente (CARVALHO et al., 2009).

O ensaio de letalidade com *Artemia salina* é eficiente, requer uma pequena quantidade de amostra, de rápida obtenção de resultados e de baixo custo, pois não demanda uma quantidade de equipamentos especiais e nem instalação sofisticada para sua realização (PIMENTA et al., 2003). Os cistos de *Artemia salina* podem ser adquiridos prontamente e com baixo custo no comércio e continuam viáveis por anos, por estarem no estado inativo (latente). Esse bioensaio pode ser utilizado na avaliação de resíduos de pesticida, análise de micotoxinas, fluxo de poluentes, toxicidade de óleos dispersantes, agentes tóxicos em ambientes marinhos, dentre outras aplicações (MEYER et al., 1982). Adicionalmente, de acordo com Luna e colaboradores (2005), os resultados obtidos nesse ensaio apresentam boa correlação com a atividade citotóxica em tumores sólidos humanos.

### **2.3 Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC)**

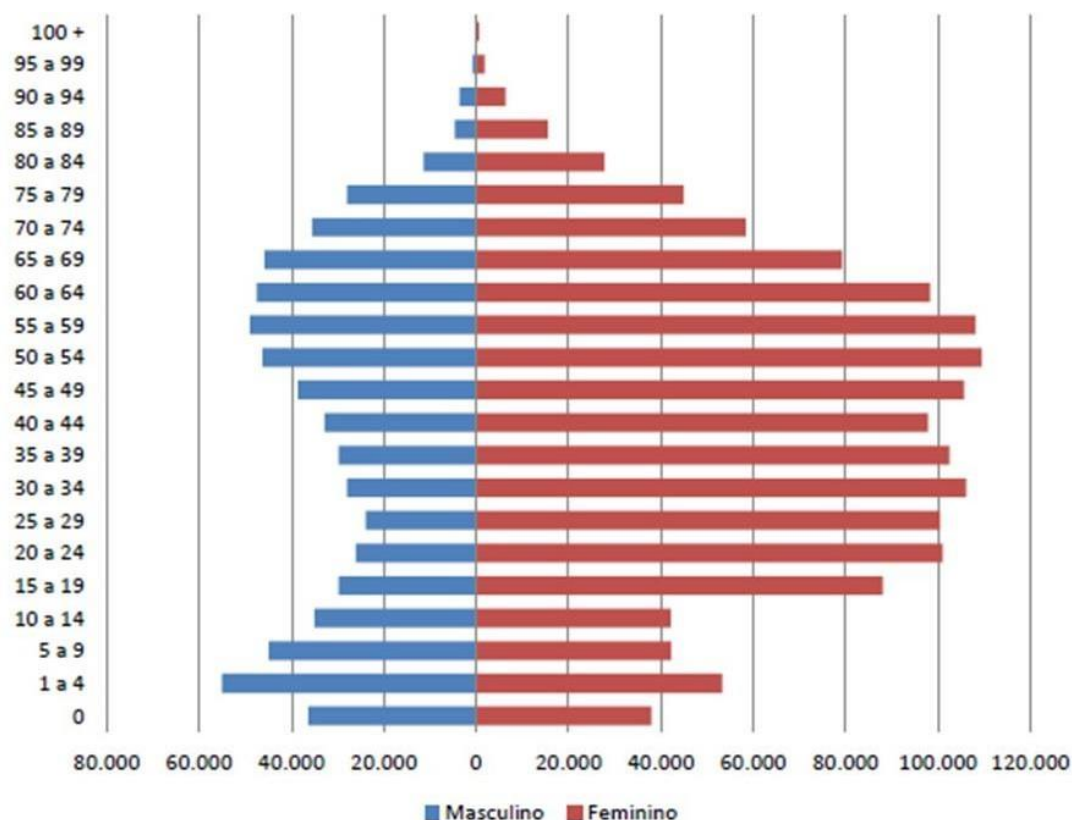
A prática e a utilização da Medicina Tradicional e Complementar aumentaram nas últimas décadas nos sistemas de saúde (SOUSA e TESSER, 2017). Segundo a OMS, a Medicina tradicional e complementar é definida como o conjunto de conhecimentos, habilidades e práticas baseado em teorias, crenças e experiências de diferentes culturas aplicadas na manutenção da saúde do indivíduo. Além disso, engloba práticas de cuidado à saúde que não estão inseridas no sistema de saúde do país (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

No Brasil, devido à ausência de diretrizes específicas para regulamentação de experiências já aplicadas em diversos municípios e estados em relação à Medicina tradicional e complementar, foi criada em 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS). Essa Política Nacional visa à prevenção de agravos, a promoção e a recuperação da saúde; garantir qualidade, eficácia, eficiência e segurança quanto ao uso das práticas complementares; estimular e divulgar possíveis terapias alternativas para o tratamento de doenças (BRASIL, 2006). Dentre as práticas complementares que abrangem essa política, destacam-se a Medicina tradicional chinesa (Acupuntura), Homeopatia, Fitoterapia, Antroposofia e a Crenoterapia. Além dessas, em março de 2017, as práticas integrativas e complementares (PICs) foram ampliadas em 14 outras modalidades, as quais disponibilizam ao usuário do SUS maiores alternativas terapêuticas e possibilita a integralidade no atendimento ao paciente na atenção básica (BRASIL, 2018).

Diversos fatores que motivam a procura do paciente por essas práticas alternativas podem ser destacados, tais como o reposicionamento do paciente como centro do modelo médico; a busca de meios terapêuticos simples, sem utilização de tecnologias invasivas, porém com igual ou maior eficácia no tratamento dos agravos de saúde; a construção de uma Medicina na qual promova uma autonomia do paciente, na qual o foco seja a saúde como um todo e não a doença (SANTOS e TESSER, 2012). Portanto, devido ao reconhecimento dessas práticas como alternativa para os tratamentos convencionais e à maior demanda por esse serviço, profissionais de saúde estão procurando se qualificar melhor e enriquecer suas habilidades (TESSER, 2009).

Diante dos fatos acima relacionados, a procura pelas Práticas Integrativas e Complementares (PICs) está crescendo nos últimos anos. Em 2015, segundo o Sistema

de Informação em Saúde para a Atenção Básica (SISAB) do Departamento de Atenção Básica do Ministério da Saúde, foram registrados cerca de 527.953 atendimentos individuais (BRASIL, 2016), enquanto em 2016 foram registrados cerca de 2.203.661 atendimentos (BRASIL, 2017a). Além disso, no total de atendimentos em 2016, é possível observar a maior procura de mulheres pelas PICs, superando o dobro de atendimentos para os homens, como ilustrado na Figura 7.



**Figura 7.** Atendimentos individuais com oferta de práticas integrativas e complementares por gênero e idade no ano de 2016. Fonte: BRASIL, 2017a.

Entretanto, ainda há desafios para implementação das PICs no SUS e por parte dos gestores públicos, tais como a falta de recursos humanos capacitados para o desenvolvimento das práticas; recurso financeiro insuficiente; espaço físico inadequado para o oferecimento do serviço; além de fatores culturais e científicos que impendem a implementação do serviço. Desse modo, há o reconhecimento das PICs, porém há uma carência de diretrizes operacionais para sua implantação (SANTOS e TESSER, 2012).

### 2.3.1.1 Fitoterápicos

O medicamento fitoterápico é aquele originado exclusivamente de matérias-primas vegetais. A eficácia e segurança do uso são comprovados por meio de estudos etnofarmacológicos, documentações técnico-científicas ou ensaios clínicos de fase 3, bem como sua qualidade comprovada por testes de reprodutibilidade e homogeneidade da matéria-prima (BRASIL, 2006).

Em relação à regulamentação da utilização de plantas medicinais e fitoterápicos, debates mundiais resultaram na Declaração de Alma Ata, em 1978, na qual foi atribuído às plantas medicinais e fitoterápicos a finalidade profilática, curativa e paliativa (MACEDO, 2016). No Brasil, além da PNPIC, foi instituída em 2006 a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006), que tem como objetivo garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional, além de promover o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Em 2008, foi aprovado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que em conformidade com a PNPMF e a PNPIC traz ações, aspectos relacionados à gestão, órgãos, prazos e origens dos recursos (BRASIL, 2009). Esses marcos foram importantes para a inserção das plantas medicinais e fitoterápicos no SUS, promovendo maior acesso a população a esse método alternativo de tratamento.

Considerando a Fitoterapia como uma prática integrativa e complementar, segundo o SISAB, no ano de 2016 foram registrados 89.037 atendimentos individuais para uso da Fitoterapia na atenção básica (BRASIL, 2017a), sendo evidenciado um aumento no número absoluto em relação ao ano anterior (2015), no qual 50.050 atendimentos foram registrados (BRASIL, 2016).

Em relação aos fitoterápicos inseridos no SUS, são disponibilizados o total de treze medicamentos, os quais estão listados na Relação de Medicamentos Essenciais (RENAME) (BRASIL, 2017b) e indicados para o tratamento de diversas enfermidades, tais como queimaduras, gastrite, úlceras, artrite e osteoartrite.

#### 2.3.1.1.1 Compostos antitumorais de origem vegetal

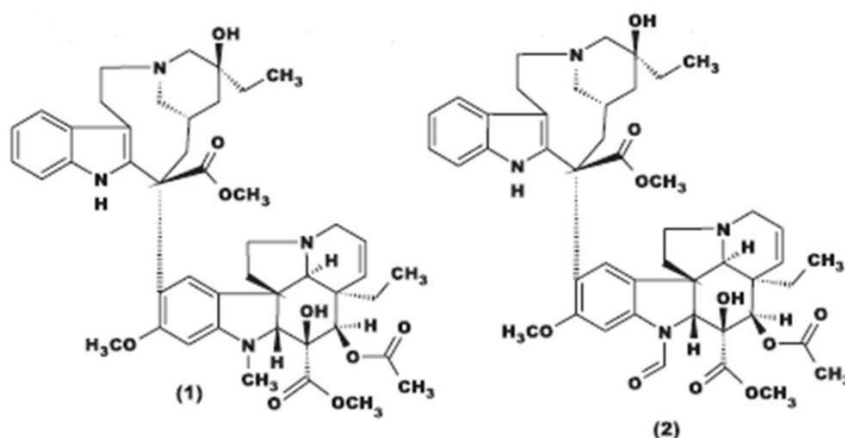
As plantas superiores constituem uma fonte importante de novas substâncias utilizadas como agentes terapêuticos. O isolamento e determinação estrutural de compostos produzidos pelo metabolismo secundário dos vegetais funcionam como



modelo para modificações estruturais que irão otimizar as propriedades farmacológicas e bioquímicas do composto (BRAZ FILHO, 2010).

Diversas classes de compostos originadas do metabolismo secundário das plantas apresentam atividade antitumoral, tais como terpenos (JIANG et al., 2018), alcaloides (MARQUES e LOPES, 2015), cumarinas (HUANG et al., 2017), flavonoides (LI et al., 2018), dentre outras classes.

