



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PPGCF**

ROZILENE VALADARES MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO da *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen E DA ATIVIDADE EM
LINHAGENS DE CÂNCER DE CÓLON, MAMA E ÚTERO**

**Macapá
2021**

ROZILENE VALADARES MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO da *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen E DA ATIVIDADE EM
LINHAGENS DE CÂNCER DE CÓLON, MAMA E ÚTERO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal do
Amapá como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Clarissa Silva
Lima

**Macapá
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá.
Elaborado por Mário das G. Carvalho Lima Júnior – CRB-2/1451

Martins, Rozilene Valadares.

Caracterização química e avaliação antitumoral do extrato hidroetanolico da *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen e da atividade em linhagens de câncer de cólon, mama e útero / Rozilene Valadares Martins; orientadora, Clarissa Silva Lima. - Macapá, 2021.

136f.

Dissertação (Mestrado) - Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Câncer – Doenças. 2. Produtos naturais – Jambú. 3. Farmácia – Amapá. I. Lima, Clarissa Silva, orientadora. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

CDD – 616.994 / M386c

ROZILENE VALADARES MARTINS

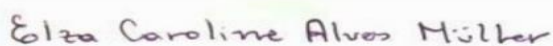
**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO da *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen E DA ATIVIDADE EM
LINHAGENS DE CÂNCER DE CÓLON, MAMA E ÚTERO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal do
Amapá – UNIFAP, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Data de Aprovação: 01/10/ 2021



Profa. Dra. Clarissa Silva Lima
Membro Titular Presidente/UNIFAP



Profa. Dra. Elza Caroline Alves Muller
Membro Titular/UNIFAP



Documento assinado digitalmente

RAQUEL RODRIGUES DO AMARAL

Data: 08/10/2021 09:44:52-0300

Verifique em <https://verificador.itl.br>

Profa. Dra. Raquel Rodrigues do Amaral
Membro Titular/UNIFAP

*Á minha mãe, filha e meu neto, a quem amo imensamente, devo muito aos três e
nunca poderei pagar o amor infinito que me dão;*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus** por ter concedido esse desafio e por está sempre ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, **Aracele Valadares Martins e Manoel Mário Neris Martins**, por terem incentivado a estudar e lutar por meus objetivos.

À **minha família** pelo apoio, carinho, referência e por acreditarem em minha perseverança.

À minha orientadora **Dra. Clarissa Silva Lima** pela orientação, que apesar da distância, adversidades ao longo dessa jornada, sempre me impulsionou e contribuiu para a continuação e término dessa dissertação, pois a paralisação de laboratórios pelo advento da pandemia comprometeu a realização dos ensaios de cultura celular.

Ao Prof. **Dr. Rodrigo Alves Soares Cruz**, pela condução anteriormente da Coordenação da Pós-Graduação e parceria para caracterização dos constituintes do extrato da planta na UFPB.

Ao Prof. **Dr. Irlon Maciel** por permitir a utilização do Laboratório de Biotransformação e Catálise Aplicada e ainda pela condução da Coordenação da Pós-Graduação.

Ao Prof. **Dr. Geilson Alcantara da Silva**, do Laboratório de Química Industrial do Instituto de Química da **UFPA**, pelo apoio, disponibilidade em meios suas atividades pelo início da coleta e registro do material botânico.

Ao Igor **Victor Hugo Marinho**, do Laboratório de Biotransformação e Catálise Aplicada pela ajuda, apoio e disponibilidade, pois Deus o colocou em meu caminho em um momento muito importante do meu trabalho e contribuiu muito para a preparação do extrato da planta;

Ao **Francinaldo Sarges Braga**, do Laboratório de Absorção Atômica e Bioprospecção, que Deus o colocou no momento de grande importância para iniciar o trabalho e pacientemente me ajudou na extração do extrato da planta.

À minha Coordenadora **Ellen Maria Holanda Farias** pelo apoio, consideração, reconhecimento e confiança.

À minha chefe imediata e amiga **Maria Raimunda Nunes** que acompanhou os altos e baixos e com sua sabedoria sempre teve uma palavra de conforto, para os momentos mais difíceis e nunca deixou de acreditar no meu potencial.

As minhas colegas de trabalho da Coordenadoria de Políticas de Atenção à Saúde (CPAS/SESA), **Assunção de Maria, Andréa Torres e Rosilene Gomes** pelo apoio e incentivo que sempre me apoiaram e incentivaram durante esse percurso.

À UFPB através dos Profs. **Drs. Marianna Vieira Sobral e Josean Fachine Tavares**, pela parceria ao uso dos Laboratórios de Cultura celular (Oncofar) e Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA).

Aos colegas do laboratório de Fitoquímica da UFPB, Sr. **Raimundo Nonato e Glória das Neves Gonçalves da Silva** pelos ensinamentos em bancadas, parceria, apoio, palavras sinceras e positivas, além de momentos de descontração e incentivo para a realização deste trabalho.

Aos mestrandos e doutorandos pelo treinamento no Laboratório Oncofar, quanto ao manuseio da cultura de células e seu funcionamento.

Ao **Livaldo Antônio** pelo apoio, carinho, companheirismo, paciência, incentivo, compreensão e sempre acreditar em meu potencial minha determinação.

À **Universidade Federal do Amapá**, pela oportunidade criada através do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

À minha amiga **Elza Gessiane Guerra** pelo apoio e parceria, durante todo esse percurso.

À uma amiga, **Michelle Paolla Gama**, que ao longo desse percurso, sempre me incentivou, apoiou e disse palavras de reflexão em momentos cruciais.

Aos **professores e colaboradores** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Ao Edson que apesar de pouco tempo na Coordenação, sempre se disponibilizou a ajudar e incentivar os mestrandos e também à Kelciane que com grande paciência, ajudou quando necessário.

Aos colegas de turma, pelos conhecimentos trocados, informações repassadas, e em especial à **Fabíola Monteiro, Jeruza, Swany e Ana Ariza**, pela amizade e companheirismo.

A todas as pessoas não mencionadas e que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação

“Para tudo há uma ocasião certa; há um tempo certo para cada propósito debaixo do céu: Tempo de nascer e tempo de morrer, tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou...”

(Eclesiastes 3:1-2)

Introdução: O câncer é uma doença inumogênea que descontrola o ciclo celular, favorecendo o desenvolvimento tumoral, sendo que a quimioterapia, apresenta seletividade reduzida, além de resistência às células malignas, por isso a busca por fármacos que diminuam os agravos ao organismo. Neste aspecto, os produtos naturais vêm se destacando na descoberta de agentes promissores, entre eles a *Acmella oleracea*, apresenta características químicas com propriedades farmacológicas, tendo o espilantol como principal constituinte. **Objetivo:** Investigar a ação antitumoral *in vitro* da *Acmella oleracea* (L). R. K. Jansen (Asteraceae) em linhagem tumoral de mama, cérvix uterina e cólon. **Material e Métodos:** a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi usada para caracterizar o perfil químico do espilantol e a contra-corrente para fracionar o extrato. A espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear foi utilizada para identificar o composto isolado. A atividade citotóxica do extrato em linhagens tumorais MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, HCT-116 e SK-MEL-28 e a não tumoral HaCaT foi determinada pelo MTT. Além disso, a atividade metabólica indicou a viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade em 24, 48 e 72h após o tratamento. A CI50 foi determinada pela regressão não linear e o índice de Seletividade pela razão da CI50 da célula não tumoral e CI50 da célula tumoral. **Resultado e Discussão:** A caracterização química do EHIAo por CLAE demonstrou alquilamidas e traços de escopoletina e apresentou melhor percentual de inibição nas linhagens HCT-116, HeLa e MDA-MB-231. Em 24h de tratamento com EHIAo, a CI50 em HCT-116 foi 332,50 µg/mL, demonstrando curva dose-resposta em 48h ($189,6 \pm 1,70$ µg/mL) e 72h ($36,94 \pm 1,89$ µg/mL). Em HeLa a CI50 em 72h ($99,92 \pm 1,31$ µg/mL) também foi menor que em 48h ($148,8 \pm 1,08$ µg/mL). Todavia, na linhagem MCF-7 a curva dose-resposta foi diferente, com CI50 maior em 72h de tratamento ($288,1 \pm 1,17$ µg/mL) se comparado ao tratamento por 48h ($68,64 \pm 1,29$ µg/mL). A droga padrão doxorrubicina apresentou CI50 de $2,57 \pm 0,001$ µM (HCT-116), $3,8 \pm 1,1$ µM (HeLa), $1,1 \pm 1,29$ µM (MCF-7) e $0,28 \pm 0,001$ µM (HaCaT). O EHIAo possui seletividade nas linhagens HCT116 (8,64) e HeLa (3,19), que a doxorrubicina. **Conclusão:** Neste estudo, o EHIAo apresentou significativa atividade citotóxica nas linhagens HCT-116 (cólon), HeLa (cérvix uterina) e MDA-MB-231 (mama-TNBC). O EHIAo foi mais seletivo 2,7 vezes em HCT-116 do que HeLa e também da doxorrubicina em 86,4 e 45,57 vezes, respectivamente. Este resultado pode estar relacionado com os constituintes existentes no extrato que atuam em sinergismo com o espilantol.

Palavras-chave: câncer, *Acmella oleracea*, antitumoral, seletividade.

Agradecimentos: UNIFAP, UFPB, CNPq/FAPEAP e CAPES/PROCAD-AM

ABSTRACT

Introduction: Cancer is a harmless disease that uncontrolled the cell cycle, favoring tumor development, and chemotherapy has reduced selectivity, in addition to resistance to malignant cells, therefore the search for drugs that reduce damage to the body. In this regard, natural products have stood out in the discovery of promising agents, including *Acmella oleracea*, which presents chemical characteristics with pharmacological properties, with spilantol as the main constituent. Objective: To investigate the in vitro antitumor action of *Acmella oleracea* (L). R.K. Jansen (Asteraceae) in breast, uterine cervix and colon tumor lineage. **Material and Methods:** High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used to characterize the chemical profile of epilantol and countercurrent to fractionate the extract. Nuclear Magnetic Resonance spectrometry was used to identify the isolated compound. The cytotoxic activity of the extract in MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, HCT-116 and SK-MEL-28 tumor lines and the non-tumor HaCaT was determined by MTT. Furthermore, metabolic activity indicated cell viability, proliferation and cytotoxicity at 24, 48 and 72h after treatment. The IC₅₀ was determined by non-linear regression and the Selectivity Index by the ratio of the IC₅₀ of the non-tumor cell and IC₅₀ of the tumor cell. **Results and Discussion:** The chemical characterization of EHIAo by HPLC showed alkylamides and traces of scopoletin and showed a better percentage of inhibition in HCT-116, HeLa and MDA-MB-231 strains. In 24h of treatment with AoHEI, the IC₅₀ in HCT-116 was 332.50 µg/mL, demonstrating a dose-response curve at 48h (189.6 ± 1.70 µg/mL) and 72h (36.94 ± 1.89 µg/mL). In HeLa, the IC₅₀ in 72h (99.92 ± 1.31 µg/mL) was also lower than in 48h (148.8 ± 1.08 µg/mL). However, in the MCF-7 lineage, the dose-response curve was different, with a higher IC₅₀ in 72h of treatment (288.1 ± 1.17 µg/mL) compared to the treatment for 48h (68.64 ± 1.29 µg/mL). mL). The standard drug doxorubicin had an IC₅₀ of 2.57 ± 0.001 µM (HCT-116), 3.8 ± 1.1 µM (HeLa), 1.1 ± 1.29 µM (MCF-7) and 0.28 ± 0.001 µM (HaCaT). The EHIAo has selectivity in the HCT116 (8.64) and HeLa (3.19) lines, compared to doxorubicin. **Conclusion:** In this study, the EHIAo showed significant cytotoxic activity in HCT-116 (colon), HeLa (uterine cervix) and MDA-MB-231 (breast-TNBC) strains. AoEHIAo was 2.7 times more selective for HCT-116 than HeLa and also for doxorubicin by 86.4 and 45.57 times, respectively. This result may be related to the existing constituents in the extract that act in synergism with epilantol

Keywords: cancer, *Acmella oleracea*, antitumor, selectivity.

Acknowledgments: UNIFAP, UFPB, CNPq/FAPEAP and CAPES/PROCAD-AM

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Os três estágios da carcinogênese e seus mecanismos que levam à formação de metástases.....	27
Figura 2	Disseminação da célula tumoral e formação de metástase.....	29
Figura 3	Genes envolvidos no processo da carcinogênese.....	30
Figura 4	Características adquiridas pelas células ao longo da carcinogênese.....	31
Figura 5	Esquema do Ciclo Celular.....	33
Figura 6	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.....	42
Figura 7	Esquema da atividade dos agentes quimioterápicos de acordo com o ciclo celular.....	52
Figura 8	Partes aéreas compostas por folhas e inflorescências de <i>A. oleracea</i> (L). R. K. Jansen.....	60
Figura 9	Estrutura química do espilantol.....	63
Figura 10	Folhas e inflorescências de <i>Acmella oleracea</i>	68
Figura 11	Reação de oxi-redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-Difeniltetrazólio (MTT) em formazano após a conversão pela enzima succinato desidrogenase.....	75
Figura 12	Cromatografia líquida-ESI positiva-espectrometria de massa (LC-ESI-MS ⁿ)	79
Figura 13	Cromatograma do pico base da fração 9 (A) e EM ² do pico 1 (B) ..	84
Figura 14	Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da subfração-1.....	87
Figura 15	Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da subfração-1.....	88
Figura 16	Efeito do Extrato hidroetanólico da inflorescência de <i>Acmella oleracea</i> (EHIAo) sobre a viabilidade da célula tumoral HCT-116 após 24, 48 e 72h de tratamento.....	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação molecular dos carcinomas de mama por imunohistoquímica, associados ao marcador Ki67.....	44
Quadro 2 - Comparativos entre as vacinas contra HPV licenciadas no Brasil em 2017.	49
Quadro 3 - Programa oficial de vacinação contra HPV do PNI de acordo com o gênero, para o período de 2017-2020 (PNI – Junho/2017).	50
Quadro 4 - Constituintes e partes da planta.....	61
Quadro 5- Ações biológicas e farmacológicas do espilantol.....	64
Quadro 6- Origem histológica das linhagens humanas tumoral e não tumoral e meios de cultivo para manutenção.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Caracterização dos compostos identificados provisoriamente pelo HPLC-ESI-MS ⁿ em <i>A. oleracea</i>	81
Tabela 2	Deslocamentos químicos de ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) do espilantol em CDCl ₃	86
Tabela 3-	Atividade antitumoral <i>in vitro</i> do Espilantol e Extrato Hidroetanólico das folhas e das inflorescências de <i>Acmella oleracea</i> (EHFAo e EHIAo, respectivamente), em linhagens tumorais e não tumoral pelo ensaio MTT, após 72 horas de exposição.....	89
Tabela 4-	Efeito de EHIAo* e DXR** sobre a viabilidade de células tumorais e não tumorais.....	93
Tabela 5-	Índice de seletividade do Extrato Hidroetanólico das inflorescências de <i>Acmella oleracea</i> (EHIAo) em células tumorais e não tumorais, após 72h de exposição.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ACS	AMERICAN CANCER SOCIETY
AIF	Fator indutor de apoptose
ANOVA	Análise de variância
APAF-1	apoptose protease ativando fator-1
ATCC	American Type Culture Collection
Bax	Proteína apoptótica
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BRCA	Grupo de genes supressores tumorais
CCR	Câncer Colo Retal
CCU	Câncer cervical uterino
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CDK	Ciclina dependente de quinase
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CKI	Proteína inibitória
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMS	Consenso de Subtipos Moleculares
COAD	Adenocarcinoma de cólon
DD	Domínio de morte
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
dt	Duplo triplete
dq	Duplo quarteto
DDR	Genes de respostas a danos no DNA
DIABLO	Proteína de ligação direta IAP com baixo iodeto de propídio I
DISC	Complexo sinalizador indutor de morte
DMEM	Meio de cultivo Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Método de redução ou neutralização do radical livre estável

DREAM	Parceiro de dimerização, semelhante a RB, E2F e multi-vulval classe B
ECs	Células Endoteliais
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EGFR	Fator de crescimento epidérmico
EHAo	Extrato Hidroetanólico da <i>Acmella Oleracea</i>
EHFAo	Extrato Hidroetanólico das Folhas de <i>Acmella Oleracea</i>
EHIAo	Extrato Hidroetanólico das inflorescências de <i>Acmella oleracea</i>
EM ⁿ	Espectrômetro de massas
E.P.M	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ER positivo	Receptor de Estrogênio Positivo
ESI	Ionização por electrospray
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos
FEMA	Associação de fabricantes de sabores e extratos
FLMEOH	Flor fração metanólica
FRAP	Poder de Redução do Íon Ferro
GST	Genes supressores de tumor
HaCaT	Linhagem queratinócito humano não tumoral
HCT-116	Linhagem celular de câncer de cólon humano
He La	Henrietta Lacks
HER2	Receptor de Fator de crescimento epidérmico humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	<i>Papilomavírus humano</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto desempenho
HSIL	Lesões intraepiteliais de alto grau
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
CI50	Concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo
IES	Ionização por Eletrospray
IL-1 β	Citocinas inflamatórias
INCA	Instituto Nacional de Câncer

IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
IS	Índice de seletividade
JEC	Junção escamo colunar
Ki67	Proteína marcadora de proliferação
LRC	Longa região controladora
LIEBG	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
LIEAG	Lesões intraepiteliais de alto grau
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises
LSIL	Lesões intraepiteliais de baixo grau
m	Múltiplo
MAPK	proteína-quinase ativada por mitógeno
MCF-7	Linhagem celular humana de adenocarcinoma mamário
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
MEC	Matriz extracelular
MEV	Erro padrão da média
MHz	Mega-Hertz
MEK	Proteína quinase ativada por Mitogênio
MMPs	Enzimas metaloproteinases de matriz
MMR	Reparo de incompatibilidade
mtDNA	Ácido desoxiribonucleico mitocondrial
MTT	Difenil brometo de tetrazólio
NAC	Quimioterapia neoadjuvante
NIC	Neoplasias intraepiteliais cervicais
OE	Óleo essencial
PBS	Tampão Fosfato Salino
PNI	Programa Nacional de Imunização
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONCOFAR	Laboratório de Oncofarmacologia
ppm	Partes por milhão
pRb	Proteína do gene supressor de tumor retinoblastoma
p53	Proteína do gene supressor de tumor
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RE	Receptor de estrogênio

READ	adenocarcinoma retal
Rf	Fator de retenção
RP	Receptor de progesterona
RMN	Ressonância Magnética
RMN de ¹³ C	RMN de Carbono Treze
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotação por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFE	Extrato Etanólico das folhas de <i>S. microglossa</i>
SMAC	Segundo ativador derivado de mitocôndria de caspases
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	<i>Spilantes paniculata</i> Linn
TBSI	Trinity Biomedical Sciences Institute
TCD	Trinity College Dublin
TCGA	Cancer Genome Atlas
TFC	Conteúdo fenólico total
TIC	Cromatograma de íons totais
TNBC	Câncer de mama triplo negativo
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-R1	Receptores do fator de necrose tumoral
TPC	Conteúdo fenólico total
UF	Unidades de Federação
UFPA	Universidade Federal da Pará
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WHO	Organização Mundial de Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

B	Boro
°C	Grau Celsius
Ca	Cálcio
¹³ C	Carbono
CO ₂	Gás Carbônico
Cu	Cobre
Fe	Ferro
¹ H	Hidrogênio
<i>J</i>	Constantes de acoplamento
K	Potássio
KV	Quilovolt
Mg	Magnésio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
m/z	Massa-carga de íons em fase gasosa
N ₂	Nitrogênio
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
P	Fósforo
S	Enxofre
sl	Simpleto largo
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
v	Volume
v/v	Volume por volume
Zn	Zinco
%	Porcentagem

$\geq$	Maior ou igual
$<$	Menor que
δ	Deslocamento químico em ppm
δ_c	Deslocamento químico em ppm de carbono
δ_H	Deslocamento químico em ppm de hidrogênio
'	Minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	23
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
3.1	CÂNCER.....	24
3.1.1	Ciclo celular e o câncer.....	33
3.1.1.1	Estresse Oxidativo.....	38
3.1.2	Câncer cólorretal (CCR).....	39
3.1.3	Câncer de mama.....	41
3.1.4	Câncer cérvix uterina.....	45
3.2	TRATAMENTO DO CÂNCER E AGENTES QUIMIOTERÁPICOS	50
3.2.1	Produtos Naturais e o Câncer.....	56
3.2.2	<i>Acmella oleracea</i>.....	59
3.2.2.1	Composição Química.....	61
3.2.2.2	Espilantol.....	62
3.2.2.2.1	Ações biológicas e farmacológicas do Espilantol.....	64
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	67
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	67
4.2	LOCAL DA PESQUISA.....	67
4.3	MATERIAL.....	67
....		
4.3.1	Material vegetal.....	67
4.3.2	Amostras para teste.....	68

4.3.3	Linhagens de células tumorais e não tumoral.....	68
4.4	MÉTODOS.....	69
4.4.1	Preparo do Extrato Hidroetanólico de <i>Acmella oleracea</i> (I) R. K. Jansen (EH Ao).....	69
4.4.2	Caracterização do EHIAo por cromatografia líquida (CLAE-ESI-MSⁿ)	69
4.4.2.1	Instrumentação e condições de análise	69
4.4.3	Fracionamento do EHIAo cromatografia contracorrente (CCC).....	70
4.4.3.1	Equipamentos e condições de análise.....	70
4.4.3.2	Preparação do sistema de solvente de duas fases e amostras para injeção	71
4.4.3.3	Procedimento de separação HSCCC (Técnica de cromatografia de partição líquido-líquido sem suporte).....	71
4.4.4	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	72
4.4.5	Análise do perfil químico das frações por CLAE-IES-EMⁿ ...	72
4.4.5.1	Isolamento do espilantol.....	73
4.4.6	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).	73
4.4.7	Manutenção das linhagens de células tumorais e não tumoral.....	73
4.4.7.1	Ensaio <i>in vitro</i> de Avaliação da Atividade Antitumoral.....	74
4.4.7.2	Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumoral para determinar a CI50.....	76
4.4.7.3	Determinação do Índice de Seletividade.....	76
4.4.8	Análise Estatística.....	77
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO EHIAo POR CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA (CLAE-ESI-MS ⁿ)	78

5.2	FRACIONAMENTO DO EHIAo POR CROMATOGRAFIA CONTACORRENTE (CCC)	83
5.2.1	Análise do perfil químico das frações por CLAE-IES- EM^N.....	83
5.3	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DO ESPILANTOL.....	85
5.4	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	89
5.4.1	Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumoral	89
5.4.2	Avaliação dos efeitos do EHIAo sobre viabilidade celular.....	92
5.4.3	Avaliação dos efeitos do EHIAo sobre o Índice de Seletividade celular.....	95
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	97
	REFERÊNCIAS.....	98
	ANEXO I – CERTIDÃO DO SISGEN.....	134
	ANEXO II – LABORATÓRIO DE BOTÂNICA – HERBÁRIO.....	135
	ANEXO III – SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	136

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma patologia inumogênea, agressiva de caráter hereditário, resultante de transformações na morfologia estrutural, funcional e material citoplasmático do indivíduo. Encontra-se distribuída em todos os países com elevado número de óbitos, superando as doenças cardiovasculares e neurológicas.

Segundo o Ministério da Saúde por meio do INCA, em 2020 o câncer de mama foi estimado o primeiro lugar para os casos de câncer, sem considerar os tumores de pele não melanoma, em relação ao sexo feminino, segundo lugar ao câncer de colo retal em ambos os sexos e terceiro lugar para o câncer de colo de útero. Essa doença requer atenção, promoção e prevenção da saúde, para diminuir o sofrimento do paciente e seus familiares, assim como reduzir o número de óbitos com melhoria dos indicadores de saúde pública no território brasileiro.

Existem diversos tipos de tratamentos, que podem ser utilizados isoladamente ou em consórcio a outra modalidade dependendo da evolução da doença, entretanto nem todos têm acessibilidade; Além do mais, a quimioterapia proporciona reações adversas como alopecia, falta de apetite, náuseas, êmese, fraqueza muscular, entre outros. O portador da doença fica debilitado, apresenta péssimo aspecto físico, levando a depressão, ou seja, essas desvantagens resultam em desistência do tratamento, agravamento do quadro clínico, quimioresistência e por fim mau prognóstico.

Ao longo dos anos o ser humano vem utilizando produtos vegetais para tratar diversas enfermidades, e esses conhecimentos são passados de geração em geração, fazendo parte da cultura. O conhecimento empírico das propriedades terapêuticas das plantas medicinais são imprescindíveis nos estudos científicos iniciais sobre as propriedades farmacológicas dos produtos naturais. A partir desses screenings, muitos medicamentos foram descobertos inclusive para o tratamento do câncer, tal como o Taxol, alcalóides da vinca e vários outros, havendo a necessidade de continuar esses tipos de estudos científicos.

Neste contexto, outra planta que tem sido alvo de pesquisas é a *Acmella oleracea* (L). R. K. Jansen (Asteraceae), conhecida como Jambú, utilizado em diversos pratos culinários na Região Norte do Brasil. É uma planta herbácea que se desenvolve com muita facilidade em clima quente e úmido, distribuída ao norte da

África, Austrália Índia, Sri Lanka e Brasil, apresenta relevantes características químicas. O espilantol é o principal constituinte com ampla diversidade de ações biológicas e farmacológicas, como antioxidante, antiproliferativo, anticâncer, entre outras existentes na literatura, despertando interesse de Indústrias farmacêuticas em produtos inovadores que possibilite novos agentes para o tratamento, minimizando os efeitos indesejáveis.

Portanto, esta pesquisa vislumbrou investigar a ação do extrato hidroetanólico (EHAo), das folhas e flores da *Acmella oleracea* (L). R. K Jansen (Asteraceae), em linhagem celular tumoral de cólon, mama e cérvix uterina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ação antitumoral *in vitro* da *Acmella oleracea* (L). R. K. Jansen (Asteraceae) em linhagem tumoral de mama, cérvix uterina e cólon.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar quimicamente o extrato hidroalcoólico da *Acmella oleracea* (EHAo);

Isolar o espilantol;

Investigar a potencialidade antitumoral *in vitro* do EHAo e espilantol em linhagens humanas de células tumorais e não tumoral;

Determinar a CI50 nas linhagens de mama, cérvix uterina e cólon;

Determinar o Índice de Seletividade.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CÂNCER

O câncer é caracterizado por um conjunto de doenças heterogêneas, malignas e que resultam de alterações genéticas (HASANPOURGHADI et al., 2017). É a terminologia usada para a união de diversas enfermidades ocasionadas por modificações das características morfológicas e bioquímicas na célula (SANTOS et al., 2018) de origem multifatorial, com heterogeneidade marcante em decorrência de alterações epigenéticas, transcricionais que abrangem uma infinidade de genes e proteínas (GODONE et al., 2018), culminam com o descontrole do desenvolvimento das células, além de transtorno proliferativo resultando na formação de tumores (ROSENQUIST; ESTELLER; PLASS, 2017).

Esta patologia predomina as causas de morbimortalidade a nível mundial, conforme a World Health Organization (WHO) (IKSANNOVA et al., 2018). Em 2020 foi registrado uma incidência aproximada de 19 milhões de casos de câncer no mundo com 10 milhões de óbitos. A estimativa do projeto Globocan para o ano de 2040 em relação a novos casos desta patologia é de 28,4 milhões, aumentando cerca de 47% em referência ao ano de 2020. No Brasil o registro foi de 522.212 novos casos e cerca de 260.000 óbitos conforme a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) (SUNG, FERLAY, SIEGEL et al., 2021).

Foi estimado uma incidência desta doença às 26 Unidades Federativas (UF), suas capitais e o Distrito Federal para o triênio 2020-22, sendo para cada ano, 625 mil casos novos de câncer. No sexo feminino, os principais são: mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%). A metodologia usada para calcular é semelhante ao do Globocan (INCA, 2019; FERLAY et al., 2019).

A incidência mundial em 2020, comparado aos registros de 2018, demonstrou que o câncer de mama, excedeu pela primeira vez o câncer de pulmão e o câncer colorretal transpôs o câncer de próstata, em decorrência do decréscimo elevado nas taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares e cérebro (SUNG, FERLAY, SIEGEL et al., 2021).

