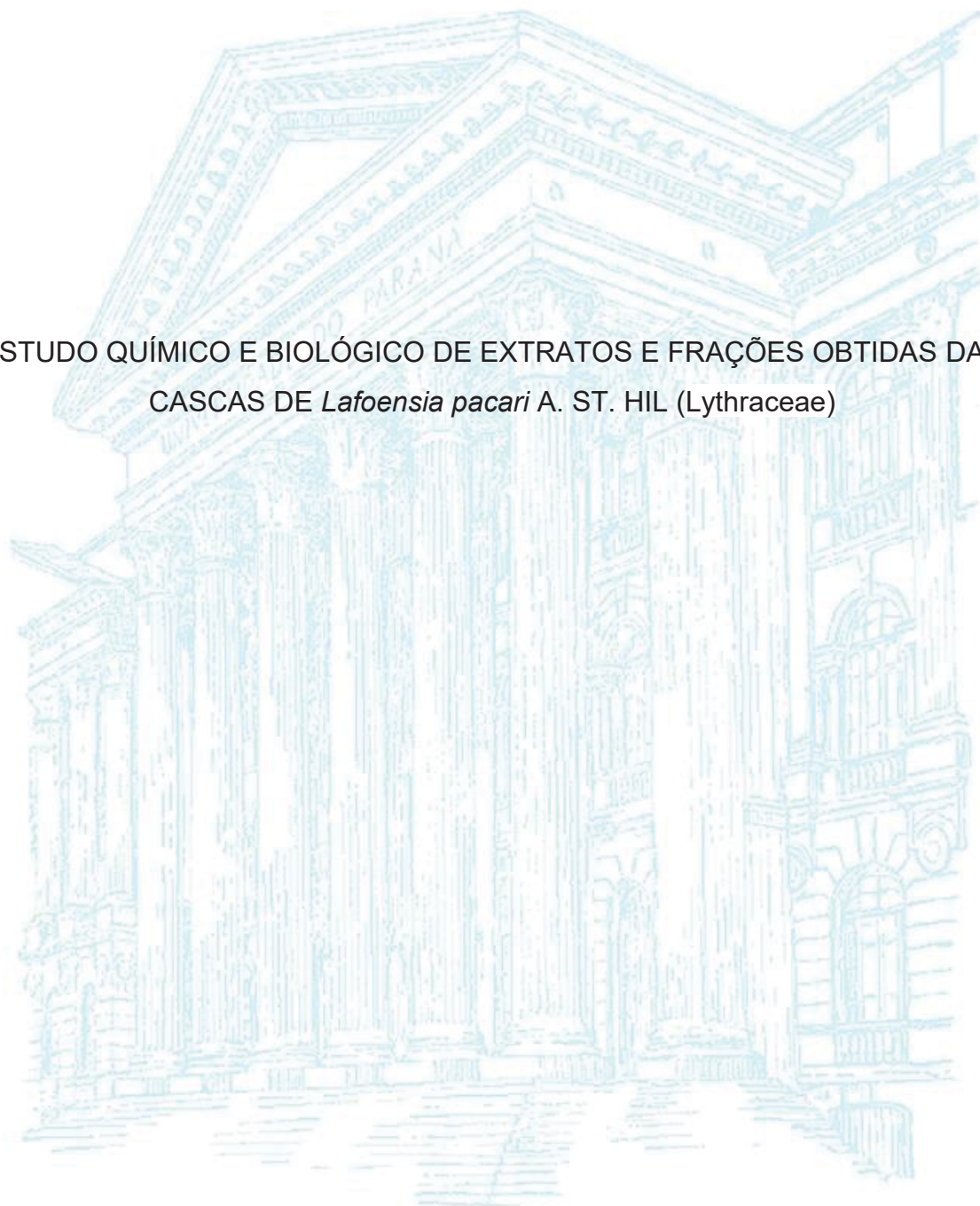


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA ANDRADE TAVERNA

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDAS DAS
CASCAS DE *Lafoensia pacari* A. ST. HIL (Lythraceae)



CURITIBA

2022

VANESSA ANDRADE TAVERNA

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDAS DAS
CASCAS DE *Lafoensia pacari* A. ST. HIL (Lythraceae)

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor
de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Wesley Mauricio de Souza
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Karina Bettega Felipe

CURITIBA

2022

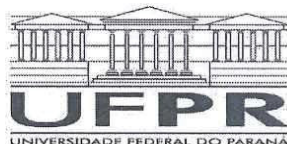
Vanessa Andrade Taverna
Estudo químico e biológico de extratos e frações obtidas das cascas de
Lafoensia pacari A. St. Hil (Lythraceae) [recurso eletrônico] / Vanessa Andrade
Taverna. – Curitiba, 2022.
1 arquivo online : PDF.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2022.

Orientador : Prof. Dr. Wesley Mauricio de Souza
Coorientador : Profa. Dra. Karina Bettega Felipe

1. Mamas - Câncer. 2. Plantas medicinais. 3. Farmacognosia. 4. Antioxidantes.
5. Agentes antineoplásicos. I. Souza, Wesley Mauricio de. II. Felipe, Karina
Bettega. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.99449



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **VANESSA ANDRADE TAVERNA** intitulada: **ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDAS DAS CASCAS DE *Lafoensia pacari* A. ST. HIL (Lythraceae)**, sob orientação do Prof. Dr. WESLEY MAURICIO DE SOUZA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Setembro de 2022.



WESLEY MAURICIO DE SOUZA

Presidente da Banca Examinadora



THAIS MARTINS GUIMARÃES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



RICARDO WAGNER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo amor incondicional, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em toda trajetória.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho e por me guiar em toda minha vida me dando muita força e fé.

Aos meus pais Elizete e Marcelo por me apoiarem em tudo sempre me dando muita força, amor, carinho e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu querido Vinicius que acima de tudo é um grande amigo, por todo amor e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos.

A minha família que sempre me deu muito apoio e amor, em especial a minha madrinha Elisabete.

Aos meus amigos por todo incentivo e por compreender a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador Prof^o Wesley por aceitar conduzir o meu trabalho de pesquisa, pelo incentivo e pela dedicação do seu escasso tempo ao meu projeto de pesquisa.

A Prof^a Karina por aceitar me co-orientar e pelas valiosas contribuições dadas durante todo o processo.

A todos os professores que abriram as portas dos seus laboratórios, cedendo equipamentos e emprestando reagentes, permitindo assim a realização deste trabalho, além dos valiosos compartilhamentos de seus conhecimentos.

A todos os professores e técnicos da Universidade Federal do Paraná que contribuíram para a realização deste trabalho e pela excelência da qualidade técnica de cada um.

A todos os meus colegas e amigos da pós graduação, Andressa, Elberth e Henrique que compartilharam dos inúmeros desafios que enfrentamos, sempre com o espírito colaborativo.

A minha amiga Bruna, pela ajuda e companhia nos experimentos, principalmente nos finais de semana e feriados, além de ter deixado a experiência da pesquisa muito mais leve e divertida.

As minhas filhas de quatro patas, Suzi, Maia e Meg, que mesmo sem saber me deram amor e carinho nos melhores e nos mais difíceis momentos de toda essa jornada.

A universidade Federal do Paraná por proporcionar todas as condições e estrutura para a realização desta pesquisa.

A todos os colaboradores terceirizados e da Universidade que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro, essencial para a conclusão deste trabalho.

*“Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia
impossível”.*

Charles Chaplin

RESUMO

A *Lafoensia pacari* é utilizada popularmente no auxílio ao tratamento de câncer, antimicrobiano e cicatrizante. Este trabalho objetivou realizar um estudo químico e biológico do extrato etanólico (70%) de cascas do caule de *Lafoensia pacari* (Lythraceae) e das frações obtidas por partição com os solventes acetato de etila, clorofórmio, *n*-butanol e o resíduo do particionamento. O perfil cromatográfico demonstrou que o extrato bruto e as frações possuem similaridade na composição química variando apenas as concentrações. Dezenove substâncias foram sugeridas nas amostras incluindo taninos hidrolisáveis, saponinas e triterpenos. Células tumorais de mama (MDA-MB-231) e não tumorais (McCoy) foram utilizadas nos ensaios biológicos “*in vitro*”. A citotoxicidade e seletividade foram determinados pelo método de redução do sal de tetrazólio (MTT) e demonstraram que as frações mais promissoras foram o resíduo (maior potencial citotóxico) e a fração acetato de etila (maior seletividade). O ensaio de adesão celular demonstrou que em concentrações maiores o ácido elágico aumenta a adesão das células MDA-MB-231. Entretanto, o extrato bruto não favoreceu a adesão, mesmo contendo ácido elágico. O teste de imunocitoquímica demonstrou que as células MDA-MB-231 não expressam transportadores OAT1 e OAT3, porém houve captação do ácido elágico pelas células 2 h após o tratamento, sendo esta captação significativamente suprimida quando foram tratadas com inibidor de transporte celular (probenicida). Contudo, tanto o extrato bruto quanto o ácido elágico foram capazes de inibir a migração celular em relação ao controle, porém, os mecanismos envolvidos nestes processos ainda não foram elucidados. A dosagem de NO demonstrou o estímulo da produção de forma dose-dependente. Os potenciais antimicrobiano e antioxidante também foram investigados. A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio do ensaio de microdiluição em caldo e foi possível observar efeito moderado do extrato bruto e das frações em relação à *Pseudomonas aeruginosa* e atividade moderada também da fração *n*-butanol e do resíduo sobre *Staphylococcus aureus*. O padrão de ácido elágico não demonstrou atividade antimicrobiana frente as bactérias testadas. Para a avaliação do potencial antioxidante foram utilizados 3 métodos distintos, sendo a redução do complexo fosfomolibdênico, redução do radical livre DPPH e análise de interpolação polinomial de Lagrange do extrato e frações. Todos os ensaios demonstraram alto potencial antioxidante, sendo que apenas as frações clorofórmica e *n*-butanol apresentaram um potencial de redução menor. Esses resultados corroboram com a quantificação elevada de flavonoides e polifenóis totais no extrato bruto etanólico, na fração acetato de etila e residual. Conclui-se com esse trabalho que o ácido elágico não é o único composto responsável pelas atividades biológicas e que estas devem estar atreladas ao sinergismo de inúmeros compostos encontrados na planta. Além disso, foi possível constatar que tanto o extrato etanólico quanto as frações das cascas de *Lafoensia pacari* demonstram efeitos em células tumorais de mama, principalmente em relação a migração e adesão, além de estimularem a produção de óxido nítrico auxiliando o potencial antineoplásico. Elevadas concentrações de flavonoides e poliofenóis foram encontradas no extrato bruto e nas frações acetato de etila, resíduo e *n*-butanol o que justifica os resultados dos potenciais antioxidantes destas amostras.

Palavras-chaves: *Lafoensia pacari*; câncer de mama; MDA-MB-231; ácido elágico; captação celular.

ABSTRACT

Lafoensia pacari is popularly used in the treatment of cancer, antimicrobial and healing. This work aimed to carry out a chemical and biological study of the ethanolic extract (70%) of *Lafoensia pacari* (Lythraceae) stem bark and the fractions obtained by partitioning with the solvents ethyl acetate, chloroform, *n*-butanol and the partitioning residue. The chromatographic profile showed that the raw extract and the fractions have similarity in chemical composition varying only the concentrations. Nineteen substances were suggested in the samples including hydrolysable tannins, saponins and triterpenes. Breast tumor cells (MDA-MB-231) and non-tumor cells (McCoy) were used in the “*in vitro*” biological assays. Cytotoxicity and selectivity were determined by the tetrazolium salt (MTT) reduction method and showed that the most promising fractions were the residue (higher cytotoxic potential) and the ethyl acetate fraction (higher selectivity). The cell adhesion assay demonstrated that at higher concentrations ellagic acid increases the adhesion of MDA-MB-231 cells. However, the raw extract did not favored adhesion, even containing ellagic acid. The immunocytochemistry test showed that MDA-MB-231 cells do not express OAT1 and OAT3 transporters, but there was uptake of ellagic acid by the cells 2 h after treatment, and this uptake was significantly suppressed when they were treated with a cell transport inhibitor (probenicid). However, both the raw extract and the ellagic acid were able to inhibit cell migration in comparison to the control, however, the mechanisms involved in these processes have not yet been elucidated. The NO dosage demonstrated the stimulation of production in a dose-dependent way. The antimicrobial and antioxidant potentials were also investigated. The antimicrobial activity was evaluated by broth microdilution assay and it was possible to observe a moderate effect of the raw extract and fractions in relation to *Pseudomonas aeruginosa* and moderate activity also of the *n*-butanol fraction and the residue on *Staphylococcus aureus*. The ellagic acid pattern did not demonstrate antimicrobial activity against the bacteria tested. For the evaluation of the antioxidant potential, 3 different methods were used: the reduction of the phosphomolybdenum complex, reduction of the DPPH free radical and analysis of Lagrange polynomial interpolation of the extract and fractions. All assays showed high antioxidant potential, and only the chloroform and *n*-butanol fractions showed a lower reduction potential. These results corroborate the high quantification of flavonoids and total polyphenols in the ethanolic raw extract, in the ethyl acetate and residual fraction. It is concluded with this work that ellagic acid is not the only compound responsible for the biological activities and these must be linked to the synergism of numerous compounds found in the plant. In addition, it was possible to verify that both the ethanolic extract and the fractions of *Lafoensia pacari* bark demonstrate effects on breast tumor cells, mainly in relation to migration and adhesion, and also to stimulating the production of nitric oxide, helping the antineoplastic potential. High concentrations of flavonoids and polyphenols were found in the raw extract and in the ethyl acetate, residue and *n*-butanol fractions, which justifies the results of the antioxidant potential of these samples.

Keywords: *Lafoensia pacari*; breast cancer; MDA-MB-231; ellagic acid; cell uptake.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA – 1	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DEMONSTRANDO O CRESCIMENTO RÁPIDO E DESORDENADO DE CÉLULAS CANCEROSAS E SUA CAPACIDADE DE INVADIR OS TECIDOS EM COMPARAÇÃO COM CÉLULAS NORMAIS ...	23
FIGURA – 2	FORMAÇÃO DE METÁSTASE TUMORAL	26
FIGURA – 3	PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DA CÉLULA TUMORAL A QUIMIOTERAPIA	29
FIGURA – 4	ISOFORMAS DA ENZIMA NO-SINTASE	33
FIGURA – 5	REPRESENTAÇÃO DA FORMAÇÃO DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	36
FIGURA – 6	MECANISMOS ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS	37
FIGURA – 7	PRINCIPAIS GRUPOS DE COMPOSTOS QUÍMICOS ENCONTRADOS EM PLANTAS MEDICINAIS	38
FIGURA – 8	REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL SIMPLIFICADA DAS BACTÉRIAS	40
FIGURA – 9	PARTES AÉREAS DE <i>Lafoensia pacari</i> A. ST.-HIL., EVIDENCIANDO FLORES (A-B), FRUTOS (B-C) E CAULE (D)	43
FIGURA – 10	ESTRUTURA QUÍMICA DO LUPEOL E DO β - SITOSTEROL	44
FIGURA – 11	REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ELÁGICO	46
FIGURA – 12	PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES DAS CASCAS DO CAULE DE <i>Lafoensia pacari</i> A. St.Hil	48
FIGURA – 13	FORMAÇÃO DO COMPLEXO QUERCETINA-ALUMÍNIO ³⁺ ..	59
FIGURA – 14	PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE DA FRAÇÃO DE ACETATO DE ETILA (A), FRAÇÃO RESIDUAL (B), FRAÇÃO <i>n</i> -BUTANÓLICA (C), EXTRATO BRUTO (70:30) (D), FRAÇÃO CLOROFÓRMICA (E) E FRAÇÃO HIDROETANÓLICA (50:50) (F) EVIDENCIANDO A SIMILARIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS E A PRESENÇA DE ÁCIDO ELÁGICO (RT = 36,036 MIN) EM TODOS OS EXTRATOS E FRAÇÕES	62

FIGURA – 15	PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD DOS PRINCIPAIS PICOS DO EXTRATO HIDROETANÓLICO 70% INCLUINDO OS TANINOS HIDROLISÁVEIS (TH), CATEQUINAS (CAT), ÁCIDO ELÁGICO (AE) E DERIVADOS, SAPONINAS (SAP) E TRITERPENOS (TRI)	63
FIGURA – 16	CLAE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA CASCAS DE <i>Lafoensia pacari</i> COMPARADO AO EXTRATO HIDROETANOLICO COM OS COMPOSTOS JÁ CARACTERIZADOS POR ATHERINO (2019)	64
FIGURA – 17	EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO NA ADESÃO CELULAR EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA HUMANO (MDA-MB-231) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NA AUSÊNCIA DAS MATRIZES (A) E NA PRESENÇA DE DE VITRONECTINA (15 µg/mL) (B) E FIBRONECTINA (15 µg/mL) (C)	71
FIGURA – 18	EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE CASCAS DO CAULE DE <i>Lafoensia pacari</i> NA ADESÃO CELULAR EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA HUMANO (MDA-MB-231) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NA AUSÊNCIA DE MATRIZES (A) E NA PRESENÇA DAS MATRIZES VITRONECTINA (15 µg/mL) (B) E FIBRONECTINA (15 µg/mL) (C)	72
FIGURA – 19	EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO NA COLORAÇÃO POR IMUNOCITOQUÍMICA PARA OAT1 E OAT3 EM CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA HUMANO MDA-MB-231	76
FIGURA – 20	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO	77
FIGURA – 21	RESULTADO EM PORCENTAGEM DA CAPTAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO POR CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA MDA-MB-231	78
FIGURA – 22	EFEITO DA MIGRAÇÃO CELULAR PELO EXTRATO BRUTO (EBE) OBTIDO DAS CASCAS DE <i>Lafoensia pacari</i> , ÁCIDO ELÁGICO E L-NAME	80
FIGURA – 23	REPRESENTAÇÃO DA EQUAÇÃO DA RETA	84
FIGURA – 24	CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA MDA-MB-231 NA PRESENTA DO EXTRATO BRUTO DE CASCAS DE CAULE DE <i>L.pacari</i>	84

FIGURA – 25	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA AAR% DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES DE CASCAS DE <i>L. pacari</i> (200 µg/mL) COM BASE NA ATIVIDADE DO ÁCIDO ASCÓRBICO	87
FIGURA – 26	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DOS VALORES DE CONCENTRAÇÃO (µg/mL) X IC%	88
FIGURA – 27	REPRESENTAÇÃO DO PROGRAMA UTILIZADO PARA O CÁLCULO DIRETO DA IC ₅₀ TENDO COMO BASE DE CÁLCULO O POLINÔMIO DE LAGRANGE	91
FIGURA – 28	CURVA DE CALIBRAÇÃO DE QUERCETINA – QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS	92
FIGURA – 29	CONTEÚDO TOTAL DE FLAVONOIDES DO EXTRATO E FRAÇÕES DE CASCAS DE <i>Lafoensia pacari</i>	93
FIGURA – 30	CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO PARA A DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE POLIFENÓIS TOTAIS	94
FIGURA – 31	CONTEÚDO TOTAL DE POLIFENÓIS DO EXTRATO E FRAÇÕES DE CASCAS DE <i>Lafoensia pacari</i>	95

LISTA DE TABELAS

TABELA – 1	EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NO MESMO TECIDO EM CONCENTRAÇÕES QUE ATUA COMO MENSAGEIRO E COMO TOXINA	34
TABELA – 2	ATIVIDADE DOS EXTRATOS ETANÓLICO E METANÓLICO DAS CASCAS DE <i>L. pacari</i>	44
TABELA – 3	ATIVIDADES BIOLÓGICAS EM ESTUDOS PRÉ CLINICOS ATRIBUÍDAS AO LUPEOL	45
TABELA – 4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS EM ESTUDOS PRÉ CLINICOS ATRIBUÍDOS AO ÁCIDO ELÁGICO	46
TABELA – 5	COMPOSTOS DETECTADOS NO EXTRATO HIDROETANÓLICO 70% POR CLAE-DAD	63
TABELA – 6	VALORES DE Cl_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) DETERMINADOS PARA O EXTRATO BRUTO HIDROETANÓLICO E DIFERENTES FRAÇÕES DE <i>L. pacari</i> EM LINHAGENS McCoy E MDA-MB-231 POR 72 HORAS E SEUS RESPECTIVOS ÍNDICES DE SELETIVIDADE (IS)	68
TABELA – 7	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DO EXTRATO, FRAÇÕES E ÁCIDO ELÁGICO	85
TABELA – 8	RESULTADOS IC_{50} $\mu\text{g}/\text{mL}$ DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES PELO ENSAIO DA REDUÇÃO DO DPPH	89
TABELA – 9	REPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO PRÁTICO DPPH E PELO MÉTODO TEÓRICO POR POLINÔMIO DE LAGRANGE	91
TABELA – 10	REPRESENTAÇÃO DE μg EQUIVALENTE DE QUERCETINA POR mg DE EXTRATO E FRAÇÕES	93
TABELA – 11	REPRESENTAÇÃO DE μg EQUIVALENTE DE ÁCIDO GÁLICO POR mg DE EXTRATO E FRAÇÕES	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

Abs	-	Absorvância
AlCl ₃	-	Cloreto de alumínio
CAT	-	Catalase
Cl ₅₀	-	Concentração estimada necessária para reduzir em 50% o número de células viáveis
CLAE-DAD	-	Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos
CG	-	Cromatografia gasosa
CSF	-	Fator cólico estimulante
CTRL	-	Controle
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
EG	-	Grama equivalente
EBE	-	Extrato bruto etanólico
ER	-	Receptor de estrógeno
FAcEt	-	Fração acetato de etila
FClo	-	Fração clorofórmica
FNB	-	Fração n-butanol
FRe	-	Fração resíduo
g	-	Gramas
GM-CSF	-	Fator cólico estimulante de colônia de macrófago e granulócito
GPH-PX	-	Glutathione peroxidase
GPH-R	-	Glutathione reductase
h	-	Hora
HER2	-	Fator de crescimento epidermal humano do tipo 2
H ₂ O	-	Água
IL	-	Interleucinas
INCA	-	Instituto Nacional Do Câncer José Alencar Gomes Da Silva
IS	-	Índice de seletividade
KDa	-	Quilo Dalton
L•	-	Radical lipídico

LH	-	Lípídeo de membrana
LOOH	-	Lípídeos hidroperóxidos
LOO•	-	Radical peroxilo
min	-	Minuto
mL	-	Mililitro
MTT	-	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NCI	-	Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos
NaCl	-	Cloreto de sódio
NaOH	-	Hidróxido de sódio
NO	-	Óxido nítrico
OAT	-	Transportadores de ânions Orgânicos
ONOO-	-	Peroxinitrila
O-•	-	Ânion superóxido
PBS	-	Solução salina tamponada com fosfatos
r	-	Fator de correlação de Pearson
SFB	-	Soro fetal bovino
TNF – α	-	Fator de necrose celular
UFC	-	Unidades formadoras de colonias
μ g	-	Microgramas
μ L	-	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER	23
3.2 METÁSTASE	25
3.3 CÂNCER DE MAMA	26
3.4 RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA	28
3.5 INFLAMAÇÃO	30
3.6 ÓXIDO NÍTRICO	32
3.7 POTENCIAL ANTIOXIDANTE	34
3.7.1 Estresse oxidativo	34
3.7.2 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio	35
3.7.3 Plantas e fitoquímicos com potenciais antioxidantes	37
3.8 POTENCIAL ANTIMICROBIANO	39
3.9 PLANTAS MEDICINAIS E <i>Lafoensia pacari</i>	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	47
4.1.1 Obtenção do material botânico	47
4.1.2 Preparo do extrato etanólico e frações das cascas do caule de <i>Lafoensia pacari</i> A. St.Hil.	47
4.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	49
4.2.1 Análise por CLAE	49
4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS “ <i>In vitro</i> ”	50
4.3.1 Cultivo de células	50
4.3.2 Avaliação do potencial citotóxico e antiproliferativo seletivo do extrato, das frações de cascas do caule <i>L. pacari</i> e do padrão de ácido elágico	50
4.3.3 Teste de adesão celular	52
4.3.4 Imunocitoquímica para detecção de OAT's	53
4.3.5 Ensaio da captação do ácido elágico	54
4.3.6 Ensaio de migração celular de linhagem tumoral MDA-MB-231 - <i>Wound Healing</i>	54
4.3.7 Dosagem de óxido nítrico	55
4.4 BIOENSAIO ANTIMICROBIANO	56
4.5 POTENCIAL ANTIOXIDANTE	57

4.5.1 Avaliação da atividade pela formação complexo fosfomolibdênico	57
4.5.2 Ensaio de redução do radical livre 1, 1 – difenil – picrihidrazil (DPPH)	57
4.5.3 Análise de interpolação polinomial de Lagrange	58
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES E POLIFENÓIS TOTAIS	59
4.6.1 Determinação de flavonoides totais	59
4.6.2 Determinação do conteúdo de polifenóis totais	60
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS	62
5.1.1 Comparação entre os dados de CLAE-DAD da composição química do extrato bruto e frações obtidas de cascas de <i>L. pacari</i> com extrato hidroetanólico (50:50) caracterizado	62
5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO	68
5.2.1 Avaliação do potencial citotóxico e/ou antiproliferativo do extrato bruto e frações de <i>L. pacari</i> pelo ensaio da redução do sal MTT	68
5.2.2 Ensaio de adesão celular <i>in vitro</i>	70
5.2.3 Ensaio de imunocitoquímica para detecção de OAT1 e OAT3	75
5.2.4 Captação ácido elágico pela célula tumoral MDA-MB-231	77
5.2.5 Avaliação da migração celular	79
5.2.6 Dosagem de óxido nítrico	81
5.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO	84
5.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	86
5.4.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênico	87
5.4.2 Ensaio da redução do radical livre 1,1 – Difenil – 2 – picrilhidrazila (DPPH)	88
5.4.3 Análise de interpolação polinomial de Lagrange	90
5.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DO EXTRATO E FRAÇÕES	92
5.5.1 Quantificação de flavonoides	92
5.5.2 Quantificação do conteúdo de polifenóis totais	94
6 CONCLUSÃO	97
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	98
REFERENCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

As plantas possuem um vasto conjunto de compostos bioativos, sendo utilizadas muitas vezes em diferentes terapias para diversas patologias. O Brasil possui uma diversidade de plantas medicinais e, por conta disso, a busca por tratamentos de inúmeras doenças, a partir de derivados de plantas, vem tendo um aumento significativo (REICHERT *et al.*, 2018).

A *Lafoensia pacari* é uma angiosperma pertencente à família Lythraceae, popularmente conhecida como mangava-brava, dedaleira, dedal ou pacari. É típica da região do cerrado, cerradão, mata ciliar, mata seca e florestas de altitude. No Brasil encontra-se nos estados do Paraná, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rondônia, São Paulo e Tocantins (SANTOS; COELHO; PIRANI, 2009).

A *Lafoensia pacari* tem sido alvo de estudos nos últimos anos, principalmente pelo seu amplo uso popular, tais como antiinflamatório, cicatrizante e antineoplásico. Além disso, alguns estudos *in vitro* demonstraram um grande potencial em células tumorais. Esses efeitos são por conta do sinergismo de diversos metabólitos secundários encontrados na planta, cujo taninos, elagitaninos e ácido elágico contribuem de forma expressiva (REICHERT *et al.*, 2018). Entre os grupos de compostos descritos na planta destacam-se os flavonoides, taninos e os compostos esteroidais (SANTOS *et al.*, 2000; SAMPAIO *et al.*, 2011; CARNEIRO *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2018).

Segundo o Instituto Nacional Do Câncer (INCA), câncer é um conjunto de doenças que possuem em comum o crescimento acelerado e anormal de células que podem invadir outros tecidos. O câncer de mama tem sido alvo de muitos estudos por ser o tipo que mais acomete mulheres no mundo de acordo com o Ministério da Saúde (2020). No Brasil, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres e a estimativa de acordo com o INCA (2020), para cada ano do triênio 2020/2022, é de 66.280 novos casos de câncer de mama, sendo que o risco é estimado em 43,74 casos a cada 100 mil mulheres e as taxas mais elevadas estão presentes nas regiões sul e sudeste.

No mundo o câncer de mama também é o que mais acomete mulheres. Em 2020 foram estimados aproximadamente 2,3 milhões de novos casos o que representa 24,5% de todos os cânceres para mulheres. O câncer de mama foi

responsável por 684.996 óbitos estimados em 2020 o que corresponde a 15,5% do total de óbitos em mulheres (IARC, 2020).

Um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa (ATHERINO *et al.*, 2019) investigou o efeito citotóxico/antiproliferativo seletivo de extratos *L. pacari* sobre duas linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF7) e os resultados obtidos demonstraram atividade citotóxica seletiva sobre células de câncer de mama sendo que, tais efeitos foram atribuídos a um conjunto de compostos presentes nessa planta com destaque aos taninos hidrolisados.

Portanto, levando em consideração os resultados mencionados e a importância da *Lafoencia pacari* e seus compostos para o tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer, o presente trabalho objetivou realizar um estudo químico e biológico do extrato e diferentes frações obtidas a partir das cascas de *Lafoencia pacari* e do padrão ácido elágico, composto presente em grande quantidade na planta e responsável por diversas atividades biológicas, empregando linhagens tumorais de mama MDA-MB-231 e não tumorais McCoy.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo químico e biológico do extrato e frações obtidos a partir das cascas de *Lafoensia pacari* (Lythraceae) e do padrão ácido elágico, empregando linhagens tumorais de mama MDA-MB-231 e não tumorais McCoy.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o extrato etanólico (70%) a partir das cascas do caule de *Lafoensia pacari* (Lythraceae) e obter as frações por partição com os solventes acetato de etila, clorofórmio e n-butanol e o resíduo do particionamento.
- Caracterizar a composição química do extrato e frações obtidas a partir das cascas de *Lafoensia pacari* por meio da avaliação do perfil cromatográfico (CLAE);
- Avaliar o efeito citotóxico, antiproliferativo e seletivo do extrato e frações de *Lafoensia pacari*, além do padrão de ácido elágico em células tumorais (MDA-MB-231) e não tumorais (McCoy), por meio do ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT);
- Avaliar o potencial do extrato bruto das cascas de *Lafoensia pacari* e do ácido elágico, na adesão celular em células MDA-MB-231, bem como considerar a presença de proteínas de matriz (fibronectina e vitronectina) sobre a adesão celular;
- Submeter as células MDA-MB 231 ao ácido elágico com e sem inibidor (probenicida) para avaliar a expressão de transportadores de ânions orgânicos (OAT1 e OAT3) utilizando o ensaio de imunocoloração;
- Analisar a captação do ácido elágico por células MDA-MB-231, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar a migração celular de células tumorais MDA-MB-231 após os tratamentos com o extrato bruto de *Lafoensia pacari* e com ácido elágico, por meio do ensaio de cicatrização de ferida *in vitro*;
- Proceder à dosagem do óxido nítrico em células tumorais MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações de extrato bruto de *L. pacari*, por meio

da reação de Griess;

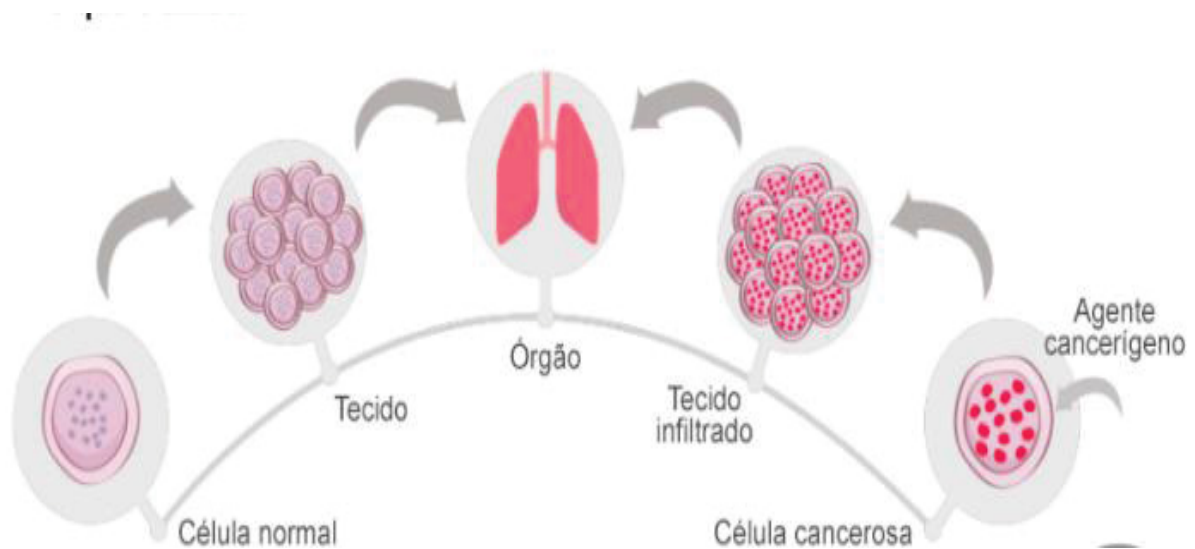
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato e frações da casca de *L. pacari* e do padrão de ácido elágico contra patógenos humanos gram-positivos e gram-negativos;
- Avaliar *in vitro* o potencial antioxidante do extrato e frações obtidos de *Lafoensia pacari*;
- Proceder a quantificação de flavonoides totais e de polifenóis totais do extrato, frações e compostos isolados da *Lafoensia pacari*;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que possui como característica em comum o crescimento rápido e desordenado de células que são capazes de invadir outros tecidos e órgãos, como representado na FIGURA 1 (PEDRAZA-FARIÑA, 2006).

FIGURA 1- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DEMONSTRANDO O CRESCIMENTO RÁPIDO E DESORDENADO DE CÉLULAS CANCEROSAS E SUA CAPACIDADE DE INVADIR OS TECIDOS EM COMPARAÇÃO COM CÉLULAS NORMAIS.



FONTE: INCA (2020).

Os tipos de câncer variam conforme as células afetadas. Quando se iniciam em epitélio, como mucosa e pele, são denominados de carcinoma. Já os sarcomas têm início em tecido conjuntivo, tais como, ossos, músculos e cartilagens. Outra característica utilizada para classificar os tipos de câncer é sua velocidade de crescimento e a capacidade de invadir tecidos ou órgãos sendo próximos ou distantes, nesse caso denominado metástase (INCA, 2020).