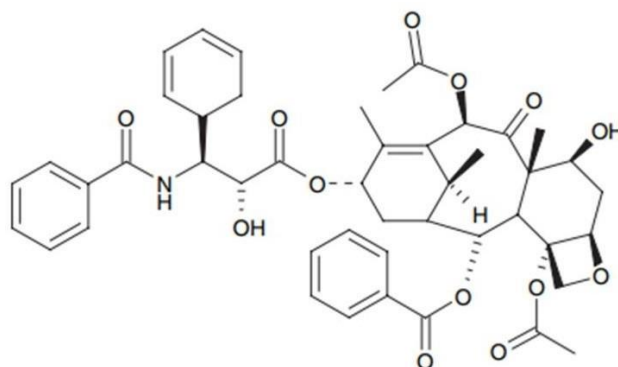
Os alcaloides vimblastina e vincristina (Figura 8) são exemplos de compostos isolados da espécie vegetal *Catharanthus roseus* (L.) G. Don e utilizados na terapêutica de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e leucemia linfoblástica aguda infantil (BRANDÃO et al., 2010). Esses compostos agem na estimulação da despolarização dos microtúbulos através da ligação com as  $\beta$ -tubulinas, impedindo a polimerização. Dessa forma, não há a formação do fuso mitótico e o ciclo celular é interrompido. Outras estruturas semissintéticas dos alcaloides da vinca foram estabelecidas, tais como a vinorelbina e a vindesina, sendo o primeiro utilizado no tratamento do câncer de mama e carcinoma de pulmão, e o segundo usado para câncer de mama, melanoma, adenocarcinoma de pulmão e distúrbios hematológicos (MARQUES e LOPES, 2015).



**Figura 8** Estrutura química dos alcaloides vimblastina (1) e vincristina (2) isolados das folhas de *Catharanthus roseus*. Fonte: BRANDÃO e colaboradores, 2010.

Outro agente antitumoral derivado de plantas que merece atenção é o paclitaxel (Figura 9). Esse composto é originado das cascas de *Taxus brevifolia* e usado no tratamento do câncer de mama, de ovário, sarcoma de Kaposi em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*),

cânceres de cabeça e pescoço e tumores cerebrais. O paclitaxel é um diterpeno complexo, descoberto durante extensa triagem de extratos no ano de 1963 (MARUPUDI et al., 2007). O mecanismo de ação desse composto envolve a promoção e estabilização dos microtúbulos durante a divisão celular. Dessa forma, a célula perde a capacidade de desconstruir o fuso mitótico e, conseqüentemente, inviabiliza o prosseguimento das fases do ciclo celular (MA e MUMPER, 2013).



**Figura 9.** Estrutura química do paclitaxel. Fonte: MARUPUDI e colaboradores, 2007.

Portanto, a utilização de agentes antineoplásicos ainda continua sendo a abordagem terapêutica mais adotada para o tratamento do câncer (MARQUES e LOPES, 2015). Dessa forma, diante da grande biodiversidade natural, principalmente disponível no Brasil, a pesquisa envolvendo as plantas medicinais se torna desejável e necessária, com vistas à descoberta de novas moléculas ativas e elaboração de fitoterápicos mais seguros, eficazes e específicos para o tratamento de doenças.

#### 2.3.1.1.2 *Annona ambotay*

A família Annonaceae compreende 135 gêneros e cerca de 2.500 espécies (LUCIO et al., 2014), na qual se inclui *Annona ambotay*. Dentro dessa família estão incluídos vegetais na forma de árvores, arbustos e lianas e pode ser dividida em duas grandes subfamílias: Annonoidae - composta pelos gêneros *Annona*, *Guatteria*, *Xylopia*, *Uvaria* e *Artabotrys*; e Monodoridae - que inclui os gêneros *Isolona* e *Monodora* (QUÍLEZ et al., 2018). Os membros dessa família estão distribuídas entre as áreas tropicais do continente americano, africano e asiático (JUNIOR et. al., 2014), fornecendo frutos comestíveis (VENDRAMIN et al., 2013) e também usados na perfumaria, bem

como na medicina popular para o tratamento da diabetes (MADALENO, 2011) e da hipertensão (BATTISTI et al., 2013).

O gênero *Annona* pode ser considerado um dos representantes mais promissores da família Annonaceae. Economicamente, no Brasil, algumas das espécies pertencentes à esse gênero são cultivadas e comercializadas em larga escala, tais como *A. crassiflora* (araticum), *A. squamosa* (fruta do conde) e *A. muricata* (graviola), *A. reticulata* (condessa) e *A. cherimola* (cherimoia) (JUNIOR et al., 2014). Além disso, apresentam diferentes propriedades farmacológicas, tais como inseticida (BRAVO et al., 2002; RAVAOMANARIVO et al., 2014), antitumoral (PIMENTA et al., 2003), antibacteriana, citotóxica (RINALDI et al., 2017) e inibição da acetilcolinesterase (FORMAGIO et al., 2015).

Compostos isolados de diferentes espécies vegetais pertencentes ao gênero *Annona* estão relacionados às atividades biológicas atribuídas à essas espécies. Annomuricina A, B e C são acetogeninas isoladas das folhas de *A. muricata* que apresentaram citotoxicidade frente a linhagens tumorais de pulmão A549, mama MCF7 e de colon HT-29 além de toxicidade evidente frente ao microcrustáceo *Artemia salina* (MOGHADAMTOUSI et al., 2015). Outra espécie vegetal estudada é a *Annona reticulata*, a qual já foram isolados diferentes compostos tais como ácido kaurenóico, liriodenina, reticulina e bullatacina que participam das diferentes atividades relacionadas a essa espécie como atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória dentre outras (JAMKHANDI E WATTAMWAR, 2015). Além das espécies vegetais acima citadas, Quílez e colaboradores (2018) relacionam diversos outros componentes que provavelmente estão associados ao desenvolvimento das atividades biológicas atribuídas ao gênero *Annona*.

*Annona ambotay*, espécie pertencente ao gênero *Annona* e família Annonaceae, é um arbusto que encontra-se distribuído na América do Sul, incluindo Brasil, Colômbia, Peru, Venezuela, Bolívia e nas Guianas, e é conhecida popularmente como envira-caju ou envira-taia (MAAS et al., 2007). Na medicina popular boliviana, as sementes ou cascas de *A. ambotay* são usadas no tratamento de entorses através da aplicação direta no local da lesão (BRAVO et al., 2002). Além disso, Takahashi e colaboradores (2006) reportaram atividade antibacteriana do extrato benzênico obtido a partir das cascas de *A. ambotay* frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Em relação à composição química, a presença de alcaloides (LEOBOEUF et al., 1982; OLIVEIRA et al., 1987; SANTOS, MORAIS e BRAZ-FILHO, 2003),

sesquiterpenos e flavonoides (BRAVO, 2002) foi encontrada nos extratos de espécies oriundas da família Annonaceae. Em adição aos constituintes químicos relacionados, Oliveira e colaboradores (1987) e Bravo e colaboradores (2002) isolaram os compostos: geovanine do extrato bezênico, e a argemilactona do extrato diclorometânico, respectivamente, das cascas de *A. ambotay*.

Portanto, devido à escassez de dados na literatura, a espécie vegetal *Annona ambotay* se torna um importante objeto de estudo para nosso grupo, o qual vislumbra desvendar potenciais atividades biológicas ainda não descritas para esta espécie vegetal.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar as atividades biológicas e a toxicidade *in vitro* do extrato seco das cascas de *Annona ambotay* (Aubl.).

#### **3.2 Específico**

Estabelecer o potencial antioxidante do extrato seco (hidroalcoólico) das cascas de *Annona ambotay* pelo método de sequestro de espécies reativas - DPPH.

Avaliar a citotoxicidade desse extrato frente às linhagens celulares sadias de fibroblastos murino (L929) e queratinócitos humano (HaCaT).

Analisar a atividade antiproliferativa *in vitro* do referido extrato frente às linhagens celulares tumorais de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-231 e MCF7) e adenocarcinoma mamário murinho (4T1).

Estabelecer a toxicidade aguda do extrato seco obtido das cascas de *Annona ambotay* frente ao microcrustáceo marinho *Artemia salina*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

As cascas de *A. ambotay* (Aubl.) foram obtidas no mercado “Ver o peso” situado na cidade de Belém, Pará, Brasil. Em seguida, foram secas a 40 °C em estufa e pulverizadas em microprocessador para obtenção de um pó.

#### 4.1.2 Preparo do extrato

Dez (10) gramas do pó da casca obtido foram colocados em maceração durante 72 horas e extraído com 500 mL de solução hidroetanólica 70% (v/v) em temperatura ambiente. Posteriormente, os resíduos foram removidos por filtração e o solvente foi evaporado após ser submetido à temperatura de aproximadamente 40 °C sob baixa pressão e rotação, no rotaevaporador (Buchi, Suíça). Após essa redução, o extrato foi liofilizado (Christ, Alemanha) sob pressão de 1,8 mbar e temperatura de -14 °C. O rendimento do extrato foi de 5,9% peso/peso (p/p). O material obtido foi armazenado protegido da luz e à de -20 °C, até a utilização.

### 4.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de sequestro de espécies reativas de oxigênio através da redução do DPPH, descrito por Sreejayan e Rao (1996), com modificações. Para realização do ensaio, foi preparada uma solução de DPPH na concentração de 0,05 mM através da pesagem de 1 mg de DPPH solubilizado em 50 mL de etanol absoluto.

Em relação ao preparo da amostra, o extrato seco obtido das cascas de *A. ambotay* foi pesado (2 mg) e solubilizado em 2 mL de etanol para análise (P.A.) para obtenção de uma solução inicial de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A partir dessa, foram realizadas diluições seriadas, sendo etanol absoluto o diluente. Em uma microplaca de 96 poços, 150  $\mu\text{L}$  de DPPH foram adicionados a 50  $\mu\text{L}$  das soluções preparadas anteriormente, sendo obtido, ao término do processo, concentrações-teste na faixa de 0,97 a 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para cada concentração foi preparado o branco da amostra, adicionando-se 150  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto à 50  $\mu\text{L}$  da solução-teste, para excluir possível interferência da coloração da

amostra. O padrão utilizado no ensaio foi o resveratrol (Fagron, Brasil) e foi preparado igualmente à amostra e na mesma faixa de concentração.

Após o preparo da placa, a mesma foi levada ao agitador de microplaca para homogeneização e deixada ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por um período de 30 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro (Multiskan GO, Datamed, Brasil) no comprimento de onda fixo de 510 nm.

A atividade antioxidante foi calculada por meio da Equação 1:

$$A_{\text{amostra}} - A_{\text{DPPH}} (\%) = \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{DPPH}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

onde:  $A_{\text{amostra}}$  é o valor da absorvância da solução contendo a amostra mais o DPPH;  $A_{\text{controle}}$  equivale ao valor da absorvância da solução contendo amostra mais o etanol; e  $A_{\text{DPPH}}$  equivale à solução etanólica de DPPH.

Com a obtenção das absorvâncias, foram calculadas as porcentagens da atividade antioxidante para cada concentração e construído um gráfico de dose-resposta. Dessa forma, foi possível obter a concentração capaz de inibir 50% dos radicais livres ( $CI_{50}$ ) presente no DPPH. A análise estatística realizada foi o teste T de *Student* e valores de  $p < 0,05$  apresentaram diferença estatisticamente significativas.