Os tumores benignos apresentam células semelhantes as originais, crescem lentamente com limite bem definido, expansivo, organizado, sem invasão de tecidos próximos, porém, apresentam a capacidade de comprimir órgãos e tecidos vizinhos

(YASMIN et al., 2015; ISRAEL, 2016, INCA, 2020). Esses tumores são originados pelos seguintes tecidos: gorduroso (lipoma), muscular liso (mioma) e as glândulas (adenoma) (ISRAEL, 2016; INCA, 2020).

As células incomuns do tumor, neoplasma ou blastoma, sofrem divisão desordenada e acelerada, em função das mudanças no Ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial (mtDNA), envolvendo mutação de ponto de deleção, inserção e alteração na quantidade de cópias produzidas, além de se associarem aos diversos tipos de câncer. Dessa maneira, reproduzem-se de forma agressiva, têm aptidão por novos tecidos, estes são invadidos através do sistema linfático e sanguíneo (HU et al., 2015; LEE et al., 2015; NCI, 2016; WHO, 2017). Quando o tumor é identificado na fase inicial, existe maior chance de cura (INCA, 2018).

Assim, a neoplasia maligna ou câncer, apresenta desenvolvimento celular acelerado e desordenado (HILBIG et al., 2018), sinal intenso não homogêneo devido a hemorragia, margem irregular, passam por constantes mitoses, entretanto, não forma a cápsula fibrosa, facilitando a invasão aos tecidos adjacentes, os quais diferenciam-se de sua origem (POLO et al., 2017). As células de tumores malignos desregulam a funcionalidade da célula, proliferam-se em conjunto com o estroma, caracterizando dessa forma, o microambiente do tumor (GILABERT-ORIOLE et al., 2018).

O processo inflamatório e estado imunológico determinam a carcinogênese e a progressão do câncer na maioria das doenças malignas (SAVAS et al., 2016; LIU; GUO, 2018). As células dos tumores malignos têm grande potencial de metástase (CAIXEIRO et al., 2014). Sendo assim, as neoplasias podem ser denominadas, de acordo com o tipo de célula de partida: sarcomas, carcinomas, leucemias, linfoma (GONZALEZ et al., 2017) e mielomas (glóbulos brancos específicos para síntese de anticorpos) (ABBAS; REHMAN, 2018). Os linfomas ocorrem a partir dos linfonodos, ou gânglios linfáticos, culminando com risco elevado de propagação linfática (GONZALEZ et al., 2017).

Os sarcomas ocorrem em tecidos conjuntivos como ósseo (osteosarcomas), cartilagens (condrossarcomas) - tecidos moles, músculo liso e estriado (rabdomyosarcoma) (HUDGENS et al., 2017; MIN et al., 2017), tecido adiposo e conjuntivo (ABBAS; REHMAN, 2018), vasos sanguíneos, correspondendo a 1% destas neoplasias em adultos (FRICKE et al., 2017). No que diz respeito a leucemia, decorre de uma modificação de células hematopoiéticas normais, que dão origem a

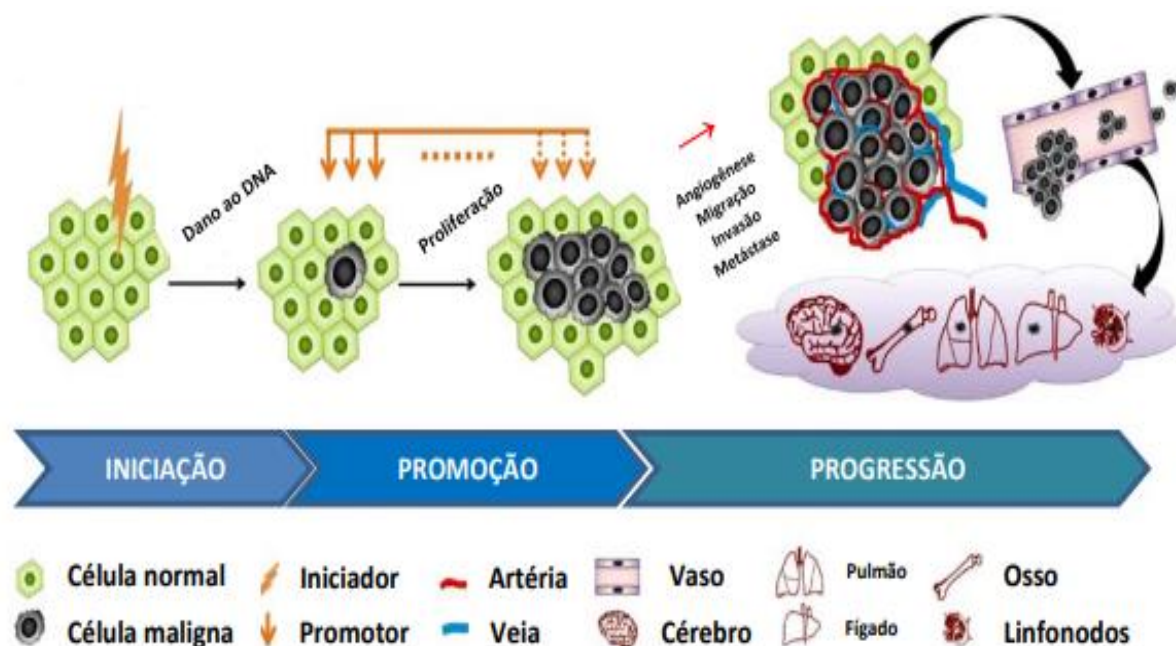
neoplasia maligna na medula óssea, promovendo prejuízo à síntese de glóbulos vermelhos, brancos e também das plaquetas (STUBBS; KRIVTSOV, 2017). Os carcinomas advindos a partir do epitélio, acometem a maior parte do corpo humano (GAJULAPALLI et al., 2016; SÉBE et al., 2016), correspondem a maioria dos cânceres (ABBAS; REHMAN, 2018), podem se originar em tecido epitelial glandular e será definido como adenocarcinoma (FARAJI; EISELE; FAKRY, 2016).

A carcinogênese ou oncogênese, processo formador do câncer (INCA, 2020), desenvolve-se de forma complexa com alteração celular em decorrência das mudanças genéticas e epigenéticas produzindo inúmeros fenótipos, os quais impedem de forma autônoma a apoptose e alcançam um potencial de replicação indeterminado (CALDERON et al., 2014; BOHLOLI et al., 2016). Além disso, esse processo biológico, apesar de complicado, ocorre principalmente em detrimento a mutação da função dos genes: oncogenes e os genes supressores de tumor (GST), ambos responsáveis pela regularização do crescimento e a proliferação das células (NCI, 2015; BASHYAM et al., 2019).

No processo da carcinogênese as células normais transformam-se em neoplásicas malignas e a formação de tumores malignos ocorre em três estágios: iniciação, promoção, progressão (LIU et al., 2015; SIDDIQUI et al., 2015; INCA, 2017). A metástase é considerada o quarto estágio (Figura 1), no qual as modificações moleculares e celulares, abrangem formas distintas (OLIVEIRA, 2016; ALVARADO et al., 2017). Isto interfere nas fases do processo de inflamação antitumoral, causando resistência ao tratamento e favorecendo óbito do paciente (ISRAEL, 2016).

No primeiro estágio da carcinogênese, também denominado de iniciação, as células são submetidas às ações de agentes cancerígenos ou carcinógenos, estes promovem danos e alterações moleculares no DNA de forma acelerada e irreversível em genes específicos, chamados de proto-oncogenes e GST (CHAPPELL; RAGER, 2017; INCA, 2017). As células alteradas modificam a expressão gênica celular saudável em malignas, possibilitando a ativação da proto-oncogenes (KRAS), inativação dos genes supressores de tumor, a exemplo do TP53, entretanto, este processo não originará o câncer isoladamente, pois, haverá a necessidade de um agente promotor (HYNDMAN, 2016).

Figura 1. Os três estágios da carcinogênese e seus mecanismos que levam à formação de metástases.



Fonte: LIU et al., (2015).

No decorrer da promoção, assim chamado o segundo estágio, as células iniciais latentes, envolvem os mecanismos epigenéticos e expressam alterações nos genes. As oncogenes são ativadas através dos mecanismos epigenéticos, mudando os genes e a seleção clonal em abundância, levando ao desenvolvimento e aumento rápido das células iniciais (JOPKIEWICZ, 2019), desregulando as proteínas envolvidas nos processos de proliferação, diferenciação e morte celular (IMRAN et al., 2017). As células alteradas sofrem transformação lenta e gradual pelo contato contínuo com os agentes “oncopromotores” ou cancerígenos e se tornam células malignas, que para tal deverá ocorrer uma longa e contínua exposição ao agente carcinógeno promotor. Havendo a interrupção deste contato, o processo carcinogênico possivelmente não continuará (SAITO et al., 2015; INCA, 2017).

Os agentes quimioterápicos podem interferir nessa fase, alterando a taxa de crescimento do tumor. Na progressão ou terceiro estágio, as células pré-neoplásicas se remodelam em neoplásicas (ALVARADO et al., 2017). Os mecanismos de regulação que mantém o controle da multiplicação das células encontram-se alterados, devido a inexistência da sensibilidade aos sinais que impedem a proliferação, favorecendo alterações genéticas e fenotípicas, hiperproliferação celular, na última fase de comutação neoplásica, é a etapa entre uma lesão pré-maligna e o

desenvolvimento de câncer invasivo, em sequência surgem as manifestações clínicas do câncer (SAITO et al., 2015; SIDDIQUI et al., 2015).

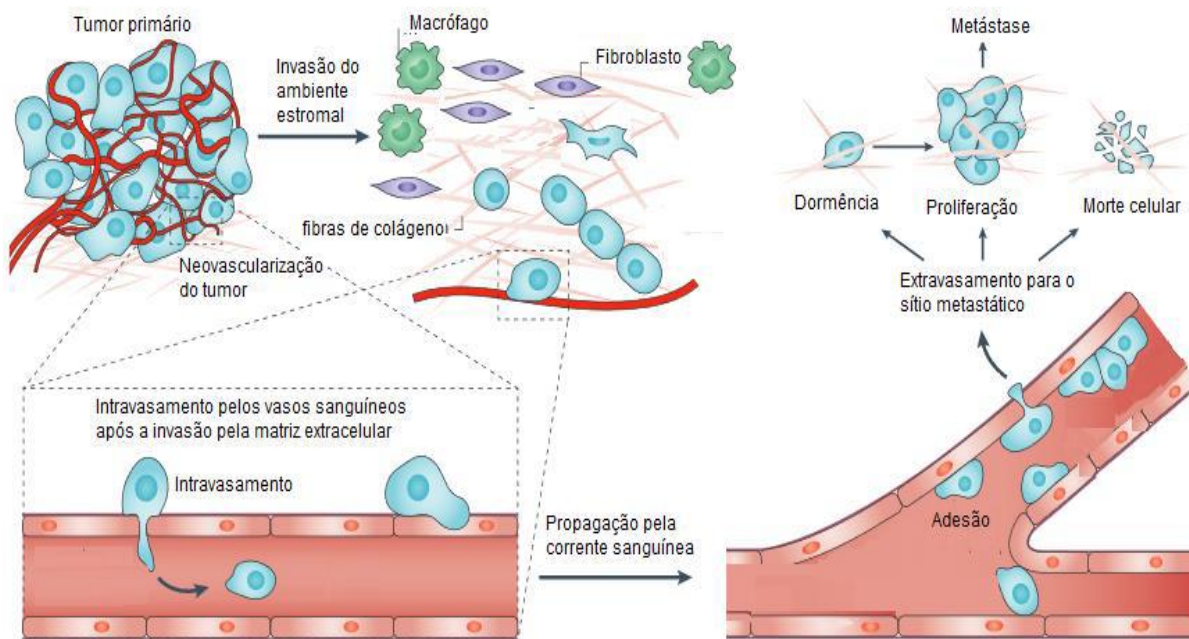
Em consequência haverá prejuízo da função dos GST, ocupação da membrana basal pelas células migratórias, alcançando a progressão tumoral (SAIED; ALSHENAWY, 2017), sendo irreversível, uma vez que o câncer já está presente devido a invasão, crescimento acelerado, agressividade e disseminação (GREENSTEIN, 2016; INCA, 2017). Nesta fase o tumor pode ser maligno e extremamente metastático (SAFARDEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). A inibição da progressão do ciclo celular ocorre em decorrência da mutação dos GST, promovendo o crescimento anormal celular (DAMMANN et al., 2017).

A metástase tumoral causa 90% dos óbitos por câncer (TANSI et al., 2016), porque promove invasão do tecido circundante, atividade de difícil compreensão que, favorece a disseminação das células tumorais, pela corrente sanguínea ou sistema linfático, indo do local primário para outros órgãos afastados do corpo, por meio de mecanismos invasivos, formando tumores secundários, uma característica peculiar das neoplasias malignas (HYNDMAN, 2016; MASSAGUÉ, 2016; MÜLLER-COAN et al., 2018).

Todo esse processo acontece ao longo de cinco fases (Figura 2): invasão, intravazamento da vasculatura tumoral, transporte, extravasamento parenquimal de órgãos distantes e colonização cancerosas (CHANG, 2016; MASSAGUÉ, 2016). Na primeira fase, a ocupação de tecidos circunvizinhos, perda de junções celulares e indução de proteases que facilitem a invasão local, transcorre através do contato do tumor primário com o microambiente estromal, envolvendo as células endoteliais fibroblastos, macrófagos e as proteínas da matriz extracelular, os quais participam da constituição dos vasos sanguíneos e linfáticos que irão irrigar e suprir as necessidades do tumor, processo denominado angiogênese (CHANG, 2016; REYMOND; D'AGUA; RIDLEY, 2013).

Já na segunda fase, as células tumorais, migram e invadem o sistema vascular pelo processo de intravasamento. Na terceira, elas direcionam-se aos tecidos distantes de sua origem, através da circulação sistêmica.

Figura 2: Disseminação da célula tumoral e formação de metástase.



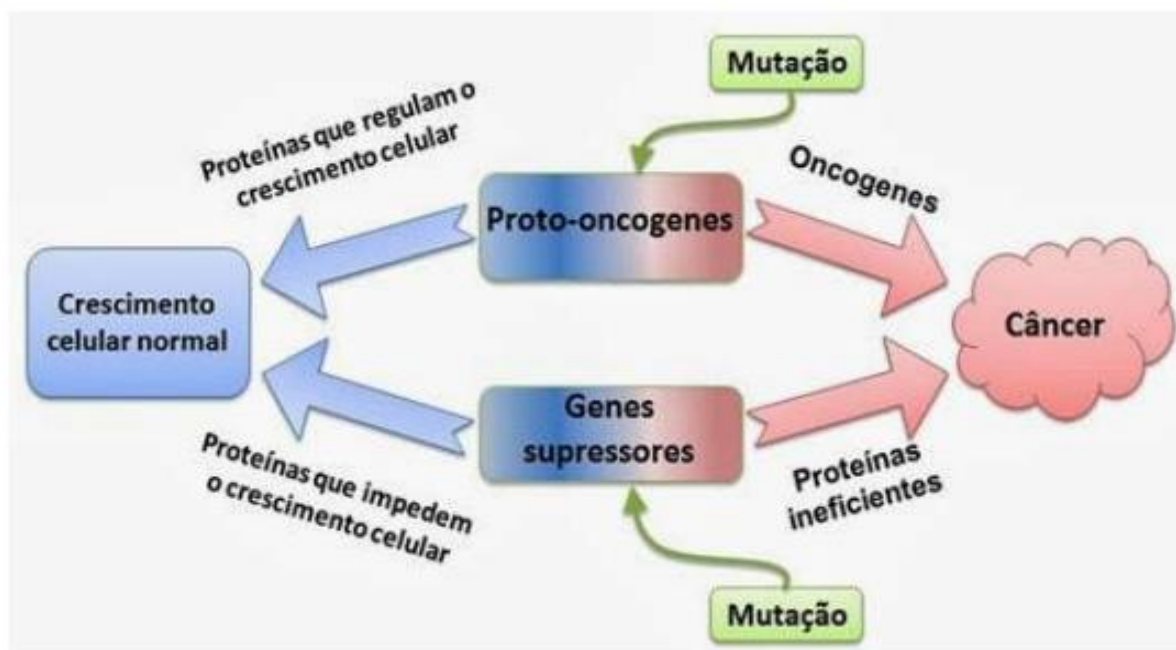
Fonte: Extraído e modificado de (REYMOND et al., 2013).

Na quarta fase (extravasamento), se fixam nos tecidos diferentes de sua origem, posteriormente esta fase segue com a proliferação dos tumores e colonização dos tecidos saudáveis por parte das células cancerosas e na última fase, agem promovendo a formação de um novo tumor (REYMOND et al., 2013; CHANG, 2016). Durante o complexo processo da carcinogênese, inexistem uma única via específica, molecularmente vários oncogenes são ativados e os GST são desativados pelas alterações genéticas e epigenéticas, promovendo o início e o crescimento sustentável do tumor (SHANMUGAM et al., 2018).

Os proto-oncogenes, são genes do genoma que estão diretamente associados aos processos de disseminação, diferenciação e também a sobrevivência da célula, ao ocorrer a mutação, transformam-se em oncogenes (HYNDMAN, 2016; EWALD, 2017). Além disso, as mutações se encontram desequilibradas altamente expressas de forma anômala contribuindo com a carcinogênese (BOURGUIGNON, 2019). Já os genes supressores de tumor apresentam várias funções, entre elas: regular negativamente os processos celulares, impedindo o desenvolvimento da tumorigênese (DYSON, 2016), codificar as proteínas que controlam o checkpoint paralisando o ciclo celular na ocorrência de prejuízos ao DNA ou anomalias cromossômicas (SAVAGE, HARKIN, 2015).

Após ocorrer a ativação de proto-oncogenes (Figura 3), elas assumem o papel de oncogenes (por exemplo, KRAS), havendo concomitantemente, a perda de função dos genes supressores de tumor (TP53), então às células cancerígenas serão submetidas à uma elevada capacidade de autorrenovação, proporcionando superação das células vizinhas e a iniciação do tumor (ZHAO et al., 2018).

Figura 3: Genes envolvidos no processo da carcinogênese



Fonte: Mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor. (Adaptado de http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Proto-Oncogenes&lang=3)

O gene p53, recebe estímulo de estresses celulares, advindos de hipóxia, carcinógenos, estresse oxidativo e radiação ionizante (ELLISEN, 2015).

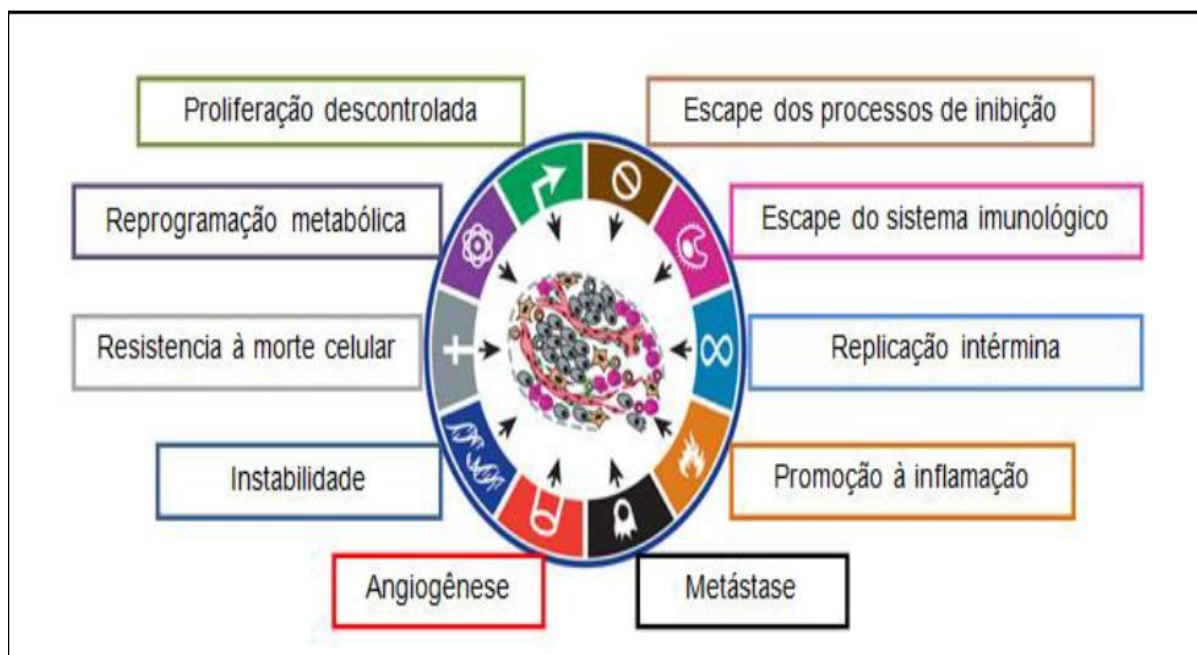
Há seis classes de oncogenes: Fatores de crescimento, fator de transcrição, remodeladores da cromatina, transdutores de sinal, receptores de fatores de crescimento e reguladores de apoptose (WEINBERG, 2014). Os genes que participam das vias de sinalização que regulamentam a proliferação celular, sobrevivência, diferenciação e migração, além de codificarem as proteínas, são chamados de oncoproteínas: RAS/RAF/MEK/ERK, STAT, NF-Kb, c-JUN e FOXM1. Estas são alvos regulares do processo de mutação e conduzem a superexpressão, resultando no péssimo funcionamento das vias de sinalização e consequentemente no desequilíbrio das funções celulares (ZOU et al., 2017; EL-MAGD et al., 2017).

Os genes BRCA₁ ou BRCA₂ (classe de genes supressores de tumor) (HORST et al., 2016), responsáveis pela codificação das enzimas de reparo, são importantes

na remoção e correção das mutações. Havendo a perda dessas proteínas, os genes sofrem mutação, o produto proteico funciona incorretamente, logo o dano celular não é reparado de forma correta, resultando em aumento da instabilidade genética nas células afetadas, beneficiando a carcinogênese (RICHARD, 2016; CHAE et al., 2016).

O DNA constantemente sofre vários danos oriundos de agentes genotóxicos extracelular (luz ultravioleta, radiação ionizante e outros) ou intracelular (espécies reativas de oxigênio como subproduto de metabolismo celular), sendo necessário manter o genoma saudável por meio do papel vital dos genes reparadores de danos do DNA (ROMERO-LAORDEN; CASTRO, 2017). Em sequência das alterações bioquímicas e celulares que ocorreram na complexidade do processo de carcinogênese, as células tumorais se diferenciam em dez aspectos biológicos fundamentais (Figura 4), que culminarão com o desenvolvimento do câncer, entre eles estão: sinalização proliferativa sustentada, reprogramação do metabolismo energético, resistência à morte celular, invasão, indução à angiogênese, metástase, inflamação promotora de tumor, imortalidade replicativa, escape da eliminação pelo sistema imunológico e evasão de genes supressores de tumor (HANAHAAN; WEINBERG, 2011).

Figura 4. Características adquiridas pelas células ao longo da carcinogênese



Fonte: Adaptado de HANAHAAN; WEINBERG (2011).

Estudos posteriores, como a revisão realizada por Fouad e Aanei (2017), descreveram que as células normais, evoluídas a neoplasias apresentam sete características específicas de células cancerígenas: Na primeira etapa, ocorre o desdobramento seletivo e a vantagem proliferativa, pela oncogene ativada e a ausência de resposta do bloqueio do crescimento dada pelo GST inativado. Na segunda etapa, as células neoplásicas enfrentam a diminuição de oxigênio, carência de nutrientes e danos do DNA, devido aos inúmeros estresses sofridos pela resposta modificada, sendo que a adaptação a esses fatores irá favorecer a sobrevivência e a disseminação das células (FOUAD; AANEI, 2017).

Na terceira etapa, ocorre a brotação, divisão das células, migração e montagem de células endoteliais (ECs) de vasos pré-existentes para irrigação do tumor, esses processos acontecem através da vascularização. Na quarta etapa, a metástase promove a invasão da matriz extracelular (MEC), membrana basal, intravasamento da vasculatura tumoral, extravasamento no parênquima de órgãos distantes; sobrevivência e manipulação do novo microambiente, micrometástases serão produzidas, que poderão se transfazer em macrometástases (MASSAGUÉ, 2016). A quinta etapa é a recaptção metabólica que favorece uma vantagem seletiva durante a iniciação e a progressão de tumores (DEBERARDINIS, 2016; CAIRNS, MAK, 2016).

Em seguida o microambiente se torna alterado e sua remodelagem está completamente associada às enzimas metaloproteinases de matriz (MMPs) que se encontram intimamente ligadas ao câncer de mama invasivo (GOLUBNITSCHAJA et al., 2017; LOU et al., 2016). Uma vez que os tumores são altamente complexos, a comunicação parácrina se mantém entre as células cancerígenas e o estroma criando um microambiente tumoral rico e dinâmico em todas as etapas da carcinogênese, caracterizando a modulação da resposta imune (MALLADI, 2016).

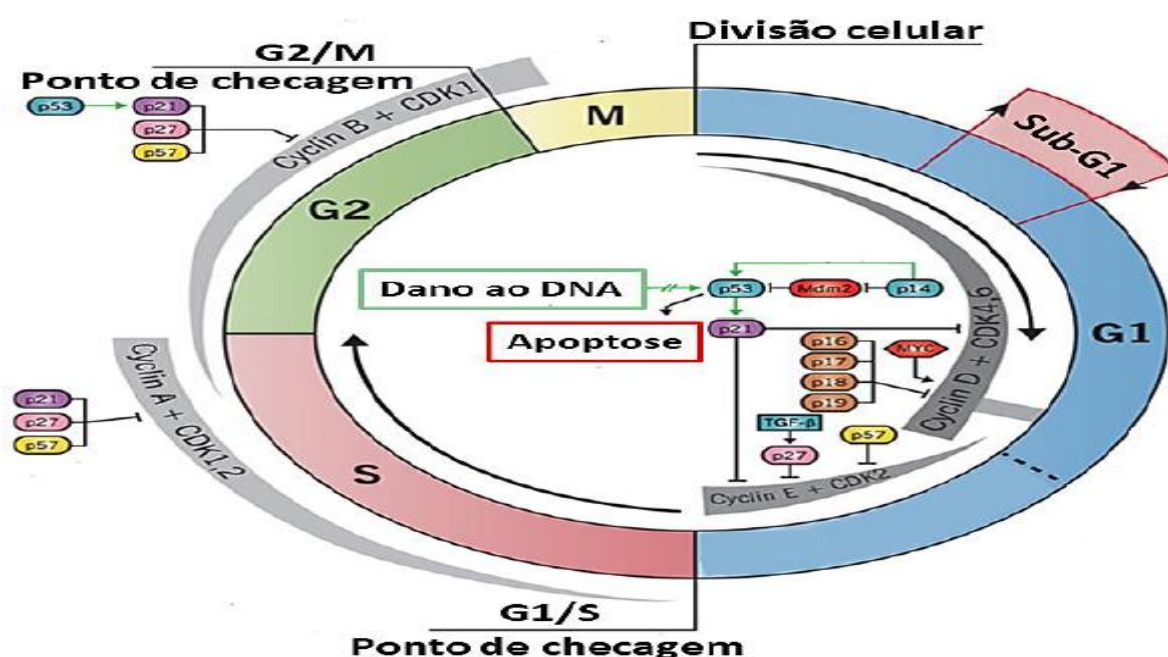
Além do mais, os componentes citotóxicos do sistema imunológico podem ser paralisados pelas células neoplásicas por meio da síntese de fatores imunossupressores ou recrutamento de células inflamatórias imunossupressoras (WELTE, 2016). No caso de tumores, as mudanças epinergéticas e genéticas contribuem com a tumorigênese. Essas alterações favorecem a malignidade do câncer, prejudicando principalmente, a regulação do ciclo celular (JAHANAFROOZ et al., 2018).