A proliferação celular pode ser controlada ou não controlada. No crescimento controlado tem-se um aumento localizado e autolimitado do número de células de tecidos normais que formam o organismo causado por estímulos fisiológicos ou patológicos. Nele as células são normais ou com pequenas alterações na sua forma e função, podendo ser igual ou diferente do tecido onde se instalam. Esse processo é

reversível após o término dos estímulos que o provocam. São exemplos a hiperplasia, metaplasia e displasia. Já no crescimento não controlado tem-se uma massa anormal de tecido, cujo crescimento é quase autônomo persistindo excessivamente após o término do estímulo que o provocam, como exemplo o câncer *in situ* e câncer invasivo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

O câncer surge a partir de alterações no DNA, podendo ser ocasionadas por herança genética ou ao longo da vida. Tais alterações podem ocorrer em alguns genes designados de proto-oncogenes que em células normais encontram-se inativos. Quando esses genes são ativados se tornam oncogenes que tornam a célula normal em tumoral ou a mutação pode ocorrer em genes de supressão de tumor que são responsáveis por retardar ou levar a célula a morte no momento correto. As mutações no genoma conferem a célula tumoral a capacidade de crescimento, comunicação, multiplicação metastática e crescimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As células cancerígenas podem apresentar resistência a apoptose quando ocorre alterações da expressão dos genes de proteínas da família BCL-2, esta suprime proteínas pro-apoptóticas, como BAK e BAX. Na presença de um sinal apoptótico essas proteínas se deslocam do citoplasma para membrana de mitocôndrias sendo responsáveis pelo rompimento da integridade desta membrana e assim ativando uma cascata de proteínas que promovem apoptose (BERTRAM, 2000; FARIA *et al.* 2006; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Quando ocorre a perda, disfunção ou inativação de genes supressores de tumor, a célula começa a se dividir descontroladamente e por conta disso surgem neoplasias e tumores (PAYNE *et al.*,2005). Os genes supressores atuam em uma vasta gama de atividades da célula normal. Apesar da sua principal função não ser proteção contra câncer eles estão envolvidos em uma cascata de sinalização para o processo de degradação proteica, detecção e reparo de danos no DNA, migração e diferenciação, entre outras respostas que ocorrem ao estresse que em células cancerígenas estão desregulados fazendo com que a célula perca a capacidade de receber esses sinalizadores e processe a informação de inibidores de proliferação (SHERR, 2004). Alguns dos genes tumorais são o p53 e o Rb, esses quando sofrem danos param de expressar proteínas de regulação de apoptose, tendo como consequência a perda desse estímulo. Muitos tumores estão relacionados a alteração no gene p53 (FETT-CONTE; SALLES, 2002).

Os tratamentos fundamentais para o câncer são a quimioterapia, radioterapia, transplante de medula óssea e cirurgia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020), variando de acordo com a extensão da doença e das características do tumor (INCA, 2020). A quimiorresistência tumoral é um problema importante relacionado à terapia com agentes antineoplásicos, uma vez que leva a redução da eficácia do regime de fármacos utilizados, sendo responsável então pelo fracasso do tratamento e/ou pela reincidência da doença (MARTÍNEZ-LACACI *et al.*, 2007).

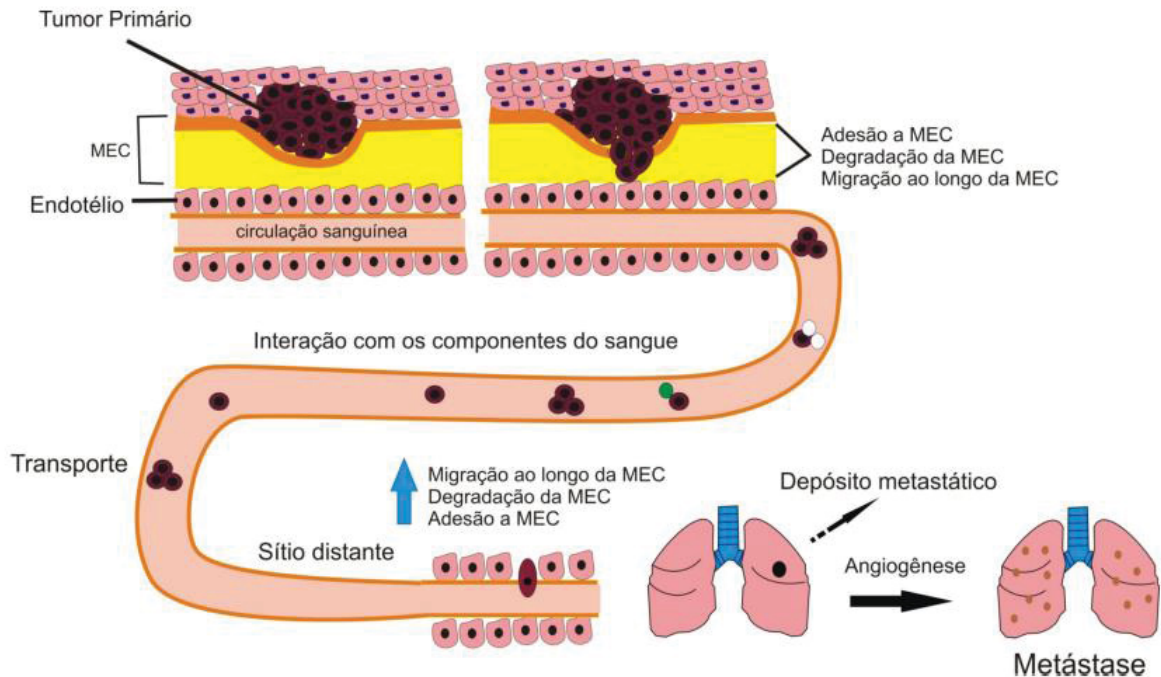
3.2 METÁSTASE

O processo de metástase ocorre com a migração de células tumorais partindo do tumor primário que requer a penetração no estroma local, entrada no sistema sanguíneo e/ou linfático, ligação nas plaquetas, interação com o endotélio em local distante do tumor primário, extravasamento e transporte até o sítio secundário (COLEMAN; RUBENS, 1987). As células tumorais precisam resistir a concentrações elevadas de oxigênio além da ação de linfócitos citotóxicos até atingirem o órgão alvo, desta forma ocorre uma seleção de células mais resistentes e agressivas (LEBER; EFFERTH, 2009; GUAN, 2015).

A adesão das células tumorais na matriz extracelular (MEC), tais como, fibronectina, laminina, matrigel é crucial para metástases. As células que possuem capacidade de invasão têm um citoesqueleto modificado, este ajuda no prolongamento da membrana, são denominados de invadopodia sendo ricos em F-actina (WEAVER, 2006). A matriz extracelular é degradada levando a secreção e ativação de enzimas proteolíticas, como as matrizes de metaloproteinases (MMP) que degradam componentes da MEC como colágeno tipo IV, glicoproteínas e proteoglicanos que permitem a invasão das células cancerígenas pelas membranas celulares e a migração para vasos sanguíneos ou linfáticos adjacentes (LEEK, 2001; ILLSON, 2002; SAUER; DEISSLER *et al.*, 2002).

A angiogênese é um processo essencial para o suporte de crescimento e progressão do tumor, pois, proporciona um suplemento de sangue necessário, além de permitir que as células metastáticas consigam entrar na circulação sanguínea, sendo uma das principais causas da letalidade do câncer (LEBER; EFFERTH, 2009; GEIGER; PEEPER, 2009). O processo de metástase está representado na FIGURA 2.

FIGURA 2 - FORMAÇÃO DE METÁSTASE TUMORAL



FONTE: Carvalho (2009).

NOTA: MEC: matriz extracelular; Esferas brancas: plaquetas; Esferas verdes: leucócitos.

3.3 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o tipo que mais acomete mulheres no Brasil e no mundo. É raro o aparecimento antes dos 35 anos, porém após essa idade a incidência aumenta progressivamente especialmente após os 50 anos. Os homens também podem ser afetados e a representatividade é de 1% do total de casos (SILVA; RIUL, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Existem vários tipos de câncer de mama sendo esse determinado de acordo com a célula específica em que o câncer se desenvolve. Na maior parte dos casos o câncer é carcinoma, ou seja, desenvolve-se primeiramente em células de tecido epitelial. Quando desenvolvidos na mama são do tipo adenocarcinoma, que começa no ducto mamário (80% dos casos) ou nas glândulas (lóbulo) produtoras de leite (10% dos casos). Existem também outros tipos de tumores menos comuns como os carcinomas mucinosos, cribriformes, micropapilares, papilares, tubulares, medulares e inflamatórios (SANDHU *et al.*, 2010).

Clinicamente é possível dividir o câncer de mama ductal invasivo em 2 subtipos que são classificados de acordo com a expressão de receptores de progesterona, estrogênio e fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER-

2/Neu). Portanto, molecularmente, os tumores de mama podem ser ordenados como lumial A e B, basalóide ou triplo negativo e HER 2 (CIRQUEIRA *et al.*, 2011).

Geralmente, os tipos de câncer de mama que expressam receptores de hormônio têm um prognóstico mais favorável do que aqueles que possuem amplificação de HER-2/Neu ou os triplos negativos (CIRQUEIRA *et al.*, 2011).

Carcinoma ductal *in situ* é conhecido como intraductal e não invasivo ou pré invasivo. O câncer de mama invasivo é aquele que se dissipou para um tecido adjacente, sendo o mais comum o carcinoma ductal invasivo. Existem ainda alguns tipos especiais de câncer de mama, ou seja, desenvolvem-se de maneiras diferentes o que afeta o prognóstico e tratamento. São exemplos o câncer de mama triplo negativo que é muito agressivo e invasivo, difícil de ser tratado representando 15% de todos os tipos de cânceres de mama no mundo e o câncer de mama inflamatório invasivo que é um tipo raro chegando a 5% do total dos casos do mundo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

Outros tipos de câncer que afetam outras células da mama são menos comuns e podem requerer diferentes tratamentos. A doença de Paget inicia-se em ductos mamários, porém se dissipam para a pele do mamilo e aréola e representa 1 a 3% do total dos cânceres de mama. Já o tumor tifoide é muito raro, este ocorre no tecido conjuntivo, apesar da maioria possuir prognóstico benigno podem ocorrer casos malignos. Os angiosarcomas de mama também são raros, representando cerca de 1% do total de câncer de mama e iniciam-se em células que revestem vasos linfático e vasos sanguíneos podendo envolver o tecido mamário ou a pele da mama. Alguns desses casos estão relacionados a tratamento de radioterapia prévia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

Alguns sinais e sintomas do câncer de mama incluem nódulos na axila ou mama, dor mamária, inversão do mamilo, hiperemia, descamação ou ulceração, secreção papilar, retração cutânea e edema cutâneo o que resulta na pele com aspecto de casca de laranja (SILVA; RIUL, 2011).

Os principais fatores de risco para o câncer de mama são menarca precoce, primeira gestação com idade acima de 30 anos, contraceptivos hormonais de alta dose, menopausa tardia e reposição hormonal, alta densidade de tecido mamário, idade avançada e histórico familiar de câncer de mama. Outros fatores que podem influenciar no risco são o sedentarismo, amamentação, pós menopausa com obesidade, drogas e exposição contínua a radiação ionizante (PROLLA *et al.*, 2015).

A quimioterapia é amplamente utilizada para o tratamento de tumores de mama e a escolha da terapia utilizada varia de acordo com o tipo de tumor e seus receptores. O tamoxifeno e anastrozol são fármacos utilizados para o tratamento de tumores de mama que expressam receptores hormonais. O anastrozol é um potente inibidor não hormonal da aromatase e altamente seletivo, cujo mecanismo de ação se faz pelo bloqueio da conversão de andrógenos adrenais em estrógenos. Já o tamoxifeno atua como modulador seletivo de receptores estrogênico e seu mecanismo de ação se dá pela inibição competitiva do receptor de estrogênio levando ao bloqueio da proliferação celular e controle da recidiva da doença. Os tumores de mama triplo-negativos são os que não possuem os receptores de progesterona, estrogênio e não possuem muito HER2, por conta disso não possuem tratamento específico, pois a hormonioterapia se torna ineficaz, sendo assim, o tratamento ocorre por medicamentos como paclitaxel e doxorrubicina. Já os tumores triplo positivos que apresentam receptores de progesterona, estrogênio e HER2 podem ser tratados com medicamentos hormonais ou medicamentos específicos para a proteína HER2, tais como trastuzumabe (Herceptin®) (BRENTON *et al.*, 2005; ANDERS; CAREY, 2009; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

3.4 RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA

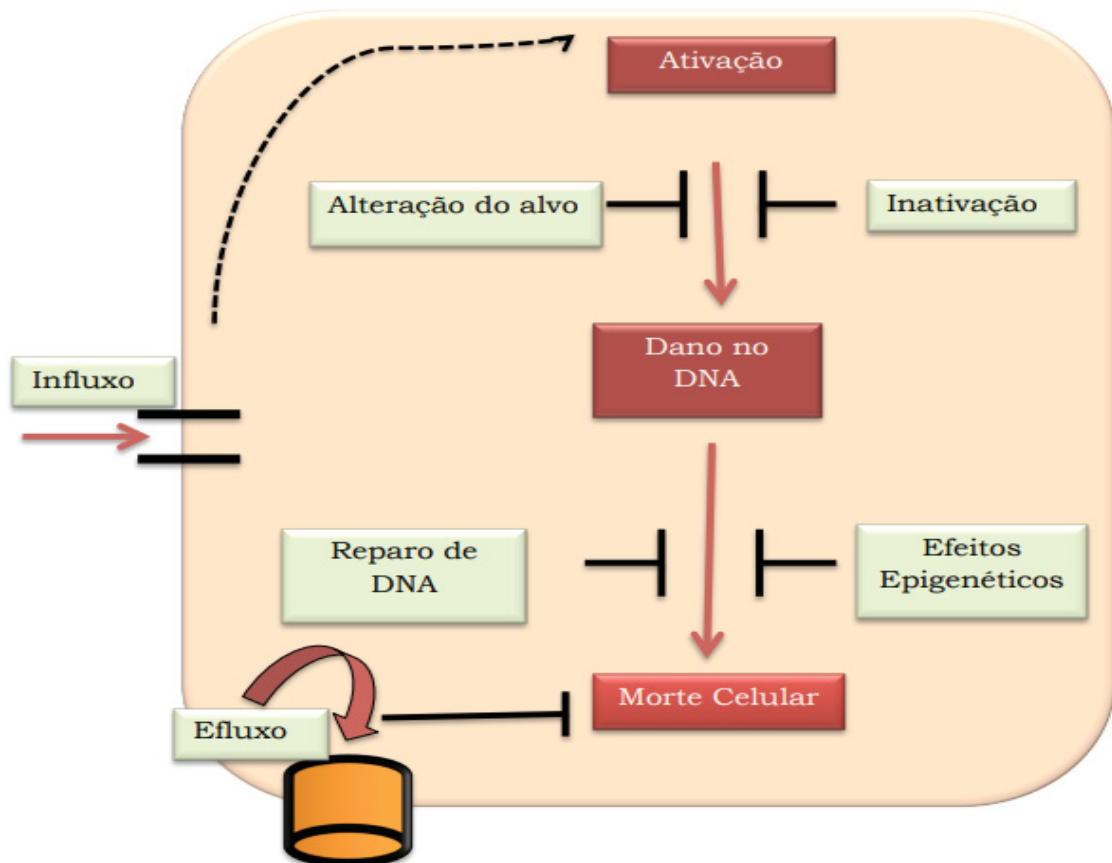
Apesar da quimioterapia ser o principal tratamento para o câncer a grande problemática se dá pela quimioresistência tumoral, pois é um problema grave em pacientes com câncer, gerando a redução da eficácia do fármaco podendo levar ao fracasso do tratamento e/ou reincidência da patologia (MARTÍNEZ-LACACI *et al.*, 2007).

A quimioresistência pode ser intrínseca ou adquirida. No caso da intrínseca os fatores de resistência se encontram presentes nas próprias células tumorais fazendo com que a terapia não seja eficaz. Porém quando a resistência é adquirida a célula tumoral que já foi exposta a quimioterapia, e se encontrava sensível ao tratamento, sofre mutações ativando inúmeras vias de sinalizações compensatórias, permitindo que as células tumorais não respondam mais ao tratamento resultando em uma vantagem proliferativa em relação a massa tumoral total (HOLOHAN *et al.*, 2013). Segundo Longley e Johnston, (2005) aproximadamente 90% dos casos de fracasso

na terapia de pacientes com câncer metastático ocorrem devido a resistência a quimioterapia.

A célula tumoral desenvolve vários mecanismos de resistência a uma determinada droga. Como exemplos temos os fatores que limitam a quantidade da droga que entra na célula conhecido como influxo da droga e também o aumento o efluxo da droga. A célula pode ainda inativar alguns processos de ativação da droga, modificar alvos celulares da droga, entre outros (HOLOHAN *et al.*, 2013). Os principais mecanismos de resistência estão demonstrados na FIGURA 3.

FIGURA 3 - PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DA CÉLULA TUMORAL A QUIMIOTERAPIA.



FONTE: Rocha (2015).

NOTA: Os principais mecanismos de resistência são a diminuição do influxo da droga, podendo acontecer pela diminuição da expressão de transportadores. Outro mecanismo ocorre pelo efluxo da droga ocasionado pelo aumento da expressão de canais transportadores de inúmeras drogas. O aumento da expressão da glutatona ou glutatona S-transferase leva a inativação da droga. A indução da modificação do alvo da droga por alteração na topoisomerase, por exemplo, impede a ligação de inibidores dessa enzima. Outro mecanismo importante é o aumento do reparo do DNA, podendo ser causado pelo aumento da expressão de genes relacionados ao reparo por exclusão de nucleotídeos. Além disso, podem acontecer alterações epigenéticas, por meio de metilação no promotor de genes relacionados a morte celular via apoptose.

Desta forma pode se considerar que as células tumorais são altamente adaptáveis podendo ativar vias de sinalizações pró-sobrevivência e/ou inativar mecanismos que levariam a morte celular. Além disso, as células tumorais possuem uma grande heterogenicidade celular e molecular, o que se supõe que a resistência a droga possa acontecer devido a seleção que o tratamento proporciona em algumas células que seriam resistentes e que estariam presentes no tumor. Neste contexto no primeiro momento ocorre a recidiva do tumor, pois as células em sua maioria sensíveis ao tratamento são levadas a morte, porém algumas células que eram resistentes ao tratamento voltam a proliferar e crescer resistentes a terapia utilizada (SWANTON, 2012).

Por conta da alta porcentagem de resistência a quimioterapia existente o interesse por novas moléculas e fármacos antitumorais vem tendo um aumento contínuo para novos tratamentos dos tumores (MUKHERJEE *et al.*, 2001).

3.5 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta local e específica do organismo a uma invasão por algum agente infeccioso, antígeno, dano físico, químico ou traumático. É um fenômeno que pode levar a dor, rubor, calor, tumor e perda da função. Em um processo inflamatório os leucócitos primeiramente rolam, fixam-se transitoriamente e aderem-se ao endotélio vascular, ocorrendo então a diapedese seguida de migração em direção aos estímulos quimiotáticos liberados no local da ação (SOUZA, 2018).

No processo inflamatório inúmeras células são envolvidas, tais como, neutrófilos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, células dendríticas, plaquetas, células epiteliais e fibroblastos. Esse processo ocorre em três fases distintas, sendo, aguda, subaguda retardada e crônica. Essas três fases são importantes, desejáveis e consideradas benignas quanto as atividades celulares e seus mediadores (ABBAS; JANEWA, 2000; SANTOS JUNIOR, 2003).

As citocinas inflamatórias são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa presentes no plasma e são importantes mediadores da resposta celular e vascular. Estas são produzidas por várias células no local da lesão ou por células do sistema imunológico e são ativadas por proteinoquinasas ativadas por mitógenos pelo estímulo inflamatório. Dentre as citocinas se destacam as interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), fator de necrose tumoral alfa

(TNF- α), fator cólico estimulante (CSF) e o fator estimulante de colônia de macrófago e granulócito (GM-CSF) (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; SOMMER, 2010).

As primeiras células a chegarem na lesão são os leucócitos, ativados por quimiocinas e outros agentes químicos ativadores da inflamação sendo seguidos por neutrófilos e depois macrófagos teciduais. A expressão e produção dos mediadores e a migração celular varia de acordo com o estímulo antigênico gerado. Os leucócitos passam para a região mais externa, aderem-se de forma transitória ao endotélio e assim atravessam a parede do vaso. Após o processo da diapedese as células continuam migrando para o foco da infecção iniciando o processo de quimiotaxia (DEKKER; SEGAL, 2000).

O processo de adesão se inicia após a quimiotaxia, quando os leucócitos se aderem ao endotélio vascular e duração da adesão vai aumentando gradualmente. Durante o processo inflamatório os mediadores inflamatórios e quimotáticos do complemento intensifica as proteínas de adesão na superfície leucocitária, assim como, a adesão dos leucócitos no endotélio (YAMAGUCHI *et. al.*, 2005.; FRIEDL; ALEXANDER 2011).

A migração possui um papel muito importante em vários processos biológicos, sendo que os leucócitos móveis saem dos vasos sanguíneos e migram para tecidos perivasculares. Após o processo da adesão, outra importante etapa da resposta inflamatória, os leucócitos se movem através da superfície endotelial inserindo pseudópodos nas junções entre as células endoteliais. As células interendoteliais aumentadas permitem que os leucócitos deslizem e se estabeleçam entre a membrana basal e a célula endotelial. Assim, podem ficar lá por um determinado tempo, mas depois atravessam a membrana basal e vão para o espaço extravascular (LAUFFENBURGER; HORTWITZ, 1996).

A migração também possui um papel muito importante em processos patológicos como no processo de invasão de células tumorais pelo endotélio vascular, pelo estroma do tecido em volta da célula tumoral ou pela disseminação na circulação para locais distantes (SHARMA *et al.*, 2012).

Durante a carcinogênese, estudos mostraram níveis séricos elevados de marcadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, que indicam um estado inflamatório subclínico e criam um microambiente favorável para o início do tumor, crescimento e invasão metastática. Esse estado inflamatório subclínico tem um papel relevante na fisiopatologia do câncer de mama quando associado a outros fatores de

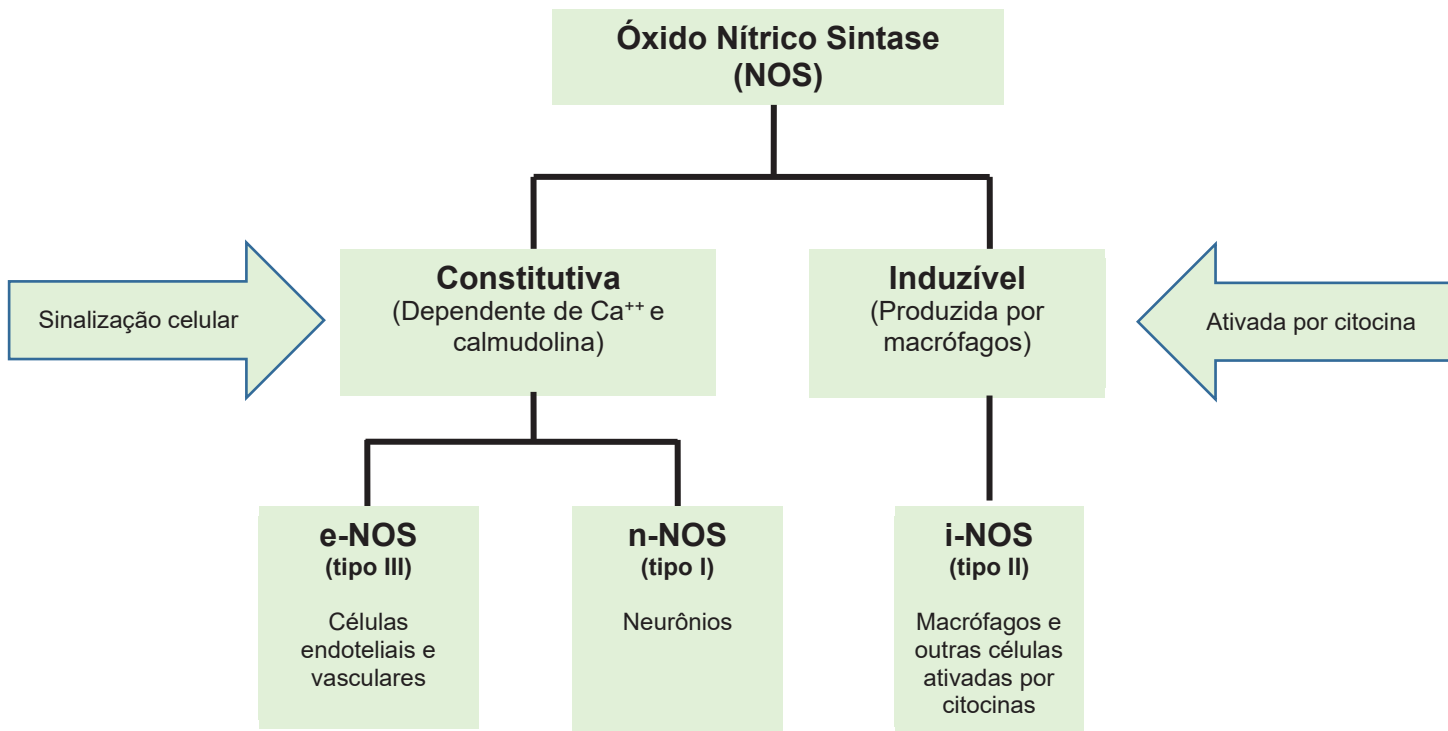
risco, como as alterações hormonais que ocorrem durante a menopausa e excesso de peso corporal (IMAYAMA *et al.*, 2012; SIMONE *et al.*, 2018; SHIVAPPA *et al.*, 2016).

3.6 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula de gás simples e geralmente é encontrado em pequenas quantidades no ar atmosférico. É altamente tóxico devido aos radicais livres (elétrons extras) que o tornam um produto altamente reativo. Quando diluído, o NO tem uma meia-vida inferior a 10 segundos devido à sua alta velocidade de oxidação de nitritos e nitratos. O NO liga-se à hemoglobina e outras proteínas como o grupo heme, levando à cessação da sua atividade biológica (SNYDER; BREDET, 1992).

O óxido nítrico é um importante mediador de processo intra e extracelulares. A sua síntese resulta na oxidação de um nitrogênio guanidino da L-arginina que é convertido a L- citrulina catalisada pela NO-sintase. Pode-se agrupar a NO-sintase em dois grupos. NO-sintase constitutiva, dependente de cálcio e calmodulina, que está envolvida na sinalização celular. Já a NO-sintase induzível é produzida por macrófagos e células ativadas por citocinas. A NO-sintase constitutiva é dividida em tipo I que está presente em neurônios e tipo III que está presente em células endoteliais vasculares. Sendo assim, é possível classificar as NOS (óxido nítrico sintase) como cálcio-dependentes sendo estas as isoformas I e III e cálcio-independentes a isoforma II, como demonstrado na FIGURA 4 (SOUZA, 2018).

FIGURA 4- ISOFORMAS DA ENZIMA NO-SINTASE



FONTE: Adaptado de Souza, (2018).

A função do óxido nítrico no organismo pode ser considerada benéfica ou tóxica dependendo da concentração encontrada ou depuração tecidual. O NO é um mensageiro intercelular importante. O mecanismo de transdução de sinal geralmente é implementado por meio de receptores na membrana celular da célula-alvo, esses receptores são geralmente de transmembrana, entram em contato com o citoplasma e desencadeiam uma cascata de sinais intracelulares que resultam em alterações celulares. Devido à natureza química altamente difusa, nenhuma sinalização ocorre diretamente no nível intracelular sem receptores de membrana. Por conta da sua penetração intracelular sem intermediários membranosos, o organismo utiliza o NO em funções fisiológicas que requerem uma resposta rápida (LOWENSTEIN *et al.*, 1993; DRAPIER; WEIZESBIN; HIBBS, 1988; FILHO; ZILBERSTEIN 2000).

Além disso, o NO está presente em resposta do sistema imunológico primário atuando como agente antibacteriano, antiparasitário e antiviral. Porém, nessa ocasião, o NO é encontrado em concentrações muito mais elevadas do que quando está apenas atuando como mensageiro sendo considerado tóxico para os micro-organismos agressores. Entretanto o NO pode ser encontrado em concentrações

tóxicas também para células humanas, como no caso das doenças autoimunes (FILHO; ZILBERSTEIN 2000).

A TABELA 1 representa os efeitos do óxido nítrico nos mesmos tecidos de acordo com sua concentração.

TABELA 1 - EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NO MESMO TECIDO EM CONCENTRAÇÕES QUE ATUA COMO MENSAGEIRO E COMO TOXINA.

Tecido	NO como mensageiro	NO como toxina
Vasos sanguíneos	Antitrombótico, antiaterosclerótico, inibe a proliferação do músculo liso, proteção a isquemia e antiadesão plaquetária.	Choque séptico, inflamação, síndrome de reperfusão após isquemia, extravasamento microvascular, arteriosclerose.
Coração	Perfusão coronariana e inotrópico negativo.	Choque séptico, síndrome de reperfusão após isquemia.
Pulmões	Manutenção da ventilação-perfusão, motilidade bronquiolar, secreção de muco e defesa imunológica.	Alveolite autoimune.
Rins	Perfusão glomerular, feed-back túbulo-glomerular e secreção de reína.	Glomerulonefrite.
SNC	Memória tardia, fluxo sanguíneo e isquemia, secreção neuroendócrina, controle olfativo e visual.	Neurotoxicidade, irritabilidade, enxaqueca e hiperalgesia.
Pâncreas	Secreção endócrina e exócrina.	Destruição de células β .
Intestino	Fluxo sanguíneo, peristaltismo, secreção exócrina, proteção de mucosa, antimicrobiano e antiparasitário.	Danos na mucosa (hemorragia no trato gastrointestinal) e mutagênese.
Células imunológicas	Antimicrobiano, antiparasitário e antitumoral.	Antitransplante, doença do enxerto-hospedeiro, inflamação, choque séptico e dano tissular.

FONTE: Filho e Zilberstein (2000).

3.7 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

3.7.1 Estresse oxidativo

Durante o processo de funcionamento normal da célula em organismos aeróbios são produzidos radicais livres, em sua maior parte consideradas espécies

reativas de oxigênio. Porém, grande parte desses radicais são removidos pelo processo antioxidante da célula através de enzimas e outras moléculas não enzimáticas (VALKO *et al.* 2007).

Os radicais livres em pequenas quantidades nas células podem apresentar um papel importante em processos fisiológicos de sinalização e regulação. Porém, quando ocorre o desequilíbrio da formação dos radicais livres e o processo antioxidante da célula a concentração de radicais livres aumenta ocorrendo o processo chamado estresse oxidativo. Nesse processo os radicais livres causam danos celulares por oxidação de lipídeos celulares, proteínas e o DNA, o que pode levar a modificação constante e inutilização ocasionando disfunção (VALKO *et al.*, 2007; FU *et al.*, 1998; RIDNOUR *et al.*, 2005).

O estresse oxidativo pode acontecer por causas naturais, como quando acontece em exercícios físicos, inflamação, mas também pode acontecer por causas não naturais como quando ocorre a exposição a poluentes ambientais, xenobióticos ou em algumas doenças. Muitas doenças já foram relacionadas por conta de excesso dos radicais livres como cancro, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, envelhecimento entre outras (VALKO *et al.*, 2007; HALLIWELL, 1996).

3.7.2 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio

Um radical livre é uma molécula ou um átomo que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Estes compostos apresentam alta reatividade, sendo as espécies reativas de oxigênio as que possuem maior importância biológica (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000; GILBERT, 2000).

O superóxido é normalmente produzido nas mitocôndrias, pois, na cadeia respiratória ocorre uma pequena e constante perda de elétrons. Esses então não reduzem O_2 em H_2O , mas reduz o O_2 em um ânion superóxido $O_2^{\bullet-}$. Embora esse superóxido não seja uma espécie tão reativa, o mesmo pode interagir com outras moléculas formando outros compostos reativos como o radical hidroxila HO^{\bullet} (CADENAS; SIES, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

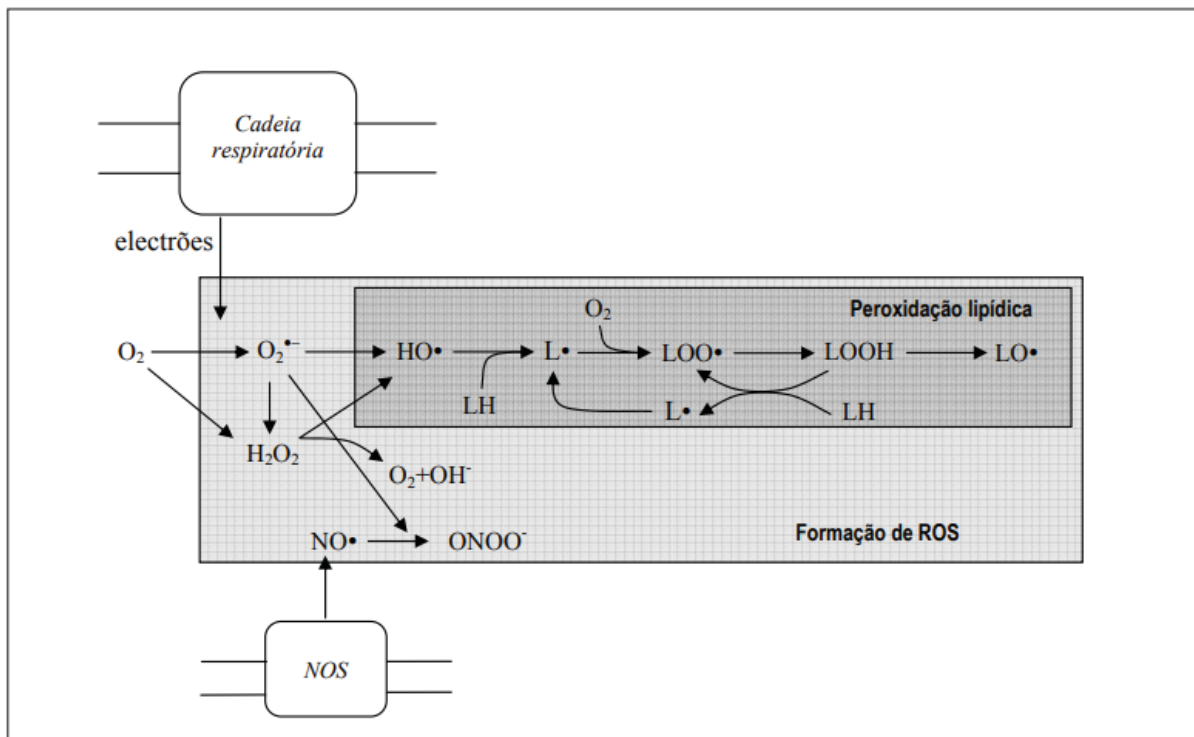
O radical hidroxila pode danificar purinas e pirimidinas e o esqueleto de desoxirribose do DNA causando danos permanentes no material genético que pode resultar em envelhecimento, mutagênese e carcinogênese. Os radicais livres formados no processo de respiração são gerados próximos a membrana lipídica das

mitocôndrias, por esse motivo eles reagem facilmente com os lipídeos gerando o processo de peroxidação lipídica e por consequência a geração de vários tipos de espécies reativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; VALKO *et al.*, 2007; MEHROTRA; KAKKAR; VISWANATHAN, 1991).