### 4.3 Cultura de células

#### 4.3.1 Linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas para o desenvolvimento desse projeto foram: fibroblasto murino (L929), queratinócito humano (HaCaT), adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-231 e MCF7) e tumorais de glândula mamária de murinos (4T1). Todas as células foram cultivadas em meio *Dubelcco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Vitrocell) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocell), 1% de penicilina e estreptomicina ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Sigma-Aldrich) e 1% de ácido [4-(2-hidroxietil)]-1-piperazinaetanolsulfônico (HEPES, 10 mM, Sigma-Aldrich) e mantidas em estufa sob atmosfera umidificada a  $37^\circ\text{C}$  à 5% de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e  $\text{pH}=7,2$ .

### 4.3.2 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com o método MTT (Sigma-Aldrich, EUA) descrito por Mosmann (1983) frente à linhagem de células imortalizadas de fibroblastos (L929) e queratinócitos (HaCaT). Inicialmente, foram plaqueadas placas de 96 poços com densidade celular de  $5 \times 10^3$  células por poço em 100  $\mu\text{L}$  de meio. Depois de 24 horas de incubação, tempo necessário para aderência celular, o meio foi substituído pelos tratamentos. Foram preparadas 5 réplicas, das quais foram aplicadas 100  $\mu\text{L}$  do extrato de *A. ambotay* solubilizado inicialmente a 1% de etanol 70% (v/v) em meio de cultura DMEM, sendo a faixa de concentração teste variando de 7,81 a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O controle do experimento foi realizado nas mesmas condições, porém aplicados apenas meio de cultura sem o extrato. Além disso, foi preparado o controle do solvente por meio da adição de 1% de etanol 70% em meio DMEM. Essas placas foram novamente incubadas a 37 °C à 5%  $\text{CO}_2$  pelo período de 48 horas. Ao término desse tempo, os tratamentos foram removidos, os poços lavados com 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) e aplicado a solução de MTT a 10% [(10  $\mu\text{L}$  de MTT (5  $\text{mg mL}^{-1}$ ) e 90  $\mu\text{L}$  de DMEM]. As placas foram novamente incubadas por 3 horas e, então, os cristais de formazana foram solubilizados com 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec). A absorvância foi medida em espectrofotômetro com leitor de microplaca em comprimento de onda fixo de 540 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de viabilidade celular (Equação 2) comparando o controle (células não tratadas) com os tratamentos e foi calculado a concentração inibitória de 50% ( $\text{CI}_{50}$ ), ou seja, concentração que reduz a viabilidade celular em 50% por meio da elaboração do gráfico de mortalidade celular em função das concentrações, usando o *Microsoft Office Excel*.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

onde:  $A_{\text{amostra}}$  é o valor da absorvância obtida após reação com MTT referente às células tratadas com diferentes concentrações do extrato;  $A_{\text{controle}}$  equivale ao valor da absorvância após reação com MTT de células não tratadas, ou seja, que foi adicionado apenas meio de cultura.



A análise estatística aplicada foi a análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste de Bonferroni, sendo valores de  $p < 0,05$  considerados estatisticamente diferentes.

#### 4.3.3 Atividade antiproliferativa do extrato seco de *A. ambotay* em células de carcinoma mamário

A atividade antiproliferativa do extrato seco de *A. ambotay* foi avaliada pelo método de redução do sal de MTT (MOSMANN, 1983), com metodologia já descrita no item 4.3.2 desse trabalho. Foi aplicado frente às linhagens tumorais de câncer de mama MDA-MB-231, MCF7 e 4T1 e observada a redução da viabilidade celular em função dos tratamentos. A faixa de concentração do extrato de *A. ambotay* utilizada foi de 7,81 até 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O controle positivo foi realizado pela adição de meio de cultura sem a presença do extrato e o controle do solvente pela adição de 1% de etanol 70% (v/v) em meio de cultura.

Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de viabilidade celular (Equação 2) comparando o controle (células não tratadas) com os tratamentos e foi calculada a  $CI_{50}$ , através elaboração do gráfico de mortalidade celular em função das concentrações, usando o *Microsoft Office Excel*. A análise estatística aplicada foi a ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni, sendo valores de  $p < 0,05$  considerados estatisticamente diferentes.

#### 4.4 Ensaio de letalidade para *Artemia salina*

O ensaio de letalidade para *Artemia salina* foi realizado de acordo com modelo descrito por Meyer e colaboradores (1982), com modificações. Os ovos encistados do microcrustáceo foi obtido no estabelecimento Maramar Aquacultura (Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil) e incubados em água marinha artificial com  $\text{pH} = 8-9$  à temperatura ambiente. Depois de 48 horas de incubação, os ovos eclodiram e 10 unidades do microcrustáceo foram coletados e adicionados em poços contendo o extrato seco das cascas de *A. ambotay* solubilizados inicialmente em 2,5% de DMSO com volume completado para 5 mL usando água do mar artificial. O extrato foi testado em triplicata nas concentrações de 10 a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Como controle negativo foram utilizados água do mar artificial e DMSO (2,5%). Além disso, como controle positivo foi utilizado o timol na faixa de concentração de 10 a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Depois de 24 horas de tratamento, o

número de microcrustáceos sobreviventes foi obtido e a porcentagem de morte calculada. A concentração letal de 50% ( $CL_{50}$ ) e o erro padrão foram calculados pela análise Probit (Finney, 1971). A análise estatística aplicada foi o teste T de *Student* e valores de  $p < 0,05$  apresentaram diferença estatística significativa.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada para o extrato seco obtido das cascas de *A. ambotay* e os resultados encontram-se na Tabela 3. A partir dos valores de absorvância encontrados para cada concentração testada, foi possível construir um gráfico de dose-dependência e através da equação da reta obter a  $CI_{50}$ . Por meio da análise desse parâmetro foi possível observar que não houve diferença significativa entre a atividade antioxidante do extrato bruto ( $CI_{50} = 8,30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e o padrão de referência – o resveratrol ( $CI_{50} = 8,60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ( $p = 0,2841$ ).

Martins e colaboradores (2016) classificaram a atividade antioxidante como ótima ( $CI_{50} < 15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), boa ( $15 \mu\text{g mL}^{-1} < CI_{50} < 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), média ( $50 \mu\text{g mL}^{-1} < CI_{50} < 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e fraca ( $CI_{50} \geq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Portanto, o extrato de *A. ambotay* apresenta ótima atividade antioxidante e, além disso, possui atividade semelhante ao resveratrol, molécula de origem natural que possui potente atividade já comprovada na literatura científica (PANGENI et al., 2014; BITTERMAN e CHUNG, 2014; GAMBINI et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2015).

**Tabela 3.** Atividade Antioxidante do extrato de *A. ambotay* e do resveratrol.

Amostra	$CI_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$
Extrato de <i>A. ambotay</i>	$8,30 \pm 0,12^{\text{n.s.}}$
Resveratrol	$8,60 \pm 0,40$

O sobrescrito (n.s.) indica que não houve diferença significativa entre resveratrol e o extrato de *A. ambotay* com valor de  $p > 0,05$  analisado pelo teste t de *Student* (média  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$ ).

Uma das características de células tumorais é o maior consumo de energia, devido ao metabolismo acelerado e ao aumento da taxa de proliferação. Como consequência, há o acúmulo de EROs, os quais podem desencadear o desenvolvimento de novas células tumorais através da mutação do DNA genômico (GORRINI, HARRIS e WAK, 2013), da expressão de oncogenes (ZIECH et al., 2010) e da modulação da apoptose celular (HALLIWELL, 2007). Portanto, a descoberta de novas moléculas com atividade

antioxidante pode auxiliar no tratamento do câncer por meio da neutralização de EROs, reduzindo a toxicidade gerada pelos mesmos.

Diferentes estudos envolvendo espécies do gênero *Annona* relatam atividade antioxidante para os extratos obtidos de diferentes partes das plantas e empregando o mesmo método analítico usado no nosso estudo (DPPH). Roesler e colaboradores (2007) encontraram  $CI_{50}$  superior ao presente estudo para o extrato das cascas ( $CI_{50} = 48,82 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e sementes ( $CI_{50} = 31,14 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *A. crassiflora*, assim como Kalidindi e colaboradores (2015) para o extrato clorofórmico das folhas ( $CI_{50} = 308,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *A. squamosa* Linn. Simo e colaboradores (2018) encontraram  $CI_{50}$  de  $54,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $40,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $18,8 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o extrato etanólico das folhas, do tronco, e das raízes de *A. muricata*, respectivamente.

Formagio e colaboradores (2013) obtiveram resultados próximos ao presente estudo para as frações acetato de etila ( $CI_{50} = 8,53 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e hidrometanólico ( $CI_{50} = 10,57 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) obtidos das folhas de *A. dioica* St. Hill. Já em estudo realizado por Roduan e colaboradores (2018), referente às frações metanólica, diclorometânica, etanólica e hexânica das folhas de *Annona muricata*, apenas a primeira fração apresentou atividade antioxidante menor que a do presente estudo ( $CI_{50} = 3,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Trabalhos presente na literatura científica demonstraram correlação entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante para membros pertencentes à família Annonaceae. As espécies *A. squamosa* (RUIZ-TÉRAN, MEDRANO-MARTÍNEZ, NAVARRO-OCAÑA, 2008), *A. cuneata* Oliv. (KHALLOUKI et al., 2011), *A. coriacea* e *A. sylvatica* (BENITES et al., 2015) são exemplos dessa relação de estrutura-atividade. Do Santos e colaboradores (2018) também atribuíram o potencial antioxidante do extrato metanólico obtido das folhas de *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Benth. & Hook. f. ( $CI_{50} = 22,46 \pm 1,76 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) à presença do conteúdo fenólico e flavonoides.