3.1.1 Ciclo celular e o câncer

O câncer é essencialmente uma doença do ciclo celular, pois a desorganização dos mecanismos controladores da proliferação celular é uma característica comum a todos os tipos de tumores (INCA, 2017a). A ação primordial do ciclo celular é assegurar a duplicação fiel do DNA no período da fase S, além de distribuir cópias idênticas dos cromossomos entre as células filhas durante a mitose (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

O ciclo celular (Figura 5) divide-se em quatro etapas: réplica fidedigna de material genético em tempo definido (síntese de DNA ou fase S) e a divisão nuclear (Mitose ou fase M), alternadas entre o G₁ (dentre as fases M e S) e G₂ (entre as fases S e M) (LACERDA, 2012; ROACH et al., 2018). A primeira etapa (G₁), coincide com o intervalo entre a mitose e o começo da replicação do DNA, relacionam-se os fosfatos, as bases nitrogenadas e as riboses mobilizando-se a favor da célula entrar na fase de síntese para favorecer a produção de aminoácidos, proteínas, enzimas e nucleotídeos. O metabolismo da célula é ativo, há crescimento, entretanto, o seu DNA não é replicado (INCA, 2008; MAES et al., 2017). Nesse sentido, a célula prepara-se para nova divisão caracterizando a transcrição gênica (ZAVERI; DHAAN, 2018).

Figura 5: Esquema do Ciclo Celular



Fonte: adaptado de WONG, (2008).

Na segunda etapa (S), ocorre essencialmente a replicação do Ácido desoxiribonucleico, a qual é conduzida através da interação entre este e as enzimas de duplicação proporcionada pelas proteínas, concluindo a síntese de DNA e consequentemente seguindo a terceira etapa (G₂) (MAES et al., 2017). Na fase G₂, a célula conclui seu crescimento e após a síntese de proteínas se organizam para a mitose (ZAVERI; DHAWAN, 2018), reconstituindo os cromossomos. Esta fase tem a função de refazer os danos ocorridos durante a replicação do DNA (DE FALCO et al., 2010). Na quarta etapa (M), a clivagem celular e o movimento dos cromossomos promovem a divisão dos pares de cromossomos para as células filhas, as quais poderão entrar na Fase G₁, com a possibilidade de condução à morte ou entrar em quiescência (INCA, 2008).

As etapas supramencionadas são gerenciadas por mecanismos sensores, que são pontos de verificação ou de checagem (checkpoints), proteínas cinases e ciclinas que agem entre si. Os checkpoints estão sob o comando das cinases que dependem de ciclina (CDKs, cyclin-dependent kinases), possuem ação catalítica e ambas são imprescindíveis na regularização do ciclo celular (MORGAN, 1997; FINN et al., 2016; VISCONTI; DELLA MONICA; GRIECCO, 2016).

Esses pontos têm o dever de manter o controle de eventos durante o ciclo, assim como paralisá-lo ou prosseguir-lo. Agem como um “freio”, para assegurar que as condições mitógenas (ponto de restrição), replicação definitiva do DNA (local de verificação da fase S), integridade preservada do genoma (identificação dos danos de DNA) e segregação correta dos cromossomos (ponto de inspeção do conjunto de fusos) fiquem concluídos de maneira perfeita antes da fase seguinte (VISCONTI; DELLA MONICA; GRIECCO, 2016; JAHANAFROOZ et al., 2018).

Há três pontos de checagem durante o ciclo celular, o checkpoint G₁, G₂ e o de montagem do fuso mitótico, denominado de checkpoint intra-S. O primeiro responde pela supervisão, o segundo age como fator de transcrição acelerando a expressão de genes que compreendem a repressão da progressão. O terceiro é o regulador chave da fase G₁, controla o ponto de restrição e impede a entrada na fase S. Quando os reparos são acionados, significa que houve desastres no DNA, porém se eles falharem, conduzirá à morte programada da célula. Os erros transferidos da célula mãe para as filhas resultam na formação de tumores (KAISER; ATTARDI, 2018; ZAVERI; DHAWAN, 2018).

O intra-S promove a sinalização que regula a origem de disparos e estabiliza as forquilhas de replicação, ativando no decorrer da fase S, a reparação de prejuízos eventuais ao DNA (IYER; RIND, 2017).

O checkpoint G₂ age preventivamente na introdução da mitose, até que a divisão do genoma ocorra totalmente (IYER; RIND, 2017). Nesta fase, os níveis de ciclina A e B são aumentados e as proteínas envolvidas na duplicação de DNA pelos complexos CDK-2/Ciclina-A e CDK-1/Ciclina-B são compartilhadas. Somando a isto, ocorrerá a fosforilação de várias proteínas nucleares, a condensação dos cromossomos, a formação do fuso mitótico e o início da mitose pelo CDK-1/Ciclina-B. Consequentemente a ciclina B será degradada, interrompendo a ação das enzimas do complexo, culminando com o fim do ciclo celular (JOHNSON; SKOTHEIN, 2013; MEDINA; TURNER; GORDAN, 2016).

Entretanto, a progressão do ciclo celular em G₂/M pode ser bloqueada eficazmente pela proteína p53, por meio da via p53-p21-DREAM-CDE/CHR, além do mais, a p21 age fisicamente inibindo a atividade dos complexos ciclina-CDK₂, -CDK₁, e -CDK4/6, promovendo a regulação da progressão do ciclo celular durante as fases G₁ e S (FISCHER et al., 2016; GEORGAKILAS et al., 2017). Os pontos de checagem, a p53 e retinoblastoma (Rb) são imprescindíveis para o controle do ciclo celular. As proteínas Rb e a p53, importantes reguladores do ciclo, são ativadas e inativadas pela ação do complexo ciclina CD-K e os inibidores da CDK (p16, p21, p27), com a finalidade de assegurar uma síntese adequada de DNA, agem bloqueando o avanço da fase seguinte, evitando o descontrole da divisão celular (ZAVERI, DHAWAN, 2018).

A proteína Rb se associa a família E2F de fatores de transcrição reprimindo sua atividade, consequentemente promove o bloqueio da capacidade dos genes reguladores que contribuem seguramente na entrada da fase S, comprometendo a divisão celular (DYSON, 2016). A ativação do E2F encaminhará as células à fase S, sendo mediado a transcrição das ciclinas E e A, além de outras proteínas importantes para a síntese de DNA (LIN; ZHU; RATNER, 2018). As CDKs são as cinases (enzimas) serina/treonina específicas, apresentam ação de regular os eventos celulares essenciais como ciclo celular e transcrição, estes são estimulados por ciclinas correlacionadas a proteínas, retratando a expressão modificada durante o ciclo celular (ROACH et al., 2018), através da fosforilação/ desfosforilação das proteínas específicas que são cruciais para seu controle (BEHL; ZIEGHLER, 2013).

As cinases se apresentam diante da mudança celular de G₁ para S, desta até G₂ e em seguida à fase M. Sendo assim, o ciclo celular para em decorrência de anormalidade em quaisquer desses pontos até alcançar o reparo total do dano ou morte da célula. Suas ações são elevadas ou reduzidas conforme o avanço da célula no decorrer do ciclo. Ao surgimento de oscilações pode acontecer alteração cíclica na fosforilação das proteínas intracelulares que dão início ou regulam a replicação do DNA, mitose e a citocinese que são os principais eventos do ciclo (VISCONTI; DELLA MONICA; GRIECCO, 2016; MAES et al., 2017).

Vários mecanismos, como superexpressão de CDK, mutações pontuais e regulação negativa de inibidores de CDK, favorecem a desregulação de cinases, elevando o potencial oncogênico (SCHRAM et al., 2017; KANNAIYAN; MAHADEVAN, 2018). Os inibidores de CDK4/6 foram aprovados recentemente pelo FDA (Food and Drug Administration) para tratar câncer de mama pós – menopausa ER-positivo/HER₂ negativo (Receptor de Estrogênio Positivo /Receptor de Fator de crescimento epidérmico humano 2) (TEH; APLIN, 2018). Os inibidores de CDK apresentam elevado potencial na indução de apoptose celular em desenvolvimento, ganhando destaque na terapia do câncer (OZFILIZ-KILBAS et al., 2018).

Os fatores que contribuem com a morte celular são importantes para compreender a etiologia do câncer, assim como a busca por novos tratamentos (FOUAD; AANEI, 2017). A apoptose é conhecida como morte programada da célula (ROGERS et al., 2017), importante para o desenvolvimento e homeostase celular, assim como a eliminação de células deterioradas, exercendo uma função de grande importância em processos fisiopatológicos (VAKIFAHMETOGLU-NORBERG; OUCHIDA; NORBERG, 2017). É um elemento relevante que abrange inúmeros processos como tais: renovar a célula, desenvolver e funcionar em harmonia o sistema imune, desenvolvimento embrionário e morte celular por indução de componentes químicos (SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019).

Dessa forma a apoptose é estimulada interna ou externamente e regulada pelas mitocôndrias (via intrínseca), sob controle da família Bcl-2 e o receptor de morte (via extrínseca), tem seu início através dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF) (SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019; CASSIER et al., 2017). A família das proteínas Bcl-2 (Bcl-2 e Bcl-XI) apresentam papel fundamental de proteger a célula contra a apoptose e também das proteínas que a estimulam, entre elas: a BAX, BID, NOX A e BAK chamadas de pró-apoptóticas (CASSIER et al., 2017).

A via intrínseca é acionada pelas mitocôndrias, no momento em que as proteínas são liberadas no citosol, que estimula a apoptose, através de sinalizadores de estresse, como por exemplo, oncogenes, DNA comprometido ou estresse oxidativo. Como resultado as proteínas BAX e BID são translocadas para a membrana externa das mitocôndrias, associam-se com a BAK, pertencente ao interior da mitocôndria, liberando o citocromo c e outros fatores pro-apoptóticos mitocondriais: as proteínas Smac/diablo (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low Propidium iodide*) e ainda o fator indutor de apoptose (AIF) (FULDA, 2015; CASSIER et al., 2017; GAHL; DWIVEDI; TJANDRA, 2016).

A presença do citocromo c no citosol favorece sua ligação ao APAF-1 (*apoptosis protease activating factor-1*) resultando no apoptossomo, complexo multicatalítico, o qual tem afinidade pela caspase 9, que ao ser clivada e acionada favorecerá a ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7 da cascata apoptótica, culminando com a morte celular (KOFF et al., 2015; MCARTHUR; KILE, 2018). Sendo assim, a oligomerização das proteínas BAX e BAK induzem a célula à apoptose por meio dos seguintes mecanismos: formação direta dos poros protéicos na membrana da mitocôndria e promoção do processo antagonista das proteínas Bcl-2 e Bcl-XL, pela via domínio BH₃ (CASSIER et al., 2017). Ademais, a caspase 3 é ativada pelas duas vias supramencionadas, desenvolvendo várias mudanças morfológicas, que caracterizam a apoptose (FULDA, 2015).

A via extrínseca é controlada pelos receptores que favorecem sinais extracelulares de morte para a máquina de apoptose intracelular, são eles o CD₉₅ (Faz ou Apo-1) ou TNF-R₁ (receptores do fator de necrose tumoral), pertencentes a superfície celular (NEGRONI; CUCCHIARA; STRONATI, 2015; IORGA; DARA; KAPLOWITZ, 2017), tais receptores apresentam características diferentes das proteínas padrões e são chamadas de: domínios de morte (DD) e domínios efetores de morte, que executam interações e agem ativando as caspases 8 e 10, proporcionando a homodimerização do receptor. Esse processo é denominado de complexo sinalizador indutor de morte (DISC), pois ao ser ativado transmitirá e aumentará o sinal de falência, através da ação direta das caspases efetoras (3, 6 e 7) ou ainda pela aceleração da via de apoptose intrínseca, suscitando as modificações morfológicas e bioquímicas apoptóticas (KOFF et al., 2015; MAURMANN et al., 2015; IORGA; DARA; KAPLOWITZ, 2017).

3.1.1.1 Estresse Oxidativo

Os antioxidantes naturais são compostos que defendem as células de prejuízos causados pelas espécies oxidativas reativas (EROs) e são produzidos pelos produtos naturais. As EROs participam de diversos processos celulares e iniciam ações não benéficas, as quais devem ser reguladas de forma adequada pelo sistema antioxidante (CHANDRASEKARAN et al., 2017; POPRAC et al., 2017).

O estresse oxidativo ocorre pelo desequilíbrio entre o gerador de compostos oxidantes (espécies reativas de oxigênio – EROS e de nitrogênio - ERN) e as defesas antioxidantes do organismo devido os maus hábitos alimentares e estilos de vida pouco saudáveis (SIES; BERDNT; JONES, 2017; EL-GUEZZANE et al., 2021). Um grupo de moléculas estáveis que contém oxigênio endógeno produzido pelo funcionamento da célula, produtos químicos ou radiação constituem as EROS. As mitocôndrias são importantes fonte de produção intracelular de EROS de forma endógena através da cadeia de elétrons transportados durante o processo normal de fosforilação oxidativa (CHEN; XIE, 2018; MARZVANYAN et al., 2018).

O estresse oxidativo prejudica o organismo, entretanto, algumas EROS agem nas vias de sinalização celular, beneficiando o organismo por serem moléculas sinalizadoras (SIES, JONES, 2020). Além disso, as EROS podem ser utilizadas como mensageiros intra e intercelulares, uma vez que desenvolvem várias ações na sinalização das células, entre elas a apoptose, expressão gênica e ativação de cascatas de sinalização celular (SIAUCINAITE et al., 2019).

As células tumorais e os componentes celulares do microambiente tumoral produzem EROS (WANG; ZHANG, 2019) e quando seus níveis estão elevados significativamente, ocorre pela disfunção mitocondrial, alteração do metabolismo e mutação dos genes promovendo elevada quantidade de lipídios, DNA e proteínas oxidadas acumuladas, resultando em prejuízos aos tecidos e morte das células, entretanto possuem ação proliferativa aos níveis diminuídos (BANSAL; SIMON, 2018; WEINBERG; RAMNATH; NAGRATH, 2019).

A ativação do oncogene, etapa que dá início a transformação maligna, acompanha usualmente o aumento das EROS, o qual não está comprovado ser o motivo direto da ativação da oncogene, ainda que participe de todo o processo da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão), assim como a metástase e agentes cancerígenos resistentes. Em contrapartida para desenvolver o câncer, não basta apenas de dano oxidativo ao DNA, mesmo que participe da carcinogênese e

também da transformação maligna (WEINBERG; RAMNATH; NAGRATH, 2019; PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017).

Em alguma etapa da carcinogênese, a ação do estresse oxidativo é proporcional ao tipo e a reação dos radicais participantes (CHEN; XIE, 2018).

Os agentes oxidantes induzem a mutação do DNA, caracterizando as EROS no processo chamado de iniciação no câncer. Na promoção, a EROS está em concentração moderada e promove a ativação da cascata de sinalização de sobrevivência celular cancerígena, participação da proteína quinase ativada por mitógeno/proteína quinase regulada através de sinal extracelular $\frac{1}{2}$ (MAPK/ERK $\frac{1}{2}$), P38, c-Jun N-terminal kinase (JNK) e fosfoinositida-3-cinase/proteína cinase B (PI3K/Akt), que acionam o fator nuclear kappa-intensificador, as metaloproteinases da matriz (MMPs) e ainda o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (MARZVANYAN et al., 2018; AGGARWAL et al., 2019).

Na progressão, a quantidade elevada de EROS, pode favorecer as mutações, impedimento das antiproteinases, estímulo das metaloproteinases da matriz (MMPs) e lesão de tecidos locais (BASUDHAR et al., 2017).

3.1.2 Câncer cólorretal (CCR)

A incidência de câncer colorretal para o ano de 2020 no mundo, foi acima de 1,9 milhão de casos novos, representando o terceiro lugar e ocupando o segundo em número de óbitos (935.000) (WHO, 2020). Neste mesmo ano a *American Cancer Society* apontou 104.610 novos casos de câncer de cólon e 43.340 de câncer retal para os Estados Unidos (LOGAN et al., 2019).

No Brasil, para o triênio 2020-2022, foram estimados 20.520 casos novos de CCR por ano no público masculino e 20.470 no feminino correspondendo a uma estimativa de risco de 19,63 novos casos a cada 100 mil homens e 19,03 para cada 100 mil mulheres (figura 6). O câncer de cólon e reto no sexo masculino, incide em segundo lugar nas regiões Sudeste (28,62/100.000) e Centro-Oeste (15,40/100.000); No Sul é o terceiro mais frequente (25,11/100.000). Além disso ocupa o quarto lugar nas regiões Nordeste (8,91/100.000) e Norte (5,27/100.000). Em se tratando do sexo feminino nas Regiões Sudeste (26,18/100.000) e Sul (23,65/100.000) é o segundo mais frequente; e nas outras regiões do Brasil, como Centro-Oeste (15,24/100 mil), Nordeste (10,79/100 mil) e Norte (6,48/100 mil) é o terceiro mais incidente (INCA, 2019).

O câncer de cólon e reto, conhecido como câncer colorretal, em 95% dos casos é o adenocarcinoma, pois deriva do epitélio glandular colônico (criptas) (PIVA, 2015), abrange os tumores que inicialmente ocorrem na parte do intestino grosso (cólon) e no reto (final do intestino, imediatamente antes do ânus) e ânus. Em muitos casos há possibilidade de cura, se identificado precocemente e que não tenha alcançado outros órgãos. Os pólipos são lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso e iniciam a maioria desses tumores (INCA, 2019).

A carcinogênese colorretal é caracterizada pela instabilidade do genoma, incluindo variações no número de cópias e perda de heterozigosidade (DRULINER et al., 2018). Em 2–3% dos pacientes com CCR, as mutações nos genes (MMR) foram observadas (LORANS et al., 2018). As mutações genéticas mais comumente identificadas acontecem em APC, TP53 e KRAS (HUANG et al., 2018; WOLFF et al., 2018; YAEGER et al., 2018).

Os registros de dados do *Cancer Genome Atlas* (TCGA) encontrou recentemente, no adenocarcinoma de cólon (COAD) e no adenocarcinoma retal (READ) a presença de mutações em diversos genes de resposta e reparo de danos ao DNA (DDR) (KNIJNENBURG et al., 2018).

O maior número de casos é encontrado em indivíduos maiores de 60 anos de idade e geralmente estão associados a alimentação não saudável, pobres em fibras, como produtos industrializados, gorduras. Esta última ao ser ingerida em elevada quantidade proporciona aumento na produção de ácidos biliares, os quais são mutagênicos e citotóxicos. O risco deste câncer aumenta de 1,3 a 2,8% através do consumo de peixes desidratados ou conservados com sal (SILVA; DAERRANTE, 2016). Outros fatores envolvidos na evolução do CCR são: obesidade, sedentarismo, tabagismo, alcoolismo, diabetes tipo 2, síndromes hereditárias, história pessoal de pólipos e doença inflamatória intestinal (KANTH et al., 2017; KUIPERS et al., 2016).

A linhagem celular HCT-116 (ATCC® CCL-247), são células malignas isoladas de um homem adulto com carcinoma de colorretal humano. Possui elevado potencial de invasão, metástase e crescimento em multicamada. Ao ser comparada à linhagem Caco-2, estas células demoram para aderir à placa de cultura, todavia, após a adesão a tripsina auxilia em seu desprendimento (RICCI, 2009). Além disso, apresenta mutação no oncogene KRAS (AHMED et al., 2013), perfil de expressão gênica e morfológica compatível ao grupo (CMS4), denominado mesenquimal conforme o CMS (BERG et al., 2017).

3.1.3 Câncer de mama

O câncer de mama, neoplasia maligna de maior incidência mundial no público feminino, excedeu o câncer de pulmão em 2020, apresentando estimativas de aproximadamente 2,3 milhões (11,7%) de casos novos de câncer e 684.996 mil ou (6,9%) do total óbitos pela doença, ocupando a quinta maior causa de óbitos no mundo (WHO, 2020). Quanto ao sexo masculino, raramente constitui grupo de risco (SENGER; ADAMS; KANTHAN, 2017). Embora no sexo masculino, os acontecimentos sejam ocasionais, a taxa atingida é de 1% totalidade dos casos (SANGUINETTI, 2016; INCAa, 2018).

Excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama também é o mais incidente em mulheres de todas as regiões do Brasil, com taxas mais altas nas regiões Sul e Sudeste. Para o ano de 2021 foram estimados 66.280 casos novos, o que representa uma taxa de incidência de 43,74 casos por 100.000 mulheres (INCA, 2020).

Em se tratando do triênio 2020-2022, foram estimados 66.280 (29,7%) casos novos de câncer de mama a cada ano (Figura 6), correspondendo a 61,61 a cada 100 mil mulheres, exemplificando por região: 81,06/100.000 (Sudeste); 71,16/100.000 (Sul), 45,24/100.000 (Centro-Oeste); 44,29/100.000 (Nordeste), 21,34/100.000 (Norte), ocupando dessa forma o primeiro lugar dentre as regiões do Brasil, não levando em consideração os tumores de pele não melanoma (INCA, 2019).

Para o surgimento do câncer incluem fatores como: ambiente, hereditariedade, ou predisposição genética ao cancro mamário, a idade implica no envelhecimento e adversidades ampliando o risco de exposição (BREWER et al., 2017; SZVARÇA et al., 2016), com maior relevância principalmente aqueles que tem acima de 50 anos (INCA, 2019).

Outros fatores que também contribuem são: a falta de atividade física, tabagismo, etilismo, uso de estrógenos associados, progesterona para menopausa, obesidade, exposições frequentes a radiações ao DNA, favorecendo alterações no funcionamento das funções celulares e intracelulares (FENGA, 2016).

Figura 6. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA). Adaptado: 01.07.2020.

Todavia o prognóstico mais complicado é atribuído as mulheres mais jovens (VILLARREAL-GARZA et al., 2016). Nesses casos, há maior necessidade de acompanhamento prévio, uma vez que as mutações disfuncionais dos genes BRCA₁ e BRCA₂ ocasionados por fatores genéticos influenciam e colaboram com o alto risco de desenvolvimento de neoplasia mamária maligna (HORST et al., 2016; BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2018).

O surgimento de nódulo indolor e endurecido nas mamas e/ou axilas (percepção ao realizar o autoexame de toque), dor, hiperemia, secreção papilar, edema mamário parcial e cutâneo, retração cutânea, mamilo invertido, ulcerado ou descamativo caracterizam a sintomatologia deste tipo de câncer (INCAc, 2018).

Neste sentido, a durabilidade dos sinais e sintomas, do paciente, a taxa de desenvolvimento do tumor, diagnóstico histopatológico (carcinoma, adenocarcinoma e sarcoma), extensão, local, sexo, idade e metástases à distância devem ser analisadas para avaliar o estadiamento do câncer e definir o grau de disseminação da neoplasia (INCA, 2018). No passado, as características biológicas não eram detectadas através do sítio anatômico, no entanto, estudos atuais apresentam a seguinte classificação: sítio anatômico, imunohistológico e/ou molecular (NOONE, 2017).

O carcinoma de célula epitelial (revestimento interno dos ductos ou lóbulos da mama) é o tipo histológico mais comum ao câncer de mama feminino, sugerindo o local de desenvolvimento do tumor e se divide em lesões *in situ* e invasoras, sendo os ductais ou lobulares os mais frequentes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2018). No carcinoma *in situ* o tumor limita-se ao epitélio mamário, ao atacar o estroma se tornará em carcinoma invasivo (MAKKI, 2015). Os de origem ductal correspondem a 80% dos eventos, em contrapartida os demais são representados pelos lobulares (INCA, 2014). Os subtipos de câncer de mama estão associados aos processos inflamatórios e a infiltração tumoral de linfócitos, influenciam o prognóstico do paciente (SAVAS et al., 2016).

Quanto a classificação molecular, o subtipo basal, as características imunohistoquímicas e moleculares dos tumores apresentam-se de forma variada e heterogênea por meio de três marcadores: receptor de estrogênio (RE), Receptor de Progesterona (RP) e receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER-2). Assim, a presença de proteínas chamadas receptores hormonais (estrogênio e/ou progesterona) e de proteína HER2 em grande quantidade, nas células tumorais definem o tipo molecular. Nesse sentido as características das células tumorais ao câncer de mama, são estratificadas em quatro subtipos de expressão gênica, demonstrando diferentes moléculas, comportamento biológico, padrão metastático e resposta a tratamento efetivo (LAMBERTINI et al. 2016).

O tipo Luminal A é heterogêneo (baixo grau, desenvolvimento das células mais lento que o B) são tumores que apresentam receptores de estrogênio (RE) e progesterona positivos (muitos receptores hormonais presentes), não apresentam a expressão da proteína HER2 (HER2 negativo) (HON et al., 2016), possuem boa resposta à terapia endócrina (COATES et al., 2015).

O câncer de mama luminal apresenta vários receptores hormonais no sexo feminino e expressam os genes com uma semelhança aos das células saudáveis, revestindo as glândulas mamárias e seus ductos, representando em torno de 60 a 90% dos tipos de câncer de mama (HON et al., 2016). De acordo com a *American Cancer Society*, geralmente os eventos de câncer de mama ocorrem da seguinte maneira: tipo luminal A (74%), TNBC (12%), luminal B (10%) e HER2 (4%), distribuídos entre raças e etnias (DE SANTIS et al., 2016).

Os receptores hormonais estão presentes no subtipo luminal A, sendo característico a ausência de HER2 e os níveis de proteína do marcador de proliferação

(Ki67) encontram-se diminuídos, favorecendo o prognóstico (SOLIMAN; YUSSIF, 2016). Os tumores cancerígenos Ki67 positivos são caracterizados por células que se desenvolvem muito rápido, são ofensivos ao se apropriarem de novos tecidos (SCHOLZEN; GERDES, 2000). No quadro 1 está representado os tipos de classificação molecular dos carcinomas de mama por imunohistoquímica, associados ao marcador Ki67.

Quadro 1: Classificação molecular dos carcinomas de mama por imunohistoquímica, associados ao marcador Ki67.

SUBTIPOS MOLECULARES	MARCADORES CLASSIFICATÓRIOS	MARCADORES KI67
Luminal A	ER+ e/ou PR +; HER ₂ -	< 14%
Luminal B (HER ₂ negativo)	ER+ e/ou PR +; HER ₂ -	> 14%
Luminal B (HER ₂ positivo)	ER+ e/ou PR +; HER ₂ -	*
Super-expressão de HER ₂ (HER ₂ +)	ER -; PR -; HER ₂ +	*
Triplo-Negativo	ER -; PR -; HER ₂ -	*

Fonte: Adaptado de (FULAWKA; HALON, 2017).

O símbolo (*) representa qualquer tipo de expressão de Ki67.

O tipo Luminal B também possui receptores estrogênio e/ou progesterona positivos, não expressam a proteína HER₂ (HER₂ negativo) e apresentam um nível mais acelerado de proliferação celular. Já o HER₂ se caracteriza por não apresentar expressão dos receptores hormonais (negativos), mas tem a expressão da proteína HER₂ (HER₂ positivo). Diante disso, o Triplo Negativo (TNBC *Triple-negative breast cancer*) significa que não possui expressão hormonal, nem a proteína HER₂, sendo negativo, portanto, para estrogênio, progesterona e HER₂. O subtipo luminal B, demonstra marcação positiva aos receptores hormonais, exibindo ou não marcadores para HER₂, além de níveis elevados de Ki67, prolifera-se rapidamente e tem prognóstico sombrio em relação ao subtipo luminal A (SOLIMAN; YUSSIF, 2016).

O HER₂ positivo, receptor aumentado de transmembrana é constituído de diversas cópias do gene Her₂, resultando em aumento deste em seu receptor da membrana plasmática e proliferação celular acelerada, favorecendo uma expansão mais agressiva em relação aos outros cânceres mamários (COATES et al., 2015).

As células do câncer de mama TNBC, caracterizam-se pelo número elevado de genes mutáveis encontrados diretamente nas vias de reparo do DNA, e aumento

da instabilidade do genoma (OCANA, PANDIELLA, 2017), além do mais possuem pouca quantidade da proteína HER2 e não apresentam receptores de estrogênio ou progesterona (JHAN, ANDRECHEK, 2017) em contrapartida as expressões genéticas são padronizadas, similarmente aos padrões celulares das camadas basais ductais e glândulas mamárias, ocorrendo em grande escala no público feminino jovem (menos de 40 anos) e de cor escura (afro-americanas) e ainda em pacientes com mutações no gene BRCA₁ (CARSTEN-DENKERT et al., 2016; JHAN, ANDRECHEK, 2017).

As subpopulações intratumorais são formadas pela participação das alterações concomitantemente de caráter genômico, epigenômico, transcriptômico e proteômico que acontecem em várias células, caracterizando o processo da oncogênese e de natureza heterogênea assim como suas linhagens. Diante disso, duas linhagens a MCF-7 e a MDA-MB-231 possuem características distintas (CAMPOY et al., 2019) e cariótipos com alterações numéricas (ATCC, 2020). Em relação a célula-tronco tumoral, na linhagem MDA-MB-231 destaca-se os genes fenotípicos em comparação a linhagem MCF-7 (RALPH, 2019).