Também é importante enfatizar que existem espécies reativas que contêm nitrogênio, sendo o principal o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$). Esse radical é produzido, como já mencionado, ao metabolizar arginina a citrulina. O estresse nitrosamínico ocorre com a nitrosilação de proteínas gerando a inibição da sua função. Conforme representado na FIGURA 5 (FRIES *et al.*, 1993; FRIDOVICH, 1999; RIDNOUR *et al.*, 2004).

Como exemplo no processo inflamatório o radical $\text{NO}\cdot$ é produzido juntamente com superóxido, esses dois radicais então reagem entre si formando ONOO- (peroxinitrilo) um poderoso agente oxidante capaz de causar a oxidação lipídica e até mesmo a fragmentação do DNA (CARR; MCCAL; FREI, 2000).

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DA FORMAÇÃO DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO.

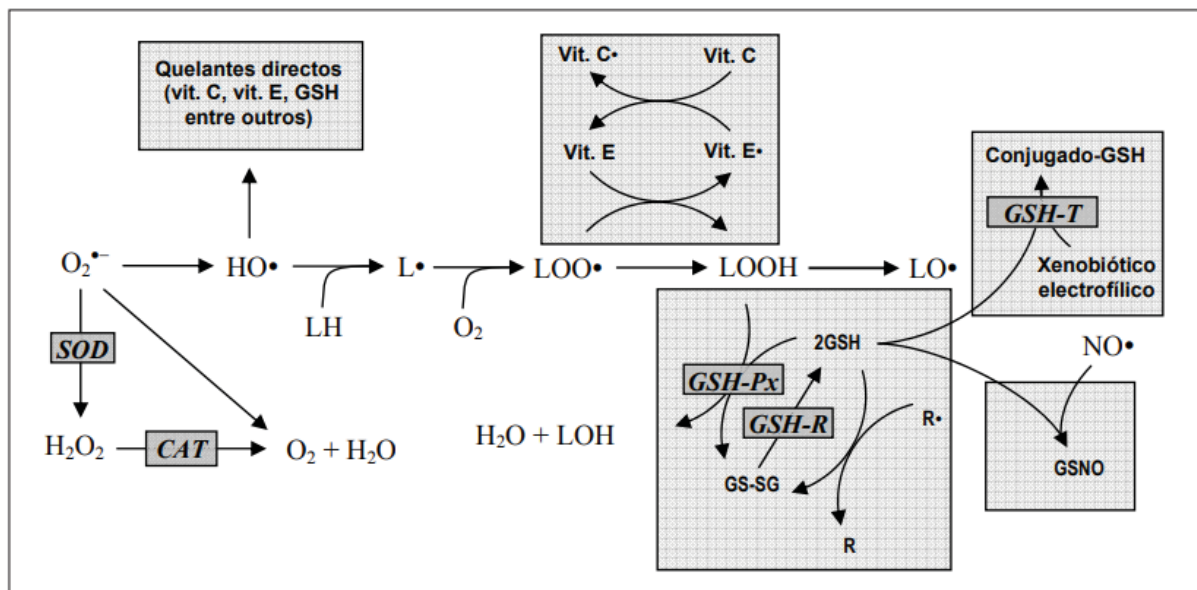


FONTE: Ferreira; Abreu (2007).

NOTA: Pode ocorrer a fuga de elétrons na cadeia respiratória que ao reagir com o oxigênio forma o ânion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) que ao reagir pode se transformar em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidróxido ($\text{HO}\cdot$). Esses podem reagir com os lipídeos presentes na membrana (LH) iniciando a reação de peroxidação lipídica que resulta em radicais lipídicos ($\text{L}\cdot$), radicais peróxido ($\text{LOO}\cdot$) e lipídios hidroperóxidos (LOOH). Já a óxido nítrico sintase mitocondrial pode formar óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), que ao reagir com o ânion superóxido produz peroxinitrila (ONOO-).

As defesas a exposição de radicais livres podem ser classificadas como enzimáticas e não enzimáticas. O organismo possui inúmeras defesas antioxidantes enzimáticas espalhadas no meio intracelular e extracelular. Como exemplo a catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPH-Px), glutathiona redutase (GPH-R), entre outros. Já dos antioxidantes não enzimáticos se destacam os flavonoides, carotenoides, ácido ascórbico, α -tocoferol, glutathiona, entre outros (CADENAS, 1997; VALKO *et al.* 2007). Esses mecanismos antioxidantes endógenos estão representados na FIGURA 6.

FIGURA 6 - MECANISMOS ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS.



FONTE: Ferreira; Abreu (2007).

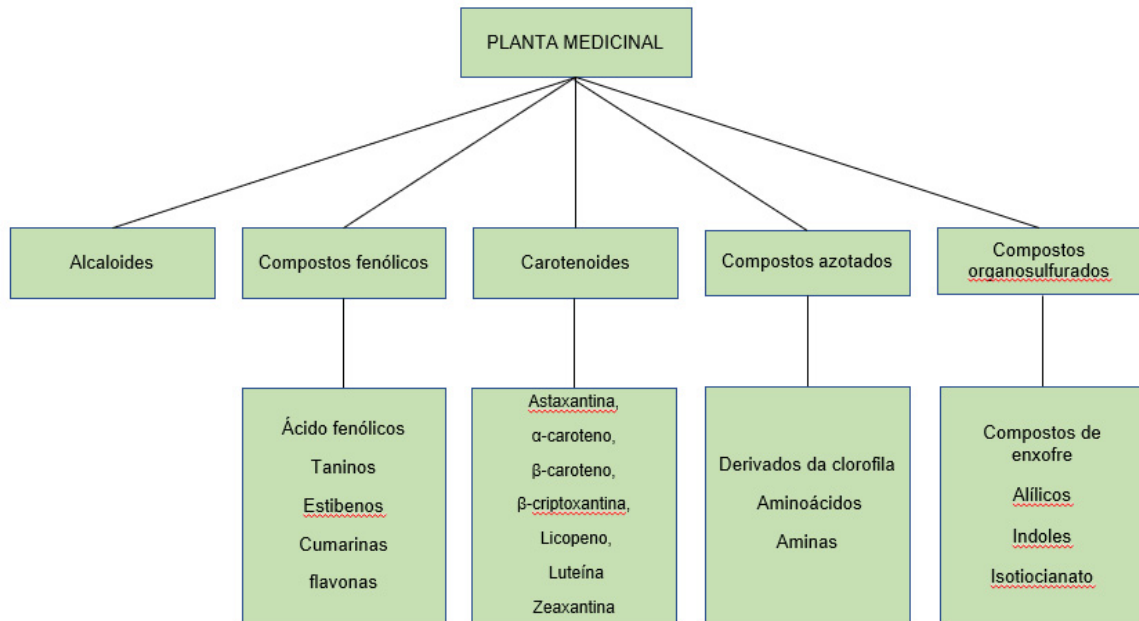
NOTA: A proteção antioxidante é mostrada na caixa escura e as enzimas antioxidantes estão expostas em itálico. ROS: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO), lipídio de membrana (LH), radical lipídico (L^\bullet), peroxiradical (LOO^\bullet) e hidroperóxido lipídico (LOOH), óxido nítrico (NO^\bullet), álcool (LOH). Proteção antioxidante: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPH-Px), glutathiona redutase (GPH-R), glutathiona (GSH), dissulfeto de glutathiona (GS-SG), α -tocoferol ou vitamina E (vit. E), vitamina E Radical (Vit. E \bullet), vitamina C (vit. C), radical de vitamina C (vit. C \bullet), não radical (R), radical (R^\bullet), S-nitrosoglutathiona (GSNO).

3.7.3 Plantas e fitoquímicos com potenciais antioxidantes

Para o auxílio do sistema antioxidante endógeno são utilizados produtos naturais denominados nutracêuticos. Compostos com potencial antioxidante presentes na dieta são de suma importância para o auxílio do processo antioxidante endógeno ajudando na redução dos danos oxidativos. Os compostos fitoquímicos bioativos podem ser encontrados em diversas partes das plantas, tais como, frutos, caule, folhas, raízes, sementes, entre outros (KANTER, 1998; RAMARATHNAM *et al.*, 1995; SKERGET *et al.*, 2005).

Os principais compostos antioxidantes encontrados nas plantas são carotenoides, compostos fenólicos, flavonoides, estibenos, cumarinas, taninos, alcaloides, derivados de clorofila, aminoácidos e amins e compostos organossulfurados, tal como representado na FIGURA 7 (HALL; CUPPETT, 1997).

FIGURA 7 - PRINCIPAIS GRUPOS DE COMPOSTOS QUÍMICOS ENCONTRADOS EM PLANTAS MEDICINAIS.



FONTE: Liu (2003).

Estudos com polifenóis em chás demonstraram um vasto efeito como aumento da resistência dos eritrócitos ao estresse oxidativo, bloqueio de superóxido e do radical hidroxila inibindo alterações oxidativas em lipoproteínas de baixa densidade, efeitos benéficos em doenças coronarianas, hipertensão e diabetes do tipo 2, além da inibição do crescimento e indução de apoptose em linhagens de células tumorais (YOUDIM *et al.*, 2000; FANG *et al.*, 1998; FANG, YANG, WU, 2002; YANG *et al.*, 1998).

Os carotenoides possuem potencial antioxidante de suma importância para a manutenção da saúde humana. Seu efeito fotoprotetor está relacionado com a capacidade em bloquear e inativar espécies reativas de oxigênio que são geradas pelas ondas de luz. Quando os carotenoides reagem com os radicais livres eles se tornam radicais, porém são estáveis o que interrompe a cadeia de propagação de formação de espécies reativas de oxigênio (FANG, YANG, WU, 2002).

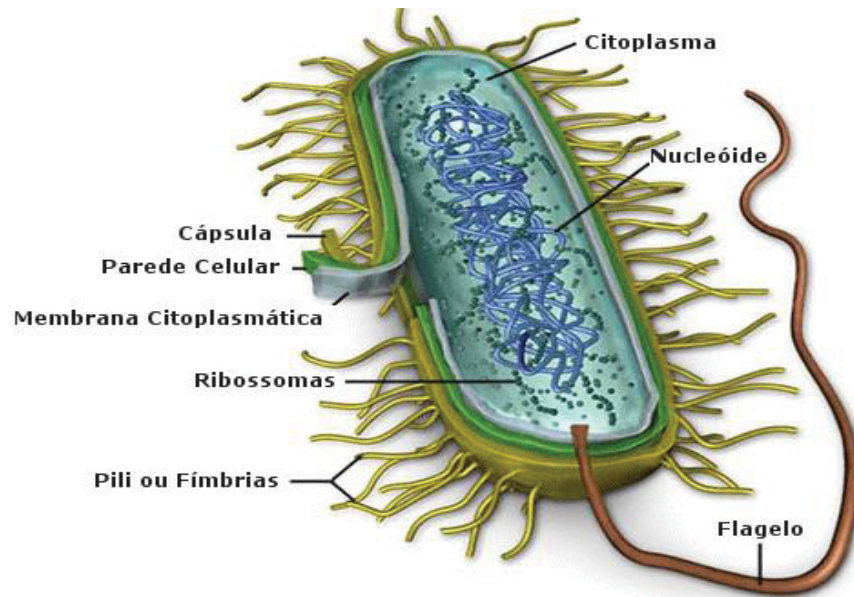
Deste modo aproximadamente dois terços dos óbitos ocasionados por câncer poderiam ser evitados através de mudança de estilo de vida, com consumo maior de alimentos com potencial antioxidante. Porém muitos estudos sugerem que o efeito maior possa ocorrer pelo sinergismo de diversos compostos antioxidantes presentes nas plantas que geram uma maior atividade antioxidante e efeito antitumoral (LIU, 2003).

3.8 POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Antibióticos são medicamentos que podem ser de origem natural ou sintética capazes de inibir o crescimento ou causar a morte das bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria ou de bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

Bactérias são organismos unicelulares procariontes incluídos no Domínio *Bacteria*, podendo apresentar diferentes formas, flagelos, fímbrias e outras estruturas como representado na FIGURA 8. Sua primeira identificação aconteceu nos anos de 1670 por Van Leeuwenhoek após a invenção dos microscópios. Porém, apenas no século XIX houve interesse nesses microrganismos e suspeita que fossem capazes de causar algumas patologias. A hipótese surgiu após alguns experimentos de Louis Pasteur demonstrando que as mesmas tinham uma ampla distribuição no meio ambiente (PATRICK, 2005).

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL SIMPLIFICADA DAS BACTÉRIAS



FONTE: CIENTIC (2003).

Após a segunda metade do século XIX, Robert Koch e outros cientistas identificaram os microorganismos responsáveis por doenças como tuberculose, cólera e tifo. Naquela época, foram realizadas pesquisas para buscar agentes químicos que tivessem atividade antimicrobiana. Em 1910 o primeiro antibiótico de origem sintética para o tratamento de sífilis foi desenvolvido por Ehrlich (WALSH, 2003). Poucos progressos nos estudos de novas moléculas foram feitos até a segunda guerra mundial quando a proflavina foi utilizada para o tratamento de feridas, porém era muito tóxica para os humanos. O marco para história dos antimicrobianos aconteceu em 1935 quando Gerhard Domagk descobriu que o corante vermelho prontossil tinha atividade contra infecções causadas por *Streptococcus sp.* O prontossil é um pró-fármaco, dando origem a classe das sulfas, porém, essa classe de compostos apresenta baixo espectro de ação demonstrando a necessidade da descoberta de novos fármacos (WRIGHT, 2005; NICOLAOU; MONTAGNON. 2008;).

Em 1928 Alexander Fleming descobriu a penicilina de forma acidental. Pesquisando substâncias antibacterianas observou que culturas de *Staphylococcus aureus* estavam contaminadas com um fungo e que apresentavam um halo de inibição de crescimento. Ao estudar o fungo identificou como sendo pertencente ao gênero *Penicillium* e a substância responsável por inibir o crescimento de diversas bactérias gram positivas foi denominada de penicilina (PROJAN; SHLAES, 2004).

Até 1980 inúmeros antibióticos sintéticos foram introduzidos pela indústria farmacêutica, sendo tanto para bactérias gram positivas e gram negativas (FERNANDES, 2006). Nos 20 anos seguintes foram bastante utilizados forma genômica e triagem de produtos naturais, porém poucas moléculas foram introduzidas no mercado e juntamente ocorreu um grande aumento da resistência antimicrobiana (HAPPI *et al.*, 2005). Em 2001 apenas um composto foi registrado na indústria farmacêutica da classe das oxazolidinonas (PAYNE *et al.*, 2007). O aumento da resistência microbiana junto com a escassa descoberta de novos compostos fez com que os estudos de produtos naturais com atividade antimicrobiana fossem retomados pelas indústrias farmacêuticas (ABEYLATH; TUROS, 2008).

É crucial entender os mecanismos bioquímicos e genéticos que fazem parte da resistência antimicrobiana além de elucidar como as bactérias podem desenvolver resistência. Embora esses mecanismos possam variar dependendo do micro-organismo, a resistência é causada por alguns fatores fundamentais tais como: inativação do antibiótico diretamente na molécula bioativa, que ocorre por modificações químicas, geralmente promovidas por enzimas bacterianas (WRIGHT, 2005); modificação do alvo da droga que se traduz em perda de sensibilidade ao antibiótico; (LAMBERT, 2005), modificações da bomba de expulsão (efluxo) e da permeabilidade externa da membrana que favorecem a redução da concentração do antibiótico sem sua modificação química (ALLINGTON; RIVEY, 2001), insensibilidade das bactérias a determinados antibióticos pois são capazes de transmitir a inativação de uma determinada enzima, ou seja, os antibióticos cujos mecanismos de ação envolvem a inibição enzimática tornam-se inativos porque não têm alvo para atuar (HAPPI *et al.*, 2005).

Fontes de produtos naturais, como as plantas, vem tendo um aumento significativo para pesquisa de novos fármacos com atividade antimicrobiana. Vários estudos demonstraram que compostos isolados de algumas plantas são eficazes contra diversos patógenos. Além disso, inúmeras plantas têm demonstrado ser eficazes impedindo a bomba de efluxo, um dos principais mecanismos de resistência bacteriana (GIBBONS, 2004).

Estudos feitos por Fu *et al.* (2022), em animais demonstraram que as bactérias presentes na microbiota das células do câncer de mama foram fundamentais para que essas se espalhassem para os vasos sanguíneos. Os pesquisadores chineses estudaram um tipo de tumor de mama que afeta naturalmente os camundongos de

laboratório. Nesse estudo eles usaram o fato de que alguns antibióticos atuam somente sobre as bactérias que se encontram na corrente sanguínea, embora outros são capazes de matar as bactérias presentes no citoplasma das células, deste modo foi possível avaliar os efeitos das bactérias que colonizam o interior das células tumorais. Além do mais, eles observaram que a presença de bactérias dentro e fora das células tumorais não tem efeito sobre o crescimento do tumor, mas aparentemente teve influência sobre o surgimento de metástases. No processo de metástase a célula tumoral se choca contra a parede dos vasos e artérias podendo lesionar e levar a morte da mesma. No entanto, a pesquisa revelou que a presença das bactérias foi eficaz no fortalecimento do citoesqueleto das células tumorais, aumentando a sobrevivência destas, o que eleva as chances de metástase.

3.9 PLANTAS MEDICINAIS E *Lafoensia pacari*

O Brasil possui uma diversidade de plantas medicinais muito extensa, que são uma fonte importante de compostos bioativos. Por conta disso, a busca por tratamentos de inúmeras doenças, derivadas de plantas vem tendo um aumento significativo (REICHERT *et al.*, 2018).

A *Lafoensia pacari* vem sendo amplamente estudada nos últimos anos devido ao uso popular principalmente como anti-inflamatório e antineoplásica. Além disso, alguns estudos prévios demonstraram tal atividade em linhagens celulares tumorais. A atividade antineoplásica foi atribuída ao ácido elágico e elagitaninos presentes nessa planta (REICHERT *et al.*, 2018).

A *Lafoensia pacari* é uma angiosperma da família Lythraceae, popularmente conhecida como mangava-brava, dedaleira, dedal e pacari. É típica da região do cerrado, cerradão, mata ciliar, mata seca e florestas de altitude. No Brasil encontra-se presente nos estados BA, GO, MG, MA, MT, SP, MS, PR, SC, AP, PA e RS e no DF. (SANTOS; COELHO; PIRANI, 2009). As flores, frutos e caule estão representados na FIGURA 9.

FIGURA 9 - PARTES AÉREAS DE *Lafoensia pacari* A. ST.-HIL., EVIDENCIANDO FLORES (A-B), FRUTOS (B-C) E CAULE (D).



FONTE: SILVA JÚNIOR (2005)

Vários compostos orgânicos que são produzidos pela planta e não possuem relação direta com o crescimento ou seu desenvolvimento são conhecidos como metabólitos secundários, sendo esses compostos responsáveis por inúmeras atividades biológicas (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Dentre os metabólitos encontrados nas folhas de *L. pacari* destacam-se os polifenóis, taninos e flavonoides. Já nas cascas estão presentes taninos, esteroides e saponinas. (SAMPAIO *et al.*, 2011; CARNEIRO *et al.*, 2016; SOLON *et al.*, 2000).

Nos extratos de cascas de *L. pacari* estudos identificaram quimicamente compostos como taninos, esteroides, saponinas, carboidratos, elagitaninos e seus derivados e triterpenos (SOLON *et al.*, 2000).

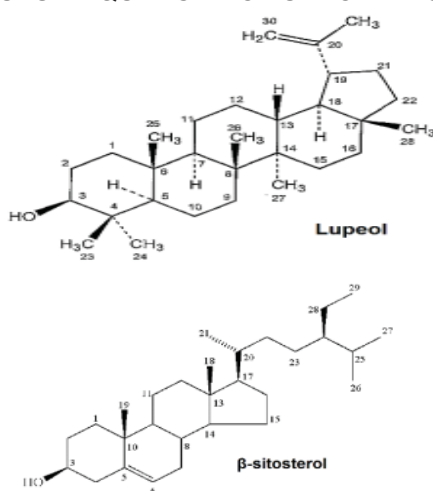
Popularmente as folhas e cascas da *Lafoensia pacari* são utilizadas na forma de decocto ou macerado. Na TABELA 2 estão representados alguns estudos pré-clínicos sobre atividade dos extratos etanólico e metanólico das cascas da *Lafoensia pacari*.

TABELA 2 - ATIVIDADE DOS EXTRATOS ETANÓLICO E METANÓLICO DAS CASCAS DE *L. pacari*.

Atividade	Referências
Antiinflamatória	ROGERIO <i>et al.</i> , 2006;
Anti-úlcera	TAMASHIRO-FILHO <i>et al.</i> , 2012;
Imunoestimulante	ALBUQUERQUE <i>et al.</i> , 1996;
Antiviral	MÜLLER <i>et al.</i> , 2007;
Antifúngico	SILVA JUNIOR <i>et al.</i> , 2010;
Antibacteriana	LIMA <i>et al.</i> , 2006;
Efeitos positivos na sintomatologia de pacientes infectados por <i>H. pylori</i>	MENEZES <i>et al.</i> , 2006;
Antitumoral	MARCONDES <i>et al.</i> , 2014; REICHERT <i>et al.</i> , 2018;

FONTE: A Autora (2022).

No estudo de Galdino (2015) referente a atividade antidepressiva do extrato etanólico das cascas de *Lafoensia pacari* foi encontrado os compostos β - sitosterol e o lupeol. As estruturas químicas desses compostos estão representados na FIGURA 10.

FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DO LUPEOL E DO β -SITOSTEROL.

FONTE: Galdino (2015).

Esteroides são lipídeos presentes em óleos e graxas, além de pigmentos e tocoferol. As plantas sintetizam uma mistura complexa de diferentes tipos de esteroides onde o β - sitosterol é o principal. Diversas atividades foram atribuídas para os fitoteróis como antiinflamatória, hormonal e hipocolesterolemia (BEZERRA; ANTONIOSI, 2015; SALGADO *et al.*, 2008).

Várias atividades biológicas são atribuídas ao lupeol (família dos lupanos), conforme demonstrado na TABELA 3.

TABELA 3- . ATIVIDADES BIOLÓGICAS EM ESTUDOS PRÉ CLINICOS ATRIBUÍDAS AO LUPEOL.

Atividade	Referências
Antiinflamatória	ASHALATHA <i>et al.</i> , 2010;
Analgésica	LIMA <i>et al.</i> , 2013;
Antidiabética	ORTIZ-ANDRADE <i>et al.</i> , 2007;
Antimicrobiana	AHMED <i>et al.</i> , 2010;
Antiprotozoária	ZIEGLER <i>et al.</i> , 2004;
Antimutagênica e Antitumoral	LEE <i>et al.</i> , 2007; LIRA <i>et al.</i> , 2008;
Gastroprotetora	LIRA <i>et al.</i> , 2009;
Hepatoprotetora	AL-REHAILY <i>et al.</i> , 2001;
Nefroprotetora	SHIRWAIKAR; SETTY; BOMMU, 2004;

FONTE: A Autora (2022).

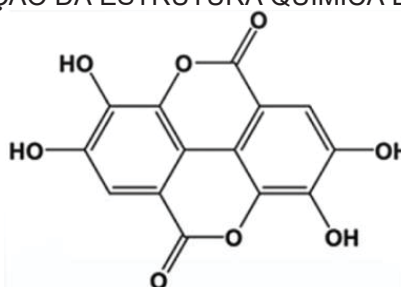
Dentre os metabólitos encontrados na *L. pacari* encontram-se os taninos. Estes possuem uma grande importância biológica atuando em cicatrização de feridas, queimaduras, auxiliando no tratamento e prevenção de câncer, entre outras (LI *et al.*, 2011; STOWE, 2011; CRUZ; FLETCHER; PAJAK, 2014; YILDIRIM; KUTLU, 2015).

Além disso, os taninos possuem a capacidade de se complexar com macromoléculas como proteínas e polissacarídeos e por conta de sua estrutura química tem a capacidade de sequestrar radicais livres (LI *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2016; FUMAGALLI *et al.*, 2016).

De acordo com a estrutura química os taninos podem ser classificados em dois grupos, sendo hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis incluem ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, derivados do ácido

chiquímico, onde os grupos hidroxila de açúcares são esterificados com ácidos fenólicos. Os taninos elágicos são majoritários em relação aos taninos gálicos e quando expressos em ácidos ou bases, sua ligação éster é hidrolisada em ácido hexahidroxidifenil reorganizando espontaneamente em ácido elágico. O ácido elágico é pouco solúvel em água e estudos demonstraram ser esse o principal responsável por diversos efeitos biológicos (CLIFFORD; SCALBERT, 2000). A estrutura química do ácido elágico está representada na FIGURA 11.

FIGURA 11- REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ELÁGICO



FONTE: Adaptado de Ríos *et al.* (2018).

Vários estudos demonstram o ácido elágico sendo o principal responsável por diversas atividades biológicas como demonstrado na TABELA 4.

TABELA 4- ATIVIDADES BIOLÓGICAS EM ESTUDOS PRÉ CLINICOS ATRIBUÍDOS AO ÁCIDO ELÁGICO.

Atividade	Referências
Antiinflamatória e antiedematogênica em camundongos	ALBUQUERQUE <i>et al.</i> , 1996; ROGÉRIO <i>et al.</i> , 2003, 2006 e 2008;
Antiasmática em camundongos	ROGÉRIO <i>et al.</i> , 2008
Gastroprotetora em ratos	TAMASHIRO-FILHO. <i>et al.</i> , 2012
Anti-oxidante	SOLON <i>et al.</i> , 2000
Antiproliferativa /Antitumoral	KIM <i>et al.</i> , 2009;

FONTE: A Autora (2022).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

4.1.1 Obtenção do material botânico

As cascas do caule de *Lafoensia pacari* secas e trituradas foram doadas pelo laboratório de farmacognosia do departamento de farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A coleta do material vegetal foi realizada em maio de 2011, na Fazenda da Mata, localizada no município de Maracaju-MS (21°45'37,4"S, 55°21'81,9"W) e aprovada no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) (n. 29123-1). A mesma foi identificada como sendo a espécie *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, e um exemplar desta encontra-se depositado no Herbário Per Kar 46 Dusén, pertencente à Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Curitiba - PR, sob o número MBM11065.

4.1.2 Preparo do extrato etanólico e frações das cascas do caule de *Lafoensia pacari* A. St.Hil.

A obtenção do extrato bruto e frações foi realizada pelo método utilizado por Galdino (2015) com adaptações. As cascas do caule secas e trituradas foram submetidas ao processo de maceração utilizando uma solução hidroalcoólica 70% (v/v) com 5% da planta (m/v), submetida a agitação manual ocasional por 72 h, posteriormente foi submetido ao processo de filtração e concentrado em rotaevaporador sob temperatura de 40 a 60 °C para que o solvente fosse retirado. Dessa metodologia extrativa obteve-se o extrato etanólico bruto (EBE) das cascas da *Lafoensia pacari*, resultando em um rendimento de 18% em comparação a massa inicial do material vegetal.

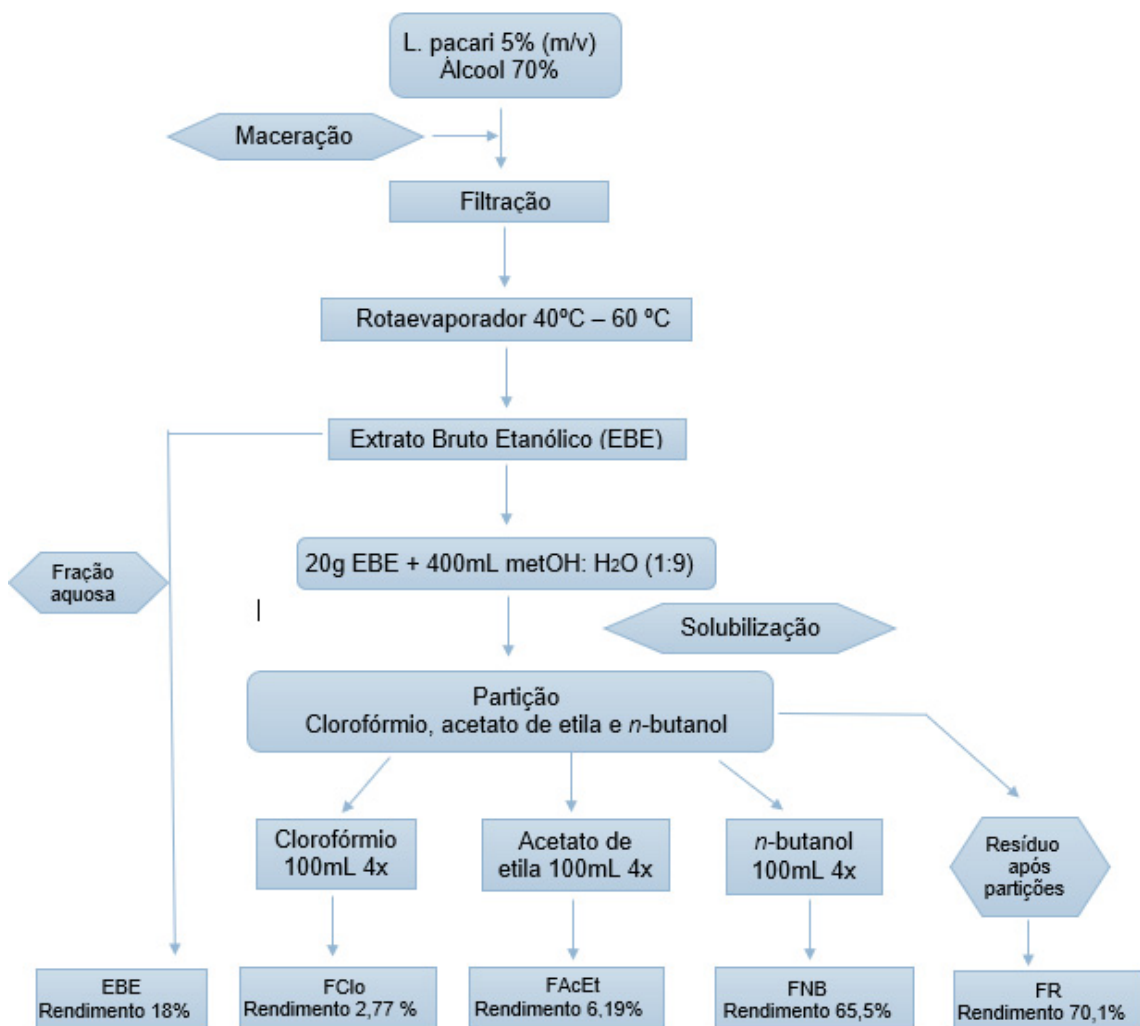
O extrato etanólico bruto foi seco e submetido a extração líquido-líquido, onde 20 g do extrato bruto seco foi solubilizado em 400 mL de metanol:água (1:9) e particionado com solventes imiscíveis com polaridade crescente, sendo eles o clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol.

A ressuspensão de metanol:água (1:9) foi transferida para um funil de separação onde foi adicionado 100 mL de clorofórmio, agitado e após a separação

das fases foi recolhida a fase clorofórmica, em um recipiente devidamente limpo, seco e pesado. Esse procedimento foi repetido por mais 4 vezes. Foi realizado de modo semelhante para os solventes acetato de etila e *n*-butanol. Também foi recolhido o material resultante do procedimento da partição denominado de resíduo.

As frações obtidas foram levadas para o rotaevaporador e dessecadas sob corrente de ar frio até que a massa permanecesse constante. Assim foram obtidos o extrato bruto hidroetanólico (EBE), fração clorofórmica (FClo), acetato de etila (FAcEt), *n*-butanol (FNB) e resíduo (FRe). O rendimento de cada fração foi calculado em relação a massa do extrato hidroetanólico seco, demonstrado na FIGURA 12. O EBE e as frações foram acondicionadas em frascos âmbar, limpos e secos e armazenados a aproximadamente 4°C.

FIGURA 12 - PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES DAS CASCAS DO CAULE DE *Lafoensia pacari* A. St.Hil.



FONTE: A Autora (2022).

4.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

4.2.1 Análise por CLAE

A análise do perfil cromatográfico do extrato e frações foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Agilent Technologies, 1100 series) acoplado ao detector de arranjo diodos (DAD). A corrida cromatográfica ocorreu em temperatura ambiente, utilizando uma pré-coluna XBridge C₁₈ (4,6 mm x 20 mm, 5 µm) e coluna XBridge C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5 µm). Como fase móvel, empregou-se uma mistura de água Milli-Q acidificada com ácido fosfórico (0,1%, v/v) (A) e metanol (B) em sistema gradiente exploratório (fluxo 5 a 95% de B em 60 min e 95% de B em 10 min).

Para a caracterização do extrato, frações e padrão de ácido elágico, estes foram diluídos em metanol (grau HPLC) na concentração final de 1 mg/mL, filtrados em filtros de membrana de PTFE de 0,45 µm (MillexTM, Millipore), injetados 50 µL no cromatógrafo, monitorados e registrados em 270 nm. A caracterização dos compostos foi feita utilizando um padrão de ácido elágico (6,5 µg/mL) e um extrato padrão obtido por maceração água:etanol (1:1) previamente identificado no trabalho de Atherino *et al.* (2020).

No ensaio de captação do ácido elágico por células MDA-MB-231, a análise cromatográfica dos sobrenadantes e das células lisadas foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Agilent Technologies, 1100 series) acoplado ao detector de arranjo diodos (DAD). A corrida cromatográfica ocorreu em temperatura ambiente, utilizando uma pré-coluna XBridge C₁₈ (4,6 mm x 20 mm, 5 µm) e coluna XBridge C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5 µm). Como fase móvel, empregou-se uma mistura de água Milli-Q acidificada com ácido fosfórico (0,1%, v/v) (A) e acetonitrila acidificada com ácido fosfórico 0,1% (B) em sistema gradiente exploratório (fluxo 80% (A) de 20% de (B) em 20 min e 85% de B em 10min).

Foi realizada uma curva padrão com ácido elágico diluídos em metanol (grau HPLC) nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL. Para a caracterização das amostras, estas e a curva padrão foram filtradas em filtros de membrana de PTFE de 0,45 µm (MillexTM, Millipore), o volume injetado no cromatógrafo foi de 10 µL, monitorados e registrados em 270 nm.

4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS “*In vitro*”

4.3.1 Cultivo de células

A célula da linhagem tumoral MDA-MB-231 (carcinoma mamário humano – código 0392) foram adquiridas comercialmente no banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ - UFRJ). Já a linhagem não tumoral McCoy (fibroblasto murino) foi obtida comercialmente no Instituto Adolfo Lutz.

Ambas as linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) e solução de antibióticos contendo penicilina e estreptomicina (10.000 U/mL - GIBCO, Baltimore, EUA).