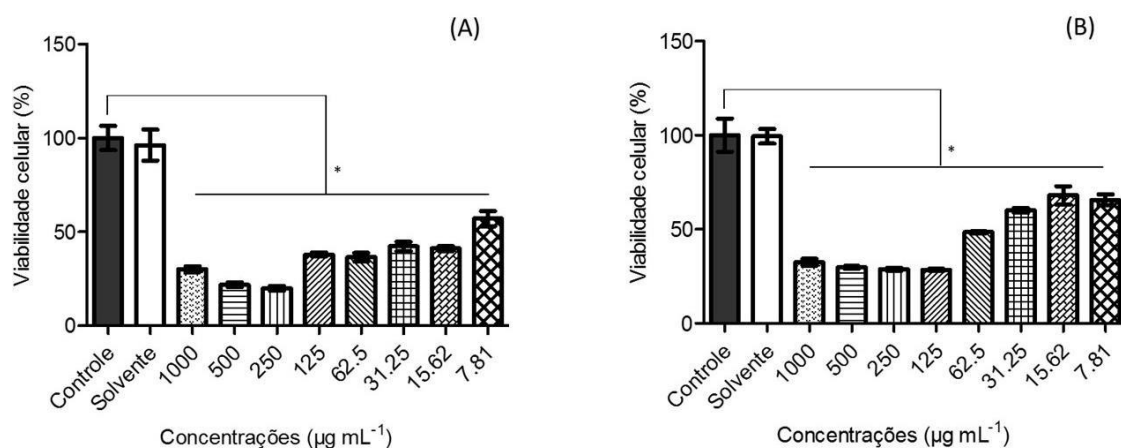
Em relação aos compostos isolados de espécies pertencentes ao gênero *Annona*, Lima, Pimenta e Boaventura (2010) avaliaram a atividade de doze acetogeninas da *A. cornifolia* e demonstraram que as mesmas possuíam atividade antioxidante com  $CI_{50}$  variando de  $1,95 \pm 0,34 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $0,99 \pm 0,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Considerando os dados acima expostos, o resultado obtido nesse estudo para a atividade antioxidante possivelmente pode ser explicado pela presença dos diferentes compostos bioativos presente no extrato bruto das cascas de *A. ambotay*. Oliveira e colaboradores (1987), ao analisarem o extrato benzênico e a fração acetato de etila das cascas do tronco de *A. ambotay*, identificaram a presença de diferentes compostos com

atividade antioxidante já descrita na literatura científica, tais como a quercetina (D'ANDREA, 2015), kaempferol (CHEN e CHEN, 2013) e catequina (BERNATONIENE E KOPUSTINSKIENE, 2018).

## 5.2 Viabilidade celular

A citotoxicidade foi avaliada frente a linhagens celulares sadias de fibroblastos e queratinócitos e os resultados estão expressos na Figura 10 (A e B). Pode ser observada a redução de 43% até 84% na viabilidade celular frente aos fibroblastos murinos (L929) (Figura 10A), quando comparado ao grupo controle, sendo evidenciado efeito citotóxico em todas as concentrações testadas. Além disso, em relação aos queratinócitos (HaCaT), a redução na viabilidade celular variou de 32% até 72% (Figura 10B) quando comparado ao grupo controle.



**Figura 10.** Viabilidade celular de fibroblastos murino (L929) (A) e queratinócitos humano (HaCaT) (B) em função dos tratamentos com extrato seco de *Annona ambotay* por um período de 48 horas. O \* indica diferença estatística significativa das concentrações do extrato de *A. ambotay* quando comparadas ao grupo controle, com valores de  $p < 0,05$  realizado pela ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni.

O efeito citotóxico observado possivelmente está relacionado à presença de metabólitos secundários, dentre os quais merecem destaque as acetogeninas - importante classe de compostos presente em extratos de plantas do gênero *Annona* (TUNDIS, XIAO e LOIZZO, 2017). Essas apresentam atividade pesticida, antimalária, antiparasitária, antimicrobiana, inibidor do crescimento celular e citotóxico (ROHAM et al., 2016).

Freiburghaus e colaboradores (1996), ao analisarem a citotoxicidade dos extratos etéreos e diclorometano obtidos da casca do tronco de *Annona senegalensis* em

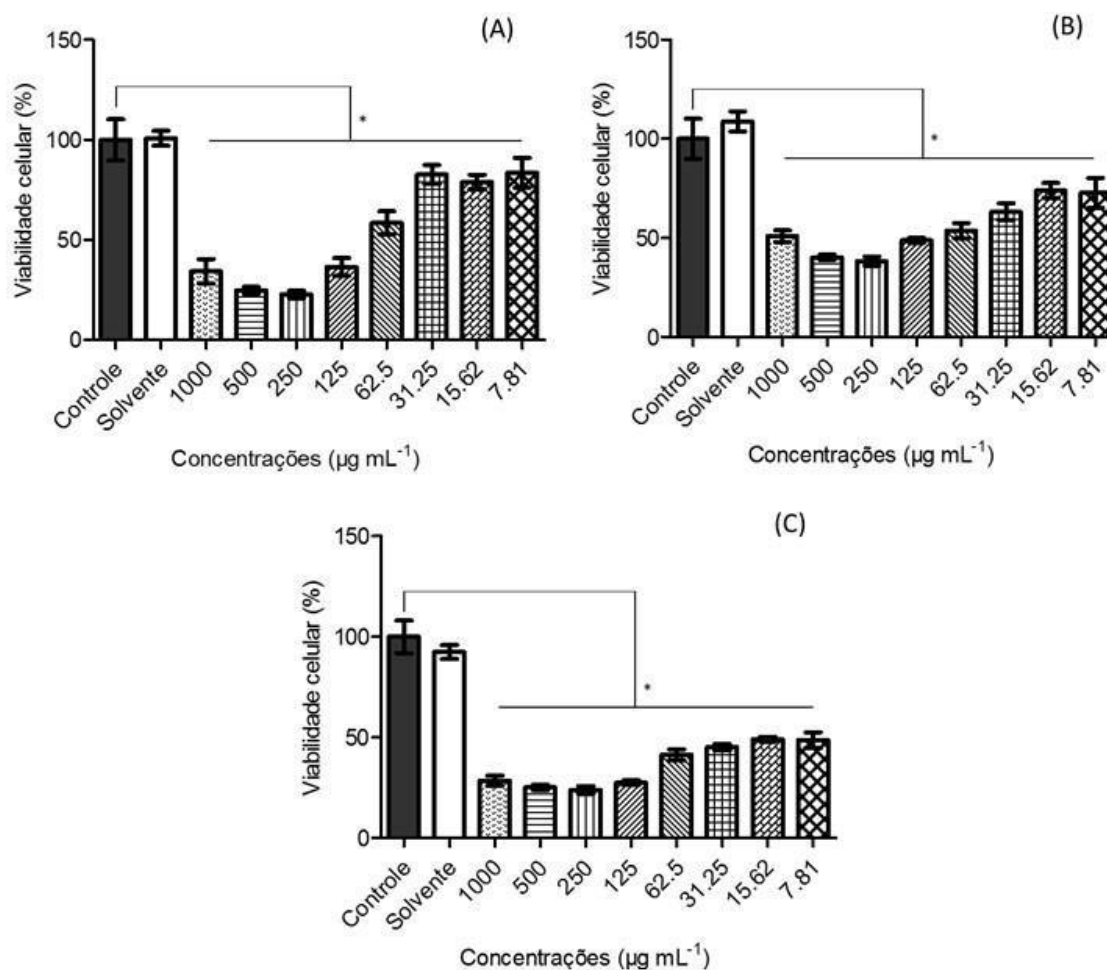
fibroblastos humanos (WI-38), verificaram que as maiores concentrações que não afetaram o crescimento celular foram  $56 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Estudo realizado por Santos e colaboradores (2015) avaliando a citotoxicidade do extrato hexânico e metanólico das sementes de *Porcelia macrocarpa* (Annonaceae) frente à linhagem de fibroblastos (L929), obtiveram  $\text{CI}_{50}$  superior a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Justino e colaboradores (2016) avaliaram a atividade citotóxica do extrato etanólico das cascas do fruto de *Annona crassiflora* frente à linhagem de fibroblasto murino (NIH/3T3) e obtiveram  $\text{CI}_{50} = 240 \pm 3,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Em relação à citotoxicidade em queratinócitos humano (HaCat), George e colaboradores (2012) avaliaram a atividade do extrato butanólico das folhas de *Annona muricata* Linn. frente à essa linhagem e obtiveram  $\text{CI}_{50} = 30,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em outro trabalho realizado com as frações diclorometânica, hexânica e metanólica obtidas da mistura de folhas e cascas de *Annona muricata* foi observado efeito tóxico frente à linhagem de células HaCaT, com  $\text{CI}_{50} = 38,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $59,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e  $59,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (CHAMCHEU et al., 2018).

Comparativamente aos resultados descritos acima, o extrato seco de *Annona ambotay* demonstrou efeito citotóxico mais proeminente para fibroblastos murinos (L929), os quais apresentaram alteração no padrão de crescimento celular, com variação de 16% a 57% na viabilidade celular nas concentrações testadas ( $7,81$  a  $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Em relação ao efeito citotóxico em queratinócitos (HaCaT), foi observada toxicidade menor ou similar ( $\text{CI}_{50} = 60,65 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) desse estudo quando comparado à diferentes frações de extratos e outras espécies vegetais pertencentes ao gênero *Annona*.

### 5.3 Atividade antiproliferativa

O efeito antiproliferativo do extrato seco das cascas de *A. ambotay* foi avaliado frente às linhagens tumorais de câncer de mama e estão descritos na Figura 11. Foi observada uma variação na viabilidade celular de 22% a 83% para MD-MB-231 (Figura 11A), de 38% a 74% para MCF7 (Figura 11B) e de 23% a 49% para 4T1 na faixa de concentrações testadas, quando comparada ao grupo controle.



**Figura 11.** Avaliação do efeito antiproliferativo frente às linhagens tumorais de câncer de mama humano MDA-MB-231 (A), MCF7 (B) e murino 4T1 (C) em função dos tratamentos com extrato seco de *Annona ambotay* pelo período de 48 horas. O \* indica diferença estatística significativa das concentrações do extrato de *A. ambotay* quando comparadas ao grupo controle, com valores de  $p < 0,05$  realizado pela ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni.

Gavamukulya e colaboradores (2014) analisaram o extrato etanólico das folhas de *Annona muricata* em células de câncer de mama humano (MDA-MB-231) e encontraram uma resposta de dose-dependência com  $CI_{50} = 248,77 \mu\text{g mL}^{-1}$  por um período de exposição de 72 horas. Najmuddin e colaboradores (2016) demonstraram o efeito antiproliferativo de 19 extratos brutos das folhas de *Annona muricata* de diferentes regiões da Malásia e encontraram variação de  $CI_{50}$  de  $221,67 \mu\text{g mL}^{-1}$  à  $799,67 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a linhagem de câncer de mama MCF7 e  $350 \mu\text{g mL}^{-1}$  até  $769,44 \mu\text{g mL}^{-1}$  para MDA por um tempo de exposição de 72 horas. Outro trabalho também avaliou a atividade antiproliferativa do extrato bruto das folhas de *Annona muricata*, no qual o valor de  $CI_{50}$  está presente na faixa de concentração entre 100 e  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  para ambas linhagens

celulares MDA-MB-231 e MCF7 por um período de tratamento de 48 horas (KIM et al., 2018).

Nam e colaboradores (2018) analisaram diferentes extratos do fruto maduro e imaturo de *Asimina triloba* (L) Dunal (Annonaceae) frente à diversas linhagem de células tumorais, dentre elas as de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF7. Para essas, o extrato etanólico do fruto imaturo apresentou maior atividade antiproliferativa, com  $CI_{50} = 125,64 \pm 18,50 \mu\text{g mL}^{-1}$  para MDA e  $CI_{50} = 112,30 \pm 5,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ainda referente a esse estudo, os autores observaram a relação linear entre a presença de acetogeninas e a atividade antiproliferativa, evidenciando a presença de diferentes tipos de acetogeninas de acordo a maturidade do fruto e o tipo de extrato.