A linhagem celular humana de adenocarcinoma mamário (MCF-7), foi extraída de uma mulher caucasiática de 69 anos que era portadora de câncer de mama metastático, cuja linhagem era denominada de 734B (ATCC, 2020). A MCF-7 foi mantida em cultura e permaneceu estável, a partir de um grupo de células flutuantes da cultura primária de 734B. Além disso, possui receptores de estrógeno (possibilidade de servir como alvo terapêutico), uma propriedade de supra importância para a prática clínica (SOULE et al., 1973).

A linhagem humana MDA-MB-231, adenocarcinoma mamário foi retirada de uma paciente durante um procedimento cirúrgico de mastectomia radical na mama direita, que apresentava alterações numéricas em seu cariótipo, a mulher era caucasiana e tinha 51 anos de idade, suas células foram cultivadas em laboratório, desde outubro de 1973 a partir de uma única amostra (ATCC, 2020; CAILLEAU et al., 1974). Essa linhagem é conhecida como triplo-negativa no que tange à expressão dos receptores: RE, RP e Her-2 (PINHO, 2014).

3.1.4 Câncer de cérvix uterina

O câncer cervical uterino (CCU) é uma das principais neoplasias que acometem gravemente o público feminino, em decorrência a exposição recorrente ao *Human Papiloma vírus* (HPV) (INCA, 2019). É um vírus de DNA epiteliotrófico, que

pode estimular o epitélio, porém a sua capacidade de proliferação dependerá da célula atingida (BRASILEIRO FILHO, 2016). Foi encontrado 99,7% do DNA desse vírus em casos de câncer de colo uterino, destacando-se uma proporção de causa e efeito entre um agente e câncer em humanos (WHO, 2016).

Esse vírus é muito comum entre a população humana, prevalecendo de 2% a 44% entre as mulheres do mundo (MEHTA et al., 2017). Em 2020, estimou-se 604 mil casos novos do CCU a nível mundial e foi considerado o quarto tipo de câncer mais frequente no sexo feminino, sendo responsável por cerca de 342 mil óbitos em mulheres (WHO, 2020).

No território brasileiro, a estimativa para o triênio de 2020-2022 é de 16.590 novos casos por ano, esperando-se 15,43/100.000 mulheres, apresentando a segunda maior incidência. A Região Norte (21,20/100.000) e Nordeste (17,62/100.000), ocupam primeiro e segundo lugar, respectivamente. O Centro-Oeste (15,92/100.000), Região Sul (17,48/100.000) e Região Sudeste (12,01/100.000) menor estimativa (INCA, 2019).

Etiologicamente as persistentes infecções pelo HPV estão no ranking, estimando-se a existência de 200 genótipos do HPV, dos quais 18 são oncogênicos (STEWART, WILD; MCGRAW, 2014), e os tipos HPV16 e HPV18 representam risco elevado para 70% do surgimento neoplásico intraepitelial cervical (lesões precursoras) (BYCHKOVSKY, 2016), além destes, o HPV31, HPV33, HPV35, HPV45), também são de alto risco. Em quase todos os tumores cervicais são detectados, sequências de DNA de HPVs (NUNES et al., 2018). Aproximadamente 40% dos tipos de HPV acometem a genitália de ambos os sexos, aqueles considerados de risco elevado podem promover câncer de colo de útero, vagina, vulva, ânus, pênis, orofaringe e boca. Os subtipos HPV6 e HPV11 estão entre os de baixo risco, presentes em 90% das verrugas anogenitais benignas, sendo de grande importância (BYCHKOVSKY, 2016; NUNES et al., 2018).

O CCU origina-se, principalmente, na junção escamo colunar (JEC) e se desenvolve através da replicação desorganizada do epitélio que reveste o colo uterino, chamada de lesão precursora. Apresenta ainda um imunofenótipo igual e acima de 90% das células de lesões intraepiteliais de alto grau (LIEAG) e de carcinomas cervicais, reforçando o quão é importante este local para iniciar a sequência carcinogênica (INCA, 2016; MIRKOVIC et al., 2015; BRASILEIRO FILHO, 2016).

As lesões precursoras são atípicas e limitadas ao tecido epitelial através de uma relação temporal e espacial, favorecendo a infecção, a colonização epitelial, pré-requisito para desenvolver o carcinoma invasor do colo uterino (MIRKOVIC et al., 2015; MEHTA et al., 2017). Na fase inicial, raramente as lesões precursoras apresentam sinais e sintomas, porém ao progredir a doença, pode surgir corrimento, sangramento vaginal (LIBERA, et al., 2018) intermitente ou em seguida a relação sexual e anormalidade da secreção vaginal. No estágio avançado envolvem: lombalgia, fadiga, presença de urina ou fezes na região genital, dor pélvica e diminuição de massa corpórea (MEDLINEPLUS, 2016).

Essas lesões encontram-se em duas formas: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LIEBG), envolvidas com a replicação ativa do HPV e a lesão intraepitelial escamosa de alto grau (LIEAG), apresenta características de alterar o núcleo, causando a transformação da célula (MIRKOVIC et al., 2015; BRASIL, 2019).

As microlesões presentes na camada basal do epitélio escamoso dão início ao processo infeccioso pelo HPV, que se encontra no núcleo da célula hospedeira, servem de reservatório ao DNA viral, não sofrem lise, o genoma fica estável e se replica. O genoma do HPV divide-se em: região não codificante denominada de longa região controladora (LCR), região codificadora precoce (E) e região codificadora tardia (L). As novas células já infectadas, no momento da divisão, irão originar as células filhas com DNA viral de forma equitativa, as quais migrarão da camada basal para as camadas mais superficiais do epitélio e iniciarão a diferenciação celular (SAMPAIO; ALMEIDA, 2009; BOCCARDO, 2010).

Os genes codificadores das proteínas reguladoras das fases vegetativas e produtivas do ciclo do vírus, participantes de sua replicação e da oncogênese pertencem a região E (E, E2, E4, E5, E6 e E7) (BRASILEIRO FILHO, 2016). Os genes virais, E6 e o E7 originam a carcinogênese advindo do HPV, ambos intervêm no funcionamento das proteínas pRb e p53 da célula hospedeira, levando à desregulação e imortalização celular. Esses genes virais também causam danos em outras proteínas celulares que têm atividades regulatórias diversificadas, proporcionando fuga imunológica, resistência à apoptose e reprodução de células epiteliais (SAMPAIO; ALMEIDA, 2009; DOORBAR et al., 2012).

Quando as proteínas p53 e pRb são inibidas, ocorre descontrole na proliferação das células e na morte celular programada, permitindo que as células infectadas pelo HPV dêem sequência na divisão, apesar do dano no DNA,

potencializando o risco delas se tornarem malignas (SOUTO et al., 2005). As deformações em decorrência do HPV, no epitélio glandular do colo uterino, associam-se ao progresso do adenocarcinoma cervical (BRUNI et al., 2014).

Ao persistir a infecção viral, expressão de oncogenes do HPV pelo metabolismo alterado dos queratinócitos e a cronicidade das respostas inflamatórias sem eficácia levam à produção de EROs (KGATLE et al., 2017), participantes dos três estágios de carcinogênese, contribuindo no começo do câncer com as mutações no DNA nuclear ou mitocondrial, deleção, mutação pontual, deleções, translocações cromossômicas e outros. Ou seja, as células naturais são modificadas pela EROs e promovem a disseminação celular, inibem a apoptose, regulam os genes e alteram o estado redox para conservar a malignidade dos fenótipos (KOCYIGIT et al., 2017).

Dessa forma, as alterações pré-malignas são denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), iniciam-se lentamente de forma previsível, sendo consideradas de lesões intraepiteliais de baixo grau, evoluem potencialmente à estágios invasivos (lesões intraepiteliais de alto grau), podendo ser identificados precocemente por meio do exame Papanicolau e quando tratados no início da enfermidade são curáveis em quase todos os casos. As NICs evoluem para carcinoma *in situ* e carcinoma invasor (INCA, 2019, INCA, 2016a).

A vacina contra o HPV, surgiu como forma de proteger o público feminino que iniciou a vida sexual e ainda nas mulheres que fazem tratamento por lesões em decorrência do HPV, já que a infecção não favorece suficientemente a produção de anticorpos (SASAGAWA et al., 2012). Além disso, reduz a prevalência, incidência, a persistência do vírus e ainda possui a capacidade de proteção contra neoplasia intraepitelial cervical grau 2 ou NIC2+ (GARLAND et al., 2016; HARPER, DEMARS, 2017).

A ANVISA, aprovou duas vacinas no Brasil para esse enfrentamento, a Quadrivalente recombinante (laboratório Gardasil, MSD) contra o vírus HPV dos tipos 6, 11, 16 e 18; e a vacina bivalente do laboratório Cervarix®, GSK, contra o HPV oncogênico dos tipos 16 e 18 (ANVISA, 2007).

A vacina quadrivalente mostrou eficácia como precaução das neoplasias intraepiteliais do colo uterino, vagina, vulva e ânus e também contra os tipos virais presentes na vacina (GARLAND et al., 2016; HARPER, DEMARS, 2017). O quadro 2 demonstra as diversas características dessas vacinas.

Quadro 2: Comparativos entre as vacinas contra HPV licenciadas no Brasil em 2017.

LABORATÓRIO	MSD	GSK
Nome	Gardasil®	Cervarix®
Composição (VLP)	6 e 18 (20 µg) 11 e 16 (40 µg)	16 e 18 (20 µg)
Adjuvante	225 µg Sulfato hidroxifosfato de alumínio	500 µg Alumínio + 50 µg MPL ('AS04')
Esquema vacinal	0-2-6 meses por via IM	0-1-6 meses por via IM
	0-6 a 12m (9-14 anos)*	0-5 a 13m (9-14 anos)*
Aprovação por idade e gênero	Homens 9 a 26 anos Mulheres 9 a 45 anos	Mulheres a partir de 9 anos
Foco principal da prevenção	Verrugas genitais, NIV, NIVA, NIC2/3, câncer cervical e anal	Lesões pré-cancerosas NIC 2/3 pelo HPV 16 e/ou 18, e infecções incidentes e persistentes causadas pelo HPV 31 e/ou 45 e câncer cervical.

Fonte: Cervarix®, 2017; Gardasil®

* Imunossuprimidos devem realizar três doses, mesmo abaixo de 14 anos de idade.

Em março de 2014, o Programa Nacional de Imunização (PNI) iniciou a vacinação contra o HPV em meninas entre 11 e 13 anos de idade (duas doses, sendo 0 a 6 meses e a terceira dose prevista após 60 meses). No ano seguinte houve mudança no esquema (duas doses) e ampliou-se a faixa etária para meninas de 9 a 10 anos. As mulheres até 26 anos que convivem HIV/AIDS passaram à ter direito na vacina em 2016, a qual também foi liberada em 2017 para o sexo masculino e feminino de maneira semelhante, acrescidos dos portadores de outros tipos de imunossupressão (BRASIL, 2017). O calendário oficial e atualizado de 2017 está descrito no quadro 3.

Quadro 3: Programa oficial de vacinação contra HPV do PNI de acordo com o gênero, para o período de 2017-2020 (PNI – Junho/2017).

Ano	Meninos e homens		Meninas e mulheres	
	Idade	Nº doses	Idade	Nº doses
2017-2018	11 e 14 anos	2 (0-6 meses)	9 e 14 anos	2 (0-6 meses)
2019	10 e 11 anos	2 (0-6 meses)		
2020	9 e 10 anos	2 (0-6 meses)		
2017-2020	HIV+ e imunossuprimido* 9 a 26 anos	3 (0-2-6 meses)	HIV+ e imunossuprimido* 9 a 26 anos	3 (0-2-6 meses)

Fonte: BRASIL, (2016); BRASIL, (2017).

* Imunossupressão por transplante e tratamento oncológico

Em se tratando das linhagens de células mais comuns de HPV, segundo Diao, et al. (2015) são SiHa e CasKi (HPV-16 positivo), HeLa (Adenocarcinoma cervical humano - HPV-18 positivo), C33-A (HPV-16 negativo) e HT-3 (HPV-18 negativo) (IJAZ et al., 2018).

As células de um carcinoma de cérvix uterino da paciente Henrietta Lacks (He La), foram isoladas para cultura na década de 1950 por Gey e colaboradores (LANDRY et al., 2013). Elas são consideradas a primeira linhagem de células humanas a sobreviver e se multiplicar em laboratório e vêm contribuindo com cientistas mundiais, biomédicos, criação de tecnologias, medicamentos, surgimento de vacinas, mapeamento de genes, pesquisa de vários tipos de câncer, tratamento de doenças e seus mecanismos há mais de 50 anos, além disso, foram fundamentais no estudo da tuberculose, HIV e do Papilomavírus humano (HPV), sendo relevantes até os dias atuais (GUEDES, 2013).

3.2 TRATAMENTO DO CÂNCER E AGENTES QUIMIOTERÁPICOS

Para o tratamento do câncer conforme seu agravamento, os principais métodos empregados são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia citotóxica, que podem ser utilizados de maneira isolada ou conjuntamente conforme à suscetibilidade

tumoral frente a terapia e sua administração sequencial (INCA, 2020). Além destes existe a hormonioterapia, transplante de medula óssea e terapia alvo (DANCOSK; ASLEH-ALBURAYA; NIELSEN, 2017; MIN et al., 2017; ROKHFOROZ et al., 2017).

A quimioterapia é o método mais empregado, realizado através de terapia medicamentosa, administrada oralmente ou por via endovenosa e elimina as células cancerígenas, as quais se dividem rapidamente, diferente das células normais (ROKHFOROZ et al., 2017; RUBOVSKY; HORVÁTH, 2017). Seu principal mecanismo de ação é inibir a proliferação celular de forma não seletiva, promovendo sofrimento para as células malignas, porém, os agentes utilizados também afetam as células normais (INCA, 2017). As células-tronco tumorais resistem à essa modalidade de tratamento (SU et al., 2018).

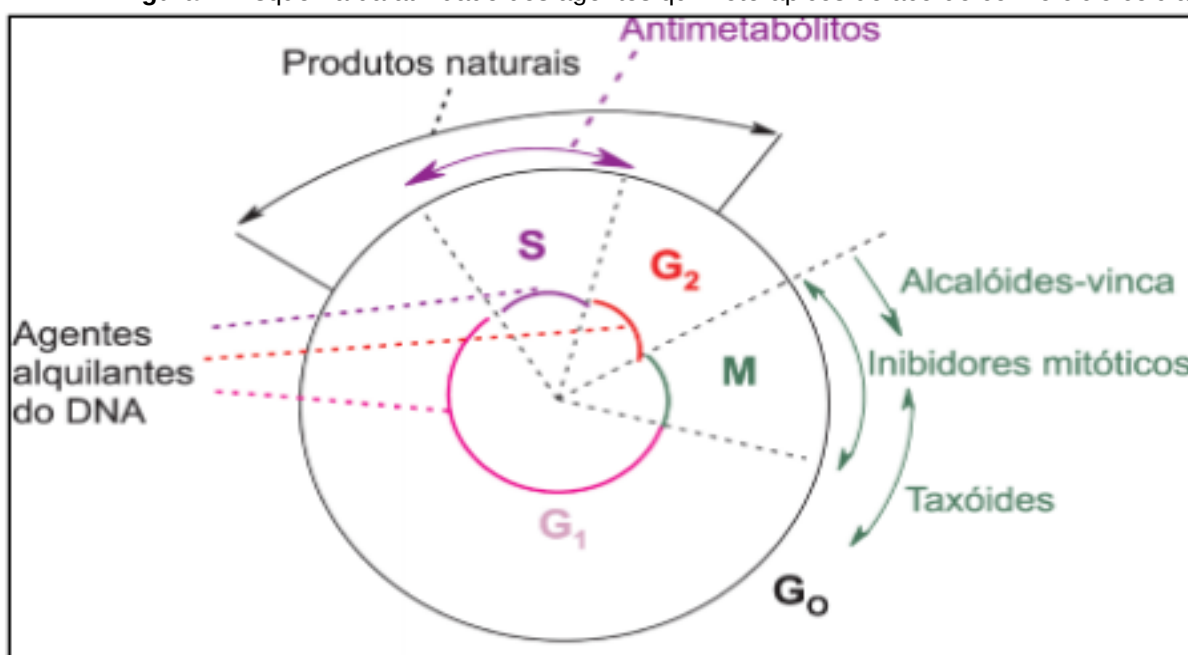
A terapia citotóxica constitui-se de inúmeras desvantagens e limitações tais como: especificidade reduzida, toxicidade em células sadias, resistência às células malignas, que conjuntamente contribuem com a ineficiência do tratamento (EL-MAGD et al., 2017; PAJUELO-LOZANO et al., 2018), devido os efeitos adversos em células normais do sistema imunológico, aparelho gastrointestinal e capilares (CHU; RUBIN, 2018). As ações indesejáveis são: alopecia, náuseas, cefaléia, várias lesões no DNA, ativando mecanismos de morte celular, induzem resistência à múltiplos fármacos (SALEM et al., 2016; EL FAR et al., 2018), constipação intestinal, diarreia, êmese, supressão da medula óssea, toxicidade nas células (fígado, coração, pulmão, rim, derme, aparelho reprodutivo) e alterações no metabolismo. Neste contexto os eventos adversos a longo prazo contribuem com o risco de desenvolver outros tipos de câncer, uma vez que os agentes antineoplásicos são mutagênicos (SABAA et al., 2017).

Os quimioterápicos citotóxicos se dividem em três classes: agentes alquilantes, os produtos naturais e os agentes antimetabólicos (Figura 7). Os agentes alquilantes têm ação direta no DNA, proporcionando danos (ciclofosfamida, cisplatina e mostardas nitrogenadas) (CHEN et al., 2017), através da ligação intracadeia aos filamentos de DNA, impedindo sua transcrição e replicação do ácido nucleico. Eles possuem a capacidade de eliminar as células tumorais em repouso ou presentes no ciclo celular (RUSSO et al., 2018).

As mostardas nitrogenadas (ciclofosfamida, ifosfamida), fazem parte desse grupo, além das mostardas fenilalanina, alquilsulfonatos (bissulfan), as nitrosurêias, os complexos de coordenação de platina (cisplatina e a carboplatina) (RANG, 2016; ABOTALEB et al., 2018).

Os produtos naturais, denominados como “metabólitos secundários”, apresentam estruturas químicas complexas com capacidade de alterar as funções biológicas, além de serem vistos como fontes de grandes descobertas farmacêuticas, ao longo dos anos, pela ampla diversidade de compostos químicos obtidos diretamente da natureza (DUTRA et al., 2016; KATZ; BALTZ, 2016; YUAN et al., 2016). Como exemplo, temos os alcalóides da vinca e diterpenos como o taxol (CHEN et al., 2017).

Figura 7: Esquema da atividade dos agentes quimioterápicos de acordo com o ciclo celular



Fonte: ALMEIDA et al., (2005).

Os agentes antimetabólicos, agem bloqueando a produção do DNA, na fase S do ciclo celular (metotrexato e o 5-fluorouracil) (CHEN et al., 2017). A tioguanina também são antimetabólitos e inibem principalmente a síntese das purinas (CHU; RUBIN, 2018).

Outros quimioterápicos são utilizados para tratar o câncer no ser humano: actinomicina D, bleomicina, cisplatina (DNA é danificado através da alquilação), daunorrubicina, doxorrubicina e taxanos (interação com a tubulina), etoposídeo (interação com topoisomerase II), hidroxiureia, mercaptopurina, vincristina e vimblastina (inibe a síntese do RNA ou de proteínas), fluruoracila (impede a formação dos dextrorribonucleotídeos) (CHU; RUBIN, 2018), inibindo de forma irreversível a

timidina sintetase, a qual converge a uridina em timidina (SHAH et al., 2016; SCHULTZE et al., 2017).

A 5-fluoruracil (5-FU) é um análogo da pirimidina, apresenta um átomo de flúor na posição C-5 da uracila no lugar do hidrogênio, sua atividade se dá incorporando os fluoronucleotídeos ao RNA e DNA (CLIFFORD et al., 2018).

Os taxanos, paclitaxel e docetaxel, quebram os microtúbulos na fase inicial da divisão celular, obstruem o processo normal da polimerização/despolimerização, inibem a mitose, resultando em apoptose do ciclo celular na fase G₂-M, interrompendo o desenvolvimento das células neoplásicas, possibilitando sua morte. Porém, eles são neurotóxicos, cardiotoxicos e causam, náuseas, êmese, mielosupressão, alterações no sistema gastrointestinal, alergia e reações cutâneas. Os taxanos apresentam resistência ao câncer mamário culminando em uma problemática aos pacientes que precisam fazer o tratamento oncológico (SOUCHEK et al., 2017).

Já os antibióticos antineoplásicos, antraciclinas (epirrubicina e doxorrubicina), inibem a enzima topoisomerase II, alterando a fluidez e a passagem de íons através da membrana celular, formando radicais livres e posteriormente a quebra dos filamentos de DNA (CARVALHO et al., 2015). Entretanto, esta classe é cardiotoxica, associa-se a trombose e prejudicam o tratamento do adenocarcinoma mamário por desenvolver resistência aos quimioterápicos (SHAFIEI-RANNEJAD et al., 2017).

Os últimos avanços na abordagem terapêutica do câncer de mama têm a finalidade de prolongar a sobrevida e possibilitar a qualidade de vida, sendo assim, divide-se em tratamento local (cirurgia, radioterapia, além da reconstrução mamária), e sistêmico (quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica) (INCA, 2020). A escolha da melhor associação das terapias é de extrema relevância e leva em consideração o estadiamento clínico anatômico e/ou patológico, o tipo histológico, a presença de RE e RP, a superexpressão do HER₂ no tumor, o estado de saúde da paciente (COATES, 2015; NCCN, 2018), para determinar o tratamento mais apropriado (PRABHU; DEVARAJ, 2017).

Os vários subtipos moleculares do câncer de mama demonstram diversidades biológicas, a correlação entre eles direcionará os resultados clínicos e terapêuticos, favorecendo uma abordagem personalizada para a medicina (HENNIGS et al, 2016; LI et al., 2016). Os subtipos TNBC e enriquecidos HER-2 são mais sensíveis à quimioterapia e fazem co-relação com as características clínicas e patológicas apesar do TNBC apresentar sensibilidade ao quimioterápico. Existindo recorrência da

metástase, haverá maior dificuldade de tratar, resultando em breve sobrevida pela decorrência do mau prognóstico (KUMAR; AGGARWAL, 2016).

A cirurgia é considerada um tratamento eficaz para o câncer de mama, pode ser conservadora (somente o tumor é extraído) ou mastectomia total em que ocorre a extração de todo o tecido mamário e também os gânglios linfáticos axilares (INCA, 2016b). Em alguns casos os pacientes passam pela quimioterapia neoadjuvante (NAC), estratégia que permite eles receberem quimioterapia antes do procedimento cirúrgico com foco na redução do tamanho do tumor a fim de promover a manutenção saudável do tecido mamário (ACEVEDO et al., 2015). Além de procedimento cirúrgico radical ou conservador, utiliza-se a nível sistêmico a quimioterapia, hormonioterapia e/ou terapia-alvo molecular e local, assim como a radioterapia (NCCN, 2018).

No tratamento radioterápico são utilizados raios X, gama e feixes de elétrons que culminam com a morte das células e tecidos afetados, através de diversos mecanismos (UK, 2016). O tratamento pode ser: radical ou curativa, remissiva, profilática, paliativa e ablativa. O primeiro vislumbra a erradicação do tumor, o segundo busca reduzir o tumor, o terceiro atua na fase subclínica, ou seja, o volume tumoral é inexistente, todavia há possibilidade de dispersão das células malignas, o quarto tem a finalidade de controlar o sangramento, a dor intensa, e a compressão de órgãos; por último a radiação é administrada para suprimir a função de um órgão (INCA, 2017c).

Existem técnicas muito usadas no combate ao câncer como a fotorradiação e a imunoterapia, estas podem ser associadas à alguma das terapias supramencionadas. A fotorradiação com derivados hematoporfirínicos (HTP), seleciona a célula que será atacada, esta perderá sua utilidade internamente, pois terá porfinas que resultarão em acúmulo aos órgãos sadios (CHU; RUBIN, 2018; LI et al., 2019). A imunoterapia é usada tecnicamente na destruição de células malignas remanescentes de cirurgias, age estimulando as defesas do organismo através das citocinas como a interleucina-2, interferon (IFN- α), e também o Bacilo Calmette-Guérin (BCG). Utiliza inclusive anticorpos monoclonais (ipilimumabe, pembrolizumabe e nivolumabe), atuantes em alguns tipos de câncer, pois se ligam nos receptores de proteínas de células T reguladoras, impedindo sua ativação e evitando que a resposta imunológica seja desligada (LE et al., 2019; CHEN et al., 2017).

Dois medicamentos foram utilizados com desfecho em TNBC, o Atezolizumab (anticorpo anti-PDL-1) e Pembrolizumabe (anticorpo anti-PD-1) que agiram em subgrupo de tumores que expressam níveis elevados de ligante de morte celular programada (SCHMID et al., 2018). O bevacizumabe, anticorpo monoclonal, está atuando contra mecanismos específicos da célula neoplásica, sua ação consiste em se ligar de forma seletiva aos receptores Flt-1 e KDR presentes na superfície das células endoteliais. Essa ação resultará na inativação da atividade biológica, do fator de crescimento do endotélio vascular humano (VEGF, *vascular endothelial growth factor*, um dos agentes relevantes que estimulam a formação de novos vasos), consequentemente ocorrerá a diminuição da vascularização neoplásica, inviabilizando o crescimento do tumor (KEATING, 2014; ANVISA, 2016).

Esse medicamento é indicado em vários tipos de câncer, entre eles o de mama metastático ou local recorrente e da cérvix uterina persistente, para este deve ser tratado em conjunto ao paclitaxel e cisplatina ou paclitaxel e topotecano no público alvo que não puder utilizar a terapia com platina (ANVISA, 2016). O trastuzumab, o pertuzumab e o docetaxel, são anticorpos usados na prática clínica para combater o HER-2, receptor tirosina quinase, regulador relevante no crescimento das células de câncer de mama (SWAIN et al., 2015).

Diante do exposto, a busca por terapias antitumorais que apresente o mínimo de reações adversas, fácil acesso ao público alvo e também minimize a proliferação das células tumorais impedindo a disseminação da metástase, tem sido um grande desafio às pesquisas, as quais vislumbram moléculas ativas advindas dos vegetais (SHARMA; ZAFAR, 2015).

Entre 1940 e 2019 cerca de 64,8% dos fármacos antitumorais aprovados, são medicamentos não sintéticos, de origem natural como exemplo, o paclitaxel, isolado da casca de *Taxus brevifolia* Nutt, é uma das drogas usadas em grande escala no tratamento do câncer de mama (MAJOLO et al., 2019).

Diante deste contexto, existe uma busca incessante por novos fármacos, com menos efeitos colaterais que as drogas usuais existentes no mercado para o tratamento do câncer. Os compostos oriundos das plantas medicinais são fontes imprescindíveis para desenvolver novos medicamentos, por serem moléculas terapeuticamente ativas, obtidas de uma química combinatória inigualável. Neste sentido, a indústria farmacêutica e agências de fomento à pesquisa investem fortemente em estudos científicos e o *screening* de produtos naturais é uma

ferramenta importante e eficaz na identificação de fármacos antitumorais promissores que possam aumentar a qualidade e sobrevida dos pacientes em tratamento oncológico (CHAVOSHI *et al.*, 2017; NEWMAN; CRAGG, 2020; MAJOLO *et al.*, 2019).

3.2.1 Produtos Naturais e o Câncer

Historicamente o ser humano buscou na natureza, através de plantas medicinais uma maneira de curar e prevenir terapeuticamente a população das enfermidades, desde a antiguidade (IJAZ *et al.*, 2018; PATEL *et al.*, 2018; RAJ *et al.*, 2018). Na obra Pen Ts'ao, do chinês Shen Nung, foram registrados os relatos mais antigos (3.000 a.C.). Os registros do uso medicinal das plantas foram feitos pelas civilizações mesopotâmicas, por volta de 2600 a. C., egípcias e gregas (CHEN *et al.* 2017), através de fósseis, há cerca de 60 mil anos e continua desempenhando um importante papel na terapêutica (YUAN *et al.*, 2016). O uso da papoula (*Papaver somniferum*), é exemplo, sendo descrito por mais de 4000 anos (KHAN, 2014; DUTRA *et al.*, 2016).