As células foram mantidas em garrafas de cultivo T25 em uma densidade de 1×10^5 células/mL de meio RPMI, à temperatura de 37 °C e em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.3.2 Avaliação do potencial citotóxico e antiproliferativo seletivo do extrato, das frações de cascas do caule *L. pacari* e do padrão de ácido elágico

4.3.2.1 Ensaio da viabilidade celular pelo método da redução do sal de tetrazólio (MTT)

Para avaliar a viabilidade metabólica das linhagens MDA-MB-231 e McCoy foi realizado o ensaio de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo) de acordo com Mosmann (1983).

Foram utilizadas placas de 96 poços para o plaqueamento das células nas concentrações de $2,0 \times 10^3$ células/poço, utilizando meio de cultivo RPMI suplementado com 5% de SFB, seguido de incubação em estufa (37 °C e atmosfera de 5% de CO₂) por 24 h para adesão das células. Após esse tempo foi realizada a remoção do meio de cultivo e, em seguida, as células foram tratadas com concentrações variadas do extrato (5 a 1000 µg/mL), frações e ácido elágico, diluídos em meio de cultivo por 72 h. Como controle negativo foi utilizado o veículo das diluições dos extratos (DMSO 0,125%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA,) e meio de cultivo. Após o tempo de tratamento, a cada poço foi adicionado 20 µL da solução de

MTT (5 mg/mL). As placas foram incubadas novamente por mais 2 h. O conteúdo de cada poço foi aspirado com auxílio de uma micropipeta e os cristais de formazan solubilizados com a adição de 100 µL em cada poço de DMSO (PA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Após homogeneização em shaker por 5 min, os resultados foram lidos em leitor de microplaca (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) no comprimento de onda de 570 nm. Para o branco foram utilizadas placas equivalentes, porém sem células.

A redução do sal MTT do grupo controle (CTRL) foi considerada como 100% de viabilidade metabólica. Os valores de concentração inibitória média (CI₅₀) foram determinados a partir do software GraphPad Prisma 6 (San Diego, EUA). Os experimentos foram realizados em triplicata e repetido três vezes para melhor consistência dos resultados.

A porcentagem de células viáveis foi calculada pela fórmula descrita por Ebada *et al.* (2008):

$$\% \text{ células viáveis} = 100 \times \frac{\text{Abs células tratadas} - \text{Abs branco tratado}}{\text{Abs células CTRL} - \text{Abs branco CTRL}}$$

4.3.2.2 Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) foi calculado pelo método descrito por Badisa e colaboradores (2009), onde foi considerado a concentração inibitória média (CI₅₀) calculada anteriormente pelos ensaios de MTT para células não tumorais e tumorais, conforme a equação abaixo:

$$IS = \frac{CI50 \text{ do extrato na célula não - tumoral}}{CI50 \text{ do extrato na célula tumoral}}$$

O índice de seletividade mostra a atividade diferencial de um composto ou mistura de compostos, ou seja, quanto maior o valor obtido pela equação mais seletivo se apresenta (KOCH *et al.*, 2005).

4.3.3 Teste de adesão celular

Para avaliação da adesão celular foi realizado o experimento pelo método de Wang *et al.* (2003) com adaptações. Células MDA-MB-231 foram plaqueadas em 6 poços, na concentração de $6,0 \times 10^4$ células/poço, utilizando meio de cultivo RPMI suplementado com 5% de SFB, seguido de incubação em estufa (37 °C e atmosfera de 5% de CO₂) por 24 h para adesão das células. Em seguida, as células foram tratadas com extrato bruto de *Lafoensia pacari* (EBE) por 72 h e com ácido elágico por 2 h, nas concentrações de 1, 10, 100 e 200 µg/mL. Para os controles foram utilizadas células MDA-MB-231 em meio RPMI 1640 suplementado com SFB nas mesmas condições, mas sem a presença dos tratamentos.

Em outros experimentos, seguiu-se com a avaliação da presença da matriz sobre a adesão celular. Neste ensaio foram utilizadas placas de 96 poços, sendo estas revestidas com as proteínas de matriz (fibronectina 15 µg/mL e vitronectina µg/mL). As proteínas de matriz foram adicionadas em cada poço com meio RPMI suplementado com 10% SFB seguido de incubação em estufa (37 °C e atmosfera de 5% de CO₂) por 60 min e secas a temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados 3 vezes com PBS.

As células que foram tratadas anteriormente com o EBE de *Lafoensia pacari* por 72 h e com ácido elágico por 2 h, nas concentrações de 1 a 200 µg/mL, foram retiradas da placa de 6 poços e adicionadas na placa de 96 poços com as proteínas de matriz e incubadas (37 °C e atmosfera de 5% de CO₂) por 90 min. Para o controle foram utilizadas as mesmas células nas mesmas condições, porém, adicionadas em poços sem a presença das proteínas de matriz.

4.3.3.2 Avaliação da adesão celular *in vitro*

A avaliação da adesão celular *in vitro* com a linhagem celular tumoral MDA-MB-231 foram realizadas por método colorimétrico. Após o período de incubação de 90 min, as placas contendo as células tratadas com as diferentes concentrações de extrato e do ácido elágico foram lavadas 3 vezes com PBS a fim de remover as células não aderidas, e em seguida realizado a fixação com 100 µL de paraformaldeído 2% por 10 min, lavadas por 3 vezes com PBS e coradas com cristal de violeta a 0,2% em etanol 2% por 5 min. Posteriormente foram realizadas aproximadamente 10 lavagens

com PBS e então as células foram lisadas com NaOH 0,2M (100 µL por poço) por 10 min. A leitura foi realizada em leitor de microplaca (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) ao comprimento de onda de 540 nm. As absorvâncias das amostras foram comparadas com as do controle e os resultados foram expressos na forma de porcentagem de adesão. As fotomicrografias foram realizadas utilizando microscópio invertido (Bioval, serie XDS-1B).

4.3.4 Imunocitoquímica para detecção de OAT's

A imunocoloração em células da linhagem tumoral MDA-MB-231 decorrente da presença de OAT1 e OAT3 foi realizada segundo protocolo adaptado de Enomoto *et al.* (2002). Foram plaqueadas $5,4 \times 10^4$ células/ poço sobre lamínulas em placas de 24 poços. Após o tempo de adesão de 24 h as células foram tratadas com o ácido elágico na concentração de 100 µg/mL por 2 h (tempo previamente descrito por Atherino *et al.* (2020). Após o tempo de tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 min, permeabilizadas com triton X-100 por 5 min e incubadas com peróxido de hidrogênio 3% (H₂O₂) por 30 min para que a atividade da peroxidase endógena fosse suprimida. O bloqueio foi realizado com BSA 0,5%, seguido de incubação com anticorpo primário anti-OAT1 e anti-OAT3 na proporção 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) por 18 h a 4 °C e em seguida, com anticorpo secundário (anti-cabra) marcado com peroxidase na diluição de 1:150 por 1 h à temperatura ambiente. A reação foi revelada com o *kit* Vector Red (Vector Laboratories, CA, EUA). Após coradas as lamínulas foram montadas em lâminas com Entellan (Millipore Merk, Darmstadt, Alemanha) para microscopia. As imagens foram feitas no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, em microscopia de luz (Axiolmager Z2, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) acoplado a um scanner de slides automatizado (Metassystems, Altussheim, DE) utilizando aumento de 100x. Os experimentos foram realizados em duplicata. A comparação da coloração de células MDA-MB-231 tratadas e não tratadas com ácido elágico (com e sem anticorpos) foi realizada utilizando o software ImageJ versão 1.51p.

4.3.5 Ensaio da captação do ácido elágico

A captação celular do padrão de ácido elágico pelas linhagens MDA-MB-231 foi realizada pelo protocolo de Larrosa *et al.* (2006) com modificações. Basicamente, as células das linhagens MDA-MB-231 foram cultivadas em frascos de cultivo T25, plaqueadas em placas de 6 poços com $2,7 \times 10^5$ células/poço e incubadas durante 2 h com meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) contendo ácido elágico (100 µg/mL) conforme condições já demonstradas por nosso grupo de estudo (ATHERINO *et al.*, 2020). De modo a verificar a especificidade de um inibidor de transporte celular, em outro poço foi adicionado probenicida (10 mM) e mantidos por 30 min, posteriormente ácido elágico (100 µg/mL) e incubadas por 2 h. Para os controles, as células foram plaqueadas nas mesmas condições, porém sem a presença do tratamento com o ácido elágico. Após o período de tratamento, o sobrenadante foi retirado e congelado para a análise por HPLC do ácido elágico presente no meio extracelular. Em cada poço foi adicionado NaOH (0,2 M) e cada amostra submetida ao ultrassom para realização da lise celular, sendo o conteúdo armazenado para posterior análise do ácido elágico que foi captado pelas células tumorais através do HPLC. Os experimentos foram realizados em duplicata. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas descritas no item 4.2 (Análises Cromatográficas e Espectrométricas).

4.3.6 Ensaio de migração celular de linhagem tumoral MDA-MB-231 - *Wound Healing*

O ensaio de migração celular foi realizado de acordo com o ensaio de *Wound Healing*, baseado no modelo descrito por Burk *et al.* (1973) com adaptações. Células de linhagem tumoral MDA-MB-231 foram cultivadas em garrafas T25 até atingirem 80% de confluência. Então foram plaqueadas $6,0 \times 10^4$ células/ poço em placas de 6 poços. As placas foram incubadas (37 °C com 5% de CO₂) por 24 h para adesão. Após este tempo, as células foram tratadas com um inibidor L-NAME por 72 h, extrato bruto de *L. pacari* por 72 h (EBE) e com ácido elágico por 2 h. Ao término do período de tratamento o sobrenadante foi delicadamente retirado com auxílio de micropipeta e realizado um risco no poço vertical e outro horizontal, com auxílio de ponteira de 100 µL e uma lâmina de modo a formar uma fenda no poço. Cada poço foi lavado 3 vezes com PBS e adicionado meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB)

e incubadas novamente na mesma condição anterior. Para o controle negativo o experimento foi realizado nas mesmas condições sem tratamento. As fotos foram realizadas em microscópio invertido (Bioval, serie XDS-1B) nos tempos 0, 24, 48 e 72 h após exposição da célula ao tratamento.

A área da fenda foi estimada utilizando o software ImageJ. A área do tempo 0 foi considerada como 100% de inibição de migração e os valores percentuais do tempo 0 foram atribuídos para as medias das áreas mensuradas nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h. Cada experimento foi realizado em duplicata e repetidos por 3 vezes.

4.3.7 Dosagem de óxido nítrico

Os níveis de óxido nítrico após o tratamento das células MDA-MB-231 foi realizado pela reação de Griess de acordo com Giovanonni *et al.* (1997) modificado. Células de linhagem tumoral MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de $5,0 \times 10^3$ células/ poço e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 h. Posteriormente as células foram tratadas com extrato bruto hidroetanólico de *L. pacari* nas concentrações de 200, 100, 20, e 2 µg/mL isoladamente ou em associação com um inibidor da NOS, nitro-L-arginina metil éster (L-LAME-1 µg/mL). Foi utilizado também um estimulador da NOS, o lipopolissacarídeo (LPS-100 ng/mL). O controle negativo foi feito nas mesmas condições, porém, sem a presença de tratamento, utilizando apenas o meio RPMI suplementado com 10% de SFB. O tempo de tratamento foi de 72 h. Após esse tempo o sobrenadante foi recolhido e procedeu-se com dosagem do óxido nítrico.

Utilizando uma placa de 96 poços foram adicionadas em cada poço 100 µL do sobrenadante recolhido anteriormente e 100 µL do reagente de Griess (Sulfanilamida 1% p/v, em H₃PO₄ 5%, juntamente com alfa-naftil-etilenodiamina 0,1% v/v em água) (WAGNER *et al.*, 1982). Para o branco foi utilizado apenas o meio RPMI suplementado com SFB e com reagente de Griess nas mesmas condições. Por fim, foi realizada a leitura em leitor de microplaca (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) a 540 nm após 10 min. A quantificação de nitrito do sobrenadante foi realizada a partir de uma curva padrão com concentrações determinadas de nitrito de sódio em µM. A produção de óxido nítrico foi estimada pela quantificação de nitrito por ser o metabólito estável de NO.

4.4 BIOENSAIO ANTIMICROBIANO

Foram utilizadas nos experimentos bactérias gram-positivas tais como *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), além de gram-negativas como *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). A atividade antimicrobiana foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (BORDIGNON-JUNIOR *et al.*, 2012).

Para o ensaio, as bactérias foram viabilizadas em meio CLED (Cistina Lactose Eletrólitos Deficiente) 24 h antes da realização dos experimentos. O inóculo bacteriano foi preparado em salina 0,85% a partir da cultura bacteriana semeado em meio CLED cultivada *overnight*, com uma turbidez equivalente à escala de 0,5 de McFarland ($\sim 1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Esta suspensão foi então diluída 1:20 ($\sim 5 \times 10^6$ UFC/mL).

Utilizando placas de 96 poços de fundo redondo as suspensões foram inoculadas em caldo Mueller Hinton II (MH). Cada poço recebeu 180 μ L de meio, 10 μ L da suspensão de bactérias e 10 μ L do extrato bruto e frações das cascas de *L. pacari* nas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 e 7,81 μ g/mL. O agente antimicrobiano gentamicina (500-0,03 μ g/mL) foi adicionado ao poço e usado como controle positivo. Como controle negativo, os microrganismos foram tratados com DMSO 1%.

As microplacas foram mantidas em estufa bacteriológica por 18 h a 37 °C, avaliada quanto a presença de turbidez ou precipitado e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada, definida como sendo a menor concentração da mistura de composto testado que inibiu o crescimento bacteriano quando observada a olho desnudo e expresso em micrograma por mililitro (μ g/mL).

A CIM dos compostos testados e duas concentrações subsequentes (10 μ L) foram semeadas em meio CLED com alça bacteriológica, incubadas em estufa bacteriológica por 18 h a 37 °C e após avaliado o crescimento de colônias para determinação da concentração bactericida mínima (CBM). A atividade antibacteriana do extrato e frações foram baseadas na concentração inibitória mínima (MIC) utilizando o seguinte critério: MIC < 100 μ g/mL, 100–500 μ g/mL, 500–1000 μ g/mL e >1000 μ g/mL sendo considerado bom, moderado e inativo, respectivamente (PESSINI *et al.*, 2003). Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

4.5 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

A avaliação do potencial antioxidante do extrato bruto hidroetanólico (EBE) e frações (FClo, FAcEt, FNB e FR) das cascas de *L. pacari* foi realizado por três metodologias distintas, sendo elas o ensaio de redução do complexo fosfomolibdênico, ensaio de redução do radical livre 1, 1 – difenil – picrihidrazil (DPPH) e o pelo método polinomial de Lagrange.

4.5.1 Avaliação da atividade pela formação complexo fosfomolibdênico

O ensaio foi realizado de acordo com Prieto; Pineda; Aguiar (1999), com adaptações, onde 0,3 mL do extrato bruto e frações da *L. pacari* (200 µg/mL) foram adicionadas em um tubo com 3 mL da solução do complexo fosfomolibdênico (solução de Na₃PO₄ (28 mL, 0,1 mol/L) com solução de (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (12 mL, 0,03 mol/L) e solução de H₂SO₄ (20 mL, 3 mol/L), sendo o volume completado com H₂O destilada para 100 mL) previamente preparado (100 °C). Depois do tempo da reação (90 min) foi realizada a leitura da absorvância em leitor de microplaca Multiskan FC (ThermoScientific, EUA) utilizando o filtro de 695 nm. As absorvâncias das amostras foram comparadas com a absorvância do padrão de ácido ascórbico nas mesmas condições de análise.

Os resultados foram expressos na forma de atividade antioxidante relativa (AAR%_(ác. Ascórbico)) e os cálculos foram realizados de acordo com a seguinte equação:

$$AAR\% (\acute{a}c. \text{ascórbico}) = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs}(\acute{a}c. \text{ascórbico}) - \text{Abs}(\text{branco})} \cdot 100$$

Esse método fundamenta-se na reação de redução do molibdênio VI a molibdênio V na presença de substâncias que possuem capacidade antioxidante, formando um complexo verde entre o fosfato/molibdênio V em pH ácido.

4.5.2 Ensaio de redução do radical livre 1, 1 – difenil – picrihidrazil (DPPH)

O experimento foi realizado segundo protocolo de Mensor *et al.* (2001) com adaptações. O ensaio foi realizado partindo de uma solução etanólica a 1000 µg/mL

das amostras e diluídas a fim de obter concentrações para curva de calibração (1000 – 25 µg/mL). Na sequência as soluções obtidas (2,5 mL) foram incorporadas a 1 mL de solução etanólica de DPPH (0,3 mM). A mistura foi incubada por 60 minutos ao abrigo da luz e a absorvância foi determinada com espectrofotômetro no comprimento de onda 518 nm. O controle negativo foi feito com solução de DPPH e etanol. O branco foi formado apenas pela mistura de etanol (1 mL) com cada uma das soluções obtidas (2,5 mL), de modo que, para cada concentração existiu um branco.

As amostras foram diluídas de forma a evidenciar seu IC₅₀ resultando em diferentes concentrações para cada amostra. Portanto, o ensaio para cada concentração de cada amostra foi realizado em triplicata nas mesmas condições de análises e as medias foram utilizadas para o cálculo do percentual de inibição do DPPH em relação ao controle negativo, pela fórmula demonstrada abaixo:

$$\%Inib. DPPH = 100 - \left[\left(\frac{Amostra - Branco}{Controle} \right) \times 100 \right]$$

Foi obtido um gráfico de percentual de inibição do DPPH em função da concentração. Através da equação da reta foi possível determinar o IC₅₀ da amostra analisada, já que a linha de tendência do gráfico apresentou característica linear.

O ensaio fotométrico de DPPH ocorre com a reação dos compostos antioxidantes presentes na amostra em neutralizar o radical livre 1, 1 – difenil – picrihidrazil (DPPH). Esta reação pode ser evidenciada pela mudança da coloração do meio de violeta profundo ou claro para amarelo pálido.

4.5.3 Análise de interpolação polinomial de Lagrange

O polinômio de Lagrange é construído a partir do seguinte princípio: um conjunto de n pontos de coordenadas X e f(X), sendo que todos os X são distintos. Pode-se então, construir um polinômio de grau (n-1) que passa por todos esses pontos, conforme demonstrado pela fórmula descrita abaixo:

$$P_n(x) = \sum_{i=0}^n \left(y_i \prod_{\substack{j=0 \\ j \neq i}}^n \frac{(x - x_j)}{(x_i - x_j)} \right)$$

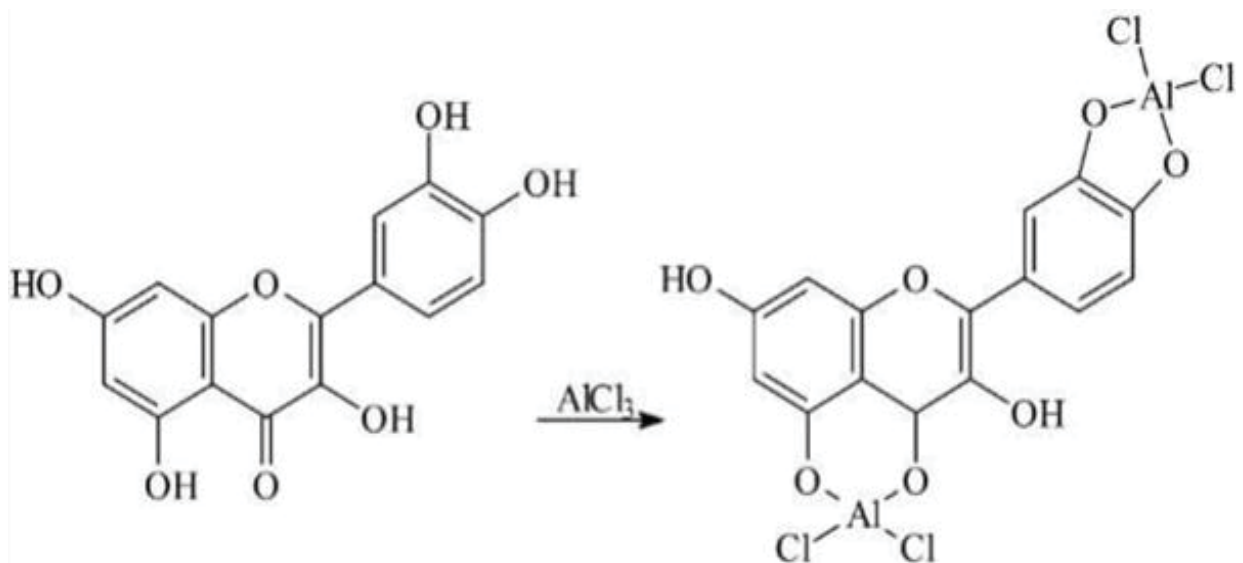
Na análise da atividade antioxidante também foi utilizado o método de interpolação de Lagrange conforme descrito por Guimarães; Nascimento, (2004).

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES E POLIFENÓIS TOTAIS

4.6.1 Determinação de flavonoides totais

A determinação de flavonoides totais presentes na amostra foi realizada pela complexação do flavonoide com cloreto de alumínio (AlCl_3), gerando um complexo estável de coloração amarelada, demonstrado na FIGURA 13, que é proporcional a concentração de flavonoides presentes na amostra (PEIXOTO SOBRINHO *et al.*, 2012).

FIGURA 13 - FORMAÇÃO DO COMPLEXO QUERCETINA-ALUMÍNIO³⁺.



FONTE: Peixoto Sobrinho *et al.*, (2012).

O ensaio foi realizado seguindo a metodologia utilizada por GUERRERO-CASTILLO *et al.*, (2019) com modificações, utilizando uma curva padrão de quercetina em etanol (250 µg/mL – 7,8125 µg/mL). Em uma placa de 96 poços foi adicionado 100µL de de extrato bruto e frações (500 µg/mL ou 250 µg/mL) ou 100 µL do padrão quercetina. Em seguida foi adicionado em cada poço 100 µL de AlCl₃ em metanol (2% m/v). A reação foi deixada em repouso ao abrigo da luz por 60 min. A leitura da absorvância foi realizada em leitor de microplaca Multiskan FC (ThermoScientific, EUA) utilizando o filtro de 414 nm contra o branco (amostras em metanol). Os resultados das amostras foram comparados com a curva padrão da quercetina, e os resultados foram expressos em mg equivalentes de quercetina por grama de extrato ou fração (mg EQ/g). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.6.2 Determinação do conteúdo de polifenóis totais

A quantificação de polifenóis totais presentes na amostra foi realizada através do ensaio de Folin-Ciocalteu. O mecanismo dessa reação envolve o reagente Folin-Ciocalteu, composto por molibdatos e tungstatos oxidados com agentes redutores presentes na amostra, que formam espécies reduzidas desses metais, ocorrendo a mudança da coloração do meio de amarelo para azul (SÁNCHEZ-RANGEL *et al.*, 2013).

O teste foi realizado de acordo com Bridi *et al.* (2019) com adaptações e em triplicata. Utilizando uma curva padrão de ácido gálico em etanol nas concentrações de 500 µg/mL – 5 µg/mL. Em uma placa de 96 poços, foi adicionado 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água (10%, v/v), 20 µL do extrato bruto e frações da *Lafoensia pacari* (500 µg/mL ou 250 µg/mL) e 80 µL de solução de carbonato de sódio (7,5%, p/v). A placa foi deixada em repouso no escuro por 60 min. A leitura da absorvância foi realizada em leitor de microplaca Multiskan FC (ThermoScientific, EUA) utilizando o filtro de 690 nm. Os resultados de cada amostra foram comparados com a curva padrão de ácido gálico e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama do extrato e frações (mg EAG/g).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em $\text{media} \pm \text{desvio padrão (DP)}$. Para analisar os resultados entre os grupos foram realizados análise de variância ANOVA seguido pelo teste de Holm-Sidak, Tukey ou Bonferroni t-test. Os resultados foram considerados significativos com valores de $P < 0,001$, $P < 0,01$ ou $P < 0,05$. Foi utilizado o pacote estatístico Sigmastat® para Windows (Versão 3.5, USA).

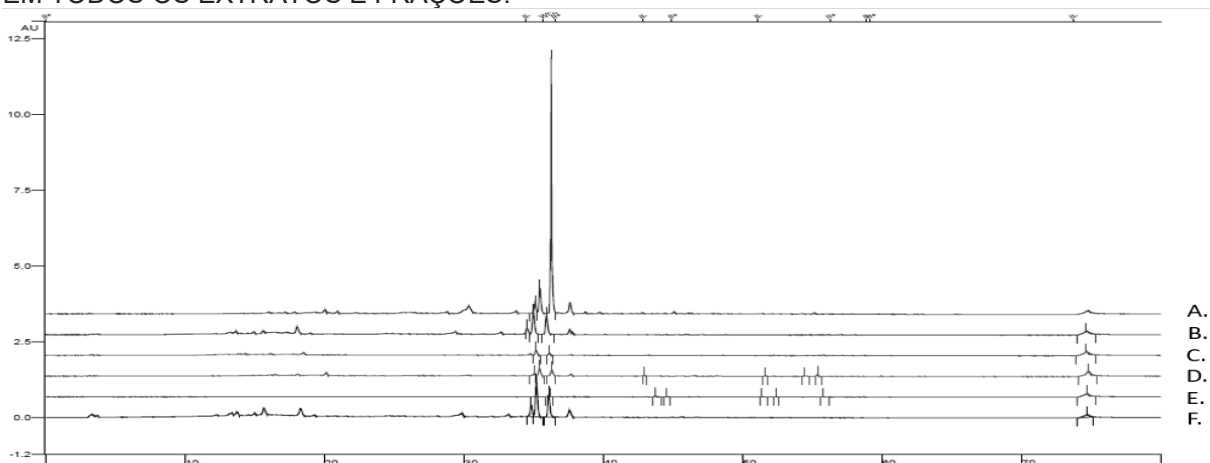
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

5.1.1 Comparação entre os dados de CLAE-DAD da composição química do extrato bruto e frações obtidas de cascas de *L. pacari* com extrato hidroetanólico (50:50) caracterizado

A análise por CLAE-DAD foi realizada comparando o extrato bruto e frações obtidas com uma referência obtida a partir de um extrato bruto hidroetanólico (50:50) já amplamente estudado e caracterizado por nosso grupo de pesquisa (ATHERINO, 2019). Embora o extrato bruto etanólico (70:30) obtido nesse trabalho tenha sido obtido com proporção diferente de solventes pode ser observado que apresentou característica química semelhante ao extrato usado como referência, variando apenas a área do pico (AU), conforme pode ser observado na FIGURA 14. Os compostos químicos, conforme esperado, encontram-se particionados nas frações clorofórmica, acetato de etila, butanólica e residual, contudo, o ácido elágico está presente em todas elas ($t_R = 36,313$ min).

FIGURA 14 – PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE DA FRAÇÃO DE ACETATO DE ETILA (A), FRAÇÃO RESIDUAL (B), FRAÇÃO *n*-BUTANÓLICA (C), EXTRATO BRUTO (70:30) (D), FRAÇÃO CLOROFÓRMICA (E) E FRAÇÃO HIDROETANÓLICA (50:50) (F) EVIDENCIANDO A SIMILARIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS E A PRESENÇA DE ÁCIDO ELÁGICO ($RT = 36,036$ MIN) EM TODOS OS EXTRATOS E FRAÇÕES.

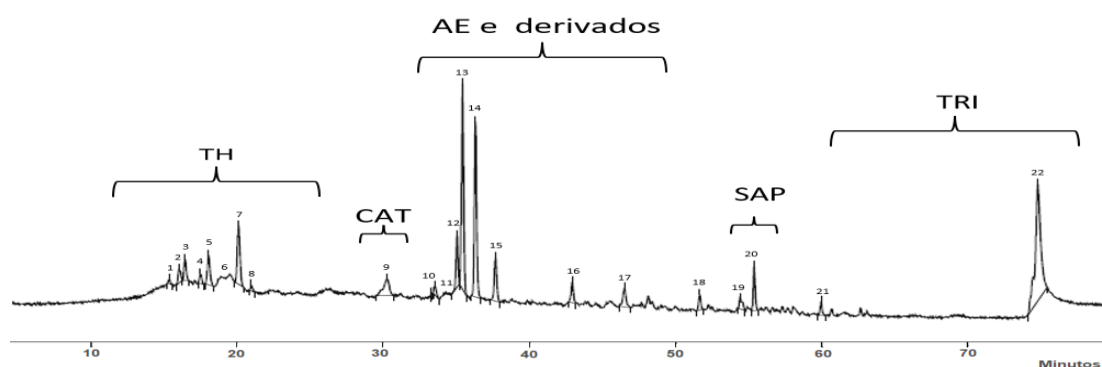


FONTE: A Autora (2022).

NOTA: Perfil cromatográfico obtido por CLAE dos extratos hidroetanólicos e frações das cascas do caule de *L. pacari*, evidenciando a similaridade na composição química qualitativa. A: fração acetato de etila, B: fração resíduo, C: fração *n*-butanol, D: extrato bruto hidroetanólico 70%, E: fração clorofórmio, F: extrato hidroetanólico 50%.

Análise de CLAE dos extratos revelou a presença de uma mistura complexa onde foram sugeridos 19 componentes nas amostras de *L. pacari* dos 22 picos selecionados, incluindo taninos hidrolisáveis, ácido elágico e derivados, saponinas e triterpenos (FIGURA 15 e TABELA 5). A FIGURA 16 demonstra o grupamento dos elagitaninos e derivados presente no extrato hidroetanólico referência (50:50) comparada ao extrato hidroetanólico e frações obtidas nesse trabalho.

FIGURA 15 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE-DAD DOS PRINCIPAIS PICOS DO EXTRATO HIDROETANÓLICO 70% INCLUINDO OS TANINOS HIDROLISÁVEIS (TH), CATEQUINAS (CAT), ÁCIDO ELÁGICO (AE) E DERIVADOS, SAPONINAS (SAP) E TRITERPENOS (TRI).



FONTE: A Autora (2022).

TABELA 5 - COMPOSTOS DETECTADOS NO EXTRATO HIDROETANÓLICO 70% POR CLAE-DAD.