As acetogeninas é uma classe de compostos bioativos identificadas em diferentes partes de espécies vegetais pertencentes à família Annonaceae (MOGHADAMTOUSI et al., 2015). São compostos derivados de um policetídeo e são caracterizadas estruturalmente por possuir uma longa cadeia alifática, com a presença de anel lactônico, anéis tetrahydrofurano e grupos oxigenados (TUNDIS, XIAO e LOIZZO, 2017). Na literatura, essa classe de compostos está relacionada à toxicidade em linhagens celulares tumorais, incluindo aquelas resistentes à fármacos. O seu mecanismo de ação está associado à inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, processo esse envolvido na síntese de ATP. Dessa forma, células tumorais por possuírem metabolismo celular mais acelerado quando comparado à células saudáveis necessitam de uma demanda maior de ATP e, portanto, as acetogeninas podem funcionar com um promissor agente antitumoral (RADY et al., 2018). Portanto, a possível presença de acetogeninas no extrato seco das cascas de *A. ambotay* podem justificar o efeito antiproliferativo evidenciado frente a linhagens celulares de adenocarcinoma mamário.

Adicionalmente, o extrato seco de *A. ambotay* apresentou  $CI_{50} = 11,04 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a linhagem murina de câncer de mama (4T1). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer Americano, citado por Itharat e colaboradores (2004), um extrato bruto apresenta atividade citotóxica em ensaios preliminares quando se obter uma  $CI_{50} < 30 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Portanto, o extrato seco de *A. ambotay* foi considerado citotóxico para a linhagem celular 4T1.

Ao analisar os resultados de toxicidade frente às linhagens tumorais de câncer de mama, é possível observar o direcionamento do efeito antiproliferativo para linhagem tumoral 4T1. Essa é caracterizada por ser triplo negativas, apresentando baixa expressão de receptores de estrógeno, progesterona e fator de crescimento epidermal humano 2



(HER2) (HOLLIDAY e SPEIRS, 2011; ABU et al., 2018). Além disso, a linhagem 4T1 representa um modelo animal para o estágio IV do câncer de mama humana (ASSOCIAÇÃO TÉCNICO CIENTÍFICA PAUL EHRLICH, 2018), o qual é caracterizado por apresentar uma alta capacidade de metástase. Portanto, devido à alta toxicidade atribuída à essas linhagens celulares, o extrato de *Annona ambotay* representa uma possível e futura alternativa para o câncer de mama metastático triplo negativo, usualmente associado com uma alta taxa de mortalidade.

Em comparação aos dados apresentados acima presente na literatura, o efeito citotóxico do extrato seco de *Annona ambotay* foi maior para ambas linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF7, com  $CI_{50} = 116,32 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $CI_{50} = 126,87 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

#### **5.4 Letalidade em *Artemia salina***

Os resultados de letalidade em *Artemia salina* estão descritos na Tabela 4. O extrato seco de *A. ambotay* apresentou  $CL_{50}$  de  $296,78 \mu\text{g mL}^{-1}$ . De acordo com Meyer e colaboradores (1982), um extrato demonstra toxicidade para *A. salina* quando a  $CL_{50}$  for menor que  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Portanto, o extrato de *A. ambotay* pode ser classificado como tóxico.

**Tabela 4.** Valores de  $CL_{50}$  para o extrato seco *Annona ambotay* e controle positivo referente ao ensaio de letalidade em *Artemia salina* após 24 horas de tratamento.

Substâncias	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Extrato de <i>A. ambotay</i>	$296,98 \pm 5,45^*$
Timol	$23,0 \pm 2,7$

O sobrescrito \* indica diferença estatística significativa entre o padrão (timol) e o extrato seco de *A. ambotay* com valores de  $p < 0,05$  analisado pelo teste t de *Student* (média  $\pm$  erro padrão,  $n=5$ ).

Trabalhos publicados na literatura científica demonstram resultados de toxicidade em *Artemia salina* referente à extratos obtidos de espécies do gênero *Annona*. Pimenta e colaboradores (2003) avaliaram a toxicidade de dezoito diferentes extratos obtidos de sementes, folhas e tronco das espécies de *Annona crassiflora*, *Annona nutans*, *Annona hypoglauca* e *Annona cherimola* contra *Artemia salina* e evidenciam suas atividades tóxicas. Além disso, os mesmos autores correlacionaram essa atividade com a presença de acetogeninas.

Os extratos metanólico das cascas dos frutos de *Annona squamosa* L. e *Annona reticalata* L. também apresentaram toxicidade, com  $CL_{50}$  de  $236,55 \pm 2,89 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $741,28 \pm 8,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, de acordo com Chel-Guerrero e colaboradores (2018). Outro trabalho referente aos extratos etanólicos obtidos das folhas e das cascas do caule de *Annona muricata* apresentaram toxicidade com  $CL_{50} = 324,07 \mu\text{g mL}^{-1}$  e com  $CL_{50} = 196,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (SILVA et al., 2015).

O ensaio de letalidade em *Artemia salina* tem mostrado significativa correlação com a atividade antitumoral *in vitro* (ARCANJO et al., 2012; MCGAW, ELGORASHI E ELOFF, 2014), em linhagens de células de tumores sólidos humano, e *in vivo* (HAMIDI, JOVANOVA E PANOVSKA, 2014), representando uma importante ferramenta de triagem para o desenvolvimento de novos fitofármacos.

Estudos prévios referentes à extratos obtidos de espécies pertencentes ao gênero *Annona* mostraram ação antitumoral. Suresh e colaboradores (2011), usando o extrato etanólico das raízes de *Annona reticulata*, demonstrou efeito antiproliferativo significativo do mesmo contra as linhagens de carcinoma de pulmão humano (A549), leucemia mielogênica crônica de medula óssea humana (K562), tumorais do colo do útero humano (HeLa) e adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB). Adicionalmente, Chen e

colaboradores (2012) analisaram o extrato das sementes de *Annona squamosa*, evidenciando um efeito antitumoral frente à linhagem de células tumorais humanas A549 ( $CI_{50} = 3,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), HeLa ( $CI_{50} = 13,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), MCF7 ( $CI_{50} = 0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e carcinoma de fígado humano HepG2 ( $CI_{50} = 0,36 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Portanto, os resultados observados nesse estudo referente ao efeito antiproliferativo do extrato seco de *Annona ambotay* associado à toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, justifica a realização de ensaios futuros para melhor investigação do potencial antitumoral dessa espécie vegetal.

## 6 CONCLUSÃO

A análise conjunta dos dados permite concluir que o extrato seco das cascas de *Annona ambotay* apresentou atividades biológicas promissoras. Foi estabelecido o potencial antioxidante do extrato, com resultado similar ao padrão resveratrol, bem como a toxicidade frente às linhagens sadias de fibroblasto murino (L929) e queratinócito humano (HaCaT). Além disso, apresentou redução da viabilidade celular nas linhagens celulares tumorais de câncer de mama (MDA-MB-231, MCF7 e 4T1), evidenciando o efeito antiproliferativo presente no extrato. Por meio do ensaio de letalidade em *Artemia salina* a toxicidade foi confirmada, no qual esse dado corrobora com os resultados de citotoxicidade nas linhagens tumorais.

Portanto, essa espécie vegetal pode ser usada como objeto de estudo na pesquisa para melhor estabelecimento de suas atividades farmacológicas e possíveis mecanismos de ação, principalmente relacionada à atividade antitumoral, a qual está fortemente relacionada às espécies pertencentes ao gênero *Annona* e à família *Annonaceae*.

## REFERÊNCIAS

ABU, N.; ZAMBERI, N. R.; YEAP, S. K.; NORDIN, N.; MOHAMAD, N. E.; ROMLI, M. F.; RASOL, N. E.; SUBRAMANI, T.; ISMAIL, N. H.; ALITHEEN, N. B. Subchronic toxicity, immunoregulation and anti-breast tumor effect of Nordamnacantal, an anthraquinone extracted from the stems of *Morinda citrifolia* L. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 31-41, 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). 2016. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Artemia* sp (Crustacea, Brachiopoda). ABNT NBR 16530:2016

ACEVEDO, F.; HERMOSILLA, J.; SANHUEZA, C.; MORA-LAGOS, B.; FUENTES, I.; RUBILAR, M.; CONCHEIRO, A.; ALVAREZ-LORENZO, C. Gallic acid loaded PEO-core/zein-shell nanofibers for chemopreventive action on gallbladder cancer cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 119, p. 49-61, 2018.

ADEM, F. A.; KUETE, V.; MBAVENG, A.T.; HEYDENREICH, M.; KOCH, A.; NDAKALA, A.; IRUNGU, B.; YENESEW, A.; EFFERTH, T. Cytotoxic flavonoids from two *Lonchocarpus* species. **Natural Product Research**, v. 16, p.1-9, 2018.

AHMED, S.; SAMI, A.; XIANG, J. HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer. **Breast Cancer**, v. 22, n. 2, p. 101-116, 2015.

AL-MUBARAK, M.; SACHER, A.G.; OCANA, A.; VERA-BADILLO, F.; SERUGA, B.; AMIR, E. Fulvestrant for advanced breast cancer: A meta-analysis. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 7, p. 753-758, 2013.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Types of breast cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer.html>>. Acesso em: 18 de junho de 2018a.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Surgery for breast cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/surgery-for-breast-cancer.html>>. Acesso em: 18 de junho de 2018b.

ANAMPA, J.; MAKOWER, D.; SPARANO, J. A. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. **Bmc Medicine**, v. 13, n. 1, p. 195-208, 2015.

ARCANJO, D. D. R.; ALBUQUERQUE, A. C. M.; MELO-NETO, B.; SANTANA, L. C. L. R.; MEDEIROS, M. G. F., CITÓ, A. M. G. L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.

ASSIS, M. F. L.; SANTOS, E. C. O.; JESUS, I. M.; JESUS, M. I.; PINTO, W. V. M.; MEDEIROS, R. L. F.; SILVA, D. F. L. Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em medicina e biologia. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 425-432, 2002.

ASSOCIAÇÃO TÉCNICO CIENTÍFICA PAUL EHRLICH. **4T1 cell line**. Duque de Caxias, RJ: APABCAM, 2018. Disponível em: <<http://bcrj.org.br/celula/4t1-mamarian-gland-mouse>>. Acesso em: 4 de agosto de 2018.

BAGLIA, M. L.; TANG, M.C.; MALONE, K.E.; PORTER, P.; LI, C.I. Family History and Risk of Second Primary Breast Cancer after In Situ Breast Carcinoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 27, n. 3, p. 315-320, 2018.

BATISTON, A. P.; TAMAKI, E. M.; SOUZA, L. A.; SANTOS, M. L. M. Conhecimento e prática sobre os fatores de risco para o câncer de mama entre mulheres de 40 a 69 anos. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 11, n. 2, p. 163-171, 2011.

BATTISTI, C.; GARLET, T. M. B.; ESSI, L.; HORBACH, R. K.; ANDRADE, A.; BADKE, M, R. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 3, p. 338-348, 2013.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M.C.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 43-50, 2010.

BENEDICT, A.; BROWN, R.E. Review of cost-effectiveness analyses in hormonal therapies in advanced breast cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 6, n. 11, p. 1789-1801, 2005.