No Antigo Egito, Mesopotâmia, Creta, México e China, foram identificadas várias espécies de cunho medicinal em Jardins reais, e a escrita dos textos sobre elas transmitiram conhecimentos por gerações (GEORGE *et al.*, 2016). Os estudos botânicos detectaram a existência mundial superior a 3000 espécies vegetais detentoras de propriedades terapêuticas, indicadas (SOUZA *et al.*, 2016; TARIQ *et al.*, 2017) pela potencialidade de demonstrar efeitos adversos diminuídos (AHMAD *et al.*, 2017).

O Brasil contabiliza 45.000 espécies de plantas, movimenta o mercado de fitoterápicos e detém em torno de 20-22% da biodiversidade do planeta (DUTRA *et al.*, 2016). A estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o uso da medicina tradicional ou fitoterápica direta ou indireta, pela população mundial, gira em torno de 80%, para tratar enfermidades (PATEL *et al.*, 2018; FATIMA, KANWAL; MAHMOOD, 2018).

Há mais de quatro décadas, 74% de substâncias advindas de extratos naturais ou seus derivados, são utilizadas no combate ao câncer (PYE *et al.*, 2017). Nos últimos anos, as plantas medicinais têm chamado atenção e são foco de pesquisa pela diversidade química, biológica e farmacológica, para a obtenção de produtos inovadores, eficazes, com pouco impacto colateral por apresentarem atividades e propriedades terapêuticas comprovadas, designadas para tratar várias enfermidades

(CASANOVA; COSTA, 2017; RIBEIRO et al., 2018; YANG et al., 2017; NEWMAN; CRAGG, 2020).

Neste sentido existe macro interesse para descobrir compostos com seletividade elevada em células-alvo, que subsidiem a produções de novos fármacos (CARVALHO et al., 2019). Sendo assim, as plantas são utilizadas como tratamento alternativo, uma vez que, de acordo com os relatos em literatura possuem a capacidade de aumentar a concentração das caspases iniciadoras (8 e 9), clivando tanto as pró-formas nativas de caspases, como a concentração de caspases efetoras (3) que clivam os demais substratos, sequenciando uma cascata apoptótica (RODRIGUES, BERTOLIN, FUCASE et al., 2017).

há grande interesse na descoberta e identificação de compostos eficazes com baixos custos de produção e alta seletividade de células-alvo e que venha a servir de base no desenvolvimento de novos medicamentos (

Os pesquisadores asseguram ser extramamente importante identificar compostos existentes nas plantas com potencial efeito antineoplásico, que diminuam as ações tumorais (ABU-DARWISH, EFFERTH, 2018; ALVAREZ et al., 2021), além de possibilitarem o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento e/ou cura do câncer, frente a tecnologia, variedade de pontos estratégicos e disponibilidade de métodos (HARVEY et al., 2015; MOLIN, et al., 2015; AHMAD et al., 2017). Visto que, 1/3 dos medicamentos utilizados usualmente são provenientes de recursos naturais baseadas em plantas medicinais. Em se tratando dos antineoplásicos, os constituintes relevantes das plantas em mais de 60% como: aldeídos, alcalóides, flavonóides, glicósídeos, terpenoides e compostos fenólicos favorecem o desenvolvimento de medicamentos com ações anticancerígenas e antitumorais (ALEEBRAHIM-DEHKORDY et al., 2017; BUYEL, 2018; KARMAHAPATRA et al., 2018).

Os alcalóides e os taninos, são metabólitos secundários presentes nas partes aéreas da espécie *Catharanthus roseus*, na qual foram identificados mais de 100 compostos. Esses alcaloides são chamados de alcaloides vinca (vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina (semi-sintética) e vinflunina), sendo usados no combate ao câncer e promoveram importante impacto terapêutico e econômico (QU et al., 2019). Os metabólitos secundários estão presentes em abundância nas plantas, seus benefícios são promissores nos ensaios biológicos (LEE et al., 2018), por exemplo, as saponinas, triterpenos e polissacarídeos vêm se destacando em várias pesquisas, por apresentarem atividade antitumoral e propriedades que regulam as

funções do sistema imunológico, apoptose, autofagia e inibição proliferativa da célula (RAYAN; RAIYN; FALAH, 2017).

Esses metabólitos possibilitaram a descoberta de fármacos para tratar algumas neoplasias como por exemplo, os derivados da podofilotoxina, procedidos de rizomas de *Podophyllum peltatum* e *P. hexandrum*; os oriundos da camptotecina, obtidos da *Campotheca acuminata*; o taxol e o docetaxol extraídos de *Taxus brevifolia* e *T. baccata* (CHU; RUBIN, 2018).

O Taxol produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* foi aprovado clinicamente em 2005, após o isolamento dos compostos demonstrarem a capacidade de regredir o câncer de mama e ovário, resistentes ao tratamento convencional. Esse fármaco age despolimerizando os microtúbulos bloqueando-os (LIU et al., 2016; CHU; RUBIN, 2018).

A partir dos extratos obtidos de plantas medicinais, foram detectados vários constituintes ou moléculas relevantes, por conterem atividades biológicas dos compostos bioativos de suma importância, os quais são utilizados como coadjuvantes eficazes na terapia anticâncer, devido atuação através de diversos mecanismos (VIEIRA et al., 2017; AQIL et al., 2019; NGUYEN; SCARLETT, 2019), possuem também potentes inibidores da supressão de anfigênese, proliferação celular, indutores de apoptose e ainda retardam o processo de metástase (IJAZ et al., 2018), dessa maneira serão destacados por serem de fonte segura com capacidade de originar compostos altamente eficazes (VIEIRA et al., 2017).

Dessa forma, os produtos naturais obtidos de vegetais estão sendo potencialmente utilizados no tratamento do câncer em diversos lugares do mundo são: *Glycyrrhiza glabra*, *Uncaria tomentosa*, *Camellia sinensis*, *Panax ginseng*, *Prunus armenica*, *Allium sativum*, *Arctium lappa* e *Curcuma*, sendo que, as folhas são as partes aéreas mais estudadas (BARAYA, 2016).

Em uma revisão de literatura foi identificado que as substâncias: epicatequina, lupeol, ácido cafeico, ácido ursólico e berberina demonstraram ação antiproliferativa, aumento de proteínas pró-apoptóticas e redução de fatores que favorecem as células tumorais a sofrerem metástase, conforme ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstrando seus potenciais antineoplásicos (FEITOZA, et al., 2021).

O composto berberina (alcaloide benzilisoquinolina), foi avaliada contra células do câncer de mama, apresentou eficazmente a sensibilização das células ao uso do antineoplásico (cisplatina), ativando os fatores pró-apoptóticos, que tem

relação com o aumento da caspase 9, responsável pela fase inicial de apoptose (AL-DABBAGH; ELHATY; AL HROUT et al., 2018). Esse composto pode ser indicado para pacientes com câncer em metástase por sua ação em potencializar os efeitos exercidos pelos medicamentos antimetastáticos, podendo então ser indicado como terapia coadjuvante ao tratamento clínico (KOOTI, SERVATYARI, BEHZADIFAR et al., 2017).

A curcumina apresenta capacidade de inibir o NF- κ B (fator nuclear Kappa β), caracterizando-se como potente agente anticâncer. Esse complexo proteico responde à estímulos de estresse e sua desregulação tem ligação com o desenvolvimento de tumores (KUETE, NGNINTEDO, FOTSO et al., 2018).

Nesse sentido, a busca por novas drogas que atuem de forma segura, eficaz, com baixa toxicidade e diminuição de efeitos adversos, são de grande relevância para a terapia convencional do câncer no que tange a baixa adesão dos pacientes (SRIVASTAVA et al., 2016).

Diante do exposto, uma hortaliça condimentar que faz parte da família Asteraceae. o jambu (*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen), originário da Amazônia (SAMPAIO et al., 2020; LALCHHANDAMA et al., 2020), vem despertando interesse dos cientistas por ter como característica uma fonte enriquecedora de compostos ativos, possui uma fonte riquíssima de componentes terapêuticos, caracterizando-o em uma planta medicinal de cunho científico de grande relevância (PRACHAYASITTIKUL et al., 2013; PAULRAJ et al., 2013).

3.2.2 *Acmella oleracea*

É uma planta herbácea anual do tipo C₃, tem origem na América do Sul, perene, ramificada, semiereta ou quase rasteira multiplicando-se através das sementes ou hastes enraizadas, atinge cerca de 32 a 60 cm, sua raiz adventícia, possui inúmeras ramificações laterais (pivotante) (SAVADI et al., 2010). As folhas encontram-se opostas, ovais, membranáceas e pecioladas, contendo bordas irregulares, de origem simplificada. O caule tem um aspecto cilíndrico, polposos e os ramos são inclinados; as flores amarelas, pequenas, têm a ponta avermelhada, com formato de cúpula e sépalas bem dispostas, identificadas em áreas púrpuras na pálea do cálice, circundadas por pequenas pétalas, dispostas em capítulos de forma globosa e terminal (FAVORETO; GILBERT, 2010; UTHPALA, 2020).

O teor de água é elevado nas inflorescências dessa planta, caracterizando a umidade entre 10,07% e 20% e a massa 1,61% e 7,52%, concomitantemente. Dessa forma a umidade é um fator considerado como parâmetro de grande influência na extração de alquilamidas lipofílicas pelo seu alto rendimento (BARBOSA et al., 2016; DIAS et. al., 2017).

No Brasil, mais precisamente na Região Norte a *Acmella oleracea* (*Spilanthes oleracea*; *Spilanthes acmella* var. *oleracea*) é conhecida popularmente como jambú (Figura 8), “botão-de-ouro”, “abecedária”, “mastruço” (DI STASI, 2002), “jaguaçú”, “erva-maluca” e “jagurama” (LORENZI, MATOS, 2002), “agrião bravo” ou “agrião do Pará”, agrião de Brasil, agrião do Norte, jambuaçú, planta louca, jaburama e planta da dor de dente. Após ingestão de folhas e flores sente-se um leve formigamento e dormência da língua. São consumidas estado do Pará, em pratos tradicionais e típicos da gastronomia da região, como tacacá, tucupi, arroz paraense, pizzas (NASCIMENTO et al., 2013; BORGES et al., 2014; TANIA et al., 2015; ROCHA et al., 2018). Compõem também saladas cruas, sopas, aperitivos japoneses, (DIAS et al., 2012; LENG et al., 2011), pato no tucupi, pastéis, cervejas e cachaças (HOMMA et al., 2014).

Figura 8: Partes aéreas compostas por folhas e inflorescências de *A. oleracea* (L). R. K. Jansen



Fonte: MARTINS, (2021).

A *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen possui as seguintes sinônimas: *Spilanthus oleracea* L., *Spilanthus acmella* var *oleracea* (L.) C.B. Clarke ex Hook. F., *Spilanthus oleracea fusca* (Lam.) DC., *Bidens fervida* Lam., *Bidens fusca* Lam., *Cotula pyretharia* L., *Isocar. pa pyretharia* (L.) Cass, *Pyrethrum spilanthus* Medik (LORENZI; MATOS, 2008). *Spilanthus acmella* L. Murray (PAULRAJ et al., 2013).

Desenvolve-se com muita facilidade em clima quente e úmido, distribuída nos trópicos e subtropicais ao norte da África, Austrália Índia e Sri Lanka (LIM, 2016), apresentando relevantes características químicas (TANIA et al., 2015).

3.2.2.1 Composição Química

Na composição química do jambú foram identificados constituintes, em várias partes da planta, reportados na literatura ao longo de anos de investigação conforme o quadro 4.

Quadro 4. Constituintes e partes da planta

Constituintes	Parte da planta	Referência
ácido sílico	-	Dubey et al., (2013).
alquilamidas (espilantol)	partes aéreas	Cheng et al., (2015); Neves et al., 2018).
aminoácidos, ácidos orgânicos, ácido redutor, fenóis, alcalóides, heterosídeos, proteínas, e Triterpenos	Folhas	Pinheiro, (2016).
carotenóides	folhas, flores e caule	Da Silva Borges et al., (2016).
compostos fenólicos	Folhas	Borges et al., (2015); Pinheiro, (2016).
cumarina (escopoletina)		Barbosa et al., (2016).
alcalóides, glicosídeos, esteróides, flavonóides, saponinas e taninos.	folhas, flores e caule	Pinheiro, (2016).
alcalóides	folhas, flores e caule	(Romão et al., 2015).
flavonóides	Flores	(Navarro-Gonzáles et al., (2014).

óleos voláteis (β -cariofileno, limoneno e timol), fenólicos (ácido vanílico e ácido trans-ferulico), fitoesteróis (estigmasterol e β -sitosterol), polissacarídeos (ramnogalacturonana), ácido 3-acetilauritólico, β -sitostenona e outras alquilamidas.	flores, folhas e caules	Prachayasittikul et al., (2013); Nascimento et al., (2013); Spelman et al., (2011).
microminerais: boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe) e zinco (Zn), além dos macrominerais: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S).	Folhas	Borges; Goto; Lima, (2013).
terpenóides e alquilamidas	folhas e flores	Paulraj et al., (2013); Dallazen, (2020).
trans-cariofileno, D-germacreno, L-dodeceno e espatulenol	folhas, flores e caule	Da Silva Borges et al., (2016); Yamane et al., (2016).

Fonte: MARTINS, (2021).

Outros compostos metabólicos foram identificados recentemente como quercetina -O-(O-di-acetilglucopiranosil-ramnopiranosídico), 6-hidroxi-N-isobutiloct-2-en-7-inamida, N-isobutildeca-2,8-dien-6-inamida, quercetina-O-(glicopiranosil-O-acetil-glucopiranosídeo) (suposta nova quercetina) e o seu derivado quercetina - O (glicopiranosil-O-acetil-glicopiranosídeo) (NASCIMENTO, 2019).

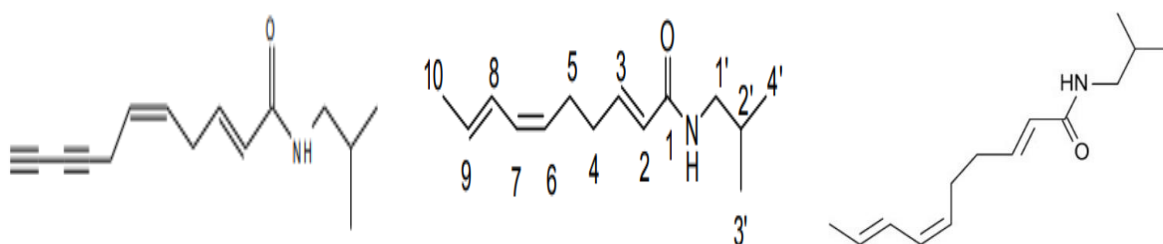
3.2.2.2 Espilantol

O epilantol tem aspecto de óleo amarelado, viscoso, ardente (RAMSEWAK et al., 1999), foi encontrado primeiramente por Gerber em 1903 é semelhante à afinina 1, existe amplamente nas partes aéreas das plantas, como folhas, flores, caule (SIMAS et al., 2013; PAULRAJ et al., 2013; PRACHAYASITTIKUL et al., 2013; NEVES et al., 2018; DALLAZEN et al., 2020; LALTHANPUII, LALCHHANDAMA, 2020), além das raízes (BARBOSA et al., 2016; JOSHI et al., 2020). A afinina causa pungência,

dormência na língua, formigamento e água na boca, caracterizando os efeitos sensoriais (RIOS; OLIVO, 2014; GREGER, 2015).

O espilantol é o composto bioativo promotor das atividades farmacológicas da *A. oleracea* (BARBOSA et al., 2016; SOARES et al., 2014; PRACHAYASITTIKUL et al., 2013) e constituinte principal das alquilamidas (2E,5Z)-N-isobutil-undeca-2,5-dieno-8,10-diinamida (Figura 9a) (CHENG et al., 2015), encontrado em plantas da família Solanaceae e Piperaceae, responsável pelas ações biológicas do extrato destas espécies (ALONSO, 2016). De acordo com os autores Veryser et al. (2015) e Benelli et al. (2019), as isobutilamidas são representadas principalmente pela N-isobutilamida [(2E, 6Z, 8E) – N-isobutil – 2,6,8 - decatrienamida] (Figura 9b, 9c) (GREGER, 2015; BARBOSA et al., 2016a), nomenclatura IUPAC, fórmula molecular C₁₄H₂₃NO, 221,339 g/mol é uma alcamida alifática (Figura 9d) (PRACHAYASITTIKUL et al., 2013).

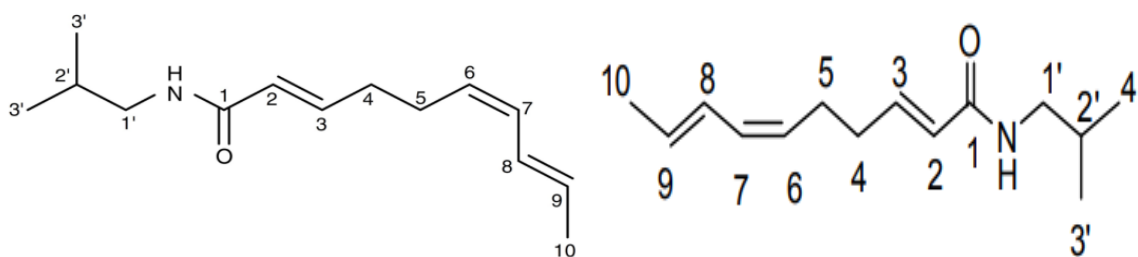
Figura 9: Estrutura química do espilantol



Fonte: a) CHENG et al., 2015

b) GREGER, 2015

c) BARBOSA et al., 2016a.



Fonte: d) PRACHAYASITTIKUL et.al., 2013

e) BOONEN, et al., 2010

As alquilamidas ou alcamidas podem ser encontradas em *Anacyclus*, *Echinacea* e *Heliopsis*, plantas dos gêneros da família Asteraceae pertencentes ao gênero *Zanthoxylum* da família Rutaceae (GREGER, 2016).

Na família Asteraceae as alquilamidas compreendem as frações de bases, que se ligam por meio de uma função amida (alcamidas olefínicas) à um ácido graxo com cadeia lateral C₈ a C₁₈: isobutilamina, sec-butilamina e fenetilamina, decorrentes

respectivamente da biossíntese de valina, isoleucina e fenilalanina (GREGER, 2016; RIOS, 2012). A isobutilamida espilantol representa a série C₁₀ na tribo Heliantheae (SILVEIRA et al., 2016).

As N-Alquilamidas (NAAs), são constituídas largamente por metabólitos secundários existentes nos vegetais, os quais possuem atividades farmacológicas utilizadas amplamente pelas indústrias farmacêuticas. O gênero *Spilanthes* é uma fonte potencialmente rica de NAAs (SHARMA, ARUMUGAM, 2021).

Os Extratos obtidos de planta da família Asteraceae com espilantol em sua composição química evidenciaram ações antioxidante, antiinflamatória e antimicrobiana (JAFARINIA; JAFARINIA, 2019).

3.2.2.2.1 Ações biológicas e farmacológicas do Espilantol

Várias pesquisas vêm sendo feito com a espécie *A. oleracea* e foram identificadas diversas substâncias com ações biológicas e farmacológicas, já descritas por vários pesquisadores, demonstrados no quadro 5:

Quadro 5: Ações biológicas e farmacológicas do espilantol

Atividades biológicas	Referências
Acaricida	Cruz et al., (2016); Oliveira et al., (2016); Anholeto et al., (2017).
Analgésico	Rios; Olivo, (2014); Dandin et al., (2014).
Analgesia oral	Hajdu, (2014).
Anestésico	De Freitas-Blanco et al., (2016); Moro et al., (2021), Rondanelli et al., (2020).
Antiartrítica	Escobedo-Martinez et al., (2017).
Antibacteriana	Alcantara et al., (2015); Franca et al., (2016).
Anticancerígena	Soares et al., (2014; Mishra et al., (2015).
Anticonvulsivante, antineoplásica, vasorelaxante, antivírus da imunodeficiência humana	Barbosa et al., (2016).
Antifúngico, endocanabinóides	Veryser et al., (2014).

Anti-helmíntico	Lalthanpuii, Lalchhandama, (2020).
Anti-inflamatória	Cho et al., (2017); Blanco et al., (2018); Huang et al.. (2018); Kim et al., (2018).
Antimicrobiana	Borges et al., (2016); Farias et al., (2019).
Antimutagênico	(Arriaga-alba; Rios; Déciga-campos, 2013).
Antinoceptivo	Dallazen et al., (2018).
Antioxidante	(Nabi, Shrivastava, 2016).
Antipirético	(Bakondi et al., 2019, Cho et al., 2017).
Anti-rugas substituindo as aplicações de Botox	(Veryser et al., 2014).
Antitérmico, anti-obesidade, diurético	Ferreira et al.; (2014); Cheng et al., (2015).
Antitumoral	Soares et al., (2014).
Bacteriostático	Barbosa et al., (2015).
Cicatrizante para os cães	Porsani et al., (2016).
Citotóxica	Franca et al., (2016); Kavya, Pattar (2016)
Controlar tecido adiposo visceral e também o peso do corpo	(Huang et al., 2019b).
Controle biológico	Oliveira et al., (2018).
Dermatite atópica com ruptura da barreira da pele	Huang et al, (2019).
Doenças bucais, garganta, reumatismo, anemia e gripe	Neves et al., (2018).
Escorbuto, dispepsia, cálculos renais, problemas hepáticos	Rodrigues et al., (2014).
Estimulante sexual e afrodisíaco	Sharma, Arumugam, (2021); Rocha et al., (2018).
Inibidora da enzima tirosinase e da lipase pancreática	Barbosa et al., (2016).
Inseticidas	Lalthanpuii et al., (2017); Benelli et al. (2019).
Larvicida	Araújo et al., (2018).

Pronociceptivo	Gulledge et al., (2018).
Neuroproteção	Suwanjang et al., (2017); Wilasinee et al., (2017).
Tratamento para gatos obstruídos	Trevisan et al., (2016).
Tuberculose	Prachayasittikul, et al. (2013).
Vasodilatador	Castro-Ruiz et al., (2017).

Fonte: MARTINS, (2021).

A atividade antimutagênica do espilantol foi demonstrada por Arriaga-Alba e colaboradores (2013), através de sua capacidade de diminuir as mutações em 40% por meio da indução de 2-aminoantraceno (2AA) e reduzir em 50% o dano oxidativo ao DNA causado por norfloxacino, nas cepas TA98 e TA102 de *Salmonella typhimurium*.

Utilizado também como matéria-prima de creme antirrugas para substituir a toxina botulínica, produtos antienvhecimento, constituindo relaxamento da microtensão da pele do rosto, prevenção de alisamentos e radicais livres (BORGES et al., 2016). Essas propriedades são subsequentes do conteúdo endógeno, constituintes bioativos, como esteróis, cumarinas, flavonóides, saponinas, terpenóides, polissacarídeos e principalmente as alquilamidas (PRACHAYASITTIKUL et al., 2013; DALLAZEN et al., 2020).

Boonen et al. (2010), Veryser e seus colaboradores (2014), identificaram que o espilantol apresentou capacidade de absorver cafeína, testosterona e ibuprofeno pela derme de forma dose-dependente e ainda de permeabilizar a barreira hematoencefálica, a pele, além das mucosas oral e intestinal (DE FREITAS-BLANCO et al., 2016). A administração oral do espilantol promoveu absorção intestinal em ratos, demonstrado através de experimentos *in vitro* e *in vivo* com células Caco-2 (VERYSER et al., 2016).

Dallazen e seus colaboradores (2020), através de ensaios, defenderam que uma determinada fração de extrato de folha de jambu, administrada intraplantar resultou em efeitos antinociceptivos na dor aguda, além de bloquear a degranulação de mastócitos.

A geração de Óxido Nítrico (NO), inchaço e infiltração do tecido celular no teste da formalina, foi inibida pela administração do extrato da *A. oleracea* ou espilantol, sem efeito tóxico renal e hepático, comprovando de forma significativa sua atividade (STEIN et al., 2021).

Lemos e seus colaboradores (2021), identificaram que apesar de não ter ocorrido mudanças significativas nos ensaios de cito e genotoxicidade, quando foi testado a maior concentração do espilantol, ainda assim pode ser utilizado. Além disso, outras vias de bloqueio da expressão de TNF e substrato para as isoformas da COX, alusivas a potência do espilantol na ação anti-inflamatória, foram observadas na realização de ensaios *in silico*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi autorizado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), sob n. A7C63F0, no SISGEN (ANEXO I).

4.2 LOCAL DA PESQUISA

Inicialmente, a pesquisa foi desenvolvida nos Laboratórios de Biotransformação e Catálise Aplicada e de Absorção Atômica e Bioprospecção, para a realização do Extratos Hidroetanólico Bruto, localizados, respectivamente, nos Blocos L e N da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). O fracionamento do extrato foi realizado no Trinity Biomedical Sciences Institute (TBSI) (Trinity College Dublin, Irlanda). A caracterização química do extrato e isolamento do espilantol foram realizados no Laboratório Multusuário de Caracterização e Análise (LMCA) e os ensaios *in vitro* para avaliar a atividade antitumoral no Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar), ambos localizados no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.3 MATERIAL

4.3.1 Material Vegetal

O material vegetal fresco (folhas e flores) da *Acmella oleracea* (Figura 10) foi coletado no Município de Belém, Estado do Pará (PA), na localidade 141° SE 48°

23' 36" / 214° SO 48° 23' 36" e uma exsicata foi depositada no Herbário Botânico da EMBRAPA do Estado do Pará para identificação botânica, sob o registro IAN 197967 (ANEXO II). Esta etapa foi auxiliada, gentilmente, pelo Dr. Geilson Alcantara da Silva (UFPA).

Figura 10 - Folhas e inflorescências de *Acmella oleracea*



Fonte: MARTINS, (2021).

4.3.2 Amostras para teste

EHIAo – Extrato Hidroetanólico das Inflorescências de *Acmella oleracea*

EHFAo – Extrato Hidroetanólico das Folhas de *Acmella oleracea*

Espilantol – Composto isolado da fração 9 (fórmula molecular: $C_{14}H_{23}NO$; PM: 221.344 g·mol⁻¹, PE: 162 °C)

4.3.3 Linhagens de células tumorais e não tumoral

As Linhagens humanas, tumoral e não tumoral (linhagens HeLa, MDA-MB 231, SK-MEL-28, HCT-116 e HaCaT) foram provenientes do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) e a linhagem MCF-7 (Quadro 6) do Instituto Nacional do Câncer, Frederick, MA, EUA. Essas linhagens foram mantidas em meio complemento *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 ou *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) (Sigma

Aldrich, St. Louis, MO, EUA), com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) inativado (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO).

A criopreservação foi realizada em Galão de Nitrogênio líquido no Laboratório OncoFar até a realização dos descongelamentos. Para os ensaios *in vitro* de atividade antitumoral foram utilizadas linhagens de células tumorais humanas (HCT-116, HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, SK-MEL 28) e, para a avaliação de citotoxicidade, utilizou-se linhagem não tumoral humana (HaCaT).

Quadro 6: Origem histológica das linhagens humanas tumoral e não tumoral e meios de cultivo para manutenção.

Linhagem	Meio de cultura	Tipo histopatológico
HeLa	DMEM alta glicose + aminoácidos	Colo de útero
MCF-7	DMEM baixa glicose	Adenocarcinoma de mama
MDA-MB 231	DMEM alta glicose	Adenocarcinoma de mama (TNBC)
HCT-116	RPMI	Carcinoma colorretal
SK-MEL-28	DMEM baixa glicose	Melanoma
HaCaT	DMEM alta glicose	Queratinócito humano (não tumoral)

Fonte: MARTINS, (2021).

4.4 MÉTODOS

4.4.1 Preparo do extrato hidroetanólico de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (EHAo)

As folhas e as inflorescências frescas de *A. oleracea* foram selecionadas e colocadas para secar sob temperatura ambiente por dez dias. Após este período realizou-se a pesagem de ambos, triturados até adquirirem um pó de fina granulação. Em seguida foram colocados para macerar em álcool etílico (95%) por dez dias à 25°C (BARBOSA; TAVARES, 2001). Logo após realizado filtração com auxílio de funil de separação e submetidos a evaporação rotativa sob vácuo e pressão reduzida em rotaevaporador (Quimis Model Q 218.2), à temperatura de 50°C adaptado da metodologia descrita por Araújo et al. (2018). Posteriormente, os extratos foram devidamente identificados e colocados em estufa (Quimis Model Q316M5).