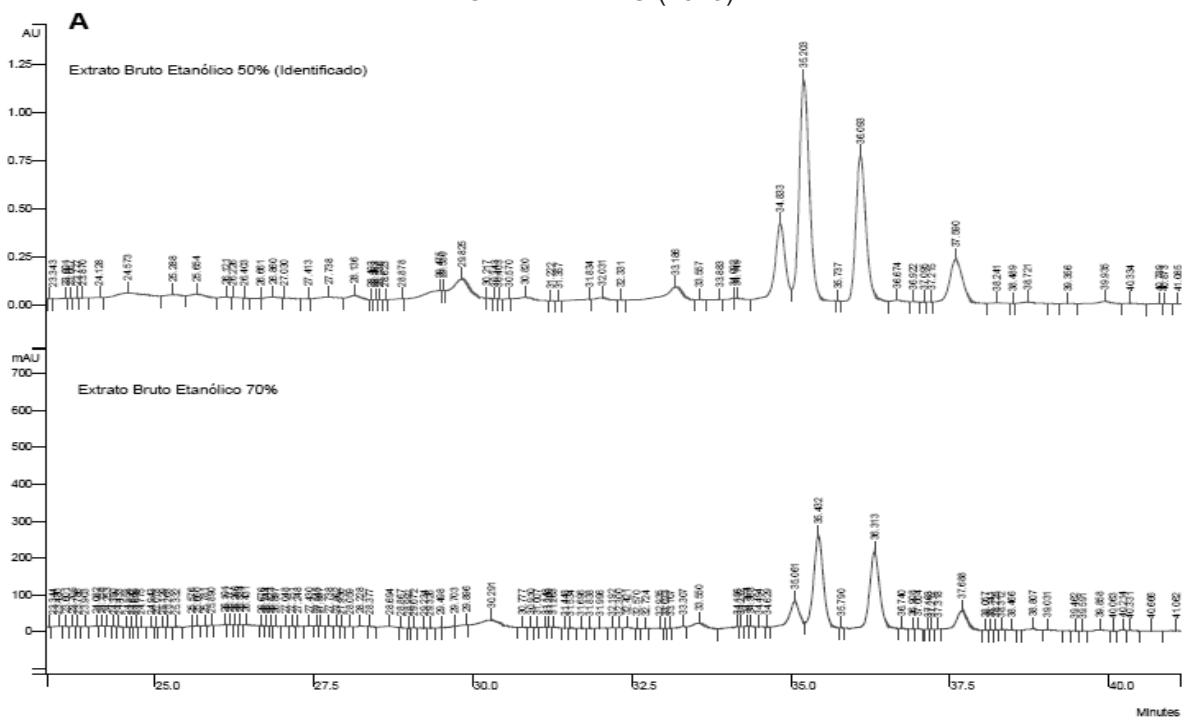
Pico	t _R (min)	Substância sugerida	Referência
1	15.381	HHDP-O-hexosídeo	
2	16.048	Isômero de punicalina	
3	16.461	Isômero de pedunculagina	
4	17.517	O-galoil punicalina	
5	18.067	Elagitanino	
6	19.168	Elagitanino	
7	20.123	Isômero de punicalagina	
8	20.984	Isômero de punicalagina	
9	30.298	Catequina	FISCHER <i>et al.</i> (2011)
10	33.304	NI	MENA <i>et al.</i> (2012)
11	33.554	Isômero de ácido hexosil elágico	CALANI <i>et al.</i> (2013)
12	35.061	Isômero de ácido hexosil elágico	AMBIGAIPALAN <i>et al.</i> (2016)
13	35.432	Ácido O-deoxihexosil elágico	ABDULLA <i>et al.</i> (2017)
14	36.313	Ácido elágico *	REICHERT <i>et al.</i> (2018)
15	37.688	Ácido O-deoxihexosil O-metil elágico	ATHERINO (2019)

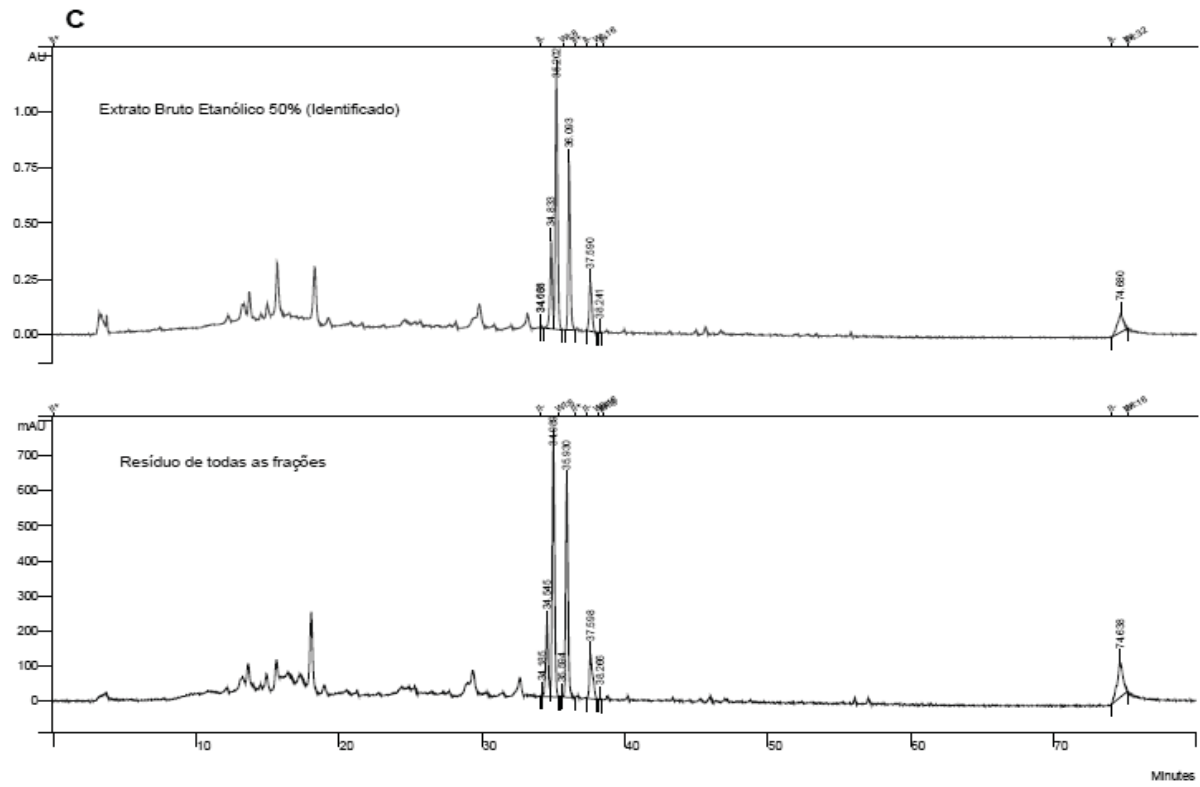
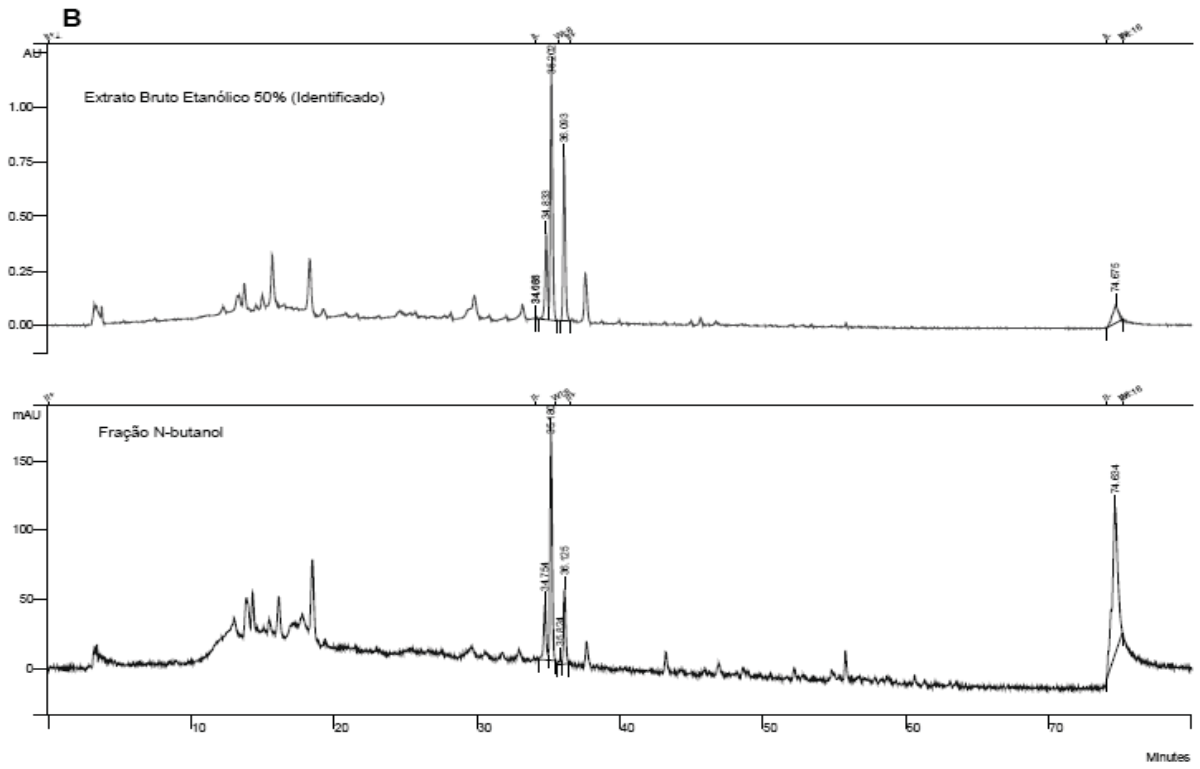
16	42.933	Ácido O-deoxihexosil O-metil elágico
17	46.504	Ácido O-galoil-deoxihexosil elágico
18	51.651	NI
19	54.415	NI
20	55.366	saponina
21	59.946	triterpeno
22	74.762	triterpeno

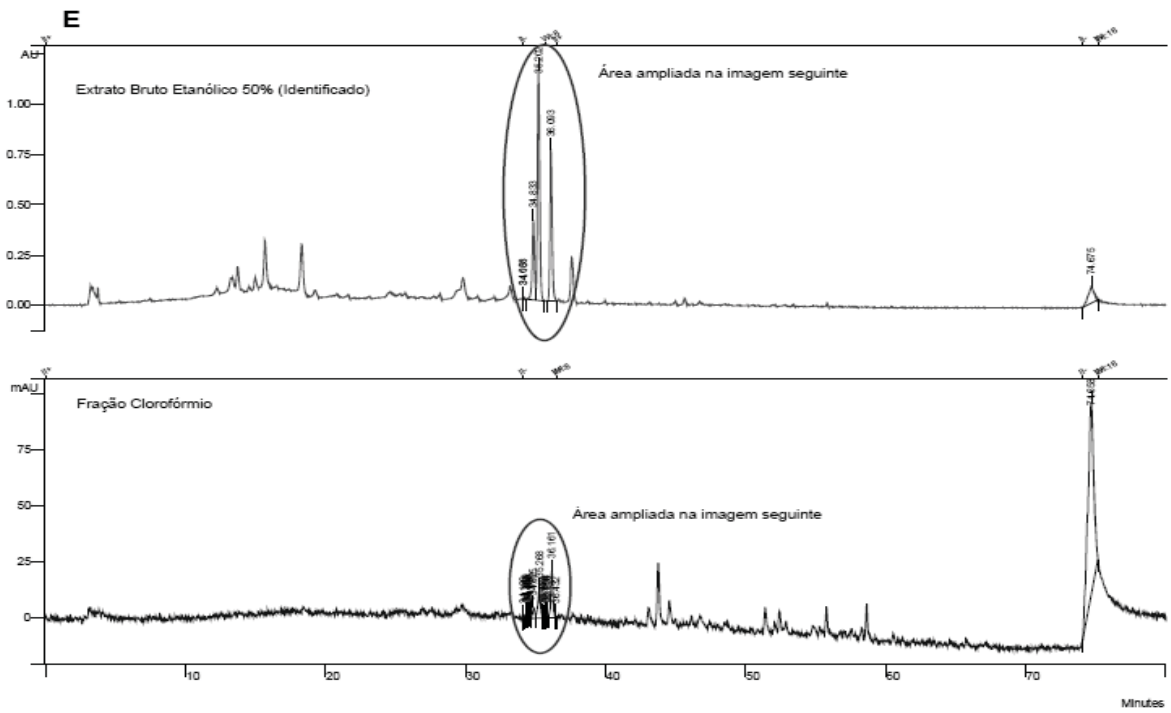
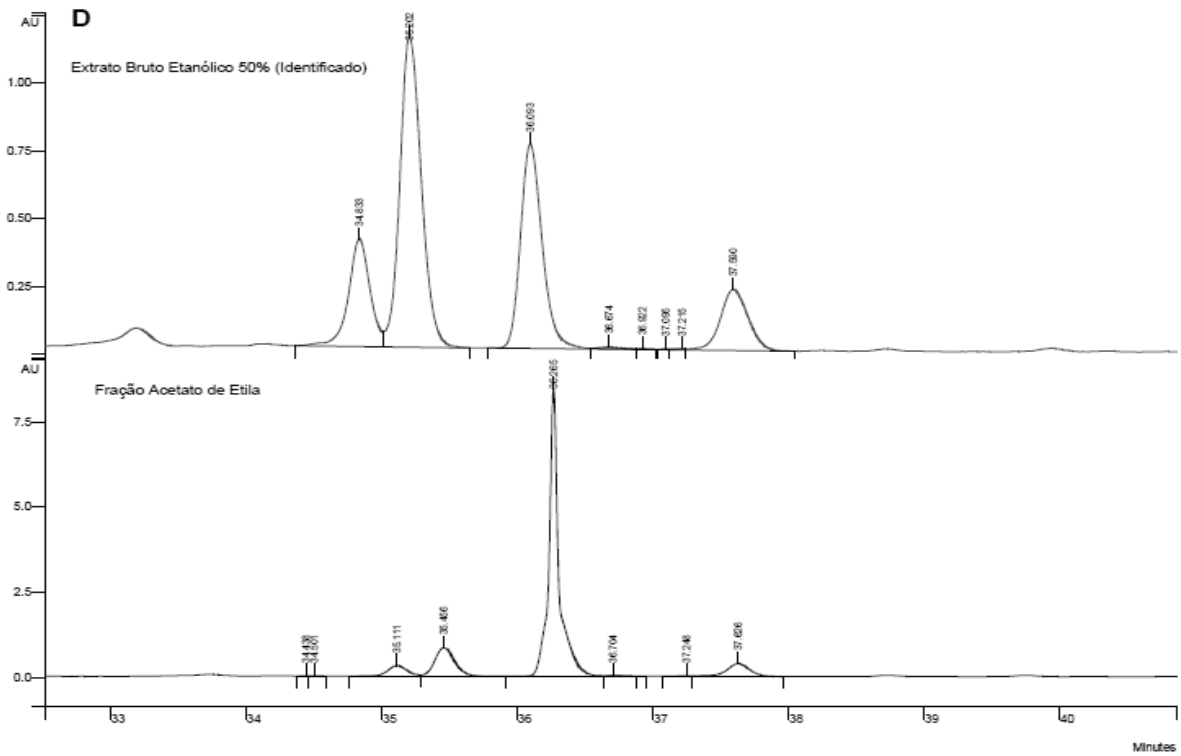
FONTE: A Autora (2022).

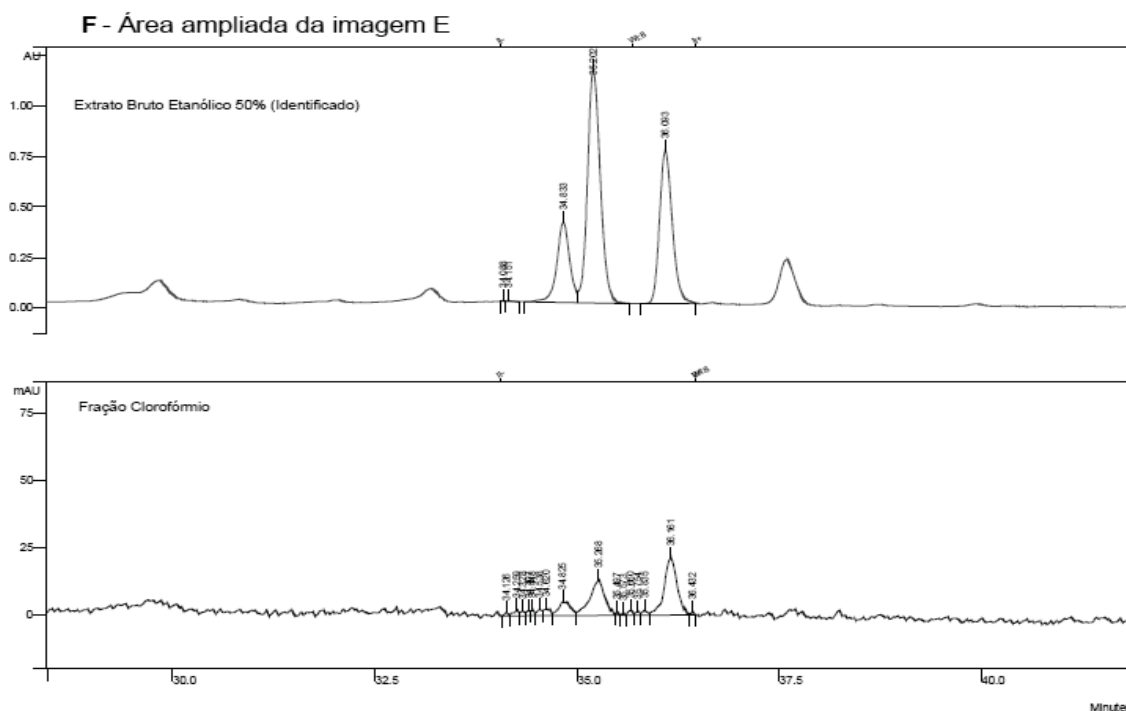
NOTA: NI: não identificado.

FIGURA 16 - CLAE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA CASCAS DE *Lafoesia pacari* COMPARADO AO EXTRATO HIDROETANÓLICO COM OS COMPOSTOS JÁ CARACTERIZADOS POR ATHERINO (2019).









FONTE: A Autora (2022).

NOTA: A imagem representa os cromatogramas do extrato bruto de cascas do caule de *L. pacari* em comparação com o extrato bruto etanólico 50% que já foi caracterizado pelo grupo de pesquisa do laboratório (ATHERINO, 2019). Imagem (A) extrato bruto 50% e extrato bruto 70%. (B) extrato bruto 50% e n-butanol. (C) extrato bruto 50% e resíduo das frações. (D) extrato bruto 50% e acetato de etila. (E) extrato bruto 50% e clorofórmio. (F) ampliação da imagem do extrato bruto 50% e clorofórmio com a área demarcada na imagem E.

Os compostos detectados por Atherino (2019) no extrato hidroetanólico (50:50) usado como referência foram HHDP-O-hexosídeo, isômero de punicalina, isômero de pedunculagina, O-galoil-punicalina, elagitanino, isômero de punicalagina, catequina, ácido elágico e seus derivados glicosilados: ácido O-hexosil-elágico, Isômero de ácido hexosil elágico, ácido O-pentosil elágico, Ácido O-deoxihexosil elágico, ácido elágico, ácido O-deoxi-hexosil O-metil-elágico, ácido O-galoil-deoxihexosil elágico, saponina e triterpeno. Os resultados demonstrados na FIGURA 15 evidenciam que a composição química dos extratos e frações foram em parte semelhantes à do metanólico elucidado por Reichert e colaboradores (2018) e extrato hidroetanólico caracterizado por Atherino (2019), sugerindo que o extrato bruto hidroetanólico (EBE) apresenta a mesma composição.

Os espectros de IR obtidos estão em fase de interpretação e serão posteriormente adicionados a dissertação. A espectrometria de massa (EM) estão em andamento para melhor caracterizar os compostos.

5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO

5.2.1 Avaliação do potencial citotóxico e/ou antiproliferativo do extrato bruto e frações de *L. pacari* pelo ensaio da redução do sal MTT

O ensaio da redução do sal MTT analisa indiretamente a viabilidade celular pela capacidade metabólica das células. O sal do MTT quando incubado com células viáveis tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais que transformam o composto com coloração amarela em um composto azul escuro. Este ensaio é amplamente utilizado em triagem para potenciais drogas antitumorais (BOYD, 1997; RISS *et al.*, 2011).

Foram avaliados os efeitos do extrato hidroetanólico (EBE) de cascas de *L. pacari* e suas frações (FClo, FAcEt, FNB e FR) sobre células de linhagem tumoral (MDA-MB-231) e sobre linhagem não tumoral (McCoy). A concentração inibitória media (Cl₅₀) e o índice de seletividade (IS) foram calculados e estão demonstrados na TABELA 6.

TABELA 6 - VALORES DE Cl₅₀ (µg/mL) DETERMINADOS PARA O EXTRATO BRUTO HIDROETANÓLICO E DIFERENTES FRAÇÕES DE *L. Pacari* EM LINHAGENS McCoy E MDA-MB-231 POR 72 HORAS E SEUS RESPECTIVOS ÍNDICES DE SELETIVIDADE (IS).

Extrato/ Fração	Cl ₅₀ MDA-MB-231 (µg/mL)	Cl ₅₀ McCoy	IS
Extrato Bruto (EBE)	156,33 ± 8,01	130,45 ± 4,59	0,8340
Acetato de Etila (FAcEt)	67,56 ± 12,94	111,65 ± 15,62	1,6524
Clorofórmio (FClo)	132,33 ± 13,74	180,15 ± 4,31	1,3636
<i>n</i> -butanol (FNB)	87,91 ± 11,80	123,26 ± 9,81	1,4021
Resíduo (FR)	54,68 ± 8,64	73,25 ± 11,60	1,3396
Ácido elágico	19,76 ± 5,04	-----	-----

FONTE: A Autora (2022).

A redução da viabilidade celular em 50% observada neste ensaio pode ser devida à capacidade do extrato e das frações de induzir a morte celular ou simplesmente por estes serem capazes de diminuir a capacidade proliferativa das mesmas. Portanto, este método não permite distinguir se os extratos exercem efeito citotóxico ou antiproliferativo (BOYD, 1997; RISS *et al.*, 2011).

Alguns estudos como o de Suffiness e Pessuto (1990) sugerem frações ou extratos vegetais com potencial antineoplásico quando a Cl₅₀ for menor ou igual 30

$\mu\text{g/mL}$ para tratamentos em 72 h. Sendo assim, seguindo esse critério nenhum extrato e frações testados demonstraram potencial antitumoral significativo.

Nas células MDA-MB-231 a fração do resíduo (FR) apresentou o menor valor de CI_{50} ($54,68 \pm 8,64 \mu\text{g/mL}$) e foi quimicamente semelhante ao extrato hidroetanólico usado como referência (FIGURA 14-C). Atherino (2019) encontrou uma CI_{50} de $21,52 \pm 2,75$ para a mesma linhagem tumoral utilizando um extrato bruto hidroetanólico (50:50). Contudo, a fração de acetato de etila (FAcEt), que apresentou uma quantidade significativa de ácido elágico, foi a mais seletiva apresentando $\text{IS} = 1,6524$, sendo considerada a fração mais promissora pelo critério de seletividade. O extrato bruto apresentou valores de CI_{50} para célula não tumoral (McCoy) inferior àquelas encontradas para células tumorais (MDA-MB-231), levando a um $\text{IS} \leq 1$ (CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2014), sendo considerado pouco seletivo.

Pereira *et al.* (2018) relataram que extrato hidroalcoólico das folhas de *L. pacari* não apresentou toxicidade sobre células CHO-k1 (células de tecido de ovário de hamster chinês) e L929 (fibroblasto murino), sendo que quimicamente foram observados a presença de ácido elágico e elagitaninos no extrato. Atherino (2019) demonstrou efeito antitumoral significativo de diferentes extratos de cascas de *L. pacari* em linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, sendo que essa diferença nos resultados pode estar relacionada com os diferentes solventes e proporções utilizadas no processo de extração, o que consequentemente leva a extratos com diferença quantitativa dos compostos extraídos.

Além disso, também foi realizado o ensaio em células MDA-MB-231 para a avaliação do efeito que o padrão de ácido elágico exerce sobre as mesmas. Foi obtido um IC_{50} de $19,76 \pm 5,04 \mu\text{g/mL}$ em 72h.

Kim *et al.* (2009) avaliaram o efeito antiproliferativos entre as linhas celulares de câncer de mama humano MDA-MB-231 e MCF-7. Foi demonstrado nesse trabalho que o ácido elágico inibiu a proliferação de células MDA-MB-231 com padrão dose-dependente, porém o efeito em células MCF-7 foi observado apenas em altas concentrações.

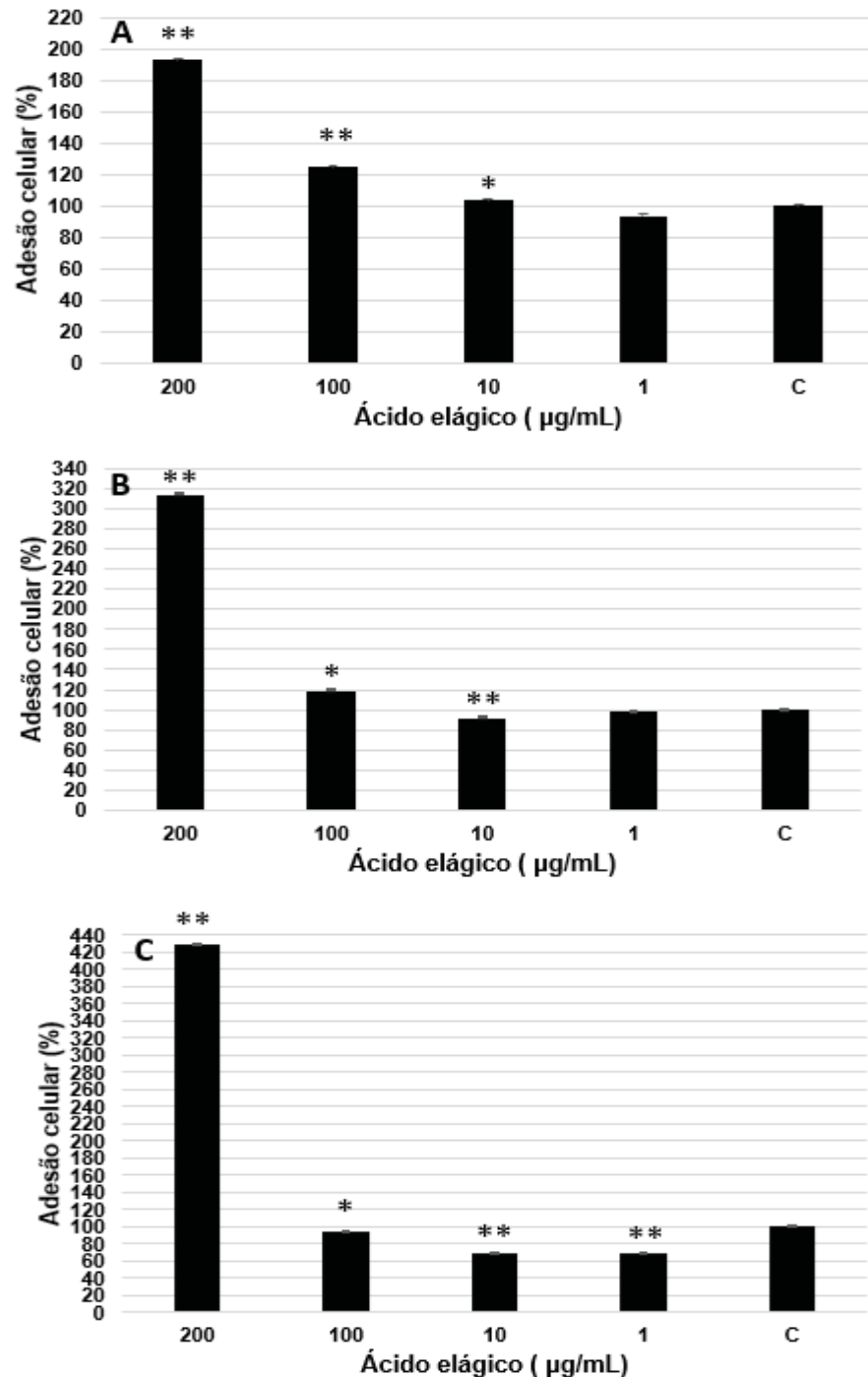
Ceci *et al.* (2016) avaliaram o efeito do ácido elágico no câncer de bexiga em 4 linhagens celulares T24 ($\text{IC}_{50} 21 \pm 1,5 \mu\text{M}$), UM-UC-3 ($\text{IC}_{50} 37,8 \pm 0,7 \mu\text{M}$), 5637 ($\text{IC}_{50} 26,7 \pm 1,8 \mu\text{M}$) e HT-1376 ($\text{IC}_{50} 58,8 \pm 3,4 \mu\text{M}$). Além disso, foi demonstrado que o efeito antiproliferativo foi dose-dependente e a exposição das células ao ácido elágico por 72 h resultou na indução da apoptose.

Estudos sugerem que o ácido elágico possui atividade antiproliferativa por meio da indução da parada do ciclo celular, apoptose ou pelo potencial antioxidante. O efeito antiproliferativo do ácido elágico tem sido estudado em algumas linhagens de celulares tumorais, porém, o mecanismo de ação não foi bem elucidado (SEERAM *et al.*, 2005; PAPOUTSI *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005; STEARNS *et al.*, 2004; NIKANDER *et al.*, 2003; LARROSA 2006).

5.2.2 Ensaio de adesão celular *in vitro*

Os resultados apresentados na FIGURA 17 demonstram o efeito do ácido elágico, principal composto presente em todos os extratos e frações, em células de câncer de mama humano (MDA-MB-231) na ausência e na presença das matrizes extracelulares (vitronectina e fibronectina). Foi observado um aumento significativo na adesão das células MDA-MB-231 promovido pelo ácido elágico na ausência de matriz extracelular nas maiores concentrações utilizadas (200 – 100 µg/mL), representando $92,80 \pm 4,48\%$ e $24,79 \pm 2,26\%$ (n=3), respectivamente, acima do controle, onde as células não foram estimuladas. Na concentração mais baixa avaliada (1 µg/mL), o ácido elágico não favoreceu a adesão celular na linhagem tumoral sendo inferior ao controle. O estímulo da adesão de células MDA-MB-231 pelo ácido elágico utilizando a vitronectina e a fibronectina são mostrados na FIGURA 17 B-C. Na presença de matrizes extracelulares, a adesão máxima ocorreu na concentração de 200 µg/mL de ácido elágico tanto para a vitronectina ($213,05 \pm 2,46\%$) quanto para a fibronectina ($328,56 \pm 1,03\%$). Para a vitronectina a adesão foi inibida a partir da concentração de 10 µg/mL e de 100 µg/mL para a fibronectina. Nossos resultados demonstram que o revestimento com matrizes celulares aumenta a adesão celular ativada pelo ácido elágico, sendo essa adesão mais evidente em altas concentrações. Esses resultados sugerem que a adesão promovida por ácido elágico pode ser modulada pelas diferentes proteínas de adesão e considerando suas respectivas concentrações. O responsável por mediar essas interações e por qual mecanismo não pode ser esclarecido por esse ensaio.

FIGURA 17 - EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO NA ADESÃO CELULAR EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA HUMANO (MDA-MB-231) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NA AUSÊNCIA DAS MATRIZES (A) E NA PRESENÇA DE DE VITRONECTINA (15 µg/mL) (B) E FIBRONECTINA (15 µg/mL) (C).

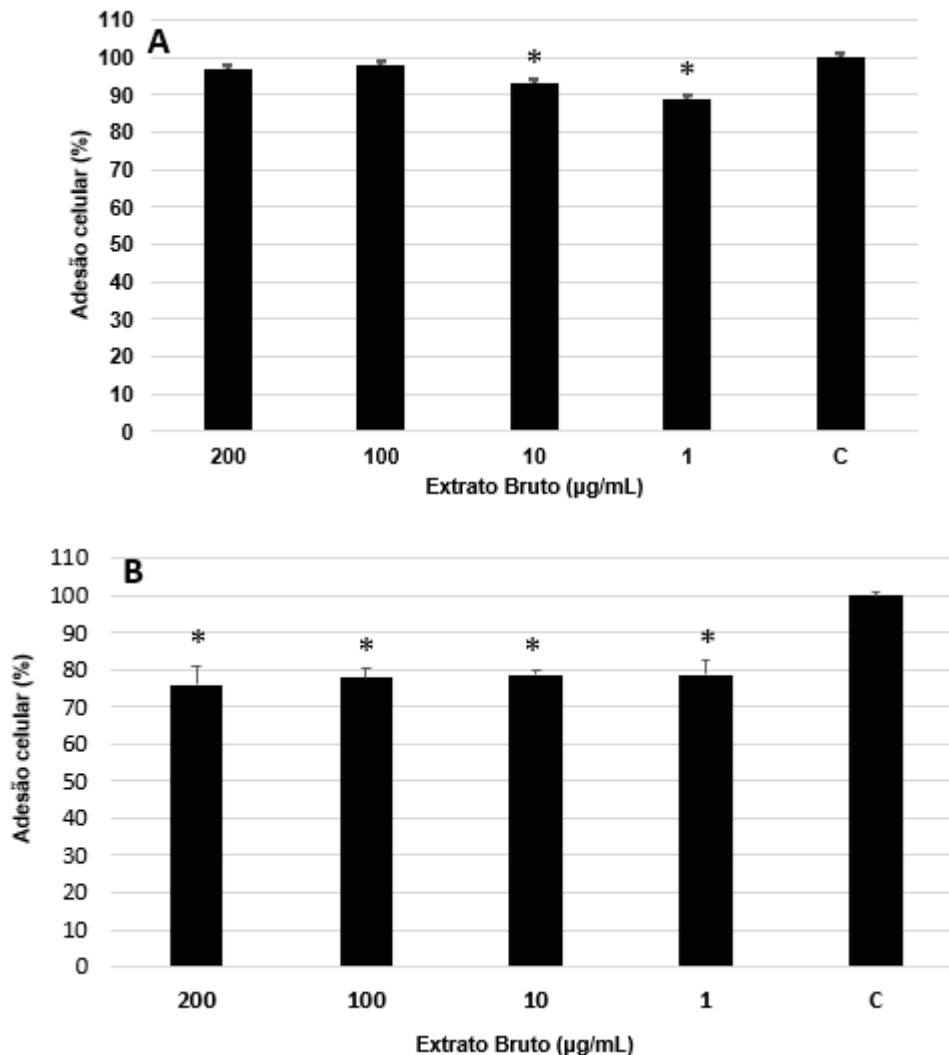


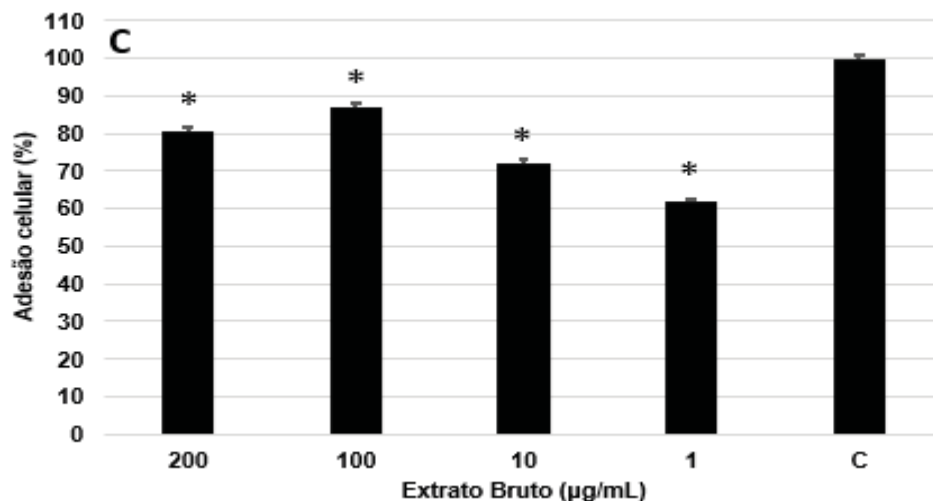
FONTE: A Autora (2022).

NOTA: Efeito do ácido elágico na adesão celular em células de câncer de mama humano MDA-MB-231 em diferentes concentrações na ausência das matrizes (A) e na presença das matrizes vitronectina (15 µg/mL) (B) e, fibronectina (15 µg/mL) (C). Cada coluna representa a média ± desvio padrão da porcentagem de adesão celular que foram medidas em espectrofotômetro a 540 nm, em relação ao controle, normalizado em 100% (n=3). ANOVA * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,001$), seguido pelo teste de Holm-Sidak ($P < 0,05$).

Além do ácido elágico, as células foram tratadas com o extrato bruto de cascas do caule de *Lafoensia pacari* 70:30 (EBE), que também contém esse composto, nas mesmas condições e os resultados estão demonstrados na FIGURA 18. Foi observado que todas as concentrações de EBE (200 – 1 µg/mL) não favoreceram o aumento da adesão celular, tanto na ausência quanto na presença de matriz extracelular, quando comparado ao controle contendo células não estimuladas. Isso pode sugerir que caso haja ligação dos compostos presentes no EBE com as proteínas receptoras suas expressões foram inibidas. É importante salientar que a concentração inibitória média (CI₅₀) do EBE no ensaio de MTT foi de 156,33 ± 8,01 µg/mL para as linhagens MDA-MB-231 com baixo potencial citotóxico.

FIGURA 18 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE CASCAS DO CAULE DE *Lafoensia pacari* NA ADESÃO CELULAR EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA HUMANO (MDA-MB-231) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NA AUSÊNCIA DE MATRIZES (A) E NA PRESENÇA DAS MATRIZES VITRONECTINA (15 µg/mL) (B) E FIBRONECTINA (15 µg/mL) (C).





FONTE: A Autora (2022).

NOTA: Efeito do Extrato bruto de cascas do caule de *Lafoensia pacari* na adesão celular em células de câncer de mama humano (MDA-MB-231) em diferentes concentrações na ausência das matrizes (A) e na presença das matrizes vitronectina (15 µg/ml) (B) e, fibronectina (15 µg/ml) (C). Cada coluna representa a média \pm desvio padrão da porcentagem de adesão celular que foram medidas em espectrofotômetro a 540 nm, em relação ao controle, normalizado em 100% (n=3). ANOVA * ($P < 0,05$) seguido pelo teste de Holm-Sidak ($P < 0,05$).

Metástase continua sendo a maior causa de morte em pacientes com câncer, portanto, a habilidade para interferir com o processo de metástase é de suma importância na terapia do câncer (NETA; OPPENHEIM; DOUCHES, 1988). A adesão das células tumorais na matriz extracelular (MEC), tais como fibronectina, laminina, matrigel é crucial para metástase (SASS, 1998) e mostra ser obrigatória para o sucesso da colonização nos órgãos alvos (NICOLSON, 1982; LIOTTA; RAO, 1983). O aspecto mais maligno do câncer tem sido mostrar a dependência na cascata metastática. Interrupção de alguns desses passos por um composto, tais como na adesão, tem o potencial para inibir a expansão maligna e pode ser usado como um agente antimetastático (MCKINNELL, 1998).

Células MDA-MB-231 são altamente metastáticas e invasivas, além de expressar taxas elevadas de integrinas ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$) quando comparadas com tumores menos agressivos como MCF-7, T47D e ZR75-1 $\alpha \beta$ (SHEU *et al.*, 1997.; VAN DER, *et al.*, 1997), sendo, portanto, extensivamente utilizadas no estudo metastático *in vivo* e *in vitro*.