BENITES, R. S. R.; FORMAGIO, A. S. N.; ARGANDOÑA, E. J. S.; VOLOBUFF, C. R. F.; TREVIZAN, L. N. F.; VIEIRA, M. C.; SILVA, M. S. Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annona coriacea* and *Annona sylvatica*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 3, p. 685-691, 2015.

BERETTA, G. L.; ZUNINO, F. Molecular mechanisms of anthracycline activity. **Topics in Current Chemistry**, v. 283, p.1-19, 2008.

BERNATONIENE, J.; KOPUSTINSKIENE, D. M. The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. E965-975, 2018.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BITTERMAN, J. L.; CHUNG, J. H. Metabolic effects of resveratrol: addressing the controversies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 8, p. 1473-1488, 2014.

BONNIER, F.; KEATING, M.E.; WRÓBEL, T. P.; MAJZNER, K.; BARANSKA, M.; GARCIA-MUNOZ, A.; BLANCO, A.; BYRNE, H.J. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n.1, p. 124-31, 2015.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-69, 2010.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Controle dos cânceres do colo do útero e de mama**. Brasília: MS, 2013. (Cadernos de Atenção Básica, n. 13).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS – PNPIC-SUS**. Brasília: MS; 2006 (Série B. Textos básicos de saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Regulação, Avaliação e Controle. Coordenação Geral de Sistemas de Informação. **Manual de bases técnicas da oncologia – SIA/SUS - Sistema de Informações Ambulatoriais**. Brasília: MS; 21ª Ed, 135 p., 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual de implantação de serviços de práticas integrativas e complementares no SUS**. Brasília: MS; 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Informe novembro de 2016**. Brasília: MS; 2016. Disponível em: <[http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/documentos/informe\\_novembro\\_PICS.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/documentos/informe_novembro_PICS.pdf)>. Acesso em: 28 de junho 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Informe maio de 2017**. Brasília: MS; 2017a. Disponível em: <[http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/documentos/informe\\_pics\\_mai2017.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/documentos/informe_pics_mai2017.pdf)>. Acesso em: 28 de junho 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em Oncologia**. Brasília: MS, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: MS; 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2017**. Brasília: MS; 2017b.

BRAVO, J.A.; CHANTRAINE, J.M.; SAAVEDRA, G.; SAUVAIN, M. Argentilactone from *Annona Ambotay*. **The Bolivian Journal of Chemistry**, v. 19, n.1, p. 6-11, 2002.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BUCHHOLZ, T. A; HUNT, K.K.; WHITMAN, G.J.; SAHIN, A.A.; HORTOBAGYI, G.N. Neoadjuvant chemotherapy for breast carcinoma. **Cancer**, v. 98, n. 6, p. 1150-1160, 2003.



CARLSON, R.W.; ALLRED, D.C.; ANDERSON, B.O.; BURSTEIN, H.J.; CARTER, W.B.; EDGE, S.B.; ERBAN, J.K.; FARRAR, W.B.; GOLDSTEIN, L.J.; GRADISHAR, W.J.; HAYES, D.F.; HUDIS, C.A.; JAHANZEB, M.; KIEL, K.; LJUNG, B.M.; MARCOM, P.K.; MAYER, I.A.; MCCORMICK, B.; NABELL, L.M.; PIERCE, L.J.; REED, E.C.; SMITH, M.L.; SOMLO, G.; THERIAULT, R.L.; TOPHAM, N.S.; WARD, J.H.; WINER, E.P.; WOLFF, A.C. Breast cancer. Clinical practice guidelines in oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 7, n. 2, p. 122-92, 2009.

CARVALHO, C. A.; MATTA, S. L. P.; MELO, F. C. S. A.; ANDRADE, D. C. F.; CARVALHO, L. M.; NASCIMENTO, P. C.; SILVA, M. B.; ROSA, M. B. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers – bignoniaceae): estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n.1, p. 51-57, 2009.

CAZARIN, K. C. C.; CORREA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.

CEILLEY, R. I. Mechanisms of action of topical 5-fluorouracil: Review and implications for the treatment of dermatological disorders. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 23, n. 2, p. 83-89, 2010.

CHALA, L. F.; BARROS, N. Avaliação das mamas com métodos de imagem. **Radiologia Brasileira**, v. 40, n. 1, p. 5-6, 2007.

CHAMCHEU, J.; RADY, I.; CHAMCHEU, R. N.; SIDDIQUE, A. B.; BLOCH, M. B.; MBEUMI, S. B.; BABATUNDE, A. S.; UDDIN, M. B.; NOUBISSI, F. K.; JURUTKA, P. W.; LIU, Y. Y.; SPIEGELMAN, V. S.; WHITFIELD, G. K.; EL SAYED, K. A. Graviola (*annona muricata*) exerts anti-proliferative, anti-clonogenic and pro-apoptotic effects in human non-melanoma skin cancer UW-BCC1 and A431 cells *in vitro*: involvement of hedgehog signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1791-1815, 2018.

CHAPMAN, K. L.; HOLZGREFE, H.; BLACK, L.E.; BROWN, M.; CHELLMAN, G.; COPEMAN, C.; COUCH, J.; CRETON, S.; GEHEN, S.; HOBERMAN, A.; KINTER, L.B.; MADDEN, S.; MATTIS, C.; STEMPLE, H.A.; WILSON, S. Pharmaceutical toxicology: Designing studies to reduce animal use, while maximizing human translation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 88-103, 2013.

CHEN, A. Y.; CHEN, Y. C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. **Food chemistry**, v. 138, n. 4, p. 2099-107, 2013.

CHEN, Y.; XU, S. S.; CHEN, J. W.; WANG, Y.; XU, H. Q.; FAN, N. B.; LI, X. Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenin compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 462-466, 2012.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC<sub>50</sub> estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 414-420, 2013.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, n. 6, p. 1161-1168, 2002.

CHUMSRI, S.; HOWES, T.; BAO, T.; SABNIS, G.; BRODIE, A. Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 125, n. 1-2, p. 13-22, 2011.

COLEMAN, C Early Detection and Screening for Breast Cancer. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 33, n. 2, p. 141-155, 2017.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p.1820-30, 2008.

D'AMATO, V.; RAIMONDO, L.; FORMISANO, L.; GIULIANO, M.; DE PLACIDO, S.; ROSA, R.; BIANCO, R. Mechanisms of lapatinib resistance in HER2-driven breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, n. 10, p. 877-883, 2015.

D'ANDREA, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?. **Fitoterapia**, v. 106, p. 256-71, 2016.

DALMAU, E.; ARMENGOL-ALONSO, A.; MUÑOZ, M.; SEGUÍ-PALMER, M.A. Current status of hormone therapy in patients with hormone receptor positive (HR+) advanced breast cancer. **The Breast**, v. 23, n. 6, p. 710-720, 2014.

DILRUBA, S.; KALAYDA, G. V. Platinum-based drugs: past, present and future. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 77, n. 6, p. 1103-1124, 2016.

DO SANTOS, R. C.; DE SOUZA, A. V.; ANDRADE-SILVA, M.; VERA CRUZ, K. C.; LEITE KASSUYA, C. A.; LIMA CARDOSO, C. A.; VIEIRA, M. D. C.; NAZARI FORMAGIO, A. S. Antioxidant, anti-rheumatic and anti-inflammatory investigation of extract and dicentrinone from *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Benth. & Hook. f. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 211, p. 9-16, 2018.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 223-229, 2015.

DOS SANTOS, J. A.; Polonini, H. C.; Suzuki, E. Y.; Raposo, N. R. B.; Silva, A. D. Synthesis of conjugated bile acids/azastilbenes as potential antioxidant and photoprotective agents. **Steroids**, v. 98, p.114-121, 2015.

EDIRIWEERA, M. K.; TENNEKOON, K. H.; SAMARAKOON, S. R. *In vitro* assays and techniques utilized in anticancer drug discovery. **Journal of Applied Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 38-71, 2018.

ENRIONE, J.; BLAKER, J.J.; BROWN, D.I.; WEINSTEIN-OPPENHEIMER, C.R.; PEPCZYNSKA, M.; OLGUÍN, Y.; SÁNCHEZ, E.; ACEVEDO, C.A. Edible scaffolds based on non-mammalian biopolymers for myoblast growth. **Materials**, v. 10, n. 12, p. 1404-1419, 2017.

FENG, S. S.; CHIEN, S. Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. **Chemical Engineering Science**, v. 58, n. 18, p. 4087-4114, 2003.

FERRAZ FILHA, Z. S.; LOMBARDI, J. A.; GUZZO, L. S.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) bioassay of extracts from *Lychnophoriopsis candelabrum* and different *Lychnophora* species. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 358-361, 2012.

FIORICA, J. V. Breast Cancer Screening, Mammography, and Other Modalities. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 59, n. 4, p. 688-709, 2016.

FORMAGIO, A. S. N.; KASSUYA, C. A. L.; NETO, F. F.; VOLOBUFF, C. R. F.; IRIGUCHI, E. K. K.; VIEIRA, M. C.; FOGLIO, M. A. The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p.1-8, 2013.

FORMAGIO, A.S.; VIEIRA, M.C.; VOLOBUFF, C.R.; SILVA, M.S.; MATOS, A.J.; CARDOSO, C.A.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E. *In vitro* biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 4, p. 308-15, 2015.

FREIBURGHHAUS F.; KAMINSKY, R.; NKUNYA, M. H.; BRUN, R. Evaluation of African medicinal plants for their *in vitro* trypanocidal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 1, p. 1-11, 1996.

GAMBINI, J.; INGLÉS, M.; OLASO, G.; LOPEZ-GRUESO, R.; BONET-COSTA, V.; GIMENO-MALLENCH, L.; MAS-BARGUES, C.; ABDELAZIZ, K.M.; GOMEZ-CABRERA, M.C.; VINA, J.; BORRAS, C. Properties of resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-13, 2015.

GAVAMUKULYA, Y.; ABOU-ELELLA, F.; WAMUNYOKOLI, F.; AEL-SHEMY, H. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and *in vitro* anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, p. S355-S363, 2014.

GEORGE, V. C.; KUMAR, D. R.; RAJKUMAR, V.; SURESH, P. K.; KUMAR, R. A. Quantitative assessment of the relative antineoplastic potential of the n-butanolic leaf extract of *Annona muricata* Linn. in normal and immortalized human cell lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 2, p. 699-704, 2012.

GHOSH, P.; THAKUR, I. S.; KAUSHIK, A. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 259-270, 2017.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 12, p. 931-947, 2013.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward?. **Biochemical Journal**, v. 401, n. 1, p.1-11, 2007.

HAMIDI, M. R.; JOVANOVA, B.; PANOVSKA, T. K. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. **Macedonian pharmaceutical bulletin**, v. 60, n. 1, p. 9-18, 2014.

HEL-GUERRERO, L. D.; SAURI-DUCH, E.; FRAGOSO-SERRANO, M. C.; PÉREZ-FLORES L. J.; GÓMEZ-OLIVARES, J. L.; SALINAS-ARREORTUA, N.; SIERRA-PALACIOS, E. D. C.; MENDOZA-ESPINOZA, J. A. Phytochemical profile, toxicity, and pharmacological potential of peels from four species of tropical fruits. **Journal of Medicinal Food**, v. 21, n. 7, p. 734-743, 2018.