4.4.2 Caracterização do EHIAo por cromatografia líquida (CLAE-ESI-MSⁿ)

4.4.2.1 Instrumentação e condições de análise

Um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho Shimadzu® (Kyoto, Japão), acoplado a um Amazon X (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) com uma fonte de íons de eletrospray (ESI), foi usado para realizar o ESI-IT-MS/MS análise. O Sistema LC consistia em uma unidade de bomba de solvente LC-20AD (vazão de 600 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$); um desgaseificador online DGU-20A5; um controlador de sistema CBM-20A e um detector de matriz de diodo SPD-M20A (190-800 nm). A separação por LC foi realizada em uma coluna analítica Kromasil C-18 5 μm 100Å, 250 x 4,6 mm (Kromasil, Bohus, Suécia). As injeções (20 μL) foram realizadas com um amostrador automático (SIL-20A).

A fase móvel consistia em 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e metanol (solvente B). O gradiente exploratório foi realizado para eluição em 60 minutos. Os parâmetros de análise são os seguintes: capilar 4,5 kV, ESI em modo positivo, deslocamento da placa final 500 V, nebulizador de 40 psi, gás seco (N₂) com vazão de 8 mL/min e temperatura de 300 °C. A fragmentação do CID foi obtida no modo MS/MS automático usando o modo de resolução avançado para o modo MS e MS/MS. Os espectros (m/z 50–1200) foram registrados a cada dois segundos.

4.4.3 Fracionamento do EHIAo - Cromatografia contracorrente (CCC)

A Cromatografia contracorrente (CCC) é uma técnica em que ocorre a separação através da partição da amostra em sistema líquido-líquido, não envolvendo fase sólida. Sendo que os líquidos imiscíveis provenientes das misturas de solventes constituem a fase estacionária (FE) e a fase móvel (FM). Os solutos da amostra são relativamente proporcionais aos coeficientes de partição (MARSTON, HOSTETTMANN, 2006). Nesta pesquisa, a Cromatografia desenvolveu-se em parceria com o Laboratório Trinity College Dublin (TCD), Trinity Biomedical Sciences Institute (TBSI) – Dublin, Irlanda.

4.4.3.1 Equipamento e Condições de análise

Os fracionamentos de Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC) foram realizados na bobina de 98 ml de um cromatógrafo de contra-corrente

Quattro HT-Prep (AECS, Bridgend, Reino Unido) equipado com duas bobinas contendo multicamadas de politetrafluoroetileno cada (bobina 1 - contém os de 26 ml e os de 224 ml, possuem bobinas de 1,0 mm e 3,2 mm de diâmetro interno, respectivamente; a bobina 2 contém as bobinas de 95 ml e 98 ml, ambas de 2,0 mm de diâmetro interno). A velocidade de rotação e Alta Velocidade é ajustável até 865 rpm.

Os sistemas HSCCC foram conectados a uma bomba de fluxo constante Jasco PU-2089S Plus (Japan Spectroscopic Corporation, Japan). Um loop de amostra de 5 ml (válvula de injeção de amostra de baixa pressão, Modelo 5020, Rheodyne) foi usado para injetar a amostra. As separações foram realizadas em temperatura ambiente.

4.4.3.2 Preparação do sistema de solvente de duas fases e amostras para injeção

O sistema de solventes selecionado (Hexano: Metanol: Água 4: 3: 1) foi perfeitamente equilibrado por meio de funil de separação em temperatura ambiente. As duas fases foram separadas pouco antes do uso e desgaseificadas através de sonicação por 5 min. As soluções de amostra foram preparadas dissolvendo a amostra (ca. 1,4325 g do extrato) na mistura de solventes de 2,5 ml de fase estacionária e 2,5 ml de fase móvel do sistema de solventes usado para a separação HSCCC.

Alíquotas iguais de cada fase foram colocadas lado a lado em placas de sílica gel de TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Sigma-Aldrich) desenvolvidas com o sistema de solvente clorofórmio: metanol: água (9: 1: 1). Os resultados foram visualizados sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) seguido de pulverização de placas de TLC com vanilina (2% em metanol) e ácido sulfúrico (1% em metanol).

4.4.3.3 Procedimento de separação HSCCC (Técnica de cromatografia de partição líquido- líquido sem suporte)

Após a desgaseificação do sistema de solvente em ultra-som (5 min), o aparelho CCC foi primeiramente preenchido com a fase estacionária (fase orgânica). Em seguida, iniciou-se a rotação (850 rpm) e a fase móvel (fase aquosa) do sistema selecionado foi bombeada com fluxo constante de 2 mL/min. Observou-se uma retenção de fase estacionária de 87%. Quando as fases entraram em equilíbrio, 1,43g

de extrato hidroetanólico das inflorescências de *Acmella oleracea* (EHIAo) foi dissolvido em 36 mL de ambas as fases do sistema (1:1; v/v) e injetado através de uma válvula de injeção, no CCC. Frações de 4 mL foram coletadas com auxílio de um coletor de frações.

4.4.4 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD), separa os componentes de uma mistura, da fase móvel pela estacionária, distribuindo-os de maneira diferente em que cada um deles sofre retenção seletiva, promovendo migrações diferentes (COLLINS, PIEIRINA, 1997).

As 80 frações resultantes da separação foram reunidas de acordo com o seu comportamento cromatográfico em CCD. As frações 1 (1-9), 2(10-19), 3 (20-13), 4 (14-18), 5 (19-24), 6 (25-28), 7 (29-50), 8 (51-69), 9 (70-80) e 10 (lavagem) foram agregadas, após completa volatilização do solvente, apresentaram cristais amarelos amorfos que totalizaram um peso de 3,16mg, no entanto, a massa da fração 9 correspondeu a 2,05mg, chamando atenção para identificação desta substância.

4.4.5 Análise do perfil químico das frações por CLAE-IES-EMⁿ

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada em parceria com o Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises – LMCA da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e adaptada de Castro et al. (2014), em que das 10 frações obtidas, a fração 9 foi analisada por CLAE da marca Shimadzu®, por meio da coluna cromatográfica analítica C18 (Kromasil - 250 mm x 4,6 mm x 5 µm), acoplado a espectrômetro de massas (Ion-Trap AmazonX, Bruker), com Ionização por Eletrospray.

Para realização da análise, as amostras foram solubilizadas em metanol (1mg/mL), com posterior filtração em filtros PVDF (Fluoreto de Polivinilideno), usando malha de 0,45 µm. O método cromatográfico desenvolvido utilizou os solventes metanol (solvente B) de grau cromatográfico e água ultrapura tipo I (Mili-Q), acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) (solvente A), com análise em gradiente de concentração

(5 a 100% de B em 95 minutos). O volume de injeção foi de 10 µL e taxa de fluxo foi de 0,6 mL/minuto.

No espectrômetro de massas (EMⁿ), as amostras foram submetidas a uma fragmentação sequencial em EM³. Os parâmetros utilizados foram: capilar 4,5 kV, *offset* da placa final 500 V, gás nebulizador 35 psi, gás seco (N₂) com fluxo de 8 mL/minuto e temperatura de 300 °C. A amostra foi analisada no modo de ionização negativo e a tentativa de identificação dos compostos foi baseada nos dados (EMⁿ) reportados pela literatura.

4.4.5.1 Isolamento do espilantol

Foi realizada o fracionamento cromatográfico da fração 9 em CLAE preparativa (YMC-Actus Triart C18), utilizado os solventes metanol (solvente B) de grau cromatográfico (Biograde) e água ultrapura tipo I (Mili-Q) (solvente A). A análise foi realizada em sistema gradiente de concentração: 60 a 72% de B em 15 minutos, com 72% por 40 minutos e 72% a 100% em 5 minutos, volume de injeção de 200 µL, taxa de fluxo de 8 mL/min e comprimento de onda de 230 nm. Obtendo a subfração SP-1, encontrado no espilantol (figura 9e) em espécies do gênero *Acmella oleracea* (BOONEN et al., 2010), e para confirmação do composto foi realizado posteriormente a Ressonância Magnética Nuclear.

4.4.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos no espectrômetro BRUKER AVANCE III HD, operando a 400 MHz (RMN de ¹H) e 100 MHz (RMN de ¹³C). A subfração SP-1 foi solubilizada em CDCl₃. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz, as multiplicidades no espectro de RMN de ¹H foram indicadas segundo as convenções: sl (simpleto largo), d (dubleto), dd (duplo dubleto), dt (duplo tripleto), dq (duplo quarteto) e m (multiplete).

4.4.7 Manutenção das linhagens de células tumorais e não tumoral

Após o processo de descongelamento e recuperação celular, as mesmas foram cultivadas em frascos de cultivo com o meio específico para cada linhagem, de acordo com as especificações descritas no quadro 4. Cada meio de cultura foi suplementado com 10-20% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Todas as linhagens foram incubadas em estufa (Panasonic®,

modelo MCO-18 ACL) sob temperatura de 37°C, em uma atmosfera de ar umidificado contendo 5% de CO₂.

Usualmente a cada 48h, o crescimento celular das linhagens era observado em microscópio invertido (Nikon®, modelo TS 100) para avaliação de viabilidade celular e troca de meio. Ao atingirem 80% de confluência realizava-se os repiques das células aderentes. Este procedimento consistia na adição 2 mL de solução de tripsina (Sigma Aldrich), por 5-7 minutos em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, para o deslocamento da monocamada das células aderidas na parede do frasco. Após esse período, o meio de cultivo suplementado com SBF era adicionado, na mesma proporção de tripsina, para neutralizar e interromper a ação enzimática. Posteriormente, as células eram centrifugadas a 500 g por 5 minutos e os pellets ressuspensos em meio suplementado com SBF.

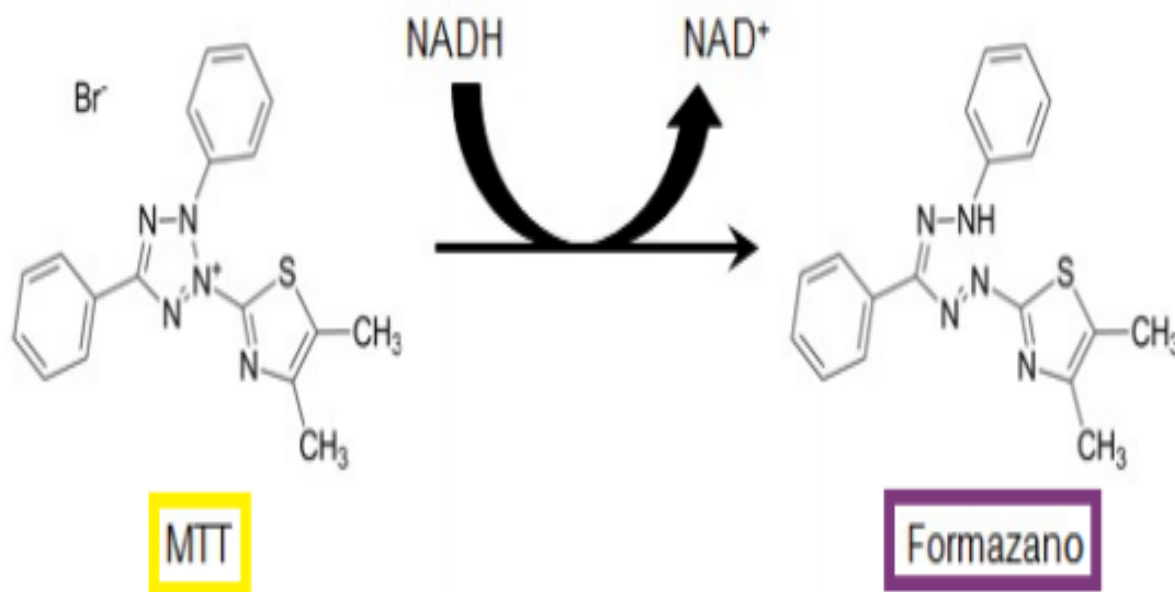
Os frascos de cultivos de 250 ou 500 mL eram lavados com tampão PBS (phosphate buffered saline). A viabilidade celular era, usualmente, avaliada em câmara de Neubauer utilizando o corante azul de Tripán (Sigma Aldrich), seguido da contagem celular para ajuste da concentração (5×10^4 células/mL) nos frascos de cultivo celular (AVELAR-FREITAS, 2014). A manutenção das células, repiques semanais e os experimentos foram realizados em capela de fluxo laminar vertical (Pachane®, Classe IIB2), em condições assépticas, conforme as orientações dos protocolos experimentais (GONÇALVES; SOBRAL, 2020).

4.4.7.1 Ensaios *in vitro* de Avaliação da Atividade Antitumoral

O efeito inibitório do crescimento *in vitro* das linhagens celulares foi determinado pelo método colorimétrico do brometo de 3-(4,5dimetil-tiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomais presentes em células metabolicamente ativas. Assim, este ensaio baseia-se na ação da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, que reage com o MTT, promovendo a diminuição e posteriormente a formação dos cristais de formazan, que é um composto colorido (Figura 11). Uma vez solubilizado, o formazan pode ser quantificado por espectrofotômetro e sua intensidade colorimétrica é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

No entanto, a oxirredutase mitocondrial e não mitocondrial, a aparição de glucose e estresse oxidativo, são fatores que contribuem com o estímulo para uma boa resposta do MTT, ademais as mudanças na endocitose e exocitose do sal de formazan, através da mitocôndria podem seguir afetando a diminuição, proporcionando resultados subestimados (STEPANENKO; DMITRENKO, 2015).

Figura 11: Reação de oxi-redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5- Difeniltetrazólio (MTT) em formazano após a conversão pela enzima succinato desidrogenase



Fonte: Adaptado de RISS et al. (2016).

Para tanto, as células (HeLa, MCF-7, SK-MEL-28, MDA-MB-231, HCT-116 e HaCaT) foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 3×10^5 células/poço. Após um período de 24 horas, necessário para aderência da monocamada de células na placa, as células foram incubadas com os extratos (200 µg/mL) e compostos isolados (50 µM) solubilizados em DMSO. Para o controle negativo utilizou-se apenas o meio de cultivo sem a amostra teste. Para controle positivo utilizou-se o DMSO a 20%. O experimento foi realizado em quadruplicata. Prosseguido o período de incubação de 72h, as placas foram centrifugadas (500 g, 5

minutos, 25 °C), foi removido 110 µL do sobrenadante e 10 µL da solução de MTT foi adicionada (5 mg/mL em PBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

As placas foram incubadas por 3 horas, em seguida foi adicionado 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%. As placas foram mantidas em agitador magnético para dissolução dos cristais de formazan produzidos (*overnight*).

As absorbâncias foram mensuradas em um leitor de microplacas (BioTek Instruments, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA), no comprimento de onda de 570 nm. A viabilidade celular foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{[(\text{Abs teste} - \text{Abs branco}) \times 100]}{\text{Abs controle}}$$

4.4.7.2 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumoral para determinar a CI50

As células foram semeadas em placas de 96 poços (100 µL) na concentração de 3×10^5 células/mL (HCT-116, HeLa, MCF-7 e HaCat). Após 24 horas, as substâncias previamente dissolvidas em DMSO foram incubadas (100 µL) em diferentes concentrações (4,7-300 µg/mL) com a suspensão celular, não ultrapassando a concentração final de 0,5% de DMSO, em uma estufa com 5% de CO₂, a 37°C. A droga padrão utilizada foi a doxorrubicina nas seguintes concentrações (0,31 e 20 µM).

Após o período de incubação (24, 48 ou 72 h), as placas foram centrifugadas (500g, 5 minutos, 25 °C), seguido da remoção de 110 µL do sobrenadante e adição de 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL em PBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) Em sequência, os procedimentos conforme já descrito anteriormente no item 4.4.7. A concentração da substância que produz 50% de inibição no crescimento celular (CI₅₀) foi obtida a partir da realização de três experimentos independentes.

4.4.7.3 Determinação do Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) foi obtido a partir da razão entre a CI_{50} da célula não tumoral pela CI_{50} da célula tumoral (SERAFIM et al., 2018). Valores inferiores a 2 indicam toxicidade não seletiva para as células avaliadas e valores ≥ 2 indicam toxicidade seletiva. Dessa forma, quanto mais elevado for o valor do IS o composto será mais seletivo de acordo com determinadas células (PRITCHETT; NAESENS; MONTOYA, 2014).

$$\text{Índice de Seletividade} = \frac{CI_{50} \text{ Célula Não Tumoral}}{CI_{50} \text{ Célula Tumoral}}$$

4.4.8 Análise estatística

Para a determinação da CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC: 95%), foi realizada a partir de regressão não-linear. Nos demais ensaios, os dados foram analisados a partir da média $\pm$ e.p.m (erro padrão da média) de três experimentos independentes. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguido de Tukey. Os resultados foram calculados usando o Microsoft excel e o software GraphPad Prism 7.0, os quais foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO EHIA₀ POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (CLAE-ESI-MSⁿ)

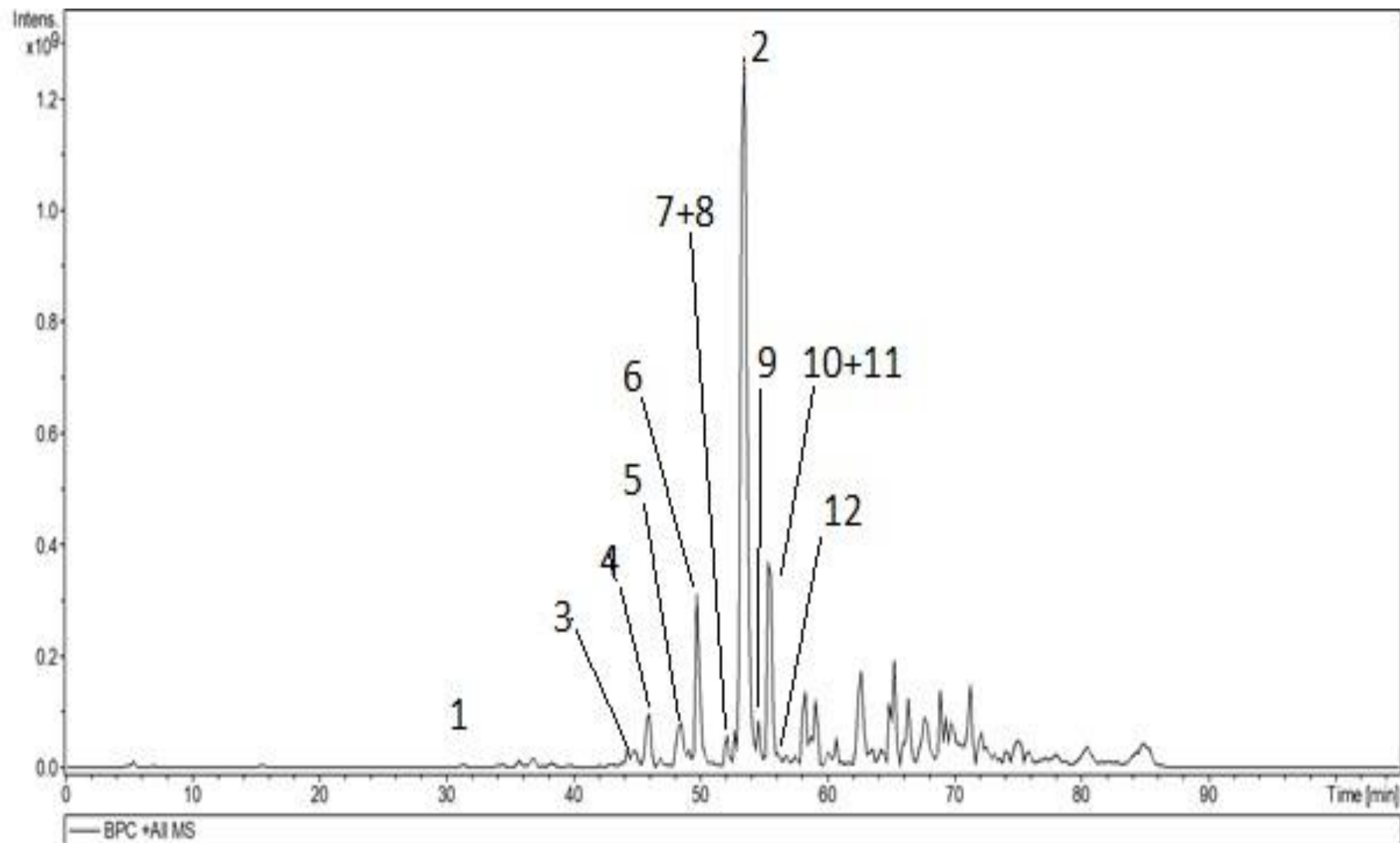
A análise de cromatografia líquida-ESI positiva-espectrometria de massa Tandem (LC-ESI-MSⁿ) demonstrou a predominância de alquilamidas no extrato de *A. oleracea*. A região do cromatograma entre 44 e 57 minutos apresentou vários picos (Figura 12), dos quais 11 foram identificados como alquilamidas (Tabela 1). Um padrão de fragmentação como esperado, sob o pico de base (Rt 53,5), consistente com as características do espilantol foi identificado como composto principal de *A. oleracea*.

A perda do grupo isobutilamida resultou em uma carbocação carregada que representou a cadeia alquila restante (m/z 121). Observou-se um fragmento adicional mais alto (m/z 123), consistente com a insaturação de uma das ligações duplas deste fragmento da cadeia de alquila. Essa insaturação ocorreu pelo processo de fragmentação, dentro do espectrômetro de massa, coincidindo com alquilas, um íon m/z 149 foi identificado como um grupo acila (HISERODT et al., 2004). Ao passo que, Jacobson (1957), observou a perda do grupo isobutllamina, com m/z =149, fragmento $[MH-C_4 H_{11} N]^+$, dessa forma o fragmento com m/z = 99, demonstrou a presença de uma isobutilamida.

Nomura (2013) também detectou o espilantol, como principal N-alquilamida no extrato etanólico de flores de *A. oleracea* utilizando cromatografia líquida de alta

eficiência associada aos detectores de arranjo de fotodiodos (PDA) e espectrômetro de massas (ESI-MS). Foram encontradas apenas 3 alquilamidas com menores tempo de retenção em relação a este estudo: $R_t = 4,64$ min, [(2E,4Z)-N-isobutil-2,4-undecadieno-8,10-diinamida)]; $R_t = 5,15$ min, [(2E,6Z,8E)-Nisobutil-2,6,8-decatrienamida), espilantol] e $R_t = 5,41$ min [(2E,6Z,8E)-N-(2-metilbutil)-2,6,8-decatrienamida)], o que pode ser explicado pela utilização da coluna de fase reversa BEH-C18, com dimensões de 2,1 x 50 mm e tamanho de partícula de 1,7 μm , a uma temperatura de 60 °C. Neste estudo foi utilizado coluna Analítica C18 acoplado ao espectrômetro de massa.

Figura 12 - Cromatografia líquida-ESI positiva-espectrometria de massa (LC-ESI-MSⁿ)



Fonte: MARTINS,(2021).

A purificação do extrato das alquilamidas pode ser submetida pelas Cromatografias: líquida de alta eficiência (CLAE), camada delgada (TLC), ou Flash (BARBOSA et al., 2016a; RONDANELLI et al., 2020).

Cheng et al. (2015), isolou a alquilamida (2E, 5Z)-N-isobutilundeca-2,5-dieno-8,10-diinamida, com mais quatro análogos em extrato das flores de *A. oleracea*. Romão e seus colaboradores (2015), realizaram análise fitoquímica do extrato aquosos das flores e detectaram a presença de flavonoides e alcanoides.

De Moraes (2018), através dos solventes fracionados de acetato de etila e acetato de butanol, encontrou elevada concentração de compostos fenólicos e, principalmente, alquilamidas no extrato aquoso hexânico de raízes da *A. oleracea*, e ainda sob a concentração de 2 mg/mL demonstrou genotoxicidade e citotoxicidade em linhagens HEP-2, através de ensaios *in vitro*.

Traços de Escopoletina, uma hidroxycumarina bioativa também foi encontrada como um pico menor em 31,4 min (Figura 13). As cumarinas são metabólitos secundários relacionados com atividades bioquímicas e farmacológicas (KLOSS et al., 2016). Possuem ação antioxidante (PEREIRA et al., 2016), anticarcinogênica (ZHANG et al., 2012) por induzir a apoptose mediada pela caspase-9 (JAMEEL et al., 2016) e inibe a enzima telomerase (o DNA é acrescentado sequencialmente de maneira específica e repetitiva) (WU, et al., 2014).

Tabela 1. Caracterização dos compostos identificados provisoriamente pelo CLAE-ESI-MSⁿ em *A. oleracea*.

Pico No.	t _R (min.)	λ _{max} (nm)	m/z [M+H] ⁺	MS ² /MS ³	Atribuição Provisória	Referência
1	31.4		192.85	MS ² [193]: 133 / MS ³ [193 → 133]: 105	escopoletina	ZENG et al., 2015 CHANG et al., 2013
2	53.5	232	222.01	MS ² [222]: 149; 123; 121; 100; 93; 81 / MS ³ [222 → 123]: 95; 93; 81; 67	(2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i>)- <i>N</i> -isobutil-2,6,8-decatrienamida (espilanthol)	Bae et al., 2010
3	44.3	258	203.96	MS ² [204]: 148; 105; 103; 79 / MS ³ [204 → 148]: 131; 120; 106; 105; 103; 79	2- <i>N</i> -isobutil-2-noneno-6,8-isômero diinamida 1	Bae et al., 2010
4	46.0	255	203.94	MS ² [204]: 176; 148; 131; 120; 105; 79 / MS ³ [204 → 148]: 131; 120; 106; 105; 103; 79	2- <i>N</i> - isobutil-2-noneno - 6,8-isômero diinamida 2	Bae et al., 2010
5	48.5	256	230.02	MS ² [230]: 174; 131; 129; 91 / MS ³ [230 → 131]: 116; 91	(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i>)- <i>N</i> -isobutil- 2,4-undecadieno-8,10-diinamida	Bae et al., 2010
6	49.7		232.00	MS ² [232]: 176; 159; 133; 131; 105; 91 / MS ³ [232 → 105]: 79	(2 <i>E</i>)- <i>N</i> -isobutil-2-undecene-8,10-diinamida	Bae et al., 2010

7	52.1		246.03	MS ² [232]: 176; 159; 133; 131; 105; 91 / MS ³ [232 → 176]: 159; 148; 131; 105; 91	(2E)-N-(2-metilbutil)-2-undeceno-8,10-diinamida	Bae et al., 2010
8	52.7		258.04	MS ² [258]: 202; 185; 157; 142; 131; 117; 105 / MS ³ [258 → 202]: 185; 174; 161; 160; 157; 143; 133; 121; 129; 117; 110; 105; 91	(2E,7Z)-N-isobutil-2,7-tridecadieno-10,12-diinamida	Bae et al., 2010
9	54.6		224.05	MS ² [224]: 182; 168; 151; 133; 123; 109 / MS ³ [224 → 133]: 105; 91	N-isobutil-2,7- isômero decadienamida 1	Stein et al., 2021
10	55.3		236.05	MS ² [236]: 123; 121 / MS ³ [236 → 123]: 81; 67	(2E,6Z,8E)-N-(2-metilbutil)-2,6,8-decatrienamida	Bae et al., 2010
11	55.7		224.00	MS ² [224]: 182; 168; 154; 151; 133; 123; 109; 100; 83 / MS ³ [224 → 83]: 79; 55	N-isobutil-2,7-isômero decadienamida 2	Stein et al., 2021
12	56.8		248.06	MS ² [248]: 175; 149; 142 / MS ³ [248 → 149]: 107; 93; 81	(2E,4E,8Z,10E)-N-isobutil-dodeca-2,4,8,10-tetraenamida	

Fonte: MARTINS, (2021.).