O envolvimento das integrinas na disseminação metastática tem sido alvo de estudo há vários anos, pois, em células normais e tumorais a sinalização da interação

dos receptores com os componentes da MEC é essencial para a sobrevivência dessas células (RUOSLAHTI; GIANCOTTI, 1989; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

A adesão celular nos componentes da matriz extracelular facilita a metástase para tecidos específicos. Wang *et al.* (2003) demonstraram que o taxol e a camptotecina inibem a adesão de B16F10 para a fibronectina e laminina. Manesh e Kuttan (2005) demonstraram naturalmente a ocorrência de alil- e fenil-isotiocianatos na inibição de células melanoma B16F10, promovendo significativa redução na formação de nódulo tumoral no pulmão. Yoshida *et al.* (2005) verificaram que o extrato metanólico das partes aéreas de *Centella asiatica* inibiu *in vitro* o crescimento de adenocarcinoma gástrico humano (MK-1), carcinoma uterino humano (HeLa) e células murino melanoma (B16F10). Além do mais, estudos demonstram um papel crucial do gene THBS-1 na regulação da adesão celular e invasão das células tumorais, etapas cruciais na metástase (ALBO *et al.*, 2000).

Santos *et al.* (2017) demonstraram em seu estudo que frações de *Bauhinia* aumentaram a adesão de células de carcinoma mamário murino triplo negativo (4T1). Em outro estudo foi observado que a biflorina foi capaz de inibir a migração celular da linhagem MDA-MB-435 sobre o colágeno de maneira concentração-dependente (CARVALHO, 2009). Em um estudo com produtos naturais foi demonstrado que a salvicina, um diterpenóide quinona, foi capaz de inibir a adesão de células MDA-MB-435 por promover a down-regulation na subunidade β_3 do receptor do tipo integrina (ZHOU *et al.*, 2008). Contudo, até o momento não foram encontrados na literatura estudos sobre o efeito que o ácido elágico e os extratos de *Lafoensia pacari* exercem sobre a adesão celular.

O ácido elágico em concentrações maiores estimula a atividade de adesão de células MDA-MB-231 na ausência e na presença de ambas as matrizes extracelulares utilizadas (fibronectina e vitronectina), porém em concentrações menores esse processo sofreu reversão, como apresentado para a fibronectina, uma importante glicoproteína de membrana. No caso do EBE todas as concentrações utilizadas inibiram a adesão tanto na ausência quanto na presença de MEC. Com esses resultados preliminares, não podemos concluir que o ácido elágico ou o Extrato bruto obtido das cascas de *Lafoensia pacari* seja considerado um agente quimiopreventivo e que participe na importante regra de modulação de ativação e detoxificação na carcinogênese. O perfil da atividade do ácido elágico (baixas concentrações) e do EBE estabelece apenas uma capacidade de inibir a adesão *in vitro*, o que em tese, contribui

para interferir em uma etapa do complexo processo metastático. Estudos futuros são necessários para verificar a ação do ácido elágico, extrato e frações em outras etapas da metástase, como a invasão, migração celular e estudo da angiogênese na tentativa de correlacionar a interferência desses compostos na formação do tumor secundário, confirmando assim o uso empírico dessa planta em doenças de natureza tumorais pela população.

5.2.3 Ensaio de imunocitoquímica para detecção de OAT1 e OAT3

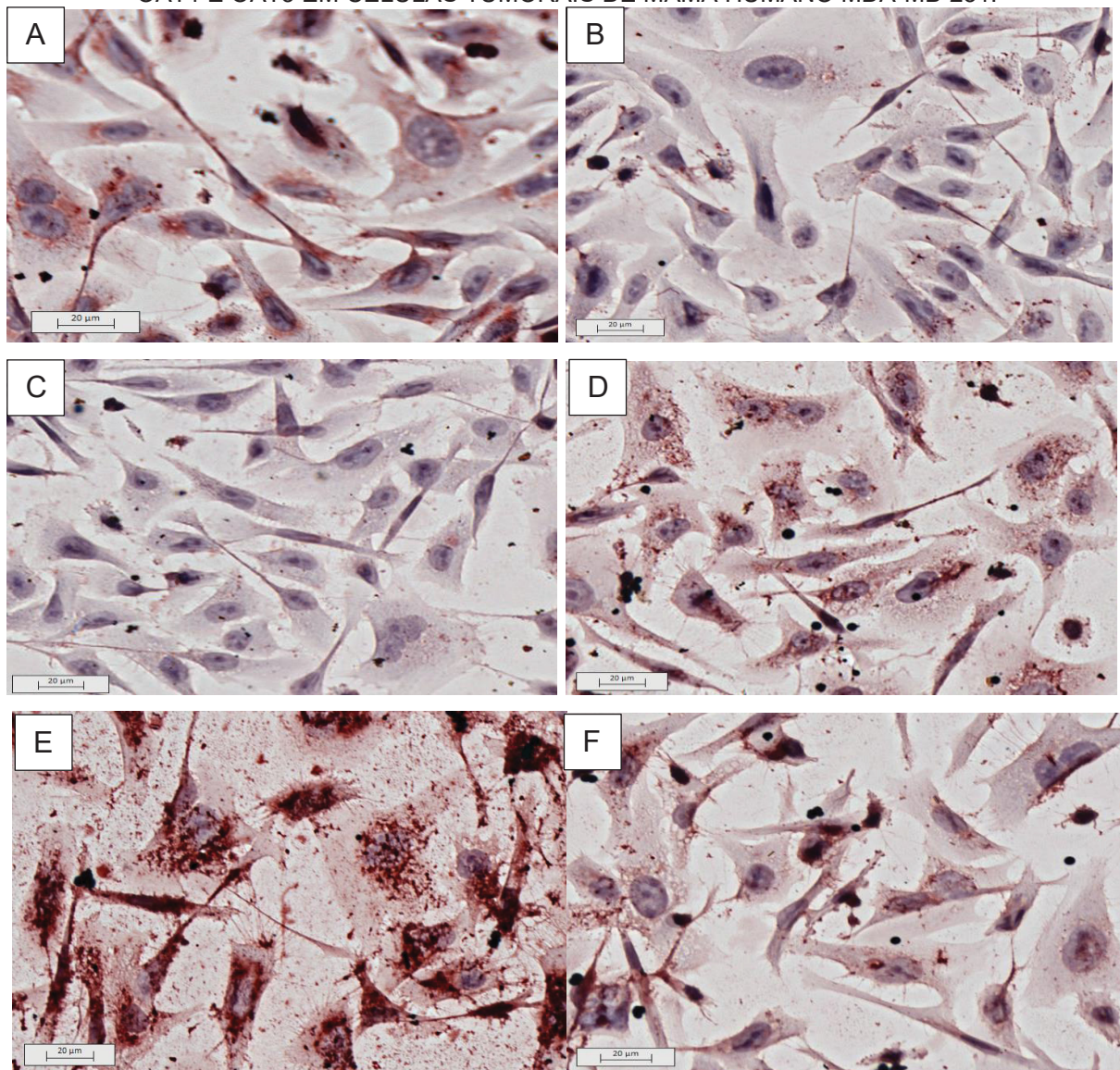
A família de transportadores OAT é expressa pelos genes SLC22 inclusos pelo menos em 22 membros e 10 subfamílias (OAT1 – OAT10). As proteínas transmembranares OATs são expressas sobre a superfície de várias células. Essas proteínas estão envolvidas na absorção de inúmeras moléculas (WATANABE; SAKAGUCHI; SUGIMOTO, 2013). São transportadores de influxo bidirecionais, levando substâncias da corrente sanguínea para o interior do tecido contra o gradiente de concentração, co-transportam ânions orgânicos e dicarboxilatos, como exemplo α -cetoglutarato. Esse processo é dependente de energia quimiostática do Na^+ e ATP, pois o sódio mantém a concentração do α -cetoglutarato e a enzima ATPase mantém a concentração do Na^+/K^+ . Para determinar a expressão de OAT1 e OAT3 em células tumorais de mama humano MDA-MB-231, associada a captação do ácido elágico foi utilizado o método de imunocitoquímica do tipo indireto (BURCKHHARDT; BURCKHHARDT, 2011.; GIACOMINI *et al.*, 2010.; WATANABE *et al.*, 2013).

No estudo de Masereeuw; Russel (2010) foi demonstrado que OAT1 e OAT3 possuem alguns substratos em comum, sendo que o OAT1 possui maior afinidade por proteínas de baixo peso molecular e o OAT3 por ânions anfipáticos volumosos e cátions. O fármaco inibidor mais comum utilizado para as OATs é a probenicida (BURCKHHARDT; BURCKHHARDT, 2011).

A imunocoloração foi determinada com a reação de anticorpos primários com os transportadores e posteriormente a interação dos anticorpos secundários ligados a peroxidase. Os resultados demonstrados na FIGURA 19, evidencia que a coloração visualizada não teve diferença nas células tratadas em comparação ao controle, o que evidencia que a linhagem celular MDA-MB-231 não expressa os transportadores OAT1 e OAT3. A foto foi dividida em 3 cores (Vermelho, verde e azul) contendo um valor máximo de 225 (branco) e 0 (zero) a cor pura. Com relação a cor vermelha foi

verificado uma porcentagem de 28,13%, 25,82%, 24,50%, 25,13%, 30,76% e 24,72% correlacionados na FIGURA 19 (A-F), respectivamente. Essas porcentagens referem-se à coloração vermelha e foram analisadas pelo ImageJ não apresentando diferenças entre elas. Outros estudos devem ser realizados para a verificação de outros transportadores OATs ou OATp. Foram realizados ensaios somente com os anticorpos OAT1 e OAT3 demonstrando ausência de cor das células avaliados no ImageJ.

FIGURA 19 - EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO NA COLORAÇÃO POR IMUNOCITOQUÍMICA PARA OAT1 E OAT3 EM CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA HUMANO MDA-MB-231.



FONTE: A Autora (2022).

NOTA: As células tumorais MDA-MB-231 foram tratadas com ácido elágico ou não tratadas (controle) por 2 h a 37°C e coradas para OAT1 e OAT3. Imagens mostradas são: (A) Células não tratadas com ácido elágico e sem anticorpo (controle); (B) Células não tratadas com ácido elágico com anticorpo OAT1 (controle); (C) Células não tratadas com ácido elágico com anticorpo OAT3 (controle); (D) Células

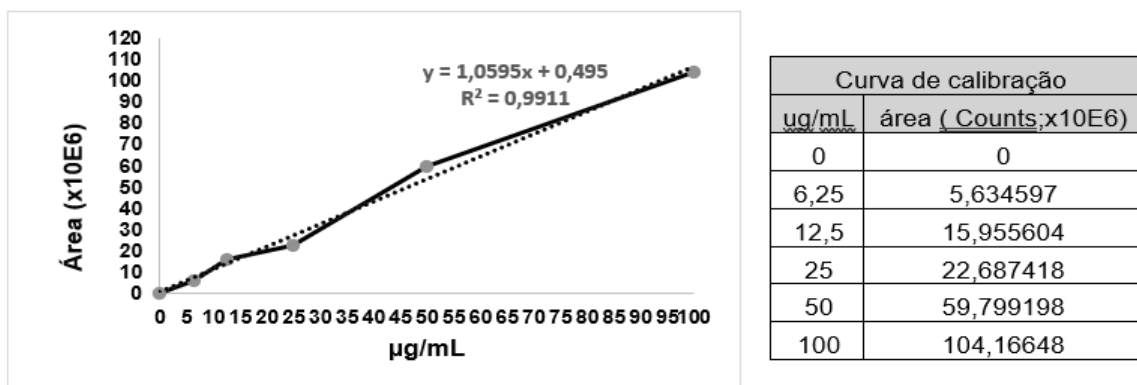
tratadas com ácido elágico sem anticorpo (controle tratado); (E) Células tratadas com ácido elágico com anticorpo OAT1; (F) Células tratadas com ácido elágico com anticorpo OAT3. Aumento de 100X.

5.2.4 Captação ácido elágico pela célula tumoral MDA-MB-231

A captação do ácido elágico foi analisada por CLAE, onde foi possível observar que a internalização pode ocorrer após 2 h do tratamento em células tumorais MDA-MB-231 conforme já demonstrado por Atherino (2019). Larrosa *et al.*, (2006) demonstraram que a célula Caco-2 (Carcinoma colorretal) também é capaz de captar o ácido elágico a partir de 2 h. A concentração de ácido elágico (100 µg/mL) foi escolhida por não exercer mudança na morfologia e na confluência das células e também não ocorrer metabolização celular do composto (dados não demonstrados). Além do mais, o método cromatográfico utilizado nesse estudo foi capaz de detectar a presença do ácido elágico livre no meio de cultura e intracelularmente após lise celular.

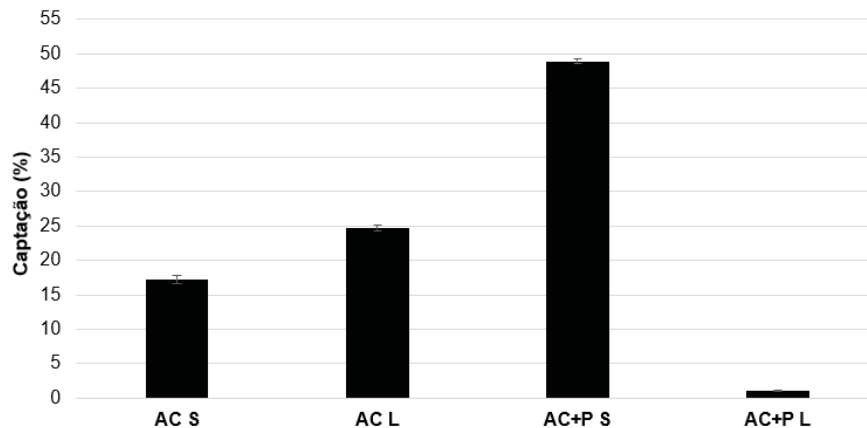
A captação do ácido elágico foi realizada utilizando as células tratadas lisadas, o sobrenadante antes de lisar as células, células tratadas com ácido elágico e probenecide lisadas e seu respectivo sobrenadante, células sem tratamento (controle) lisadas e seu sobrenadante e apenas o meio de cultivo como branco. Para quantificação foi realizada uma curva de calibração com o padrão de ácido elágico (área do pico x concentração (µg/mL)), como demonstrado na FIGURA 20 e o cálculo da concentração das amostras foram realizados a partir da equação da reta. Os resultados obtidos estão demonstrados na FIGURA 21.

FIGURA 20 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO.



FONTE: A Autora (2022).

FIGURA 21 - RESULTADO EM PORCENTAGEM DA CAPTAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO POR CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA MDA-MB-231.



FONTE: A Autora (2022).

NOTA: AC S: sobrenadante das células tratadas com ácido elágico, AC L: após a lise das células tratadas com ácido elágico, AC+P S: sobrenadante das células tratadas com ácido elágico + probenicida, AC+P L: após lise das células tratadas com ácido elágico + probenicida. Cada coluna representa a média±DP de captação do ácido elágico por células MDA-MB-231. Os resultados demonstram diferença significativa com ANOVA ($P \leq 0,001$) seguido de t-test ($P < 0,05$) em relação ao controle.

Os resultados demonstraram através do ensaio de captação celular que o ácido elágico é internalizado em células de câncer de mama MDA-MB-231 após 2 h de tratamento ($24,693 \pm 0,415\%$). Além disso, quando tratadas com probenicida a captação do ácido elágico foi de apenas $1,105 \pm 0,014\%$, ou seja, uma redução de 95,53% comparado as células tratadas sem probenicida sugerindo a participação dos transportadores OATs na absorção do ácido elágico.

Estudos sugerem que a captação do ácido elágico pelas células ocorram por transportadores OATps (peptídeo transportador de ânions orgânicos) (WHITLEY *et al.*, 2006; MAO *et al.*, 2016). Alguns subtipos desses transportadores OATp são aumentados em células tumorais, incluindo a célula de câncer de mama MDA-MB-231, quando comparadas a outras células, tais como as células epiteliais não tumorigênicas (MCF-10A). Desta forma o interesse nesses receptores é de grande importância para o transporte de drogas antitumorais obtendo um efeito mais seletivo. Drogas clinicamente utilizadas para o tratamento de câncer como metotrexato e paclitaxel que interferem no crescimento e sobrevivência da célula são internalizadas por esses transportadores (OBIDAT *et al.*, 2012; ROTH *et al.*, 2012).

Estudo de Wlcek *et al.* (2008) observaram que células MDA-MB-231 expressam transportadores da família OATp. Atherino (2019) utilizando células MDA-MB-231 demonstrou a entrada do ácido elágico nessas células em 2, 6 e 24 h, no entanto, o principal transportador da substância para o interior da célula não tinha sido

devidamente elucidado. Digno de nota, captação de compostos do extrato hidroetanólico de *L. pacari* em 24 h acarretou em uma metabolização celular de alguns compostos evidenciados no CLAE. Em linhagem celular McCoy não houve captação dos compostos presente no extrato de *L. pacari* (ATHERINO, 2019). Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os encontrados na literatura demonstrando que o principal transportador do ácido elágico para o interior da célula são os OATs ou OATps, entretanto OAT1 e OAT3 não foram evidenciados no ensaio de imunocitoquímica.

5.2.5 Avaliação da migração celular

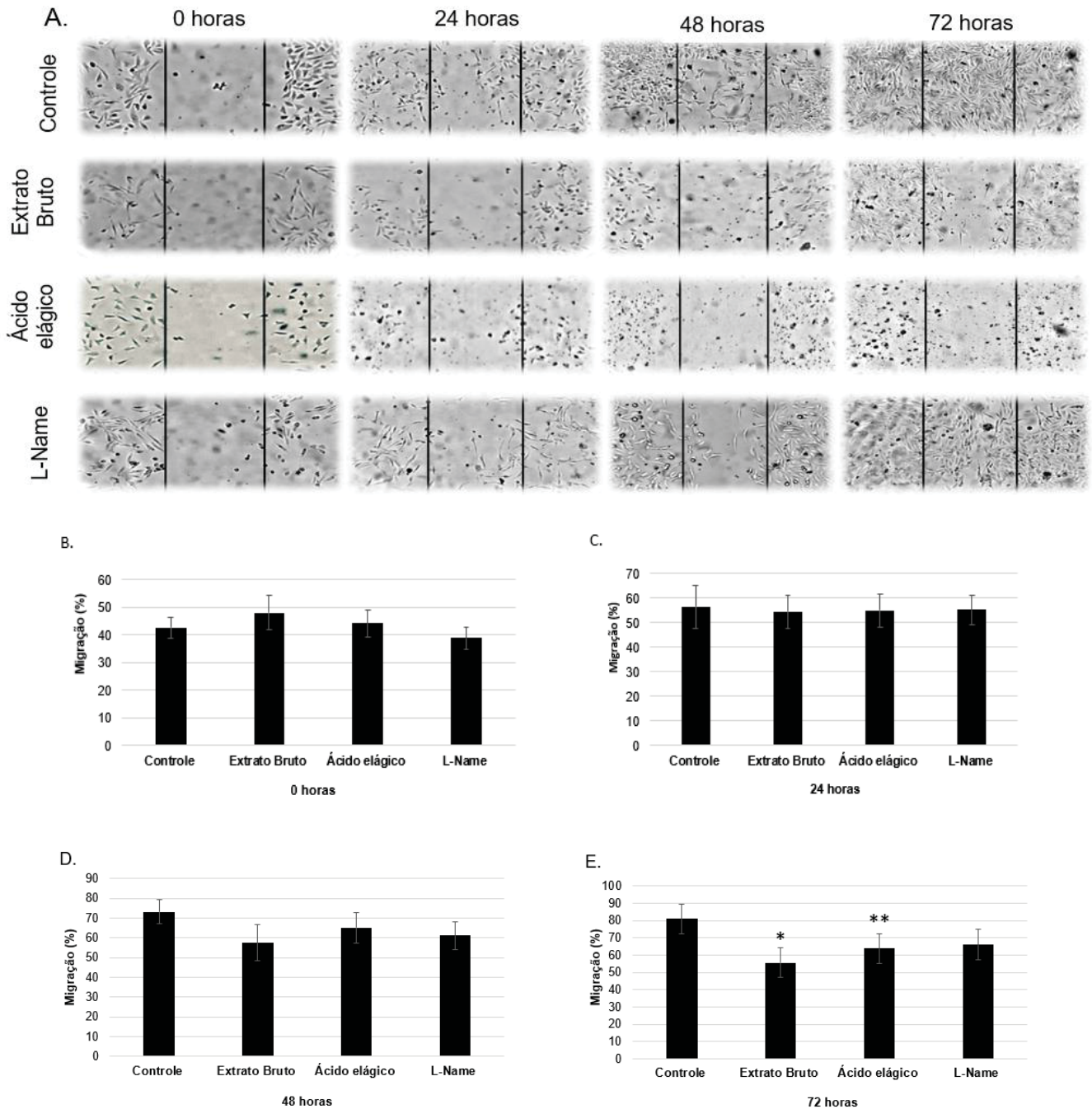
A avaliação da migração celular é importante e amplamente utilizada em inúmeros ensaios, como triagem de drogas antitumorais. Alguns testes utilizados são em câmaras Boyden, teste de barreira e ensaio com base em microfluídica, porém esses testes são caros e, conseqüentemente, não ficam acessíveis a todos os laboratórios. Já o ensaio de cicatrização de ferida *in vitro* (*Wound Healing*) é um método mais simples, barato e versátil. A fenda é realizada em uma monocamada de células e a taxa de fechamento da ranhura assim como a migração celular pode ser observada e quantificada utilizando fotos em microscópio invertido (LIANG, 2007).

A migração celular é importante em inúmeros processos biológicos, como cicatrização/regeneração tecidual. Porém, quando esse processo perde o controle pode impulsionar inúmeras patologias como invasão e metástase do câncer (CONDEELIS; SINGER; SEGALL, 2005).

O ensaio para avaliação da migração celular, foi realizado utilizando células de câncer de mama MDA-MB-231. As células foram tratadas com extrato bruto (156,3 µg/mL), ácido elágico (100 µg/mL) além de um inibidor L-NAME (L-N^G-Nitro arginina metil ester 1 µg/mL).

Os resultados obtidos do efeito do extrato bruto e do ácido elágico sobre a migração das células de câncer de mama MDA-MB-231, estão demonstrados na FIGURA 22.

FIGURA 22 - EFEITO DA MIGRAÇÃO CELULAR PELO EXTRATO BRUTO (EBE) OBTIDO DAS CASCAS DE *Lafoensia pacari*, ÁCIDO ELÁGICO E L-NAME.



FONTE: A Autora (2022).

NOTA: Cada coluna representa a média±DP da migração celular, os resultados demonstram diferença significativa com ANOVA * ($P \leq 0,001$), ** ($P < 0,05$), seguido de t-test ($P < 0,05$) em relação ao controle.

A FIGURA 22 mostra que o tratamento em 72h com EBE foi capaz de inibir a migração celular em 31,30% em relação ao controle (considerado como 100% de migração), assim como o ácido elágico que foi capaz de inibir 21,08% a migração,

resultados esses semelhantes ao apresentado pelo inibidor L-NAME (18,25% de inibição).

Até o presente momento poucos estudos foram realizados para a verificação do efeito que a *L. pacari* exerce sobre a migração celular, incluindo os mecanismos envolvidos nesse processo. Pereira e colaboradores (2018) verificaram o efeito do extrato hidroalcoólico de *L. pacari* na migração celular administrado em concentrações 0,01 – 0,5 µg/mL (consideradas não tóxicas), sendo observados que o extrato foi capaz de favorecer a migração de fibroblastos murino (L929) por estimular as vias MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos). Entretanto, como o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito cicatrizante, a metodologia utilizada não teve a redução do estímulo de proliferação, onde normalmente é feito diminuindo a concentração de SFB. Atherino *et al.* (2020), utilizando o extrato (água: metanol: acetona: etanol) de cascas do caule de *L. pacari* verificaram que esse extrato foi capaz de inibir a migração em 61% utilizando células de câncer de colo retal HRT-18 em 48 h.

A capacidade de inibição de migração do ácido elágico é amplamente descrita na literatura. Estudos demonstram a capacidade do ácido elágico em reduzir a migração celular de diversas linhagens celulares, como, carcinoma endotelial (KLE e AN3CA), carcinoma de próstata (PC-3), carcinoma pancreático (PAN-1) e osteosarcoma (Saos2 e MG63) (PITCHAKARN *et al.*, 2013; CHENG *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019).

5.2.6 Dosagem de óxido nítrico

O óxido nítrico atua como um importante mediador citotóxico para as células imunitárias, desse modo pode auxiliar a combater patógenos e células tumorais. Além disso, atua como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. Porém dependendo da quantidade em que é produzido o NO pode ser considerado altamente tóxico (KUO; SCHROEDER, 1995), em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários de oxigênio e deficiência do sistema antioxidante.

Uma das principais atividades farmacológicas presente em plantas é o potencial antioxidante. O óxido nítrico e as espécies reativas de oxigênio são conhecidos mediadores do processo inflamatório. Além disso, plantas com substâncias que possuem potencial antioxidante são amplamente estudadas, visto

que possuem uma estreita relação entre os radicais livres e o processo de senescência e neoplásico (BROZMANOVA *et al.*, 2001; KARBOWNIK *et al.*, 2001).

A quantificação do NO laboratorial é complexa e a caracterização de ativadores e inibidores específicos das vias de NO dificulta o entendimento e tratamento de inúmeras patologias (MATHEUS *et al.*, 2003).

As células MDA-MB-231 foram tratadas com o extrato bruto (EBE) de cascas de caule da *Lafoensia pacari* nas concentrações de 200; 100; 20 e 2 µg/mL. Em outros poços as células foram tratadas com um estimulante de NO (LPS) e também foram tratadas com o extrato bruto e o inibidor L-NAME nas mesmas condições. O ensaio foi realizado em quintuplicata e o cálculo das concentrações realizado utilizando a equação da reta representado na FIGURA 23. Os resultados obtidos uM de nitrito estão demonstrados na FIGURA 24.

A presença das maiores concentrações do EBE de cascas de *L. pacari* (200 e 100 µg/mL) resultou na produção de NO ($7,4358 \pm 0,0175$ µM e $4,1025 \pm 0,0042$ µM, respectivamente) em relação ao controle ($2,5641 \pm 0,0098$ µM) como demonstrado na FIGURA 23. A produção de NO dependente de NOS foi avaliada pela incubação de células de câncer de mama MDA-MB-231 com o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS, 100 ng/mL) que em comparação ao controle estimulou a produção do NO ($4,1025 \pm 0,0138$ µM) e pela inibição da produção com L-NAME em todas as concentrações testadas (200 – 2 µg/mL) sendo essa inibição mais evidente nas maiores concentrações de EBE testadas (200 e 100 µg/mL). A produção de NO sugere que o aumento não foi em decorrência de morte celular devido ao fato que no ensaio de viabilidade pelo MTT apresentar uma CI_{50} de $156,33 \pm 8,01$ µg/mL. As concentrações de EBE de 20 e de 2 µg/mL não favoreceram a produção de NO quando comparadas ao controle contendo células não estimuladas.

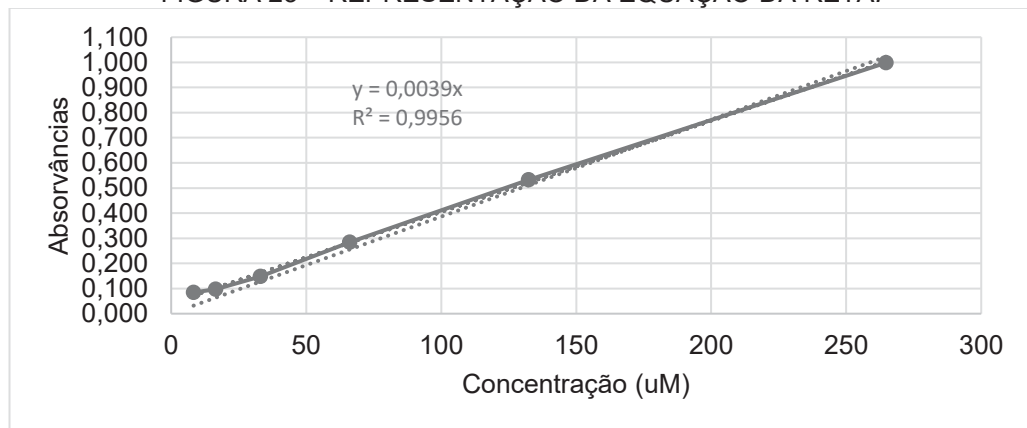
Dependendo do tipo de célula e estímulo submetido o NO é capaz de modular reações inflamatórias e anti-inflamatórias por ser um agente oxidante. Deste modo, algumas plantas com reconhecida atividade anti-inflamatória possuem capacidade de inibir ou estimular a produção de NO (ADAMS, 1996; CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). Além disso, o NO também pode ter função antitumoral dependendo da quantidade gerada e da interação das células do hospedeiro com as células tumorais resultando em efeito estimulante ou inibidor para a célula tumoral (O'SULLIVAN; LEWIS, 1994; JENKINS; CHARLES; THOMSEN, 1995; MURTA *et al.*, 2002).

Estudo realizado por Edwards *et al.* (1996) utilizando células de câncer de mama murino (EMT-6) tratadas com LPS/IFN-g foi capaz de estimular a produção de NO e inibir o crescimento das células em 50%. Em contrapartida a inoculação dessas células em camundongos levou ao aparecimento de tumores subcutâneos e metástases pulmonares duas vezes maiores que os controles. Quando utilizado inibidor de NO o crescimento das células, tamanho do tumor e metástases não demonstraram diferenças significativas em comparação ao controle. Outros estudos demonstram maior atividade da iNOS nos tumores de mama humano de maior malignidade (THOMSEN *et al.*, 1995). Porém, Somasundaram *et al.* (2019) demonstraram que níveis intracelulares altos ($>1 \mu\text{M}$) de NO podem induzir o efeito antineoplásico, enquanto níveis moderados são capazes de estimular o desenvolvimento e progressão do tumor e níveis baixos podem levar a efeitos de induzir ou inibir o tumor.

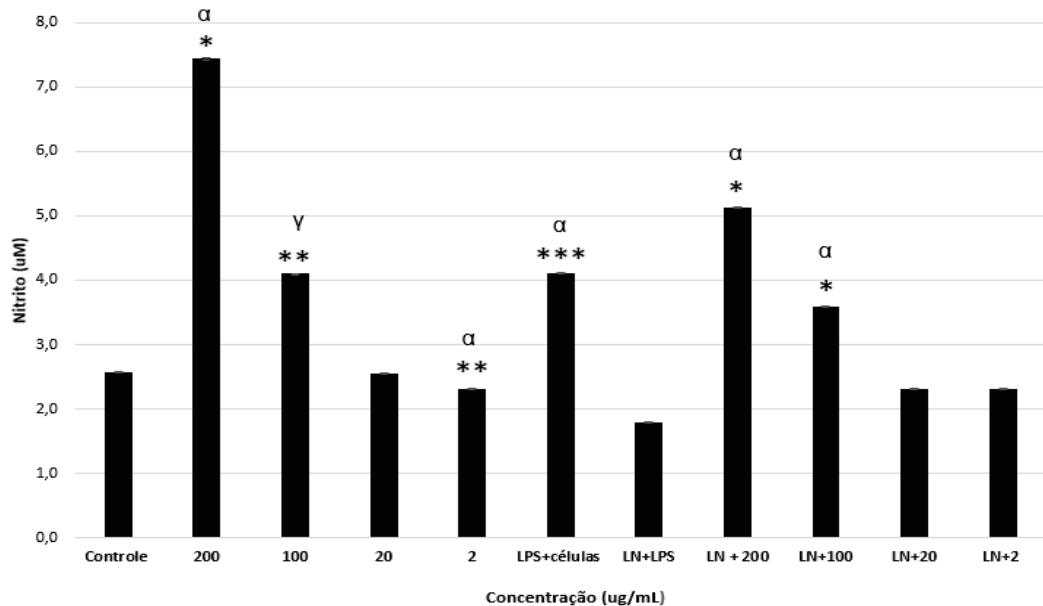
Embora estudos do efeito do NO em células de câncer de mama seja escasso, especificamente em MDA-MB-231, os resultados demonstraram que a própria célula produz NO e quando tratada nas concentrações de 200 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de EBE ocorreu o estímulo da produção de NO. O aumento de NO observado nesse trabalho, pode ser devido a ação estimulante direta nas vias de produção de NO nas células MDA-MB-231 e parte por ação sequestrante do radical livre, confirmado pelos resultados obtidos no ensaio de DPPH e fosfomolibdênico que apresentaram potencial antioxidante do EBE elevado.

Embora o NO seja objeto de muitas pesquisas e de grande número de publicações, ainda existem muitas questões controversas e numerosas dúvidas que precisam ser esclarecidas, o que também acontece com esse trabalho, como por exemplo, qual a principal enzima que participa da via de produção de NO que são estimuladas pelo EBE, além de esclarecer o papel que o NO exerce nas células tumorais estudadas.

FIGURA 23 – REPRESENTAÇÃO DA EQUAÇÃO DA RETA.



FONTE: A Autora (2022).

FIGURA 24 - CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS DE CAÂNCER DE MAMA MDA-MB-231 NA PRESENÇA DO EXTRATO BRUTO DE CASCAS DE CAULE DE *L.pacari*.

FONTE: A Autora (2022).

NOTA: Cada coluna representa a média±DP de nitrito, os resultados demonstram diferença significativa com ANOVA * ($P \leq 0,001$), ** ($P < 0,05$), *** ($P < 0,01$) seguido de t-test (α) ou Tukey test (γ) com $P < 0,05$ em relação ao controle.

5.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Compostos como polifenóis, flavonoides, estéreis fenólicos simples, entre outros, possuem papel importante na atividade antimicrobiana frente a cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas (BASILE *et al.*, 2000), estudos como, Lima *et al.*, (2006) e Porfírio *et al.*, (2009), demonstram efeito do extrato hidroalcolóico de *Lafoencia pacari* frente a diversas bactérias incluindo multiressistentes. Os estudos

fitoquímicos realizados neste trabalho demonstram que as amostras contêm polifenóis e flavonoides que podem contribuir para o potencial antimicrobiano.

O ensaio foi realizado a partir do extrato etanólico de cascas de *Lafoencia pacari* (EBE) e frações (FClo, FAcEt, FNB e FR), além do padrão de ácido elágico. As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 20000µg/mL como solução estoque. As concentrações utilizadas para o ensaio foram de 1000 a 7,81µg/mL sendo testadas em bactérias gram-positiva e gram-negativa. Os resultados demonstraram que o EBE e frações apresentaram uma atividade moderada em relação a *Pseudomonas aeruginosa*. O Extrato bruto, fração *n*-butanol e o resíduo apresentaram atividade moderada sobre os *Staphylococcus aureus*. Para *Escherichia coli* o extrato e todas as frações obtiveram CIM e CBM de 1000 µg/mL sendo considerada uma atividade fraca. O mesmo aconteceu com *Enterococcus faecalis* porém o CBM para as frações clorofórmio e resíduo foi superior a 1000 µg/mL considerado como inativo. O ácido elágico foi considerado inativo para todas as cepas bacterianas utilizadas, com CIM superior a 1000 µg/mL. Os resultados estão demonstrados na TABELA 7.