HERNANDEZ, I.; KUMAR, A.; JODDAR, B. A bioactive hydrogel and 3D printed polycaprolactone system for bone tissue engineering. **Gels**, v. 3, n. 3, p. 26-45, 2017.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 4, p. 215-222, 2011.

HOOLEY, R. J.; ANDREJEVA, L.; SCOUTT, L. M. Breast Cancer Screening and Problem Solving Using Mammography, Ultrasound, and Magnetic Resonance Imaging. **Ultrasound Quarterly**, v. 27, n. 1, p. 23-47, 2011.

HORTOBAGYI, G. N.; CONNOLLY, J.L.; D'ORSI, C. J.; EDGE, S. B.; MITTENDORF, E. A.; RUGO, H. S.; SOLIN, L. J.; WEAVER, D., L.; WINCHESTER, D. J.; GIULIANO, A. Breast. **AJCC Cancer Staging Manual**, p. 589-636, 2017.

HUANG, L.; FENG, Z. L.; WANG, Y. T.; LIN, L. G. Anticancer carbazole alkaloids and coumarins from Clausena plants: A review. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 12, p. 881-888, 2017.

INCORVATI, J.; SHAH, S.; MU, Y.; LU, J. Targeted therapy for HER2 positive breast cancer. **Journal Of Hematology & Oncology**, v. 6, n. 1, p. 38-46, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil**. Rio de Janeiro, INCA; 2015.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P. J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P. J.; SAMPSON, J. H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 33-8, 2004.

JAMKHANDE, P. G.; WATTAMWAR, A. S. *Annona reticulata* Linn. (Bullock's heart): Plant profile, phytochemistry and pharmacological properties. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, n. 3, p. 144-52, 2015.

JASRA, S.; ANAMPA, J. Anthracycline use for early stage breast cancer in the modern era: a review. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 19, n. 6, p. 30-47, 2018.

JIANG, Z.; GU, M.; LIU, J.; LI, H.; PENG, J.; ZHANG, Y. Anticancer activity of crocin against cervical carcinoma (HeLa cells): Bioassessment and toxicity evaluation of crocin in male albino rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 180, p. 118-124, 2018.

JOHNSTONE, T. C.; SUNTHARALINGAM, K.; LIPPARD, S. J. Third row transition metals for the treatment of cancer. **Philosophical Transactions of The Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 373, n. 2037, p.20140185-20140185, 2015.

JUNIOR, L. C. L.; SILVA, C. V. G.; AGUIAR, B. G. M.; SOARES, J. S.; CAMPELO, S. M. A. Nutrigenômica do câncer de mama: fatores dietéticos e a expressão gênica – uma revisão sistemática. **Revista Interdisciplinar Ciência e Saúde**, v. 4, n.2, p. 135-142, 2017.

JUNIOR, R. G. O.; RABÊLO, S. V.; ARAÚJO, C. S.; SILVA, J. C.; DINIZ, T. C.; ALMEIDA, J. R. G. S. Prospecção tecnológica do gênero *annona* (annonaceae). **GEINTEC, Gestão Inovação e Tecnologia**, v. 4, n. 2, p. 850-8, 2014.

JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; VILELA, D. D.; PEIXOTO, L. G.; MARTINS, M. M.; TEIXEIRA, R. R.; MIRANDA, N. C.; DA SILVA, N. M.; DE SOUSA, R. M.; DE OLIVEIRA, A.; ESPINDOLA, F. S. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, p. 167-182, 2016.

KALIDINDI N, THIMMAIAH NV, JAGADEESH NV, NANDEEP R, SWETHA S, KALIDINDI B. Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. *Journal of food and drug analysis*, v. 23, n. 4, p. 795-802, 2015.

KELLY, C. M.; BUZDAR, A. U. Anastrozole. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 9, n. 6, p. 995-1003, 2010.

KHALLOUKI, F.; HAUBNER, R.; ULRICH, C. M.; OWEN, R. W. Ethnobotanical survey, chemical composition, and antioxidant capacity of methanolic extract of the root bark of *Annona cuneata* Oliv. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 11, p. 1397-1402, 2011.

KIM, J. Y.; DAO, T. T. P.; SONG, K.; PARK, S. B.; JANG, H.; PARK, M. K.; GAN, S. U.; KIM, Y. S. *Annona muricata* leaf extract triggered intrinsic apoptotic pathway to attenuate cancerous features of triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p.1-10, 2018

KIM, J.; GILBERT, J. L. *In vitro* cytotoxicity of galvanically coupled magnesium-titanium particles on human osteosarcoma SAOS2 cells: A potential cancer therapy. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, p.1-12, 2018.

KRISHNAMURTI, U.; SILVERMAN, J. F. HER2 in breast cancer: a review and update. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 21, n. 2, p. 100-107, 2014.

KÜMLER, I.; TUXEN, M. K.; NIELSEN, D. L. A systematic review of dual targeting in HER2-positive breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 2, p. 259-270, 2014.

LANG, J. E; WECSLER, J.S.; PRESS, M.F.; TRIPATHY, D. Molecular markers for breast cancer diagnosis, prognosis and targeted therapy. **Journal of Surgical Oncology**, v. 111, n. 1, p. 81-90, 2014.

LEBOEUF, M.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.

LEE, S. E.; HWANG, H. J.; HA, J. S.; JEONG, H.S.; KIM, J.H. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. **Life Sciences**, v. 73, n. 2, p. 167-179, 2003.

LEMAINE, V.; SIMMONS, P. S. The adolescent female: Breast and reproductive embryology and anatomy. **Clinical Anatomy**, v. 26, n. 1, p. 22-28, 2012.

LI, X.; Zhou, N.; WANG, J.; LIU, Z.; WANG, X.; ZHANG, Q.; LIU, Q.; GAO, L.; WANG, R. Quercetin suppresses breast cancer stem cells (CD44 + /CD24 - ) by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR-signaling pathway. **Life Sciences**, v. 196, p. 56-62, 2018.

- LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1129-1138, 2010.
- LIU, X.; RODEHEAVER, D. P.; WHITE, J. C.; WRIGHT, A. M.; WALKER, L. M.; ZHANG, F.; SHANNON, S. A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 97, p. 24-32, 2018.
- LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 96, n. 2, p. 147-152, 2000.
- LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330-338, 2003.
- LORENCETTI, A.; SIMONETTI, J. P. As estratégias de enfrentamento de pacientes durante o tratamento de radioterapia. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, v. 13, n. 6, p. 944-950, 2005.
- LÚCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R.; DA-CUNHA, E. V.; TAVARES, J. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 74, p. 233-409, 2014.
- LUISI, S. B.; BARBACHAN, J. J. D.; CHIES, J. A. B.; SANT'ANA FILHO, M. A cultura de células como ferramenta para estudos do comportamento pulpar. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 45, n. 1, p. 3-8, 2004.
- LUNA, J. S.; DOS SANTOS, A. F.; DE LIMA, M. R.; DE OMENA, M. C.; DE MENDONÇA, F. A.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.
- MA, P.; MUMPER, R. J. Paclitaxel nano-delivery systems: A comprehensive review. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 4, n. 2, p. 609-621, 2013.
- MAAS, P.J.; MAAS, H.; MIRALHA, J.M.; JUNIKKA, L. Flora da reserva ducke, Amazonas, Brasil: Annonaceae. **Rodriguésia**, v. 58, n. 3, p. 617-662, 2007.



MACEDO, J. A. B. **Plantas medicinais e fitoterápicos na atenção primária à saúde: contribuição para profissionais prescritores**. 2016. 49f. Monografia (Especialização em Gestão da Inovação de Medicamentos da Biodiversidade na modalidade EAD) - Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2016.

MADALENO, I. M. Plantas da medicina popular de São Luís, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 6, n. 2, p. 273-286, 2011.

MANATUNGA, D. C.; DE SILVA, R. M.; DE SILVA, K. M. N.; MALAVIGE, G. N.; WIJERATNE, D. T.; WILLIAMS, G. R.; JAYASINGHE, C. D.; UDAGAMA, P. V. Effective delivery of hydrophobic drugs to breast and liver cancer cells using a hybrid inorganic nanocarrier: A detailed investigation using cytotoxicity assays, fluorescence imaging and flow cytometry. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, v. 128, p. 18-26, 2018.

MANGINI, N. S.; WESOLOWSKI, R.; RAMASWAMY, B.; LUSTBERG, M.B.; BERGER, M.J. Palbociclib. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 49, n. 11, p. 1252-1260, 2015.

MARQUES, J. P.; LOPES, G. C. Alcaloides como agentes antitumorais: considerações químicas e biológicas. **Revista Uningá Review**, v. 24, n. 1, p. 56-61, 2015.

MARUPUDI, N.I.; HAN, J.E.; LI, K.W.; RENARD, V.M.; TYLER, B.M.; BREM, H. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 6, n. 5, p. 609-621, 2007.

MARTINS, F. J.; CANESCHI, C. A.; VIEIRA, J. L.; BARBOSA, W.; RAPOSO, N. R. Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p.34-39, ago. 2016.

MAURI, D.; PAVLIDIS, N.; IOANNIDIS, J. P. A. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. **Journal of The National Cancer Institute**, v. 97, n. 3, p. 188-194, 2005.

MCGAW, L. J.; ELGORASH, E. E.; ELOFF, J. N. 8 - Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells. **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**, p. 181-233, 2014.

MEYER, B.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MIGITA, N. A. **Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares.** 2012. 69f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biomédicas) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZAD, S.; MOHAN, G.; ALI, H. M.; KADIR, H. A. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. **International Journal of Molecular Science**, v. 16, n. 7, p. 15625-58, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAJMUDDIN, S. U. F. S.; ROMLI M. F.; HAMID, M.; ALITHEEN, N. B.; RAHMAN N. M. A. N. A. Anti-cancer effect of *Annona muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 311-331, 2016.

NAM, J. S.; PARK, S. Y.; LEE, H. J.; LEE, S.O.; JANG, H. L.; RHEE, Y. H. Correlation between acetogenin content and antiproliferative activity of pawpaw (*Asimina triloba* [L.] Dunal) fruit pulp grown in Korea. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 5, p. 1430-1435, 2018.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Breast Cancer Treatment (PDQ<sup>®</sup>) – Patient Version. Disponível em: < <https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq>>. Acesso em: 25 de junho de 2018.

NG, V. C.; JOHNSON, J. J.; CUELLAR, S. Targeting the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: Implications for the management of metastatic breast cancer. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, v. 21, n. 6, p. 433-442, 2014.

NI, L.; Zhong, X.H.; CHEN, X.J.; ZHANG, B.J.; BAO, M.F.; CAI, X.H. Bioactive norditerpenoids from *Cephalotaxus fortunei* var. *alpina* and *C. lanceolata*. **Phytochemistry**, v. 151, p. 50-60, 2018.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F.D.; GUILHERMINO, L.M.; VAN STAPPEN, G. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v. 144, n. 2, p. 453-462, 2006.