5.2 FRACIONAMENTO DO EHIAo POR CROMATOGRAFIA CONTACORRENTE (CCC)

5.2.1 Análise do perfil químico das frações por CLAE-IES-EM^N

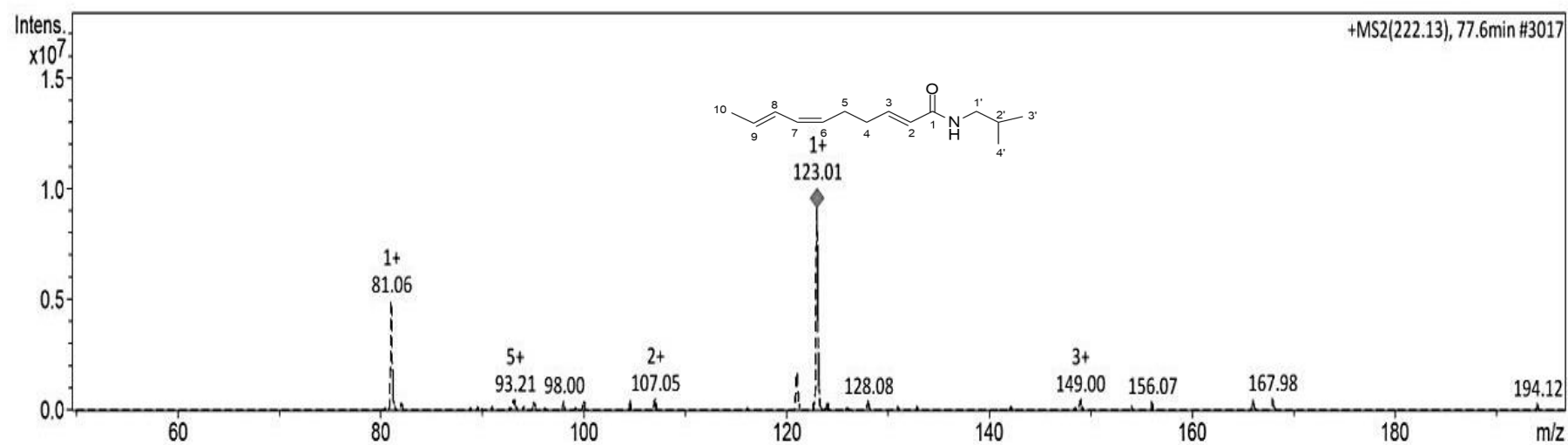
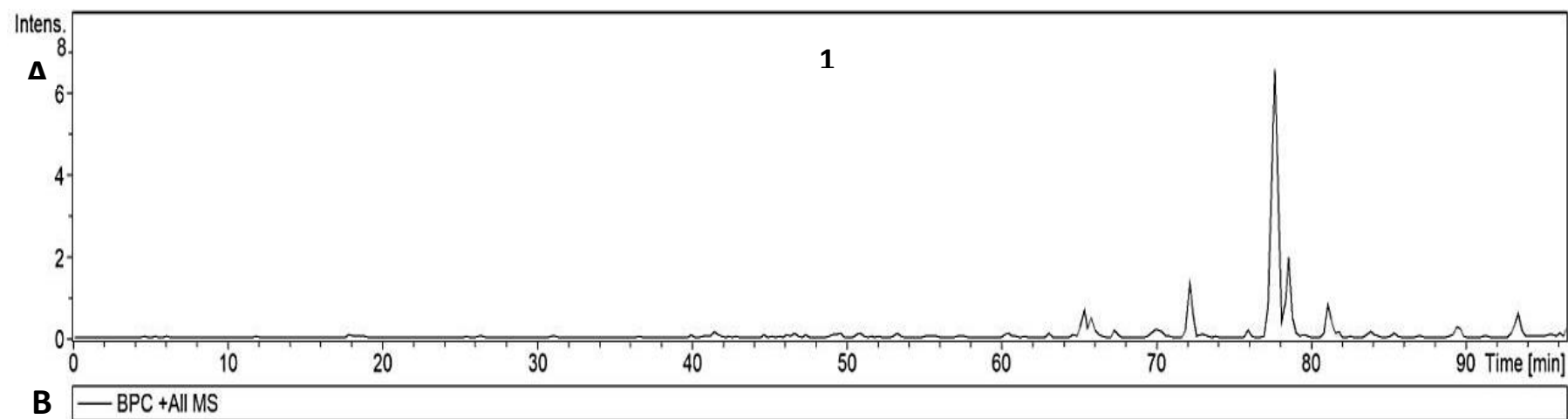
Um total de 80 frações foram obtidas após fracionamento na CCC, os quais foram reunidas de acordo com o perfil obtido na cromatografia em camada delgada (CCD), totalizando 10 frações: 1 (1-9), 2 (10 -19), 3 (20-13), 4 (14-18), 5 (19-24), 6 (25-28), 7 (29-50), 8 (51-69), 9 (70-80) e 10 (lavagem) foram reunidas. Os cristais amarelos amorfos obtidos, de todas as frações, correspondeu a 3,16 mg, sendo 2,05 mg da fração 9.

Neste estudo a CLAE-IES-EM² foi utilizada para monitorar as 10 frações obtidas, com o fim de identificar e isolar a alquilamida presente na *A. oleracea*, o espilantol, conforme a descrição de parâmetros na metodologia. Houve a observação da fração 9 (Figura 13A), no tempo de retenção de 77,6 minutos (pico 1), o íon precursor com m/z 222 $[M+H]^+$, cujo espectro de EM² apresentou os íons fragmentos com m/z 166, 149, 123, 121 e 81 (Figura 13B), reportados na literatura como característicos da molécula espilantol (BOONEN et al., 2010). Neste sentido a fração 9 foi submetida ao fracionamento por CLAE preparativo para isolamento do espilantol, obtendo a subfração-1.

A figura 14A, demonstra que o pico do espilantol foi encontrado sob um tempo de retenção (77,6 minutos), valor elevado em relação as pesquisas realizadas para o isolamento do espilantol, o que pode ser explicado por vários fatores, como por exemplo, o modo de preparo, eluição, a coluna cromatográfica, os solventes polares que por mais que não contribuam com a poluição de gases na atmosfera, podem ter afetado a extração do espilantol e comprometido a aplicabilidade do produto. Neste sentido, não foram encontrados estudos descritos na literatura, com esse tempo de retenção.

Os autores Da Mota e Da Silva (2020), identificaram o pico do espilantol em tempo de retenção de 6,3 min, corroborando o estudo de Da Silva (2016) que identificou a presença desta alquilamidas no extrato bruto de *A. oleracea* por CLAE. O espilantol é uma substância bioativa é encontrada nas folhas, ramos e flores, e tem despertado atenção de Indústrias farmacêuticas pela diversidade de ações com aplicabilidade industrial (GUSMÃO; GUSMÃO, 2013; BLANCO et al., 2018).

Figura 13: Cromatograma do pico base da fração 9 (A) e EM² do pico 1 (B)



Fonte: MARTINS, (2021).

Dellamora et al. (2013) e Arrospide (2019), identificaram um pico majoritário característico de espilantol por CLAE de extratos obtidos das partes aéreas (folhas, flores e caules) da *A. oleracea*, em um tempo de retenção próximo a 17 minutos. O espilantol encontrado no EHIAo, de acordo com a literatura, varia entre 84% a 90%, em relação a todos os constituintes encontrados na amostra (BATISTA et al., 2021; DA ROCHA, 2018; ANHOLETO et al., 2017; CHENG et al., 2015).

A pesquisa realizada por Da Silva (2016), analisou em 20 minutos a fração (FL 20) da flor fração metanólica (FLMEOH) de *A. oleracea* e identificou o pico de espilantol a 2,64 minutos e 22,76 % de área no cromatograma de íons totais (TIC), modo de ionização positiva, por meio do UHPLC-ESI-MS.

Na análise do EHIAo, notou-se a similaridade ao íon precursor com m/z 222 (pico base) $[M+H]^+$ com o pico base descrito por Da Silva (2016) e Nomura (2013), em que o primeiro pico foi encontrado sob tempo de retenção em 2,61 minutos e o segundo com 5,15 min. A molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 222 Daltons, induziu à fórmula molecular $C_{14}H_{23}NO$, IDH= 4, proporcional as quatro ligações duplas presentes no espilantol.

De acordo com a base de informações World Intellectual Property Organization (2019) existem 699 patentes registradas referentes ao espilantol, as associações de canabinóide e espilantol também têm sido consideradas para fins farmacêuticos, nutracêuticos e cosmeceuticos. As agências FEMA (Flavor and Extract Manufactures Association) e a EFSA (European Food Safety Authority) reconhecem a segurança do espilantol (FREITAS-BLANCO, 2018).

5.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DO ESPILANTOL

A análise da subfração-1 no espectro de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$), (Figura 14), apresentou cinco sinais de hidrogênio na faixa de δ 0,92 a 3,15 ppm, sendo um dubleto em δ 0,92 ppm (6H, $J = 6,4$ Hz, H-3' e H-4'), um dubleto em δ 1,77 ppm (3H, $J = 6,8$ Hz, H-10), dois multipletos em δ 1,80 ppm (1H, H-2') e 2,25-2,32 ppm (4H, H-4 e H-5), um simpleto largo δ em 3,15 (1H, H-1'). Na faixa de δ entre 5 e 7 ppm, observou-se sinais característicos de hidrogênios olefínicos, sendo dois multipletos em δ 5,25 (1H, H-6) e 5,97 ppm (1H, H-7), um dubleto de quarteto em δ 5,70 ppm (2H,

$J = 6,8$ e $13,6$ Hz, H-9), um dubleto em δ 5,82 ppm (1H, $J = 14,8$ Hz, H-2) e um duplo dubleto em δ 6,28 ppm (1H, $J = 12$ e $13,6$ Hz, H-8), e um dubleto triplete δ 6,83 ppm (1H, $J = 14,8$ e $6,2$ Hz, H-3). Alguns dados espectométricos de RMN ^1H e ^{13}C do presente estudo são similares aos descritos por Nakatani, Nagashima (1992), conforme a Tabela 2.

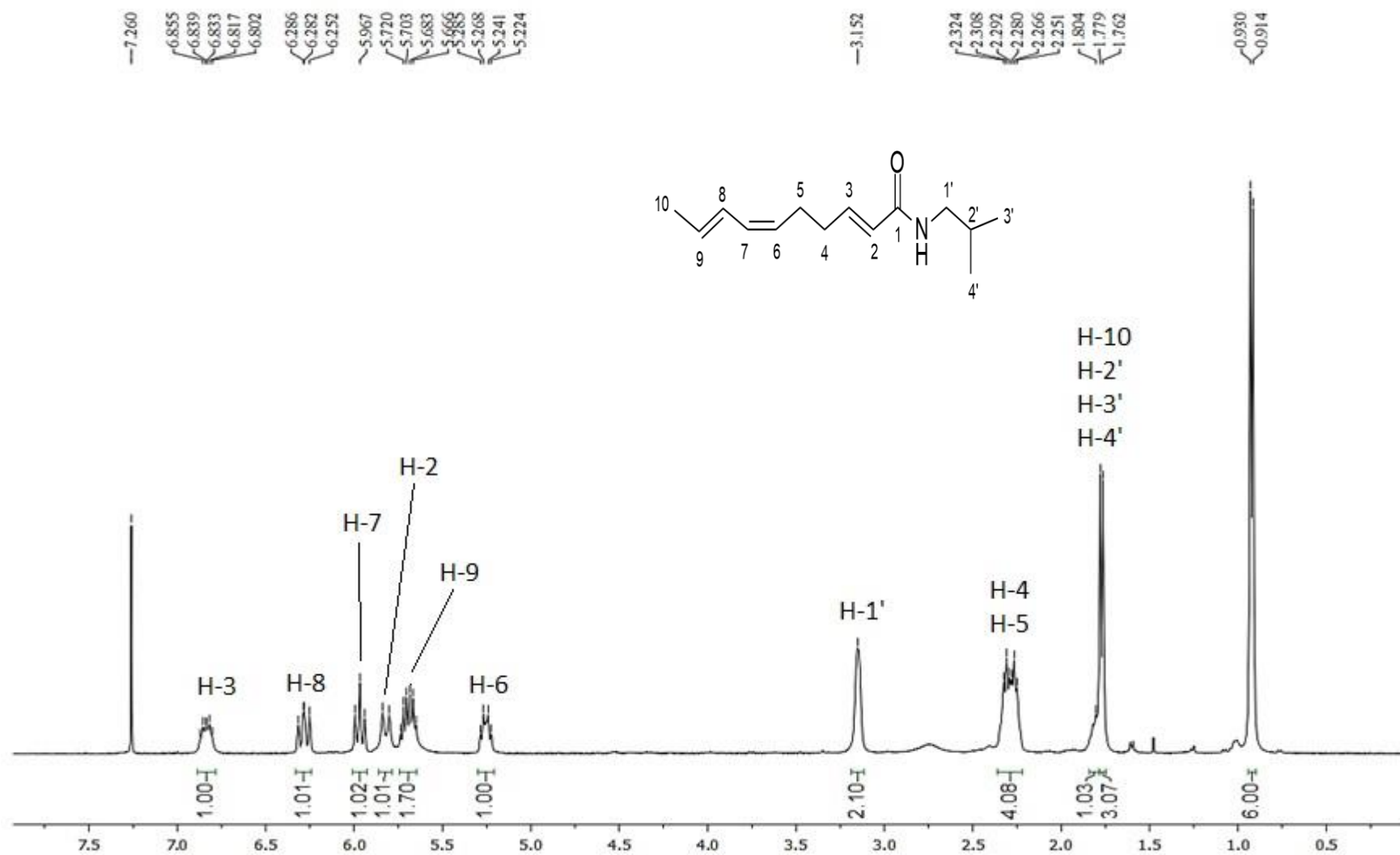
O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), (Figura 15) exibiu os sinais δ 166,5 (C, C-1), 123,5 (CH, C-2), 144, 9 (CH, C-3), 32,4 (CH₂, C-4), 26,4 (CH₂, C-5), 127, 6 (CH, C-6), 129,6 (CH, C-7), 126,8 (CH, C-8), 130,16 (CH, C-9), 18,3 (CH₃, C-10), 47,3 (CH₂, C-1'), 28,6 (CH, C-2'), 20,2 (CH₃, C-3' e C-4'). Os dados de RMN obtidos para a subfração-1 demonstrou 13 linhas espectrais, que coincidem com os quatorze carbonos existentes no espilantol em comparação com os obtidos por Nakatani e Nagashima (1992), permitiu identificá-la como espilantol (Tabela 2).

Tabela 2. Deslocamentos químicos de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do espilantol em CDCl_3

H	δ_{H}	C	δ_{C}
2	5,79 d ($J=15$)	1	166,0
3	6,83 dt ($J=15$; 7)	2	124,2
4	2,23-2,35 m	3	143,5
5	2,23-2,35 m	4	32,1
6	5,26 dt ($J=11$; 7)	5	26,4
7	5,97 dd ($J=11$; 11)	6	127,7
8	6,29 dd ($J=11$; 15)	7	129,5
9	5,70 dq ($J=15$; 7)	8	126,7
10	1,78 d ($J= 7$)	9	130,0
H-N	5,47s	10	18,3
1'	3,15 dd ($J= 7$; 6)	1'	46,9
2'	1,78 m	2'	28,6
3', 4'	1,78 m	3', 4'	20,1

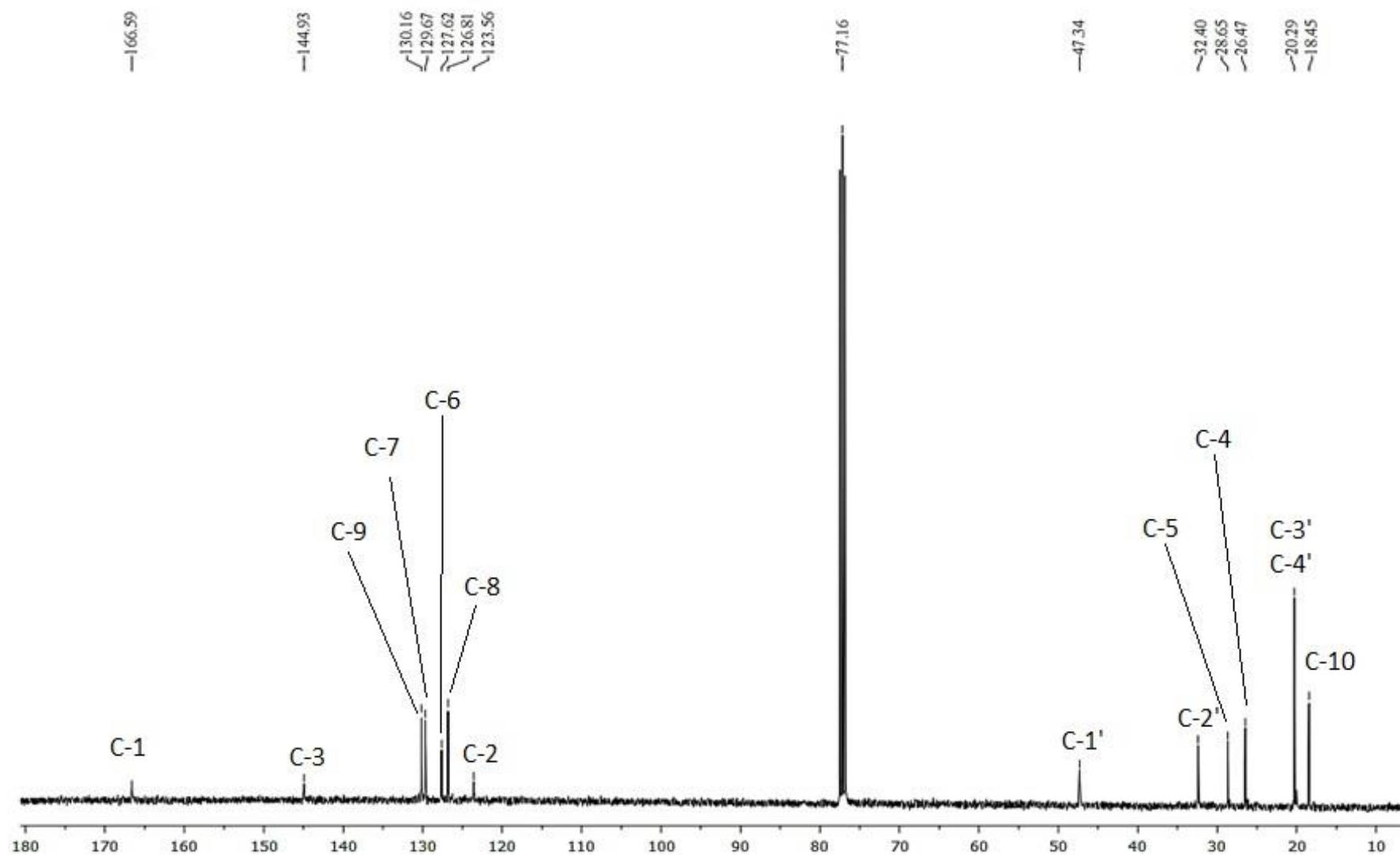
Fonte: NAKATANI; NAGASHIMA, (1992).

Figura 14: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da subfração-1)



Fonte: MARTINS, (2021).

Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da subfração-1



Fonte: MARTINS, (2021).

5.4 ENSAIOS *IN VITRO* DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

5.4.1 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumoral

O potencial citotóxico do espilantol e Extrato Hidroetanólico das folhas e das inflorescências de *Acmela oleracea* (EHFAo e EHIAo, respectivamente) em linhagens de células tumorais humanas (HCT-116, HeLa, MCF-7, MDA-MB-231 e SK-MEL-28) e em linhagem de célula não tumoral humana (HaCaT), após tratamento de 72 horas, está demonstrado na Tabela 3.

O EHFAo induziu as menores porcentagens de inibição nas linhagens MCF-7 e SK-MEL 28 testadas ($8,77 \pm 1,58\%$ e $43,39 \pm 0,47\%$, respectivamente), apresentando atividade significativa frente as linhagens HeLa, HCT-116 e MDA-MB-231 ($60,5 \pm 1,74\%$; $59,0 \pm 0,82\%$ e $54,4 \pm 1,57\%$, respectivamente). O EHIAo apresentou melhor percentual de inibição nas linhagens HCT-116 ($67,6 \pm 1,25\%$) e HeLa ($64,4 \pm 0,97\%$) e menor em MCF-7 ($18,39 \pm 2,13\%$). A linhagem MDA-MB-231 também apresentou percentual de inibição superior a 50% ($55,2 \pm 1,68\%$), semelhante ao resultado obtido pelo EHFAo ($54,4 \pm 1,57\%$).

Tabela 3. Atividade antitumoral *in vitro* do Espilantol e Extrato Hidroetanólico das folhas e das inflorescências de *Acmela oleracea* (EHFAo e EHIAo, respectivamente), em linhagens tumorais e não tumoral pelo ensaio MTT, após 72 horas de exposição

Linhagem celular	IC ** (%)		
	EHFAo	EHIAo	Espilantol
HCT-116	$59,0^* \pm 0,82$	$67,6^* \pm 1,25$	NT
HeLa	$60,5^* \pm 1,74$	$64,4^* \pm 0,97$	NT
MCF-7	$8,77 \pm 1,58$	$18,39^* \pm 2,13$	$11,94 \pm 1,29$
MDA-MB-231	$54,4^* \pm 1,57$	$55,2^* \pm 1,68$	NT
SK-MEL 28	$43,39^* \pm 0,47$	$30,40^* \pm 0,93$	NT
HaCaT	NT	$36,43^* \pm 1,46$	NT

Fonte: MARTINS, (2021).

Legenda: dados foram obtidos de um experimento realizado em quadruplicata e apresentados valores de porcentagem de inibição obtidos a partir da média $\pm$ e.p.m em comparação com o controle negativo, analisados por ANOVA seguido do teste de Tukey. Foi utilizada a concentração de 200 μ g/mL do EHIAo e EHFAo e 50 μ M do espilantol. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. **IC: Inibição do crescimento (porcentagem), ***NT: Não Testado

Neste estudo, o espilantol, composto isolado, apresentou baixo percentual de inibição ($11,94 \pm 1,29\%$) frente a linhagem MCF-7 testada. As alquilamidas e a

piperina presentes em *Capsicum* sp. e *P. nigrum* inibiram a proliferação de células humanas tumorais de mama (MCF-7) e cólon (HCT-116), sob as CI_{50} 200 μ g / mL e 25 μ g/mL respectivamente, com efeito dose-dependente (LIU et al., 2010).

Pinheiro e colaboradores (2015), observaram que a quantidade de concentração 5mg/mL do extrato bruto aquoso das folhas da *A. oleracea* ($DE_{50\%}$ = 2,76 mg) é diretamente proporcional a ação de redução no radical DPPH, demonstrando o potencial antioxidante. Corroborando com esta investigação os pesquisadores Nabi e Shrivastava (2016), elucidaram sobre a ação elevada de antioxidante com menor IC_{50} , do extrato etanólico de *Spilanthes acmella*, em decorrência das concentrações de flavonoides (72,14 mg EQ/g) e de polifenóis (84,52 mg EAG/g,) existentes no extrato. Para DHPP, o valor de IC_{50} (134,11 μ g/mL) e eliminação de Superóxido foram e 104,51 μ g/ML.

Entretanto, uma N-alquilamida sintetizada denominada composto H-10 (ácido 2-nonanóico [2-(4-hidroxi-fenil)-etil]-amida), apresentou efeito antineoplásico, pois afetou fortemente a sobrevivência clonogênica (a longo prazo) e migração de células da linhagem tumoral HCT-116 (JIANG et al., 2020). Os efeitos citotóxicos relatados em linhagens tumorais vêm corroborando com os usos etnomédicos de plantas que contêm alquilamidas como um agente anticâncer (VALÉRIO, GONZALES, 2005).

Esta pesquisa evidenciou que o EHFAo apresentou atividade significativa em relação a linhagem tumoral HCT-116 e baixa citotoxicidade frente a linhagem celular de câncer de mama MCF-7. Além disso, o EHIAo apresentou maior percentual de inibição nas linhagens HCT-116, HeLa e MDA-MB3-231, conforme a tabela 3.

O extrato etanólico da planta de *Tithonia diversifolia* da família Asteraceae apresentou atividade citotóxica após 72 horas de tratamento, na linhagem tumoral HCT-116, com IC_{50} de 7,15 μ g/mL, inibindo a proliferação das células de modo tempo-independente (MENDOZA, 2020).

Em se tratando da linhagem SK-MEL-28, o EHFAo demonstrou a maior atividade, que pode estar associada a presença de compostos fenólicos existentes em grande quantidade nas folhas da *A. oleracea*, diferente de outras partes do vegetal (NUNES, 2016; NASCIMENTO, 2019; PIRES; DA SILVA, 2020). Os compostos fenólicos estão estreitamente agregados ao conteúdo do fenol e a ação antioxidante favorecendo atividades antinociceptiva, antiinflamatória e antitumoral. As suas estruturas químicas, são relevantes para neutralizar e sequestrar radicais (MORAES et al., 2020).

Abdul Rahim et al. (2021), relataram que os metabólitos secundários ativos presentes no *S. acmella* podem agir como antioxidante natural, para prevenir várias enfermidades fatais, favorecendo o bloqueio das vias de sinalização de MAPK, diminuir a liberação de óxido nítrico, inibir as citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), devido a presença elevada de TPC e TFC, os contribuintes dos efeitos antiinflamatórios e antioxidantes.

A investigação de Soares e colaboradores (2014), demonstraram uma CI₅₀ de 513 mg/mL na linhagem HEp-2 (carcinoma epidermóide de laringe). O arranjo do citoesqueleto de actina das células Hep-2 a 500 e 1000 μ g/mL apresentou despolimerização dos filamentos, causou perda da morfologia, comprometeu a adesão celular consequentemente. No entanto, sua citotoxicidade e influência na organização do citoesqueleto de actina em linhagens de células tumorais foram praticamente inexistentes.

No presente estudo, o perfil químico do EHIAo demonstrou uma mistura de várias alquilamidas e a presença de traços de escopoletina (Figura 13). As hidroxycumarinas promoveram ação antioxidante significativa nos radicais peroxila oriundos da reação AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)] com oxigênio atmosférico (MATOS et al., 2015).

O composto cumarínico N-(5-cloropentanol), mantém efeito total em células cancerígenas multirresistentes, desenvolve ação antiproliferativa (CI₅₀ de 7-47 nM), representando uma classe inibitória e promissora para tratar o câncer, pela estabilidade de microtúbulos (CAO et al., 2016). Outras atividades dos compostos bioativos, cumarinas (escopoletina), triterpenóides, óleos essenciais (limoneno e β -cariofileno) aminoácidos, fitoesteróis, compostos fenólicos (ácido vanílico, ácido transferúlico e ácido trans-isoferúlico) e N-alquilamidas, encontradas no extrato etanólico de *A. oleracea* por Savadi e seus colaboradores (2010), foi a ação imunomodulatória em camundongos.

Outra pesquisa demonstrou sobre o chá das inflorescências da planta, que devido a presença de alcalóides, apresentou atividade diurética, pois o espilantol inibiu a produção de adenosina monofosfato cíclica, modulando de forma negativa os mecanismos que concentram a urina (GERBINO et al., 2016).

Por outro lado, segundo Caesar e Cegh (2019), do ponto de vista farmacológico, a mistura de compostos encontrados nos extratos desempenha um papel importante denominado “sinergismo farmacológico”. Por isso, em muitos casos

é interessante usar extratos brutos ou frações em vez de um único composto isolado devido à ação de dois ou mais compostos simultaneamente, dando maior resposta em vez de usar cada composto separadamente (GERTSCH, 2011).

Além disso, o pesquisador Silva (2012), comprovou que o tratamento com 1mg/mL do extrato etanólico das folhas da *A. oleracea* apresentou uma diminuição da viabilidade celular, resultando em danos ao citoesqueleto observados em células apoptóticas.

5.4.2 Avaliação dos efeitos do EHIAo sobre a viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada na linhagem HCT-116 após tratamento com EHIAo por 24, 48 e 72 horas (Tabela 4). Observou-se alterações na viabilidade de células HCT-116 em 24 horas de tratamento (Figura 16A), porém, com pequena redução da viabilidade celular nesse tempo ($CI_{50} > 300 \mu\text{g/mL}$). No tratamento de 48 horas (Figura 16B) ocorreu maior inibição da viabilidade celular em relação ao grupo controle, apresentando uma CI_{50} de $189,6 \pm 1,70 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$). No entanto, o tratamento das células por 72 horas (Figura 16C) mostrou um aumento da citotoxicidade, com uma CI_{50} de $36,94 \pm 1,89 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$).