TABELA 7 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DO EXTRATO, FRAÇÕES E ÁCIDO ELÁGICO EM BACTÉRIAS GRAM -POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS.

<i>Staphylococcus aureus</i>	G ⁺	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
EBE		500	250
FNB		500	500
Fclo		1000	>1000
FR		500	1000
FAcEt		1000	>1000
Ácido elágico		>1000	>1000
Gentamicina		15,62	15,62
<i>Enterococcus faecalis</i>	G ⁺	CIM	CBM
EBE		1000	1000
FNB		1000	1000
Fclo		1000	>1000
FR		1000	>1000
FAcEt		1000	1000
Ácido elágico		>1000	>1000
Gentamicina		31,25	31,25
<i>Escherichia coli</i>	G ⁻	CIM	CBM
EBE		1000	1000
FNB		1000	1000
Fclo		1000	1000

FR		1000	1000
FACet		1000	1000
Ácido elágico		>1000	>1000
Gentamicina		15,62	31,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G-	CIM	CBM
EBE		500	1000
FNB		500	1000
Fclo		250	250
FR		250	250
FACet		500	500
Ácido elágico		>1000	>1000
Gentamicina		7,81	7,81

FONTE: A Autora (2022).

NOTA: Valores médios das replicatas; G: reação bacteriana ao gram. EBE: extrato bruto etanolico, FNB: fração *n*-butanol, FClO: fração clorofórmio, FR: fração resíduo, FACet: fração acetato de etila, ácido elágico. CIM: concentração inibitória mínima e CBM: concentração bactericida mínima.

Os resultados corroboram com estudo feito por Nascimento *et al.*, (2011) utilizando extratos de *L. pacari* demonstrando que na concentração de 200 µg/mL ocorreu a inibição de algumas cepas bacterianas. Estudo de Porfírio *et al.*, (2009), demonstrou o efeito antimicrobiano de extratos hidroalcolico de folhas e caule de *Lafoensia pacari* em algumas bactérias gram-positivas e gram-negativas, demonstrando efeito menos expressivo nos extratos do caule onde houve a inibição de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* nas concentrações de 125 µg/mL.

Menezes *et al.*, (2006), evidenciaram o potencial antimicrobiano de extratos de *Lafoensia pacari* para o tratamento de *Helicobacter pylori*, bactéria que é associada a disfunções estomacais como gastrites, úlceras e carcinomas gástricos.

Ficou evidenciado pelos resultados que o ácido elágico isolado não possui efeito sobre as bactérias. Sendo assim, o efeito antimicrobiano encontrado pode ser por conta do sinergismo de diversos compostos encontrados no extrato e frações como flavonoides e polifenóis.

5.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Por conta da quantidade das citações bibliográficas utilizando o método e eficiência metodológica a avaliação do potencial antioxidante *in vitro* foi feito utilizando a reação do complexo fosfomolibdênico, redução do radical livre DPPH e análise de

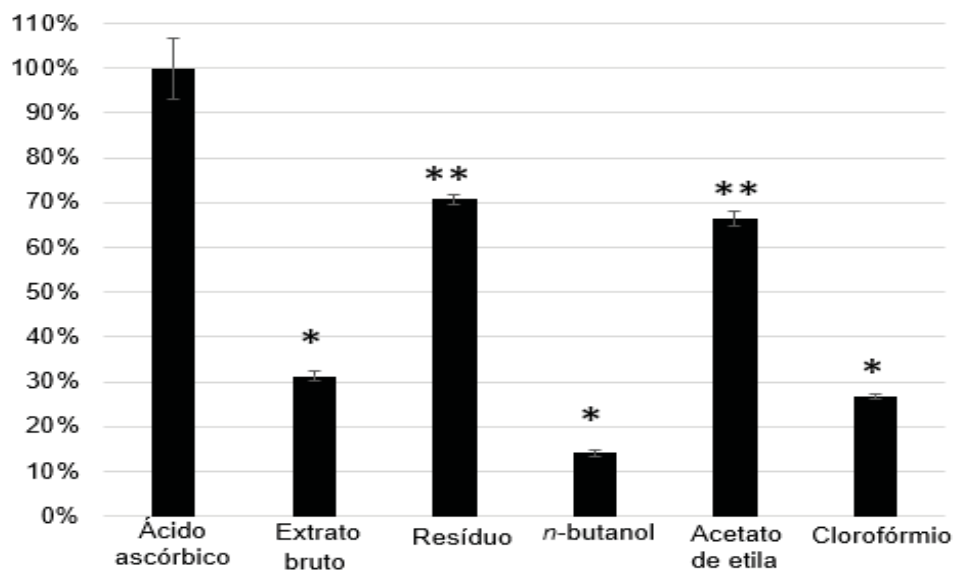
interpolação polinomial de Lagrange do extrato e frações das cascas do caule da *Lafoensia pacari*.

5.4.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênico

Soluções do extrato bruto, frações de *L. pacari* e o padrão de ácido ascórbico na concentração de 200 µg/mL foram submetidos a reação de oxi-redução por 60 min a 100°C e posteriormente lidas em leitor de microplaca Multiskan FC (ThermoScientific, EUA) em 690 nm. As absorvâncias das amostras foram relacionadas com as absorvâncias do padrão de ácido ascórbico. A reação pode ser observada pela mudança da cor do meio, pois o complexo fosfomolibdênico que possui coloração amarela se torna verde a medida que é reduzido.

Os resultados obtidos em relação ao ácido ascórbico, considerado 100% foram de 31,24 ± 1,19% para o EBE, enquanto que a FR apresentou maior potencial em relação ao ácido ascórbico 70,67 ± 1,18%, a FNB apresentou menor porcentagem sendo 14,04 ± 0,66%, a FAcEt obteve um resultado de 66,30 ± 1,72% e a FClo de 26,82 ± 0,57%, como demonstrados na FIGURA 25.

FIGURA 25 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA AAR% DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES DE CASCAS DE *L. pacari* (200 µg/mL) COM BASE NA ATIVIDADE DO ÁCIDO ASCÓRBICO.



FONTE: A Autora (2022).

NOTA: Representação gráfica da AAR% do extrato etanólico bruto e frações de cascas de *L. pacari* (200 µg/ml) com base na atividade do ácido ascórbico. Cada coluna representa a média ± DP padrão da porcentagem de AAR% em relação ao ácido ascórbico. Denotam diferença significativa ANOVA * ($P \leq 0,001$), ** ($P < 0,01$) seguido de t-test $P < 0,050$.

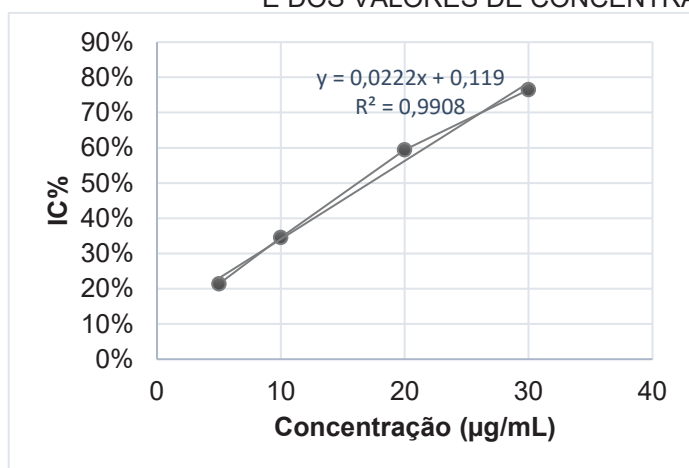
Análises fitoquímicas realizadas nesse trabalho demonstram maiores teores de flavonoides e compostos fenólicos nas FAcEt, FR e EBE, esses compostos possuem a capacidade de doar elétrons inibindo a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* uma vez que possuem esqueleto carbônico propício para a estabilização de radicais livres (SOARES, 2002). Por conta disso a disponibilidade de elétrons disponíveis para reduzir o complexo fosfomolibdênico no FAcEt, FR e EBE é superior em relação as frações com teor menor de flavonoides e fenóis totais.

5.4.2 Ensaio da redução do radical livre 1,1 – Difenil – 2 – picrilhidrazila (DPPH)

O mesmo extrato bruto e frações que foram utilizados para o teste de redução do complexo fosfomolibdênico também foram usados para o ensaio da redução do DPPH, este é uma substância estável na forma sólida solúvel em solventes polares como etanol ou metanol ficando com coloração violeta escuro e à medida que é reduzido se torna amarelo. A intensidade da cor é diretamente proporcional a concentração de substâncias com potencial antioxidante.

Dessa forma foi determinada a IC₅₀ do EBE e das frações das cascas de *Lafoensia pacari*. A FIGURA 26 mostra um ensaio da redução do DPPH, onde o padrão de ácido ascórbico foi tomado como exemplo. Baseado nos valores da IC%, foram interpolados gráficos (IC% x Conc. µg/mL) e através das equações das retas fornecidas foram calculados a IC₅₀. O resultado considerado é a media±DP de todos os ensaios realizados. A mesma base de cálculos foi aplicada para as demais IC₅₀.

FIGURA 26 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DOS VALORES DE CONCENTRAÇÃO (µg/mL) X IC%.



Ácido ascórbico	
Concentração (µg/mL)	IC%
5	21,37 ± 1,52
10	34,54 ± 0,43
20	59,45 ± 1,42
30	76,49 ± 2,30

FONTE: A Autora (2022).

Pela equação da reta valor de IC₅₀ obtido para o extrato bruto foi de 17,168 µg/mL. Para as frações procedeu-se o mesmo procedimento, os resultados da IC₅₀ estão demonstrados na TABELA 8.

TABELA 8 - RESULTADOS IC₅₀ µg/mL DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES PELO ENSAIO DA REDUÇÃO DO DPPH.

Amostra	IC ₅₀ µg/mL
Extrato Bruto	17,168 ± 1,420
Resíduo	6,228 ± 2,510
<i>n</i> -butanol	24,817 ± 0,605
Acetato de etila	7,786 ± 0,575
Clorofórmio	497,2 ± 1,070

FONTE: A Autora (2022).

Quanto menor o resultado do IC₅₀ (µg/mL) maior é o potencial antioxidante da substância ou fração testada, portanto apenas a fração clorofórmica tem um potencial antioxidante menor (497,2 ± 1,070 µg/mL), corroborando em parte com os resultados do ensaio da redução do complexo fosfomolibdênico. Como pode ser observado nos resultados a fração do resíduo, a fração de acetato de etila, extrato bruto e *n*-butanol obtiveram um resultado com IC₅₀ baixo sugerindo um alto potencial antioxidante.

Estudo feito por Solon *et al.* (2000), com extrato das cascas do caule e tronco de *L. pacari*, demonstrou que a fração da parte da haste que obteve maior potencial antioxidante foi a fração de butanol (96 ± 4%) e de éter etílico (87 ± 5%). Já com o tronco o maior percentual antioxidante foi observado com a fração acetato de etila. O estudo demonstrou também que o principal composto responsável pela reação com os radicais livres é o ácido elágico identificado na análise cromatográfica deste estudo.

Corroborando com os resultados obtidos do potencial antioxidante da *L. pacari* Firmo *et al.* (2015) demonstrou porcentagens superiores a 90% nas duas maiores concentrações no estudo de redução do DPPH com o extrato hidroalcolico, acetato de etila e a fração metanólica.

Outros autores demonstraram alta atividade antioxidante do extrato de *L. pacari* onde foi demonstrado atividade semelhante ao padrão de ácido ascórbico no ensaio de redução do DPPH (ANJOS *et al.*, 2018). Os estudos encontrados corroboram com o resultado obtido neste trabalho, demonstrando alta capacidade antioxidante do EBE, FNB, FR e FAcEt. É importante ressaltar que a variação dos

resultados obtidos com os estudos encontrados na literatura pode ser justificada pela diferença dos solventes e suas polaridades por influenciar na capacidade extrativa dos compostos.

5.4.3 Análise de interpolação polinomial de Lagrange

Para viabilizar o estudo e análise de um algoritmo, desenvolveu-se matematicamente técnicas envolvendo a manipulações de somas, equações e cálculos, como é exemplo dos métodos numéricos. Os métodos numéricos são uma alternativa de resolução de algoritmos, nos casos em que a análise exata é difícil. O princípio parte de um cálculo aproximado para obter o resultado esperado, que é retroalimentado com o resultado obtido, chegando cada vez mais próximo da exatidão. Assim, nesse trabalho adotamos métodos de interpolações sequenciais. Os métodos para interpolação são imprescindíveis para a formulação de equações referentes aos mais diversos fenômenos. A interpolação polinomial é dada pela aproximação de um conjunto de pontos tabelados por um polinômio criado que melhor se adapte a distribuição desses pontos. Assim, por meio da interpolação é possível determinar com uso dessa equação polinomial o provável valor de uma grandeza em função da disposição de outros pontos já tabelados anteriormente por meio de medições experimentais.

A interpolação polinomial é um processo para estimar os valores de uma função $f(x)$ nas ordenadas para valores de argumentos entre x_0, \dots, x_n nas abcissas sendo conhecidos os valores y_0, \dots, y_n .

Os métodos de interpolação substituem $f(x)$ por uma outra função ainda mais fácil de calcular, na maior parte das vezes polinômios; no caso mais simples, um polinômio do primeiro grau que é uma reta. Os valores y_0, \dots, y_n são substituídos na fórmula polinomial de Lagrange obtendo-se desta forma um algoritmo para interpolar, sendo o resultado uma aproximação de $f(x)$.

A partir do polinômio de Lagrange é possível inserir valores na formulação mesmo para pontos irregularmente espaçados. O cálculo da IC_{50} utilizando o polinômio de Lagrange foi obtido diretamente através de um programa, idealizado pelos próprios autores, conforme demonstrado na FIGURA 27.

FIGURA 27 - REPRESENTAÇÃO DO PROGRAMA UTILIZADO PARA O CÁLCULO DIRETO DA IC₅₀ TENDO COMO BASE DE CÁLCULO O POLINÔMIO DE LAGRANGE.

Digite os 5 pares de pontos conhecidos com coordenadas Xe Y

interpolação de lagrange	Pares conhecidos:	Equação aberta para visualizar valores parciais:	
é um polinômio, construído por n pontos, x e y=f(x), com x' diferentes	x0	y0	P4(x)= y0.L0(x)+y1.L1(x)+y2.L2(x)+y3.L3(x)+y4.L4(x)= #DIV/0!
A forma de Lagrange para o polinômio interpolador é: $P_n(x) = \sum_{i=0}^n y_i L_i(x)$ onde $L_i(x)$ é igual a: $L_i(x) = \prod_{j=0, j \neq i}^n \frac{(x-x_j)}{(x_i-x_j)}$	x1	y1	L4(x)= (x-x0). (x-x1). (x-x2). (x-x3)= #DIV/0! ^
	x2	y2	L3(x)= (x-x0). (x-x1). (x-x2). (x-x4)= #DIV/0! I
	x3	y3	L2(x)= (x-x0). (x-x1). (x-x3). (x-x4)= #DIV/0! I
	x4	y4	L1(x)= (x-x0). (x-x2). (x-x3). (x-x4)= #DIV/0! I
			L0(x)= (x-x1). (x-x2). (x-x3). (x-x4)= #DIV/0! I
	x conhecido:	concentração incôgnita	I
	y a calcular:	definido ic50 y=50	Y
	50 IC50		

	n	obs: Calcula-se com a função atingir meta do excel
Pn(x)= soma	yi.Li(x)	fixando resultado de P4(x) como 50 do IC50 e solicita ao programa o cálculo de X que proporciona esse resultado.
i=0		Automaticamente o programa faz as interações chutando valores de X até que o valor de P4(x)=Y=50
	Pn(x)= a0+ a1.x+ a2.x²+ na.x^n	O valor de X obtido é a incôgnita desejada da interpolação.
	n	
Li(x)= prod	(x-xj)	
j=0	(xi-xj)	
j dif i		

FONTE: A Autora (2022).

Os resultados dos cálculos obtidos pela equação do polinômio de Lagrange em comparação com o DPPH estão demonstrados na TABELA 9.

TABELA 9 - REPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO PRÁTICO DPPH E PELO MÉTODO TEÓRICO POR POLINÔMIO DE LAGRANGE.

	Extrato Bruto	Resíduo	n-butanol	Acetato de etila	Clorofórmio
DPPH	17,168 ± 1,420	6,228 ± 2,510	24,817 ± 0,605	7,786 ± 0,575	497,2 ± 1,070
Polinômio Lagrange	15,930	5,920	28,700	7,610	540,000
Fosfomolibdênio	31,24 ± 1,19	70,67 ± 1,18	14,04 ± 0,66%	66,30 ± 1,72	26,82 ± 0,57

FONTE: A Autora (2022).

Como já demonstrado quanto menor o valor do IC₅₀ maior o potencial antioxidante da substância, desta forma os resultados obtidos pelo método teórico do polinômio de Lagrange corroboram com os resultados pelo método de redução do DPPH ficando evidenciado a capacidade antioxidante principalmente do FR e FAcEt. O EBE e FNB também apresentaram uma alta capacidade antioxidante e apenas a FClo resultou em um IC₅₀ elevada sugerindo uma capacidade antioxidante menor. Os resultados obtidos também corroboram com os valores obtidos no ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio com relação ao FR e FAcEt com alta capacidade

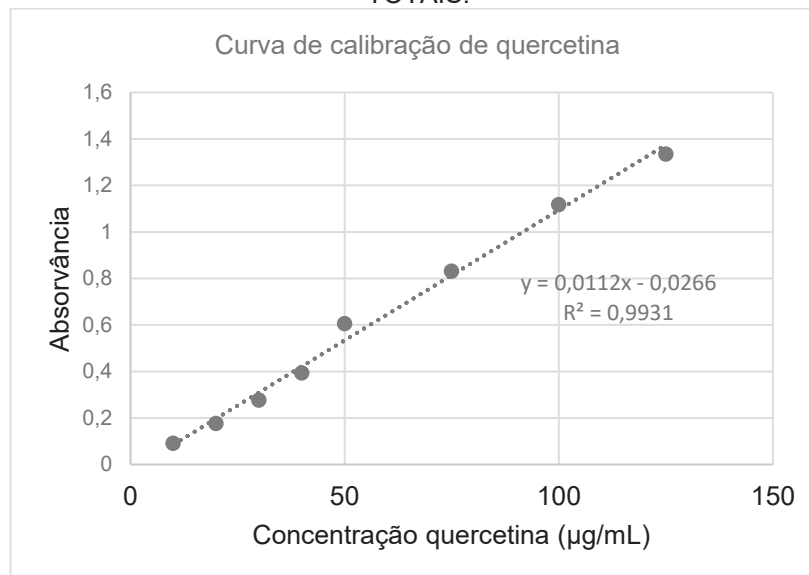
antioxidante e FClo com resultado baixo, porém, os valores são destoantes no EBE e FNB onde o potencial antioxidante foi inferior aos demonstrados nos testes do DPPH e polinômio Lagrange. Inúmeros testes podem ser utilizados para o ensaio antioxidante *in vitro* em espécies vegetais, por conta disso é de suma importância o método de polinômio Lagrange para a verificação de qual método possui maior reprodutibilidade de IC₅₀ e desta forma obtenção de um resultado mais confiável.

5.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DO EXTRATO E FRAÇÕES

5.5.1 Quantificação de flavonoides

Para a quantificação do conteúdo de flavonoides totais, foi utilizado um padrão de quercetina para a curva de calibração com concentrações variando de 10 a 125 µg/mL e a leitura realizada em 414 nm. Os dados estão representados na FIGURA 28.

FIGURA 28 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DE QUERCETINA – QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS.



FONTE: A Autora (2022).

Através dos dados obtidos pela equação da reta foi possível calcular o valor equivalente de quercetina em cada amostra. Os resultados obtidos encontram-se na TABELA 10.

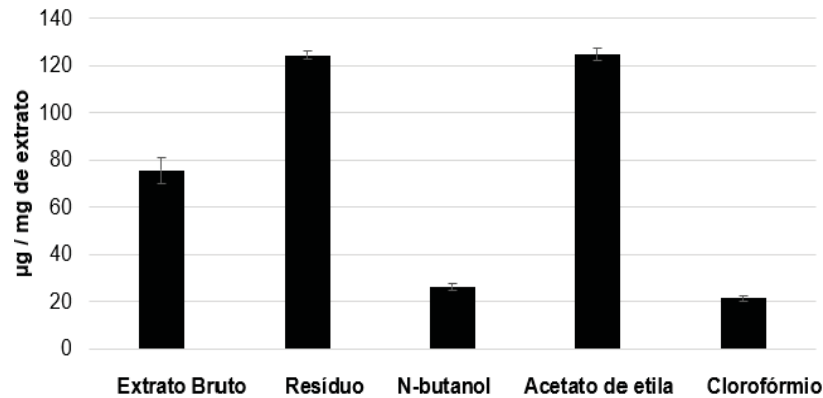
TABELA 10 - REPRESENTAÇÃO DE mg EQUIVALENTE DE QUERCETINA POR g DE EXTRATO E FRAÇÕES.

	Extrato Bruto	Resíduo	<i>n</i> -butanol	Acetato de etila	Clorofórmio
mg equivalente de quercetina por g de extrato	75,61 ± 5,30	124,54±1,74	26,39±1,47	124,79±2,59	21,43± 1,19*

*resultados fora da curva.

FONTE: A Autora (2022).

A FIGURA 29 representa a relação de todas as frações comparando com o extrato bruto.

FIGURA 29 - CONTEÚDO TOTAL DE FLAVONOIDES DO EXTRATO E FRAÇÕES DE CASCAS DE *Lafoensia pacari*.

FONTE: A Autora (2022).

NOTA: Cada coluna representa a média ± DP padrão µg de quercetina por mg de extrato.

Os resultados demonstram que a EBE, FR e FAcEt apresentam quantidade significativa de flavonoides totais. Os resultados obtidos são compatíveis com os resultados encontrados por Galdino *et al.*, (2015) utilizando extrato e frações de cascas do caule de *L. pacari* onde foi evidenciado a presença de flavonoides por CCD no extrato bruto etanólico e na fração acetato de etila, as frações *n*-butanol e clorofórmio deste estudo não apresentaram bandas sugestivas de flavonoides significativas. Em contrapartida estudo de Firmo *et al.*, (2015) utilizando folhas de *L. pacari* demonstraram teor inferior a 20% de flavonoides no extrato bruto e nas suas frações.

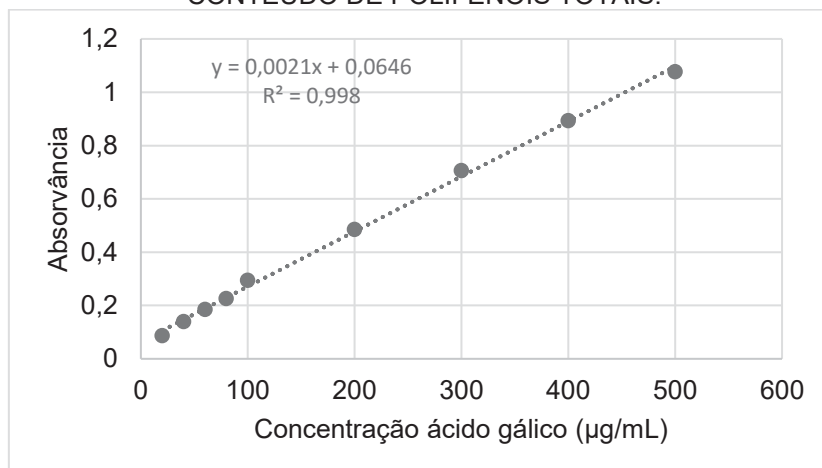
Segundo Zuanazzi; Montanha, (2007) diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas, dentre elas podemos citar proteção a luz visível e ultravioleta, contra insetos, patógenos, entre outras funções importantes para o desenvolvimento da planta. Os flavonoides podem atuar como quelantes de metais envolvidas em

processos de metabolismo do oxigênio reduzindo espécies reativas do mesmo por serem capazes de doar elétrons aos radicais por conta da sua estrutura química mais estável. Desta forma os resultados obtidos corroboram com encontrados no ensaio antioxidante, pois, pode se observar que EBE, FR e FAcEt apresentam maior quantidade de flavonoides totais demonstrando importante papel desses no potencial antioxidante.

5.5.2 Quantificação do conteúdo de polifenóis totais

Para o ensaio da quantificação do conteúdo de polifenóis totais foi feita uma curva de calibração com o ácido gálico nas concentrações de 10 a 500 µg/mL. Desta forma a curva foi construída com base na absorvância (690 nm) e a concentração do ácido gálico, demonstrado na FIGURA 30.

FIGURA 30 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO PARA A DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE POLIFENÓIS TOTAIS.



FONTE: A Autora (2022).

Através dos dados obtidos pela equação da reta foi possível calcular a concentração equivalente de ácido gálico nas amostras analisadas. Os resultados obtidos estão demonstrados na TABELA 11.

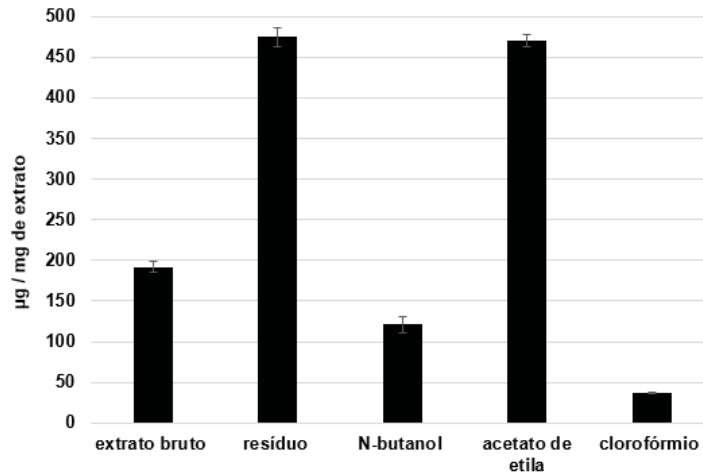
TABELA 11 - REPRESENTAÇÃO DE mg EQUIVALENTE DE ÁCIDO GÁLICO POR g DE EXTRATO E FRAÇÕES.

	Extrato bruto	Resíduo	<i>n</i> -butanol	Acetato de etila	Clorofórmio
mg equivalente de ácido gálico por g de extrato	191,95± 5,62	474,51± 8,52	121,01± 2,19	469,97± 7,05	37,77± 1,95

FONTE: A Autora (2022).

A FIGURA 31 representa a relação de todas as frações comparando com o extrato bruto.

FIGURA 31 - CONTEÚDO TOTAL DE POLIFENÓIS DO EXTRATO E FRAÇÕES DE CASCAS DE *Lafoensia pacari*.



FONTE: A Autora (2022).

NOTA: Cada coluna representa a média \pm DP padrão μg de ácido gálico por mg de extrato.

Com relação aos compostos fenólicos totais o EBE, FR, FNB e FAcEt apresentaram teores significativos de compostos fenólicos totais. Observando discordância de estudo feito por Anjos *et al.*, (2018) onde os teores ficaram fora da curva de calibração (inferiores a 10 mg). Entretanto os teores demonstrados nas análises do extrato bruto e frações de *L. pacari* no estudo de Firmo *et al.*, (2015) o extrato bruto hidroalcolico, fração acetato de etila e a fração metanólica resultaram em maiores teores de compostos de flavonoides e compostos fenólicos. Resultados semelhantes foram obtidos por Campos; Frasson (2011) no estudo utilizando curva de calibração de ácido tânico, os resultados das absobâncias de para o extrato bruto (1 mg/mL) foram 0,977 e do ácido tânico de 1,977.

Oliveira *et al.*, (2016) avaliando diferentes solventes para extração de compostos presentes nos vegetais evidenciou afinidade dessas substâncias por solventes polares, pois, grande parte dos compostos fenólicos não se encontram na forma livre naturalmente, mas sim na forma de ésteres ou heterosídeos, esses são polares facilitando a extração por solventes orgânicos mais polares. Alguns estudos demonstram que vários fatores podem influenciar o teor de compostos fenólicos na

planta como origem vegetal, polaridade do solvente, temperatura e tempo de extração (ANDREO; JORGE, 2006).

Os compostos fenólicos e os flavonoides são capazes de doar elétrons a espécies reativas por possuírem uma estrutura química mais estável. Desta forma, os resultados obtidos no ensaio de dosagem de polifenóis totais e flavonoides colaboram com os resultados dos ensaios da avaliação do potencial antioxidante. Sendo assim, ficou evidenciado que o EBE, FR, FNB e FAcEt por possuírem maiores teores de flavonoides e compostos fenólicos foram capazes de reduzir com mais facilidade o DPPH e o complexo fosfomolibdênico.

A divergência de resultados encontrados na literatura pode ser justificada por conta da dificuldade da padronização de uma metodologia para a extração desses compostos em virtude da grande diversidade de estruturas químicas dessa classe e da sensibilidade das condições de extração desses compostos.

6 CONCLUSÃO

- Análise de CLAE-DAD do extrato e frações revelou a presença de uma mistura complexa onde foram verificados vários componentes nas amostras de *L. pacari* incluindo taninos hidrolisáveis, ácido elágico e derivados, saponinas e triterpenos;
- A fração resíduo apresentou menor CI_{50} , contudo a fração acetato de etila foi a mais seletiva apresentando também uma maior quantidade de ácido elágico;
- O ácido elágico foi capaz de aumentar a adesão celular em células MDA-MB-231 e o extrato bruto em concentrações mais elevadas reduziu a adesão;
- As células MDA-MB-231 não expressaram transportadores OAT1 e OAT3 sendo assim, outros estudos devem ser realizados para elucidação do transporte do ácido elágico para o interior das células;
- As células MDA-MB-231 foram capazes de captar o ácido elágico (2 h de tratamento) e esta captação foi praticamente inibida quando tratadas com probenidica;
- O extrato bruto de *L. pacari* e o ácido elágico foram capazes de diminuir a migração celular de células tumorais MDA-MB-231 após os tratamentos com 72h.
- O extrato bruto de *L. pacari* demonstrou estimular a produção de NO de maneira dose-dependente em células tumorais MDA-MB-231.
- Os resultados para o extrato bruto e frações demonstraram atividade antimicrobiana moderada em relação a *Pseudomonas aeruginosa*, além disso, a fração *n*-butanol e o resíduo apresentaram atividade moderada também sobre *Staphylococcus aureus* já o padrão de ácido elágico não demonstrou atividade nas bactérias testadas.
- Em ambos os testes antioxidantes realizados, o extrato bruto e as frações acetato de etila e resíduo demonstraram alto potencial antioxidante comparado com padrões, sendo que apenas a fração clorofórmica e *n*-butanol apresentaram um potencial de redução menor.
- A quantificação de flavonoides e polifenóis totais mostraram taxas elevadas no extrato bruto e frações e quantidades inferiores na fração clorofórmica e *n*-butanol colaborando com os resultados obtidos nos testes antioxidantes, visto que esses compostos possuem estruturas estáveis capazes de capturar radicais livres.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Análise da composição química do extrato e frações de *L. pacari* em cromatografia gasosa;
- Análise da composição química do extrato e frações de *L. pacari* em Espectroscopia de massa;
- Análise da composição química do extrato e frações de *L. pacari* em espectrometria de infravermelho;
- Elucidar o transportador do ácido elágico para o interior da célula;
- Correlacionar os componentes do extrato e das frações com as principais atividades utilizando correlação de Pearson.

REFERENCIAS

ABBAS, A. K.; JANEWA, Y. Ç. A., JR. Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century. **Cell**. v. 100 p.129-138, 2000.

ABDULLA, R. *et al.* Qualitative Analysis of Polyphenols in Macroporous Resin Pretreated Pomegranate Husk Extract by HPLC-QTOF-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 28, n. 5, p. 465-473, 2017.

ABEYLATH SC, TUROS E. Drug delivery approaches to overcome bacterial resistance to beta-lactam antibiotics. **Expert Opin Drug Deliv**, v.5, n.9, p. 931-949, 2008.

ADAMS, H. R. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. **J Am Vet Med Assoc**, v.209, n.7, Oct 1, p.1297-302. 1996.

AHMED, Y., SOHRAB, M. H.; AL-REZA, S. M.; TAREQ, F. S.; HASAN, C. M.; SATTAR, M. A. Antimicrobial and cytotoxic constituents from leaves of *Sapium baccatum*. **Food Chem Toxicol.**, v.48, n.2, p.549-552, 2010.

ALBO, D. *et al.* Tumor cell thrombospondin-1 regulates tumour cell adhesion and invasion through the urokinase plasminogen activator receptor. **British journal of cancer**, v. 83, n.3, p.298-306, 2000.

ALBUQUERQUE, D. A.; JULIANI, J. M., SANTOS, J. A.; HOSIDA, P. Y.; BORGES, S.; BORRALHO, C. T. Efeito do extrato etanólico de *Lafoensia pacari* sobre peritonite aguda em camundongos. In: **Programa e Anais 3ª Reunião especial da SBPC "Ecossistemas Costeiros-do conhecimento a gestão"**, Florianópolis, SC, UFSC, 1996.

ALLINGTON, D. R. ; RIVEY, M. P. Quinupristin/dalfopristin: a therapeutic review. **Clin. Ther.** v. 23, p.24–44, 2001.

AL-REHAILY, A.; EL-TAHIR, K. E. H.; MOSSA, J. S.; RAFATULLAH, S. Pharmacological studies of various extracts and the major constituent Lupeol obtained from hexane extract of *Teclea nobilis* in rodents. **Nat Product Sci.**, v.7, n.3, p.76–82, 2001.

AMBIGAIPALAN, P.; DE CAMARGO, A. C.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 34, p. 6584-6604, 2016.

ANDERS, C. K.; CAREY, L. A. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. **Clinical breast cancer**, v. 9, Supl. 2, S73-81, 2009.

ANDREO, D.; JORGE, N. Natural antioxidants: extraction techniques. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, [S.l.], v.24, n.2, p. 319-336, 2006. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/7489>>. Acesso em: 15/08/2022.

ANJOS, A. P. S. A. *et al.* Fitoquímicos e atividade antioxidante das espécies *Lafoensia pacari* e *Calycophyllum spruceanum*. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.15 n.28; p. 1227-1237. 2018.

ASHALATHA, K.; VENKATESWARLU, Y.; PRIYA, A. M.; LALITHA, P.; KRISHNAVENI, M.; JAYACHANDRAN, S. Anti inflammatory potential of *Decalepis hamiltonii* (Wight and Arn.) as evidenced by down regulation of pro inflammatory cytokines-TNF-alpha and IL-2. **J. Ethnopharmacol.**, v.130, n.1, p.167–170, 2010.