OLIN, J. L.; PIERRE, M. S. Aromatase Inhibitors in Breast Cancer Prevention. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 48, n. 12, p. 1605-1610, 2014.

OPPERMANN, C. P. **Entendendo o câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2014. 95p.

PAES, C.; NAKAGAMI, G.; MINEMATSU, T.; NAGASE, T.; HUANG, L.; SARI, Y.; SANADA, H. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone enhances keratinocyte migration and induces Mmp13 gene expression *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 427, n. 2, p. 273-279, 2012.

PANDYA, S.; MOORE, R. G. Breast Development and Anatomy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 54, n. 1, p. 91-95, 2011.

PANGENI, R.; SAHNI, J. K.; ALI, J.; SHARMA, S.; BABOOTA, S. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 8, p. 1285-1298, 2014.

PIMENTA, L. P. S.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G.; BOAVENTURA, M. A. Biological screening of annonaceous brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). **Phytomedicine**, v. 10, n. 2-3, p. 209-212, 2003.

PIMENTA, L.V; PINTO, G.B; TAKAHASHI, J.A.; SILVA, L.G.; BOAVENTURA, M.A. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**, v. 10, p.209-12, 2003.

PINTO, A. C.; ADES, F.; DE AZAMBUJA, E.; PICCART-GEBHART, M. Trastuzumab for patients with HER2 positive breast cancer: Delivery, duration and combination therapies. **The Breast**, v. 22, Sup. 2, p. S152-S155, 2013.

QUÍLEZ, A.M.; FERNÁNDEZ-ARCHE, M.A.; GARCÍA-GIMÉNEZ, M.D.; DE LA PUERTA, R. Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 225, p. 244-270, 2018.

RADY, I.; BLOCH, M. B.; CHAMCHEU, R. N.; BANANG MBEUMI, S.; ANWAR, M. R.; MOHAMED, H.; BABATUNDE, A. S.; KUIATE, J. R.; NOUBISSI, F. K.; EL SAYED, K. A.; WHITFIELD, G. K.; CHAMCHEU, J. C. Anticancer properties of graviola (*Annona muricata*): a comprehensive mechanistic review **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-39, 2018.

RAIES, A. B.; BAJIC, V. B. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 6, n. 2, p. 147-72, 2016.

RAMPERSAD, S.N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347-60, 2012.

RAVAOMANARIVO, L.H.; RAZAFINDRALEVA, H.A; RAHARIMALALA, F.N.; RASOAHANTAVELONIAINA, B.; RAVELONANDRO, P.H.; MAVINGUI, P. Efficacy of seed extracts of *Annona squamosa* and *Annona muricata* (Annonaceae) for the control of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 10, p. 798-806, 2014.

RINALDI, M. V. N.; DÍAZ, I. E. C.; SUFFREDINI, I. B.; MORENO, P. R. H. Alkaloids and biological activity of beribá (*Annona hypoglauca*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 77-83, 2017.

ROBSON, M; IM, S.; SENKUS, E.; XU, B.; DOMCHEK, S. M.; MASUDA, N.; DELALOGUE, S.; LI, W.; TUNG, N.; ARMSTRONG, A.; WU, W.; GOESSL, C.; RUNSWICK, S.; CONTE, P. olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 6, p. 523-533, 2017.

ROCCA, A.; ROCCA, A.; FAROLFI, A.; BRAVACCINI, S.; SCHIRONE, A.; AMADORI, D. Palbociclib (PD 0332991): targeting the cell cycle machinery in breast cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 15, n. 3, p. 407-420, 2013.

RODUAN, M. R. M.; HAMID, R. A.; KQUEEN, C. Y.; MOHTARRUDIN, N. Cytotoxicity, antitumor-promoting and antioxidant activities of *Annona muricata* in vitro. **Journal of Herbal Medicine**, p. 1-25, 2018.

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048-1054, 2007.

ROHAM, P. H.; KHARAT, K. R.; MUNGDE, P.; JADHAV, M. A.; MAKHIJA, S. J. Induction of mitochondria mediated apoptosis in human breast cancer cells (T-47D) by *Annona reticulata* L. leaves methanolic extracts. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 2, p. 305-311, 2016.

RUIZ-TERÁN F, MEDRANO-MARTÍNEZ A, NAVARRO-OCAÑA A. Antioxidant and free radical scavenging activities of plant extracts used in traditional medicine in Mexico. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1886-1893, 2008.

SALEHI, B.; ZUCCA, P.; SHARIFI-RAD, M.; PEZZANI, R.; RAJABI, S.; SETZER, W.N.; VARONI, E.M.; IRITI, M.; KOBARFARD, F.; SHARIFI-RAD, J. Phytotherapeutics in cancer invasion and metastasis. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 8, p. 1425-1449, 2018.

SANTOS, L. A.; CAVALHEIRO, A. J.; TEMPONE, A. G.; CORREA, D. S.; ALEXANDRE, T. R.; QUINTILIANO, N. F.; RODRIGUES-OLIVEIRA, A. F.; OLIVEIRA-SILVA, D.; MARTINS, R. C.; LAGO, J. H. Antitrypanosomal acetylene fatty acid derivatives from the seeds of *Porcelia macrocarpa* (annonaceae). **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8168-8180, 2015.

SANTOS, M. C.; TESSER, C. D. Um método para a implantação e promoção de acesso às Práticas Integrativas e Complementares na Atenção Primária à Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 11, p.3011-3024, 2012.

SANTOS, P. R. D.; MORAIS, A. A.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids from *Annona dioica*. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 369-400, 2003.

SCHERLIEß, R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, n. 1-2, p.98-105, 2011.

SCOTT, S. M.; BROWN, M.; COME, S. E. Emerging data on the efficacy and safety of fulvestrant, a unique antiestrogen therapy for advanced breast cancer. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 10, n. 5, p. 819-826, 2011.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 3, n. 4, p. 177-199, 2004.

SILVA, E. M. F.; NASCIMENTO, R. B. C.; BARRETO, F. S.; FILHO, M. O. M.; GRIZ, S. A. S.; SANTOS, A. F.; MOUSINHO, K. C. Estudo *in vitro* do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n.2, p. 277-283, 2015.

SIMIONI, C.; ZAULI, G.; MARTELLI, A.M.; VITALE, M.; SACCHETTI, G.; GONELLI, A.; NERI, L. M. Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. **Oncotarget**, v. 9, n. 24, p. 17181-17198, 2018.

SIMO, M. K.; NGUEPI, M. D.; SAMEZA, M. L.; TOGHUEO, R. K.; FEKAM, F. B.; FROLDI, G. Cameroonian medicinal plants belonging to Annonaceae family: radical scavenging and antifungal activities. **Natural Product Research**, v. 32, n. 17, p. 2092-2095, 2018.

SOTIRIOU, C.; PUSZTAI, L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 8, p. 790-800, 2009.

SOUSA, I. M. C.; TESSER, C. D. Medicina Tradicional e Complementar no Brasil: inserção no Sistema Único de Saúde e integração com a atenção primária. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 1, p. 1-15, 2017.

SREEJAYAN, N.; RAO, M. N. Free radical scavenging activity of curcuminoids. **Arzneimittelforschung**, v. 46, n. 2, p.169–72, 1996.

STOCKERT, J. C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R.W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 8, p.785-796, 2012.

SUN, Z.; ZHOU, C.; LIU, F.; ZHANG, W.; CHEN, J.; PAN, Y.; MA, L.; LIU, Q.; DU, Y.; YANG, J.; WANG, Q. Inhibition of breast cancer cell survival by Xanthohumol via modulation of the Notch signaling pathway *in vivo* and *in vitro*. **Oncology Letters**, v. 15, n. 1, p. 908-916, 2018.

SURESH, H. M.; SHIVAKUMAR, B.; HEMALATHA, K.; HEROOR, S. S.; HUGAR, D. S.; SAMBASIVA RAO, K. R. S. *In vitro* antiproliferative activity of *Annona reticulata* roots on human cancer cell lines. **Pharmacognosy Research**, v. 3, n. 1, p. 9-12, 2011.

SYLVESTER, P. W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. **Methods in Molecular Biology**, v. 716, p.157-168, 2011.

TAHERIAN-FARD, A.; SRIHARI, S.; RAGAN, M. A. Breast cancer classification: linking molecular mechanisms to disease prognosis. **Briefings in Bioinformatics**, v. 16, n. 3, p. 461-474, 2014.

TAKAHASHI, J. A.; PEREIRA, C. R.; PIMENTA, L. P.; BOAVENTURA, M. A.; SILVA, L. G. Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceae plants. **Natural Product Research**, v. 20, n. 1, p. 21-26, 2006.

TESSER, C. D. Práticas complementares, racionalidades médicas e promoção da saúde: contribuições poucos exploradas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1732-1742, 2009.

TOSS, A.; CRISTOFANILLI, M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 60-71, 2015.

TUNDIS, R.; XIAO, J.; LOIZZO, M. R. Annona species (Annonaceae): a rich source of potential antitumor agents?. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1398, n. 1, p. 30-36, 2017.

TURNER, N. C.; RO, J.; ANDRÉ, F.; LOI, S.; VERMA, S.; IWATA, H.; HARBECK N.; LOIBL, S.; BARTLETT, C. H.; ZHANG, K.; GIORGETTI, C.; RANDOLPH, S.; KOEHLER, M.; CRISTOFANILLI, M. Palbociclib in hormone-receptor-positive advanced breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 3, p. 209-219, 2015.

UTTARA, B.; SINGH, A.V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R.T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.

VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 1, p. 47-57, 2015.

VENDRAMIN, M. E.; COSTA, E. V.; SANTOS, E. P.; PINHEIRO, M. L. B.; BARISON, A.; Campos, F. R. Chemical constituents from the leaves of *Annona rugulosa* (Annonaceae). **Biochemical Systematics And Ecology**, v. 49, p. 152-155, 2013.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 384-387, 2007.

VIEDMA-RODRÍGUEZ, R.; BAIZA-GUTMAN, L.; SALAMANCA-GÓMEZ, F.; DIAZ-ZARAGOZA, M.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, G.; RUIZ ESPARZA-GARRIDO, R.; VELÁZQUEZ-FLORES, M.A.; ARENAS-ARANDA, D. Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (Review). **Oncology Reports**, v. 32, n. 1, p. 3-15, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Breast cancer: prevention and control. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>>. Acesso em 24/09/2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. Geneva, 2013. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/92455/9789241506090\\_eng.pdf;jsessionid=016DE592AC094DE3A3320B941BF26E1F?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/92455/9789241506090_eng.pdf;jsessionid=016DE592AC094DE3A3320B941BF26E1F?sequence=1)>. Acesso em: 25 de junho 2018.

YANG, G.; Nowsheen, S.; Aziz, K.; Georgakilas, A.G. Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, n. 3, p. 392-404, 2013.

ZIECH, D.; FRANCO, R.; GEORGAKILAS, A. G.; GEORGAKILA, S.; MALAMOU-MITSI, V.; SCHONEVELD, O.; PAPPAS, A.; PANAYIOTIDIS, M. I. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. **Chemico-biological Interactions**, v. 188, n. 2, p. 334-339, 2010.