ATHERINO, J. C. Avaliação do potencial citotóxico, antiproliferativo e antimetastático *in vitro* de *Lafoensia pacari* A. St-Hil. em células de câncer colorretal, 2020. 91f. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2020.

ATHERINO, M. C. Investigação da atividade citotóxica e antiproliferativa de extratos de *Lafoensia pacari* A.St-Hil. sobre células de carcinoma mamário (MCF-7 E MDA-MB-231) e captação de seus componentes por célula tumoral e não tumoral, 2019. 92 f. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

ATLANTA: *American Cancer Society*, em 20/09/2019. Disponível em<<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer.html>> Acesso em 22/07/2022.

ATLANTA: *American Cancer Society*, 2021. Disponível em<<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer.html>> Acesso em 22/07/2022.

BADISA, R. B. *et al.* Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Res**, v. 29 n. 8, p. 2993-2996, 2009.

BASILE, A., S. SORBO, *et al.* Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. **Fitoterapia**, v.71 Suppl 1, Aug, p.S110-6. 2000.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 21, n. 6, p. 167-223, 2000.

BEZERRA, K. S.; ANTONIOSI, N. R. F. Análise comparativa do conteúdo em esteroides livres de diferentes óleos, gorduras e biodiesel por cromatografia gasosa. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 498-505, 2015.

BORDIGNON-JUNIOR, S. E. *et al.* Inibição do crescimento de bactérias Gram-negativas em microdiluição por tratamento com Nisina e EDTA. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p.127-135, 2012.

BOYD, M. R. The NCI in vitro anticancer drug discovery screen. In: Teicher, B.A. (eds) **Anticancer Drug Development Guide. Cancer Drug Discovery and Development**. Humana Press, Totowa, NJ. p. 30, 1997.

BRASIL, Ministério da saúde. **Classificação de câncer**. 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/assuntos/ministerio-da-saude>> Acesso em: 29/09/2020.

BRENTON, J. D. *et al.* Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application. **J Clin Oncol.**, v. 23 n. 29, p. 7350-7360, 2005.

BRIDI, R.; ATALA, E.; PIZARRO, P. N.; MONTENEGRO, G. Honeybee pollen load: phenolic composition and antimicrobial activity and antioxidant capacity. **Journal of Natural Products**, v.82, n.3, p.559-565, 2019.

BROZMANOVA, J., V. VLCKOVA, *et al.* Increased DNA double strand breakage is responsible for sensitivity of the *pso3-1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to hydrogen peroxide. **Mutat Res**, v.485, n.4, May 10, p.345-55. 2001.

BURCKHHARDT, G.; BURCKHHARDT, B. C. *In vitro* and *in vivo* evidence of the importance of organic anions transporters (OAT's) in drug therapy. In: FROMM, M. F.; KIM, R. B. **Drugs transporters: Handbook of Experimental Pharmacology**. 2011.

BURK, R. R. A Factor from a transformed cell line that affects cell migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 2, p. 369-372, 1973.

CADENAS, E.; SIES, H. The lag phase. **Free Radic Res.**; v.28, n.6, p.601-709, 1998.

CADENAS E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Biofactors**; v.6, n.4, p.391-407, 1997.

CALANI, Luca *et al.* Ultra-HPLC–MS n (poly) phenolic profiling and chemometric analysis of juices from ancient *Punica granatum* L. cultivars: A nontargeted approach. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 23, p. 5600-5609, 2013.

CALDERÓN-MONTAÑO J. M. *et al.* Evaluating the cancer therapeutic potential of cardiac glycosides. **BioMed Research International**, v. 2014, 9 p., 2014

CAMPOS, J. S.; FRASSON, A. P. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Lafoensia pacari*. ST-HIL. em emulsão não-iônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 3, p. 363–368, 2011.

CARNEIRO, C.C.; SANTOS, S. C.; LINO JUNIOR, R. S.; BARA, M. T. F.; CHAIBUB, B. A.; REIS, P. R. M.; CHAVES, D. A.; SILVA, A. J. R.; SILVA, L. S.; SILVA, D. M.; CHEN-CHEN, L. Chemopreventive effect and angiogenic activity of punicalagin isolated from leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.310, p.1-8, 2016.

CARR, A. C.; MCCALL, M. R.; FREI, B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.20, n.7, p.1716-1723, 2000.

CARVALHO, A. A. Estudo da atividade antimetastática da biflorina, uma o-naftoquinona isolada das raízes de *Caprari biflora*. Dissertação, 106f. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil, 2009.

CECI, C.; TENTORI, L.; ATZORI, M.G. *et al.* Ellagic Acid Inhibits Bladder Cancer Invasiveness and *In Vivo* Tumor Growth. **Nutrients**. v.8, n.11, p.744, 2016.

CERQUEIRA, N. F. E.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico: Revisão. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.17, p.417-423. 2002.

CHEN, J.; DU, L.; LI, J.; SONG, H. Epigallocatechin-3-gallate attenuates cadmium-induced chronic renal injury and fibrosis. **Food Chem Toxicol**. v.96, p.70-78, 2016.

CHENG, H. *et al.* Ellagic acid inhibits the proliferation of human pancreatic carcinoma PANC-1 cells in vitro and in vivo. **Oncotarget**, v. 8, p. 12301-12310, 2017.

CIENTIC. Pocariontes, Estrutura da bactéria, 2003. Disponível em <https://www.cientic.com/tema_monera_img2.html> Acesso em 29/07/2022.

CIRQUEIRA, M.B. *et al.* Subtipos moleculares de câncer de mama. **Femina**, v.39 n.10, p.499-503, 2011.

COLEMAN, R. E.; RUBENS, R. D. The clinical course of bone metastases from breast cancer. **Br J Cancer**, v.55, p.61-66, 1987.

CONDEELIS, J.; SINGER, R.H.; SEGALL, J. E. The great escape: When cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. **Annu Ver. Cell Dev Biol.**, v.21, p.695-718, 2005.

CRUZ, C. D.; FLETCHER, G. C.; PAJAK, M. A. Tannins and extracts of fruit byproducts: antibacterial activity against foodborne bacteria and antioxidant capacity. **J Agric Food Chem**. v.1, p.1-11, 2014.

DEKKER, L. V.; A. W. SEGAL. Perspectives: signal transduction. Signals to move cells. **Science**, v.287, n.5455, p.982-985, 2000.

DRAPIER J. C; WEIZESBIN, J.; HIBBS, J. B. Interferon gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine cytotoxic effects or mechanism in murine macrophages. **European J Immuno**, v.18, p.1587-1592, 1988.

EBADA, S. S. *et al.* Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. **Nature protocols**, v. 3, n.12, p. 1820, 2008.

EDWARDS, P. *et al.* Tumor cell nitric oxide inhibits cell growth *in vitro*, but stimulates tumorigenesis and lung metastasis *in vivo* **Journal Surgery Research**, v.63, n.1, p.49-52, 1996.

ENOMOTO, A. *et al.* Role of Organic Anion Transporters in the Tubular Transport of Indoxyl Sulfate and the Induction of its Nephrotoxicity. **J Am Soc. Nephrol**, v. 1, n. 20, p. 1711–1720, 2002.

FANG, Y. Z.; SUN, C. P.; TIAN, X. H.; CONG, J. H. Effect of lu-duowei on scavenging superoxide and hydroxyl radicals in vitro. **Am J Chin Med.**, v.26, N.2, p.153-158, 1998.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v.18, n.10, p.872-879, 2002.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development—the failure of success?. **Nat Biotechnol**, v.24, n.12, p.1497–1503. 2006.

FARIA, M. H. G. *et al.* Expressão das proteínas BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.**, v. 42, n. 4, p.271-278, 2006,

FETT-CONTE, A. C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Rev. bras. hematol. hemoter.** v. 24, p. 85-89, 2002.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M.V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise / Ano IV**, v.2, p. 32-39, 2007.

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira.** v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FIRMO, W. D. C. A.; MIRANDA, M. V.; COUTINHO, G. S. L.; BARBOZA, J. R.; ALVES, L. P. L. *et al.* Determinação de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante de *Lafoensia pacari* (LYTHRACEAE). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 12, n. 1, p. 1, 2015.

FISCHER, U. A. *et al.*, Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. **Food chemistry**, v. 127, n. 2, p. 807-821, 2011.

FRIDOVICH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? **Ann N Y Acad Sci.**, v.893, p.13-18, 1999.

FRIEDL, P.; ALEXANDER, S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. **Cell.** v.147, p.992–1009, 2011.

FRIES, J. F.; KOOP, C. E.; BEADLE, C. E.; COOPER, P. P.; ENGLAND, M. J.; GREAVES, R. F. *et al.* Reducing health care costs by reducing the need and demand for medical services. The Health Project Consortium. **N Engl J Med.** v. 329, n.5, p.321-325, 1993.

FU, S.; DAVIES, M. J.; STOCKER, R.; DEAN, R. T. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. **Biochem J.**, v.333, n.3, p.519-525, 1998.

FU, A. *et al.* Tumor-resident intracellular microbiota promotes metastatic colonization in breast cancer. **Cell**. v. 185, l.8, p 1356-1372. E26, 2022.

FUMAGALLI, M.; SANGIOVANNIA, E.; VRHOVSEKB, U.; PIAZZAA, S.; COLOMBOA, E.; GASPEROTTIB, M.; MATTIVIB, F.; FABIANIA, E.; DELL'AGLIA, M. Strawberry tannins inhibit IL-8 secretion in a cell model of gastric inflammation. **Pharmacol Res**. v.111, p.703–712, 2016.

GALDINO, P. M. Lafoensia pacari A. St. Hil: Identificação de constituintes ativos e avaliação da atividade antidepressiva, 2015. 124 f. (Tese De Doutorado) - Programa de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2015. Disponível em <<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/159872/337679.pdf?sequence=1;isAllowed=y>> Acesso em: 12/10/2020.

GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1796, n. 2, p. 293–308, 2009.

GIACOMINI, K. *et al.* Membrane transporters in drug development. **Nature reviews: Drug Discovery**, v.9, p. 215-235, 2010.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Nat. Prod. Rep.** v.21, p.263-277, 2004.

GILBERT, D. L. Fifty years of radical ideas. **Ann N Y Acad Sci**, v.899, p.1-14, 2000.

GIOVANONNI, G. *et al.* Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 34, p.193-198, 1997.

GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 402–418, 2015.

GUERRERO-CASTILLO, P. *et al.* Biological activity and chemical characterization of Pouteria lucuma seeds: A possible use of an agricultural waste. **Waste Management**, v.88, p.319-327, 2019.

GUIMARÃES, B. C.; L. T. NASCIMENTO. Análise de complexidade de métodos numéricos para interpolação. Disponível em: <<http://www.homepages.dcc.ufmg/~nivio/cursos/pa02/seminários/seminário6/seminário06.html>> Acesso em: 29 de junho de 2022.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann N Y Acad Sci**; v.899, p.136-47, 2000.

HALL, C. A.; CUPPETT, S. L. Structure-activities of natural antioxidants. In: ARUOMA, O. I.; CUPPETT, S. L., editors. **Antioxidant Methodology In Vivo and In Vitro Concepts**. 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v.86, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annu Rev Nutr**. v.16, p.33-50, 1996.

HANAHAHAN D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n.1 p. 57-70, 2000.

HANAHAHAN D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HAPPI, C. T. *et al.* Polymorphisms in plasmodium falciparum dhfr and dhps genes and age related in vivo sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria. **Acta Trop.**, v. 95, n.3, p.183-193, 2005.

HOLOHAN, C.; SCHAEYBROECK, V. S.; LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P.G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nat rev câncer**. v.13, p.714-726, 2013.

ILSON, D. H. New developments in the treatment of esophageal cancer. **Curr Oncol Rep**, v.4, n.3, p.213-21. 2002.

IMAYAMA I, ULRICH CM, ALFANO CM *et al.* Effects of a caloric restriction weight loss diet and exercise on inflammatory biomarkers in overweight/obese postmenopausal women: a randomized controlled trial. Effects of a caloric restriction weight loss diet and exercise on inflammatory biomarkers in overweight/obese postmenopausal women: a randomized controlled trial. **Cancer Research**, v.72, n.9 p.2314-2326, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Ministério da Saúde. **O que é o câncer**. 2020. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 28/09/2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Cancer today**. Lyon: WHO, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home> Acesso em: 03/05/2021.

KANTER, M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. **Int J Sport Nutr.**, v.4, n.3, p.205-220, 1998.

KARBOWNIK, M., A. LEWINSKI, *et al.* Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. **Int J Biochem Cell Biol**, v.33, n.8, Aug, p.735-53. 2001.

KIM, H. A.; LEE, R. A.; MOON, B. I.; CHOE, K. J. Ellagic Acid Shows Different Anti-proliferative Effects Between the MDA-MB-231 and MCF-7 Human Breast Cancer Cell Lines. **Jornal do Câncer de Mama**, v.12, n.2, p. 85-91, 2009.

KOCH, A. *et al.* Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya. **Journal of ethnopharmacology**, v. 101, p. 95-99, 2005.

Kuo, P. C. e R. A. Schroeder. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Ann Surg**, v.221, n.3, Mar, p.220-35. 1995.

JENKINS, D.C.; CHARLES, I.G.; THOMSEN, I.I. Roles of nitric oxide in tumor growth. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v.92, p.4392-4396, 1995.

LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. **Adv Drug Deliv Rev.**, v.57, n.10, p.1471-1485, 2005.

LARROSA, M. *et al.* The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 17, n. 9, p. 611-625, 2006a.

LARROSA, M.; GONZALEZ-SARRIAS, A.; GARCIA-CONESA, M. T.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; ESPIN, J. C. Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. **J Agric Food Chem.**, v.57, n.10, p.1471-1485, 2006b.

LAUFFENBURGER, D. A. E HORWITZ, A. F. Cell migration: A Physically Integrated Molecular Process. **Cell**, v.84, n.3, p. 359-369, 1996.

LEBER, M. F.; EFFERTH, T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (Review). **International Journal of Oncology**, v. 34, p. 881-895, 2009.

LEE, T.K., POON, R.T., WO, J. Y., MA, S., GUAN, X.Y., MYERS, J. N., ALTEVOGT, P., YUEN, A. P. Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor-kappa B activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model. **Cancer Res.**, v.67, n.18, p.8800–9000, 2007.

LEEK, R. D. The prognostic role of angiogenesis in breast cancer. **Anticancer Res**, v.21, n.6B, Nov-Dec, p.4325-31. 2001.

LI, K.; DIAO, W.; ZHANG, H.; WANG, S.; ZHANG, Z.; YU, B.; HUANG, S.; YANG, H. Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula* Fructus Retz. promote cutaneous wound healing in rats. **BMC Complement Altern Med**. v.11, p.1-9. 2011.

LI, T. M.; CHEN, G. W.; SU, C. C.; LIN, J. G.; YEH, C. C.; CHENG, K. C. *et al.* Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. **Res. anticâncer.**, v.25, n.2A, p.971-979, 2005.

LIANG, C.C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat protoc.**, v.2, p.329-333, 2007.

LIMA, F. O., ALVES, V., BARBOSA, FILHO, J. M., ALMEIDA, J. R., RODRIGUES, L. C., SOARES, M.B., VILLARREAL, C. F. Antinociceptive effect of lupeol: evidence for a role of cytokines inhibition. **Phytother. Res.**, v.27, n.10, p.1557-63, 2013.

LIMA, M. R. *et al.* The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 300-306, 2006.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v.127, n.2, p.117-126, 2000.

LIRA, S.R., RAO, V.S., CARVALHO, A.C., GUEDES, M.M., DE MORAIS, T.C., DE SOUZA, A.L., TREVISAN, M.T., LIMA, A.F., CHAVES, M.H., SANTOS, FA. Gastroprotective effect of lupeol on ethanol-induced gastric damage and the underlying mechanism. **Inflammopharmacology**, v.17, n.4, p.221- 8, 2009.

LIRA, W.M., DOS SANTOS, F.V., SANNOMIYA, M., RODRIGUES, C.M., VILEGAS, W., VARANDA, E.A. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. **J.Med. Food**, v.11, p.111– 9, 2008.

LIOTTA, L. A.; RAO, C. N. *et al.* Tumor invasion and the extracellular matrix. **Lab Invest**, v.49, n.6, p.636-49, 1983.

LIU, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **Am J Clin Nutr.**, v.78, n.3, p.517-520, 2003.

LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. **J Pathol**, v.205, n.2, p.275-292, 2005.

LOWENSTEIN, C.; ALLEN, G.; WALKER, A.; ROSE, N.; SNYDER, S.; HERSKOWITZ, A. Nitric oxide inhibits viral replication in myocarditis. **Circulation**, v.88, n.4, p.5, 1993.

MANESH, C.; KUTTAN, G. Effect of naturally occurring isothiocyanates in the inhibition of cyclophosphamide-induced urotoxicity. **Phytomedicine**, v.12, n.6-7, p.487-493, 2005.

MAO, X. *et al.* Transport of corilagin, gallic acid, and ellagic acid from *Fructus phyllanthi* tannin fraction in Caco-2 cell monolayers. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016.

MARCONDES, D. B. da S. *et al.* Citotoxicity and apoptogenic effects of *Lafoensia pacari*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 243-250, 2014.

MARTÍNEZ-LACACI, I. *et al.*, Tumour cells resistance in cancer therapy. **Clin. Transl. Oncol.**, v. 9, n.1, p.13-20, 2007.

MASEREEUW, R.; RUSSEL, F. G. M. Therapeutic implications of renal anionic drug transporters. **Pharmacology; Therapeutics**, v. 126, p. 200-16, 2010.

MATHEUS, M. E. *et al.* Ação de extratos de Açai (*Euterpe oleraceae* Maet.) sobre a produção de óxido nítrico em células RAW 264.7. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, supl.1, p.3-5, 2003.

MEHROTRA, S.; KAKKAR, P.; VISWANATHAN, P. N. Mitochondrial damage by active oxygen species *in vitro*. **Free Radic Biol Med**; v.10, n.5, p.277-285, 1991.

MENA, P. *et al.* Rapid and comprehensive evaluation of (poly) phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum L.*) juice by UHPLC-MSn. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14821-14840, 2012.

MENEZES, M. V. *et al.* Assessing the therapeutic use of *Lafoensia pacari* St. Hil. extract (mangava-brava) in the eradication of *Helicobacter pylori*: double-blind randomized clinical trial. **Helicobacter**, v.11, n.3, p.188-195, 2006.

MENSOR, L. L., F. S. MENEZES, *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res**, v.15, n.2, Mar, p.127-30. 2001.

McKINNELL, R.G. Cancer genetics. In: McKINNELL, et al. (Ed.). **The biological basis of cancer**. Cambridge : Cambridge University, 1998. p.79-114..

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIN, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quím Nova**. v.28, p.892-896, 2005.

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

MUKHERJEE, A. K. *et al.* Advances in cancer therapy with plant based natural products. **Current medicinal chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1467-1486, 2001.

MÜLLER, V. *et al.* Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. **Phytother Res**, v. 21, p. 970-974, 2007.

MURTA, B.M.T. *et al.* The relationship of host immune cells, cytokine and nitric oxide production to tumor cells in ovarian carcinoma. **São Paulo Medical J.**, v.117, n.2, p.87-92, 1999.

NASCIMENTO, M. V. M. *et al.* Antinociceptive effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. independent of anti-inflammatory activity of ellagic acid. **Journal of natural medicines**, v. 65, n. 3-4, p. 448-454, 2011.

NETA, R.; OPPENHEIM, J. J.; DOUCHES, S. D. Interdependence of the radioprotective effects of human recombinant interleukin 1 alpha, tumor necrosis factor alpha, granulocyte colony-stimulating factor, and murine recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **J Immunol**, v.140, n.1, p.108-111, 1988.

NICOLAOU, K. C.; MONTAGNON, T.; **Molecules that Changed the World**, Wiley-VCH: Weinheim, cap. 13. 2008.

NICOLSON, G. L. Cancer metastasis. Organ colonization and the cell-surface properties of malignant cells. **Biochim Biophys Acta**, v.695, n.2, p.113-76, 1982.

NIKANDER, E.; METSA-HEIKKILA, M.; TIITINEN, A.; YLIKORKALA, O. Evidence of a lack of effect of a phytoestrogen regimen on the levels of C-reactive protein, E-selectin, and nitrate in postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.88, n.11, p.5180-5, 2003.

OBAIDAT, A.; ROTH, M.; HAGENBUCH, B. The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 52, p. 135-151, 2012.

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C. F.; PAULA, C. S.; DUARTE, A. F. S. *et al.* Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamento totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1 suppl 1, p. 230–239, 2016.

ORTIZ-ANDRADE, R. R. *et al.* alphaGlucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*, an anti-hyperglycemic agent. **J. Ethnopharmacol.**, v.109, n.1, p.48–53, 2007.

O'SULLIVAN, C.; LEWIS, C.E. Tumor-associated leucocytes: Friends or foes in breast cancer carcinoma. **Journal Pathology**, v.172, p.229-235, 1994.

PAPOUTSI, Z.; KASSI, E.; TSIAPARA, A, FOKIALAKIS N, CHROUSOS GP, MOUTSATSOU P. Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of ellagic acid via the estrogen receptor subtypes ERalpha and ERbeta. **J Agric Food Chem.**, v.53, n.20, p.7715-7720, 2005.

PARK, M.; CHO, H.; JUNG, H.; LEE, H.; HWANG, K. T. Antioxidant and antiinflammatory activities of Tannin fraction of the extract from black raspberry Seeds compared to grape seeds. **J Food Biochem.** v.1, p.1-12, 2013.

PATRICK, G. L.; **An Introduction to Medicinal Chemistry**, Oxford University Press: New York, 2005.

PAYNE, D. *et al.* Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nat Rev Drug Discov.**, v.6, n.1, p.29–40, 2007.

PEDRAZA-FARIÑA, L. G. Mechanisms of Oncogenic Cooperation in Cancer Initiation and Metastasis. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 79, n. 3-4, p. 95-103, 2006.

PEIXOTO-SOBRINHO, T. J. S. *et al.* Teor de flavonoides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia L.*) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Rev Bras Pl Med.**, v.14, n.4, p.586-591, 2012.

PEREIRA, L. O. M.; VILEGAS, W.; TANGERINA, M. M. P.; ARUNACHALAM, K.; BALOGUN, S. O.; ORLANDI-MATTOS, P. E.; COLODEL, E. M.; MARTINS, D. T. D. *Lafoensia pacari* A. St.-Hil.: Wound healing activity and mechanism of action of standardized hydroethanolic leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology** v.219, p.337- 350, 2018.

PESSINI, G. L. *et al.* Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n., p. 1115-1120. 2003.

PITCHAKARN, P. *et al.* Ellagic acid inhibits migration and invasion by prostate cancer cell lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, p. 2859-2863, 2013.

PORFÍRIO, Z. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 3, p. 785-789, 2009.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal Biochem** v.269, p.337-341, 1999.

PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M.; Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here?. **Clin. Microbiol. Infec.**, v.10, supl.4, p.18-22, 2004.

PROLLA, C. M. D.; SILVA P. S.; NETTO, C. B. O.; GOLDIM, J. R.; ASHTON-PROLLA P. Conhecimento sobre câncer de mama e câncer de mama hereditário entre enfermeiros em um hospital público, Porto Alegre, RS, Brasil. **Rev. Latino-Americana de Enfermagem**. v. 23, n.1, p.90-7, 2015.

RAMARATHNAM, N.; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends Food Sci Tech**. v.6, p.75-82, 1995.

REICHERT, C. L. *et al.* Metabolic profiling and correlation analysis for the determination of killer compounds of proliferating and clonogenic HRT-18 colon cancer cells from *Lafoensia pacari*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, p. 541–552, 2018.

RIDNOUR, L. A. *et al.* The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. **Biol Chem**; v.385, n.1, p.1-10, 2004.

RIDNOUR, L. A.; ISENBERG, J. S.; ESPEY, M. G.; THOMAS, D. D.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.102, n.37, p.13147–13152, 2005.

RÍOS, J. L. *et al.* A Pharmacological Update of Ellagic Acid. **Planta Medica**, v. 84, n. 15, p. 1068–1093, 2018.

RISS, T. L. *et al.* Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. **Methods Mol Biol.**, v.740, p.103-114, 2011.

ROCHA, C. R. R. Mecanismos de resistência a quimioterápicos em células tumorais. Tese de doutorado. 45f. USP/ Instituto Butantan/ IPT. São Paulo. 2015.

ROGÉRIO, A. P., SÁ-NUNES, A., ALBUQUERQUE, D. A., ANIBAL, F. F., MEDEIROS, A. I., MACHADO, E. R., SOUZA, A. O., PRADO, J. C. JR.; FACCIOLI, L. H. *Lafoensia pacari* extract inhibits IL-5 production in toxocariasis. **Parasite Immunol.**, v.25, n.7, p.393-400, 2003.

ROGÉRIO, A.P., FONTANARI, C., MELO, M.C., AMBROSIO, S.R., DE SOUZA, G. E., PEREIRA, P. S., FRANÇA, S. C., DA COSTA, F. B., ALBUQUERQUE, D. A., FACCIOLI, L. H. Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of *Lafoensia pacari* extract and ellagic acid. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 9, p. 1265-1273, 2006.

ROGÉRIO, A. P.; FONTANARI, C.; BORDUCCHI, E.; KELLER, A. C.; RUSSO, M., SOARES, E.G., ALBUQUERQUE, D.A., FACCIOLI, L.H. Anti-inflammatory effects of *Lafoensia pacari* and ellagic acid in a murine model of asthma. **Eur. J. Pharmacol.**, v.580, n.1-2, p.262-70, 2008.

ROTH, M.; OBADAT, A.; HAGENBUCH, B.. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 5, p. 1260-1287, 2012.

RUOSLAHTI, E.; GIANCOTTI, F. G. Integrins and tumor cell dissemination. **Cancer Cells**. 1989 v.1, n.4, p.119-126.

SALGADO, J. M. *et al.* Efeito do abacate (*Persea americana* Mill) variedade hass na lipídemia de ratos hipercolesterolêmicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 28, n. 4, p. 922-928, 2008.

SAMPAIO, B. L. *et al.* Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 1127-1137, 2011.

SÁNCHEZ-RANGEL, J. C. *et al.* The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. **Analytical Methods**, v. 5, n. 21, p. 5990– 5999, 2013.

SANDHU, R. *et al.* Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. **LabMedicine**, v. 41, n. 6, p. 364-372, 2010.

SANTOS JUNIOR, J. Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave. **Revista brasileira de coloproctologia**, v.23, n.3, p.206-210, 2003.

SANTOS, D. Y.A. C.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. Foliar flavonoids of *Lafoensia* (Lythraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v.28, p.487-488, 2000.

SANTOS, K. M. Estudos in vitro e in vivo da atividade de extratos de *Bauhinia* sobre o desenvolvimento tumoral. Tese de doutorado, 127f. Universidade Federal de São João Del Rei, Divinópolis – Minas Gerais, Brasil, 2017.

SANTOS, L.W.; COELHO, M.F.B.; PIRANI, F.R. Fenologia de *Lafoensia pacari* A.St.-Hil. (Lythraceae) em Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 12-17, 2009.

SAUER, G., H. DEISSLER, *et al.* New molecular targets of breast cancer therapy. **Strahlenther Onkol**, v.178, n.3, p.123-33, 2002.

SASS, P. M. The involvement of selectins in cell adhesion, tumor progression, and metastasis. **Cancer Invest**, v.16, n.5, p.322-8, 1998.

SEERAM, N. P. *et al.* *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **J Nutr Biochem.**, v.16, n.6, p. 360-367, 2005.

SHANNON R. P.; CHRISTOPHER J. K. Tumor suppressor genetics, **Carcinogenesis**, v.26, n.12, p.2031–2045, 2005.

SHARMA, V. P.; BEATY, B. T.; PATSIALOU, A.; LIU, H.; CLARKE, M.; COX, D.; CONDEELIS, J.S.; EDDY, R. J. Reconstitution of *in vivo* macrophage-tumor cell pairing and streaming motility on dne-dimensional micro-patterned substrates. **IntraVital**, v.1, n.1, p. 77-85, 2012.

SHERR, C. J. Principles of tumor suppression. **Cell**, v. 116, p. 235-246, 2004.

SHEU, J.R.; YEN, M.H.; KAN, Y.C., *et al.* Inhibition of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and antialpha(v)beta3 integrin monoclonal antibody. *Biochim Biophys Acta*, v.1336 (3), p.445-54, 1997.

SHIVAPPA, N.; SANDIN, S.; LOF, M. *et al.* Prospective study of dietary inflammatory index and risk of breast cancer in Swedish women, **British Journal of Cancer**. v.113, n.7, p.1099–1103, 2015.

SHIRWAIKAR, A., SETTY, M., BOMMU, P. Effect of lupeol isolated from *Crataeva nurvala* Buch. Ham. stem bark extract against free radical induced nephrotoxicity in rats. **Ind. J. Exp. Biol.**, v.42, p.686–90, 2004.

SIMONE BA, PALAGANI A, STRICKLAND K *et al.* Caloric restriction counteracts chemotherapy-induced inflammation and increases response to therapy in a triple negative breast cancer model. **Cell Cycle**. v.17, n.13, p.1536-1544, 2018.

SILVA JUNIOR, I. F. *et al.* Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.3, p. 422-428, 2010.

SILVA JÚNIOR, M. C. da. **100 árvores do Cerrado**: guia de campo. Brasília: Rede de sementes do Cerrado, 2005.

SILVA, P. A.; RIUL, S. S. Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. **Rev. bras. enferm.** Brasília, v. 64, n. 6, p. 1016-1021, 2011.

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A. R.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chem.**, v.89, n.2, p.191-198, 2005.

SNYDER, S. H.; BREDET, D. S. Biological role of nitric oxide. **Science Am.**, v.266, n.5, p.68-71, 1992.

SOARES S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.** v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SOLON, S. *et al.* Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 173-178, 2000.

SOMASUNDARAM, V. *et al.* Molecular Mechanisms of Nitric Oxide in Cancer Progression, Signal Transduction and Metabolism. **Antioxidants; Redox Signaling**, v. 30, n. 8, p. 1124-1143, 2019.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F *et al.* **Pharmacology of Pain**. 1st Ed, Seattle, IASP Press; p.279-302, 2010.

SOUZA, W. M. Estudo químico e das atividades biológicas dos alcaloides indólicos de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae - (Agoniada). 125f, 2008. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2008.

STEARNS, V.; COOP, A.; SINGH, B.; GALLAGHER, A.; YAMAUCHI, H.; LIEBERMAN, R. *et al.* A pilot Surrogatenend Point Biomarker Trial of Perillyl Alcohol in Breast Neoplasia. **Clin Cancer Res**. v.10, n.21, p.7583-7591, 2004.

STOWE, C. B. The effects of pomegranate juice consumption on blood pressure and cardiovascular health. **Complement Ther Clin Pract**. v.17, p.113-115, 2011.

SWANTON, C. Intratumor Heterogeneity: Evolution through Space and time. **Cancer Res**. v.72, n.19, p.4875-4882, 2012.

TAMASHIRO-FILHO, P.; *et al.* Evaluation of antiulcer activity and mechanism of action of methanol stem bark extract of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lytraceae) in experimental animals. **J Ethnopharmacol**, v. 144, p. 497-505, 2012.

THOMSEN, L.L. *et al.* Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. **British Journal Cancer**, v.72, p.41-44, 1995.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.

VAN DER, P.; VLOEDGRAVEN, H.; PAPAPOULOS, S., et al. Attachment characteristics and involvement of integrins in adhesion of breast cancer cell lines to extracellular bone matrix components. **Lab Invest**, v.77, n.6, p.665-75, 1997.

WAGNER, D. A., *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v.126, n.1, p.131-8, 1982.

WALSH, C.; **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**, Washington ASM Press: Washington, 2003.

WANG, F., CAO Y., *et al.* Anti-invasion and anti-angiogenesis effect of taxol and camptothecin on melanoma cells. **J Asian Nat Prod Res**, v.5, n.2, p.121-9, 2003.

WANG, Y. *et al.* Ellagic acid exerts antitumor effects via the PI3K signaling pathway in endometrial cancer. **Journal of Cancer**, v. 10, p. 3303-3314, 2019.

WATANABE, H.; SAKAGUCHI, Y.; SUGIMOTO, R. Human organic anion transporters function as a high-capacity transporter for p -cresyl sulfate, a uremic toxin. **Clin exp. Nephrol**, v.18, n.5, p.814-820, 2013.

WEAVER, A. M. Invadopodia: specialized cell structures for câncer invasio. **Clin Exp Metastasis**, v.23, p.97-105, 2006.

WHITLEY, A. C.; SWEET, D. H.; WALLE, T. Site-specific accumulation of the cancer preventive dietary polyphenol ellagic acid in epithelial cells of the aerodigestive tract. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. 9, p. 1201-1209, 2006.

Wlcek K, Svoboda M, Thalhammer T, Sellner F, Krupitza G, Jaeger W. Altered expression of organic anion transporter polypeptide (OATP) genes in human breast carcinoma. **Cancer Biol Ther.**, v.7, p.1450-1455, 2008.

WRIGHT, G. D.; Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Adv Drug Deliv Rev.** v.57, n.10, p.1451-1470, 2005.

XU, W. *et al.* Ellagic acid and Sennoside B inhibit osteosarcoma cell migration, invasion and growth by repressing the expression of c-Jun. **Oncology Letters**, v. 16, p. 898-904, 2018.

YAMAGUCHI, H., WYCKOFF, J.; CONDEELIS, J. Cell migration in tumors. *Curr. Opin. Cell Biol.* v.17, p.559–564, 2005.

YANG, G. Y.; LIAO, J.; KIM, K.; YURKOW, E. J.; YANG, C. S. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human câncer cell lines by tea polyphenols. **Carcinogenesis**. v.19, n.4, p.611-6, 1998.

YILDIRIM I, KUTLU T. Anticancer Agents: Saponin and Tannin. **Int J Biol Chem.** v.9, p.332-340, 2015.

YOSHIDA, M. *et al.* Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VII. Active triterpenes and rosmarinic acid from *Centella asiatica*. **Biol Pharm Bull**, v.28, n.1, p.173-5, 2005.

YOU DIM, K. A.; SHUKITT-HALE, B.; MACKINNON, S.; KALT, W.; JOSEPH, J. A. Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo. **Biochim Biophys Acta**. v.1523, p.117-22, 2000.

ZIEGLER, H.L., *et al.* Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of Plasmodium falciparum growth: structure– activity relationships for betulinic acid analogues. **Bioorg. Med. Chem.** v.12, p.119–27, 2004.

ZHOU, J.; CHEN, Y.; LANG, J. Y.; LU, J.J; DING, J. Salvicine inactivates β 1 integrin and inhibits adhesion of mda-mb-435 cells to fibronectin via reactive oxygen species Signaling **Mol Cancer Res.** v. 6, n.2, p. 194-204, 2008.

ZUANAZZI, J.A.S., MONTANHA, J.A. Flavonoides. In SIMÕES, C.M.O. (org.) **Farmacognosia da planta ao medicamento** 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 577-614, 2007.