A viabilidade celular também foi avaliada nas linhagens tumorais HeLa e MCF-7 após o tratamento com EHIAo por 48 e 72 horas (Tabela 4). Na linhagem HeLa o tratamento por 72h apresentou CI_{50} ($99,92 \pm 1,31 \mu\text{g/mL}$) menor que em 48h ($148,8 \pm 1,08 \mu\text{g/mL}$), todavia na linhagem MCF-7 o tempo de tratamento apresentou resultados diferentes, sendo a CI_{50} maior em 72h de tratamento ($288,1 \pm 1,17 \mu\text{g/mL}$) se comparado ao tratamento por 48h ($68,64 \pm 1,29 \mu\text{g/mL}$). Entretanto a pesquisa de Boontha et al. (2020), manifestou a ocorrência de citotoxicidade em células MCF-7 com IC_{50} de $37,1 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ em 48h e inibiu a formação de colônias de células com IC_{50} de $44,9 \pm 1,3 \mu\text{M}$ de uma formulação (creme) contendo extrato de etanólico de *S. Acmeilla*. Além disso, essa formulação também indicou um efeito anti-migratório na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$.

Na perspectiva de avaliar a citotoxicidade em células não tumorais de origem humana, foi avaliada a viabilidade em linhagem HaCaT após tratamento de 72h com EHIAo, sendo o valor de CI_{50} superior a $300 \mu\text{g/mL}$ ($319,3 \pm 2,74$). A droga padrão doxorrubicina foi testada nas linhagens tumorais as quais apresentaram CI_{50} HCT-116 ($2,57 \pm 0,001 \mu\text{M}$), HeLa ($3,8 \pm 1,1 \mu\text{M}$), MCF-7 ($1,1 \pm 1,29 \mu\text{M}$) e linhagem não tumoral humana HaCaT ($0,28 \mu\text{M} \pm 0,001 \mu\text{M}$) ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito de EHIAo* e DXR** sobre a viabilidade de células tumorais e não tumorais

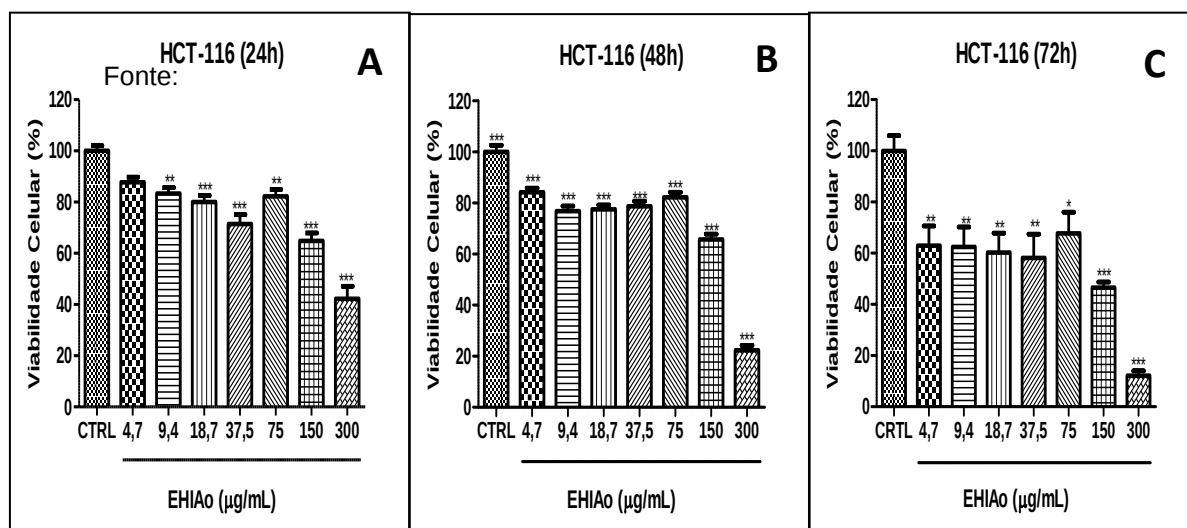
Linhagem celular	Cl ₅₀ ***(µg/mL)			Cl ₅₀ ***(µM)
	EHIAo* (24h)	EHIAo (48h)	EHIAo (72h)	DXR (72h)
HCT-116	332,5 ± 1,63	189,6 ± 1,70	36,94 ± 1,89	2,57 ± 0,001
HeLa	NT	148,8 ± 1,08	99,92 ± 1,31	3,8 ± 1,1
MCF-7	NT	68,64 ± 1,29	288,1 ± 1,17	1,1 ± 1,29
HaCaT	NT	NT	319,3 ± 2,74	0,28 ± 0,001

Fonte: MARTINS, (2021).

Legenda: Dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em quadruplicata e apresentados em valores de Cl₅₀ obtidos por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%. NT: Não Testado. *EHIAo: Extrato Hidroetanólico das inflorescências de *Acmela oleracea*, **DXR: Doxorubicina, ***Cl₅₀: Concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular

Neste estudo a avaliação do EHIAo apresentou boa atividade citotóxica nas células tumorais HCT-116 após 72 horas de tratamento (figura 17C) com Cl₅₀ de 36,94 µg/mL (tabela 4) demonstrando atividade citotóxica promissora, pois segundo Ayoub et al. (2014), os agentes citotóxicos devem ser eficazes em concentrações até 100 µg/mL.

Figura 16. Efeito do Extrato hidroetanólico da inflorescência de *Acmela oleracea* (EHIAo) sobre a viabilidade da célula tumoral HCT-116 após 24, 48 e 72h de tratamento.



Fonte: MARTINS, (2021).

Legenda: dados expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes em quadruplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey. No gráfico *p<0,1; ** p<0,01; *** p<0,001 comparado ao grupo controle.

Seregheti e seus colaboradores (2020), expressaram ação antiproliferativa elevada (95,7%) do extrato de etanol *Calea fruticosa* pertencente a família Asteraceae, em células de linhagem HCT-116 e moderada quantidade (72,7%) frente

ao extrato bruto de hexano desta planta. Em contrapartida a pesquisa de Mendoza (2020), evidenciou a viabilidade celular do extrato etanólico da *Tithonia diversifolia* (Asteraceae), na linhagem tumoral HCT-116, sob as concentrações de 4,5; 9,0 e 18,00 µg/mL após 24 horas de incubação, pela diminuição estatística significativa ($p < 0,0001$) do número de células viáveis quando comparadas ao controle

O tratamento com o EHIAo em 48h da célula tumoral MCF-7 apresentou uma diminuição da viabilidade celular. Por outro lado, Yadav (2017) investigou os efeitos do extrato alcoólico de *Eclipta alba* (AEEA), pertencente a família Asteraceae, em linhagem MCF-7 na concentração de 400 µg/mL, o tratamento por 48h, demonstrou mudança na morfologia da célula sugerindo apoptose, ocorrendo inibição potencial do crescimento dose-dependente.

A pesquisa de Gomes et al. (2018), elucidou que o extrato hidroalcoólico das partes aéreas da planta *Solidago Chilensis* (Asteraceae) promoveu potente inibição da atividade proliferativa das células tumorais de mama MCF-7 *in vitro* durante 48h sob a concentração 0,25–250 µg / ml.

Mfengwana e seus colaboradores (2019), revelaram que os extratos vegetais de diclorometano de *Senecio asperulus* DC. (Asteraceae) e *Asparagus larycinus* Burch. (Asparagaceae), têm ação citotóxica, devido a redução da viabilidade celular de forma dose-dependente em concentrações de 50 e 200 µg/mL sobre as linhagens de células cancerígenas de próstata (PC3) e mama (MCF-7) durante a exposição de 48h.

O estudo de Romão et al., (2015) mostrou que o extrato aquoso bruto das flores de *A. oleracea* possui principalmente flavonóides e alcamidas, substâncias responsáveis pelas principais atividades biológicas da planta. O estudo de Navarro-Gonzáles et al. (2015) encontraram quinze fenólicos na inflorescência do jambu (*Spilanthes oleracea*), destacando-se os flavonóides como constituinte, seguidos de antocianinas e ácido hidroxicinâmico.

Lagnika et al. (2016), demonstrou que os extratos aquosos de *Acmella uliginosa* (Asteraceae) e o metanol sequestraram radicais livres, diminuindo-os. O efeito redutor destes radicais se elevou conforme a dose-dependente, identificado no ensaio de eliminação de radicais DPPH e sua porcentagem de inibição ocorreu entre 0,94 a 73,07%. Para Lima Júnior e seus colaboradores (2021), os compostos fenólicos (cumarina e taninos), flavonóide, saponina, triterpeno desenvolvem efeito antioxidante.

5.4.3 Avaliação dos efeitos do EHIAo sobre o Índice de seletividade celular

Comparando ao resultado da droga padrão doxorrubicina que apresentou IC₅₀ de 2,57 µM L e menor seletividade (IS = 0,10) frente a linhagem HCT-116. O EHIAo possui maior seletividade frente as linhagens HCT-116 (8,64) e HeLa (3,19), que a droga padrão doxorrubicina para as mesmas linhagens, respectivamente, 0,10 e 0,07. Todavia, frente a linhagem MCF-7 o IS do EHIAo foi menor que 2 (Tabela 5). O estudo de Mendoza (2020), sobre o extrato etanólico da *Tithonia diversifolia* (Asteraceae), defendeu que este apresentou uma elevada seletividade (IS=3,57) durante o tratamento de 72 horas, na linhagem tumoral HCT-116.

O IS é um indicativo *in vitro* de quantas vezes o composto testado é mais seletivo para a célula tumoral do que para a célula humana não tumoral. Um composto é considerado seletivo à determinada célula tumoral se IS for maior que 2, e quando o IS menor ou igual a 2 que por sua vez indica toxicidade não seletiva para as células avaliadas (KOCH et al., 2005). O EHIAo foi 2,7 vezes mais seletivo para as células de cólon (HCT-116) que para células de cérvix uterina (HeLa). Todavia o EHIAo foi mais seletivo que a droga padrão doxorrubicina para as mesmas linhagens em 86,4 e 45,57 vezes, respectivamente.

Tabela 5. Índice de seletividade do Extrato Hidroetanólico das inflorescências de *Acmella oleracea* (EHIAo) em células tumorais e não tumorais, após 72h de exposição.

Linhagem Celular	CI ₅₀ ***		IS****	
	EHIAo* (µg/mL)	DXR** (µM)	EHIAo* (72h)	DXR** (72h)
HCT-116	36,94 ± 1,89	2,57 ± 0,001	8,64	0,10
HeLa	99,92 ± 1,31	3,8 ± 1,1	3,19	0,07
MCF-7	288,1 ± 1,17	1,1 ± 1,29	1,10	0,25
HaCaT	319,3 ± 2,74	0,28 ± 0,001	-	-

Fonte: MARTINS, (2021).

Legenda: Dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em quadruplicata e apresentados em valores de CI₅₀ obtidos por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%. NT: Não Testado., *EHIAo: Extrato Hidroetanólico das inflorescências de *Acmella oleracea*, **DXR: Doxorrubicina, ***CI₅₀: Concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular, ****IS: Índice de Seletividade (CI₅₀ da célula não tumoral (HaCaT) / CI₅₀ da célula tumoral)

No tratamento do câncer, o foco para homens e mulheres interessados na fertilidade futura tem sido a citotoxicidade em células não tumorais que podem ser alteradas, após o tratamento quimioterápico, com risco de infertilidade logo após. O EHIAo precisa ser melhor investigado quanto ao seu mecanismo de ação envolvido,

uma vez que possui seletividade em células tumorais. Estudos farmacológicos complementares tornam-se necessários para melhor compreensão dos mecanismos de morte celular envolvido, como o estudo feito por Mishra et al. (2015) sobre a atividade antitumoral das alquilamidas presentes no extrato da *S. paniculata*, que foi capaz de aumentar o nível da enzima caspase-3, uma enzima chave responsável pela morte programada de células. A ação antiproliferativa também foi descrita em células de hepatoma celular humano (Huh-7) do extrato das folhas *Spilanthes paniculata* Linn. (SP), também pertencente à família Asteraceae.

De acordo com Da Rocha (2018), a administração de extrato hidroetanólico das inflorescências de *A. oleracea* em fêmeas não promove toxicidade e nem interfere na reprodução ou gestação. Entretanto o tratamento com o EHIAo eleva o período fértil, sem mudar a foliculogenese. Nos machos aumentou a libido e não atrapalhou a fertilidade e nem espermatogênese.

Posteriormente, o estudo conduzido por De Souza e colaboradores (2019), demonstraram que o extrato hidroetanólico de Inflorescência da *Acmella oleracea*, não apresentou danos significativos nas gônadas do aparelho reprodutivo do peixe Zebra progenitor. Ao passo que ao ser utilizado concentrações elevadas de (100 e 200 µ/EU), podem ser letais ou teratogênicas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

- O EHIAo utilizado neste estudo comprovou em seu perfil químico, a presença de grande quantidade de alquilamidas, com maior destaque para o espilantol, e também traços de escopoletina.
- As células MCF-7 mantiveram boa viabilidade celular frente a exposição com o composto isolado do EHIAo, todavia há necessidade de investigar este em outras linhagens;
- O EHIAo demonstrou citotoxicidade frente as linhagens tumorais de cólon (HCT-116 com 67,6%), cérvix uterina (HeLa 64,4%) e um percentual de inibição maior que 50% na linhagem de mama TNBC (MDA-MB 231 com 55,2%).
- Frente as linhagens trabalhadas neste estudo, o EHIAo demonstrou melhor citotoxicidade na linhagem tumoral HCT-116, assim como sua exposição ao extrato em 72h resultou em (IS 8,64), ou seja, maior índice de seletividade em relação a linhagem He La.
- O EHIAo apresentou mais seletividade (2,7 vezes) nas células tumorais de cólon (HCT-116) do que nas células de cérvix uterina (HeLa). Além disso, o EHIAo foi mais seletivo que a droga padrão doxorrubicina para essas respectivas linhagens em 86,4 e 45,57 vezes.
- Uma nanoformulação com o EHIAo poderia aprimorar/potencializar o seu efeito citotóxico frente as linhagens tumorais
- Sendo assim, há necessidade de compreender o mecanismo de morte celular envolvidos após o tratamento com EHIAo, em especial ao HCT-116, pelo melhor resultado apresentado.

REFERENCIAS

ABBAS, Z.; REHMAN, S. An Overview of Cancer Treatment Modalities. In: SHAHZAD, H. **Neoplasm**. Intech Open. 2018. p. 139-157.

ABDUL RAHIM, R.; JAYUSMAN, P. A.; MUHAMMAD, N.; MOHAMED, N.; LIM, V.; AHMAD, N. H.; MOHAMAD, S.; ABDUL HAMID, Z. A.; AHMAD, F.; MOKHTAR, N.; SHUID, A. N.; MOHAMED, I. N. Potenciais efeitos antioxidantes e antiinflamatórios de *Spilanthes Acmella* e seus efeitos benéficos à saúde: uma revisão. **Jornal internacional de pesquisa ambiental e saúde pública**, 18 (7), 3532. 2021.

ABOTALEB, M.; KUBATKA, P.; CAPRND, M.; VARGHESE, E.; ZOLAKOVA, B.; ZUBOR P.; OPATRILOVA, R.; KRUZLIK, P.; STEFANICKA, P.; BÜSSELBERG, D. Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. **Biomed Pharmacother**. v. 101, 458-477, 2018.

ABU-DARWISH, M. S.; EFFERTH, T. Medicinal plants from near east for cancer therapy. **Front Pharmacol**. v. 9, p. 56. 2018.

ACEVEDO, S. C. F.; CAMUS, M.; FRASCO, C.; PANAY, S.; ABARCA, M.; DOMINGUEZ, F. Valor preditivo de biomarcadores imuno-histoquímicos convencionais em câncer de mama. **Rev Med Chile**. v. 2, p. 724–32, 2015.

AGGARWAL, V.; TULI, H. S.; VAROL, A.; THAKRAL, F.; YERER, M. B.; SAK, K.; VAROL, M.; JAIN, A.; KHAN, M. A.; SETHI, G. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. **Biomolecules**. v.11, p. 735. 2019.

AHMAD, R.; AHMAD, R.; AHMAD, N.; NAQVI, A. A.; SHEHZAD, A.; AL-GHAMDI, M. S. Role of traditional Islamic and Arabic plants in cancer therapy. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 7, n. 2, p. 195-204, 2017.

AHMED, D.; EIDE, P. W.; EILERTSEN, I. A.; DANIELSEN, S. A.; EKNAES, M.; HEKTOEN, M.; LIND, G. E.; LOTHE, R. A. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. **Oncogenesis**. v. 2, p. 71. 2013.

ALCANTARA, B. N.; KOBAYASHI, Y. T.; BARROSO, K. F.; SILVA, I. D. R.; ALMEIDA, M. B.; BARBOSA, W. L. R. Pharmacognostic analyses and evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of *Acmella oleracea* (L.) R. K Jansen (Jambu) floral extract and fractions. **J Med Plant Res.**, v. 9, n.4, p.91-96, 2015.

AL-DABBAGH, B.; ELHATY, I. A.; AL HROUT, A.; AL SAKKAF, R.; EL-AWADY, R.; ASHRAF, S. S.; AMIN, A. **Atividades antioxidante e anticâncer de Trigonella foenum-graecum, Cassia acutifolia e Rhazya stricta**. Medicina complementar e alternativa BMC, 18 (1), p. 240. 2018.

ALEEBAHIM-DEHKORDY, E.; NASRI, H.; BARADARAN, A.; NASRI, P.; TAMADON, M. R.; HEDAIATY, M.; BEIGREZAEI, S.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Medicinal Plants,

Effective Plant Compounds (Compositions) and their Effects on Stomach Cancer. **Int J Prev Med.** v. 8, p. 96. 2017.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPEZ, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Revista Química Nova.** v. 28, p.118. 2005.

ALONSO, I. G. **Nova abordagem para a síntese total do espilantol e avaliação da atividade antinociceptiva.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016. 163f, 2016.

ALVARADO, ANTONIETA.; FAUSTINO-ROCHA, A. I.; COLAÇO, B.; OLIVEIRA, P. A. Experimental mammary carcinogenesis-Rat models. **Life sciences.** v. 173, p. 116-134, 2017.

ALVAREZ, L.D.G.; DE CARVALHO LACERDA, Y. É.; SOUSA, A.K.F.; DE BRITO, B. S.; SANTOS, M. G.; DE MELO, N. F. R. Potencial farmacológico de produtos naturais para o tratamento do câncer. **Infarma, Ciências Farmacêuticas.** 10.14450/2318-9312, v. 33. e1.a. p. 31-40. 2021.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2019.** Atlanta: American Cancer Society, 2019.

ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; SPINDOLA, C. S.; RODRIGUES, R. A. F.; LABRUNA, M. B.; PIZANO, M. A.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases,** v, 8, n.1, p. 65-72, 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Consultoria Pública no. 102 de 22 de Outubro de 2007. [Publicada no D.O.U. de 23/10/2007] [Internet]. Brasília (DF): Anvisa; 2007. [citado 2017 Jul 5]. Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[20172-1-0\]](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[20172-1-0]). Acesso: novembro/2021.

_____. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta de bulas de medicamentos. Bula do medicamento Avastin®. 2016. Disponível: http://datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=21231622016&pidAnexo=3769280. Acesso: setembro / 2020.

AQIL, F.; MUNAGALA, R.; AGRAWAL, A. K.; GUPTA, R. Anticancer Phytocompounds: Experimental and Clinical Updates. In New Look to Phytomedicine. Academic Press. Anticancer Phytocompounds: Experimental and Clinical Updates. In: New Look to Phytomedicine. **Academic Press,** p. 237- 272, 2019.

ARAÚJO, I. F.; DE ARAÚJO, P. H. F.; FERREIRA, R. M. A.; SENA, I. D. S.; LIMA, A. L.; CARVALHO, J. C. T.; FERREIRA, I. M.; SOUTO, R. N. P., 2018. Larvicidal effect of hydroethanolic extract from the leaves of *Acmella oleracea* L. R. K. Jansen in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **South African Journal of Botany.** 117, 134-140.

ARRIAGA-ALBA, M.; RIOS, M. Y.; DÉCIGA-CAMPOS, M. Propriedades antimutagênicas de um *afinim* isolado de *Heliopsis longipes* extrair. **Biologia Farmacêutica**, v. 51, p. 1035-1039, 2013.

ARROSPIDE, T. M. **Avaliação da atividade acaricida de extratos de *Spilanthes Acmella* (jambú) frente ao *tetranychus urticae* e isolamento do espilanto**L. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso). Curso de Licenciatura em Química - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

ATCC. **MCF7 (ATCC® HTB-22™)**. Disponível em: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx>. Acesso em 24/01/2021.

ATCC. **MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)**. Disponível em: <https://www.atcc.org/en/Products/All/HTB-26.aspx>, Acesso em 24/01/2021.

ATCC. **HCT 116 (ATCC® CVCL-247™)**. Disponível em: < <https://www.atcc.org/products/ccl-247>. acesso em 11/06/2021

AVELAR-FREITAS, B. A.; ALMEIDA, V.G.; PINTO, M. C. X.; MOURÃO, F. A. G.; MASSENSINI, A. R.; MARTINS-FILHO, O. A.; ROCHA-VIEIRA, E.; BRITO-MELO, G. E. A. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.47. n.4. p.307– 315. 2014.

AYOUB, I. M.; EL-SHAZLY, M.; LU, M. C; SINGABA ANB. Atividades antimicrobiana e citotóxica dos extratos brutos de folhas, flores e rizomas de *Dietes bicolor*. **South Afr. J. Bot.**; v. 95: p. 97-101, 2014.

BAE, STACY S. et al. Um método validado de cromatografia líquida-eletrospray ionização- espectrometria de massa para quantificação de spilanthol em *Spilanthes acmella* (L.) Murr. **Análise fitoquímica**, v. 21, n. 5, p. 438-443, 2010.

BAKONDI, E.; SINGH, S. B.; HAJNÁDY, Z.; NAGY-PÉNZES, M.; REGDON, Z.; KOVÁCS, K.; HEGEDÚS, C.; MADÁCSY, T.; MALÉTH, J.; HEGYI, P.; DEMÉNY, M. Á.; NAGY, T.; KÉKI, S.; SZABÓ, É.; VIRÁG, L. O espilantol inibe fatores de transcrição inflamatórios e expressão de iNOS em macrófagos e exerce efeitos antiinflamatórios em dermatite e pancreatite. **Int J Mol Sci.**, v. 20, n. 17, p. 4308, 2019.

BANSAL, A; SIMON, M. C. Glutathione metabolismo in câncer progression and treatment resistance **Journal of Cell Biology**, v.217, n. 7, p. 2291-2298, 2018.

BARAYA, Y. S.; WONG, K. K.; YAACOB, N. S. The Immunomodulatory Potential of Selected Bioactive Plant-Based Compounds in Breast Cancer: a review. **Anticancer Agents Med Chem**. 2016.

BARBOSA, W. L. R.; TAVARES, I. C. C. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**. 1 ed. Belém: UFPA, v.1, p. 20, 2001.

BARBOSA, A. F.; ALICIEO, T. V. R.; RODRIGUES, F. M.; RODRIGUES, L. G. S. M.; SABAA-SRUR, A. U. O. Jambu drying with cold air circulation. **J. Bioen. Food Sci.**, v. 2, p. 46-54, 2015.

BARBOSA, A. F. et al. Effects of *Acmella oleracea* methanolic extract and fractions on the tyrosinase enzyme. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 321-325, 2016.

BARBOSA, A. F.; CARVALHO, M. G.; SMITH, R. E.; SABAA-SRUR, A. U. O. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 128-133, 2016a.

BASHYAM, M. D.; ANIMIREDDY, S.; BALA, P.; NAZ, A.; GEORGE, S. A. O Yin e o Yang dos genes do câncer. **Gene**. 2019; 704: 121–133.

BASUDHAR, D.; SOMASUNDARAM, V.; DE OLIVEIRA, G. A.; KESARWALA, A.; HEINECKE, J. L.; CHENG, R. Y.; GLYNN, S. A.; AMBS, S.; WINK, D. A.; RIDNOUR, L. A. O óxido nítrico derivado da sintase-2 do óxido nítrico impulsiona várias vias de progressão do câncer de mama. **Sinal Antioxidante Redox**; v. 26, n. 18, p.1044-1058, 2017.

BATISTA, L. L.; NASCIMENTO, L. C.; GUIMARÃES, G. F.; PEREIRA, A. C. M.; KOGA, A. D. C. R.; SANTOS, A.V.T.D.L.T.D.; FERNANDES, C. P.; TEIXEIRA, TA.; HU, Y.; HU, X.; CARVALHO, J. C. T. Uma revisão das plantas medicinais tradicionalmente usadas para tratar as disfunções sexuais masculinas - o potencial negligenciado de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen. **Pharmacog Rev.**, v.15, n. 29, p. 1-11, 2021.

BEHL, C.; ZIEGLER, C. Cell aging: molecular mechanisms and implications for disease. **Springer Science & Business Media**, 2013.

BENELLI, G.; PAVELA, R.; DRENAGGI, E.; MAGGI, F. Insecticidal efficacy of the essential oil of jambú [*Acmella oleracea* L. R. K. Jansen] cultivated in central Italy against filariasis mosquito vectors, houseflies and moth pests. **J. Ethnopharmacol.** v. 229, p. 272-279, 2019.

BERG, K. C. G, EIDE, P. W.; EILERTSEN, I. A.; JOHANNESSEN, B.; BRUUN, J.; DANIELSEN, S. A.; BJØRNSLETT, M.; MEZA-ZEPEDA, L. A.; EKNÆS, M.; LIND, G. E.; MYKLEBOST, O.; SKOTHEIM, R. I.; SVEEN, A.; LOTHE, R. A. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. **Mol Cancer**. v. 16, n. 1, p.116, 2017.

BLANCO, V. S. F.; MICHALAK, B.; ZELIOLI, Í. A. M.; OLIVEIRA, A. S. S.; RODRIGUES, M. V. N.; FERREIRA, A. G.; GARCIA, V. L.; CABRAL, F. A.; KISS, A. K.; RODRIGUES, R. A. F. Isolation of spilanthol from *Acmella oleracea* based on Green Chemistry and evaluation of its *in vitro* anti-inflammatory activity. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 140, p. 372-379., 2018.

BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**. v. 31, n. 11, p. 1905–12, 2010.

BOHLOLI, M.; ATASHI, A.; SOLEIMANI, M.; KAVIANI, S.; ANBARLOU, A.; Investigating effects of acidic Ph on proliferation, invasion and drug-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia. **Cancer Microenvironment**, v. 9, n. 2-3, p.119-126, 2016.

BOONEN, J. et al. LC–MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 243–249, 2010.

BOONTHA, S.; THOEDYOTIN, T.; SAENGTABTIM, T.; IM-ERB, P.; CHANIAD, N.; BURANRAT, B.; PITAKSUTTEEPONG, T. Citotóxico, formação de colônia e efeitos anti-migratórios de extrato aéreo de *Spilanthes acmella* (Asteraceae) em MCF-7 células e sua formulação em creme. **Trop. J. Pharm. Res.**, v. 19, p. 17–24, 2020.

BORGES, L. D. S.; GOTO, R.; LIMA, G. P. P. Exportação de nutrientes em plantas de jambú, sob diferentes adubações. **Ciências Agrárias**, v. 34, n.1, p.107-116, 2013.

BORGES, L. S.; GUERRERO, A. C.; GOTO, R.; LIMA, G. P. P. Índices morfofisiológicos e produtividade de cultivares de jambu influenciadas pela adubação orgânica e mineral. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1768-1778, 2014.

BORGES, L. da S. et al. Antioxidant compounds of organically and conventionally fertilized jambu (*Acmella oleracea*). **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 32, n. 3, p. 149–158, 2015.

BORGES, L. da S. et al. Antioxidant compounds of organically and conventionally fertilized jambu (*Acmella oleracea*). *Biological Agriculture & Horticulture*, v. 32, n. 3, p. 149-158, 2016.

BOURGUIGNON, L. Y. W. A interação da matriz hialuronana-CD44 ativa a sinalização de microRNA e LncRNA associada à quimiorresistência, invasão e progressão tumoral. *Frente. Oncol.*, v. 9, p. 492. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota Informativa 149 de 2015/CGPNI/DEVIT/SVS/MS. Informa as mudanças no calendário nacional de vacinação de 2016 [Internet]. Brasília (DF): Programa Nacional de Imunizações; 2015. [citado 2017 Jun 10].Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/legislação/2015/5858563/nota_informativa_149_pdf_23535.pdf. Acesso em nov/2021.

_____. Nota Informativa 384. Mudanças no calendário nacional de vacinação de 2017 [Internet]. Brasília (DF): Programa Nacional de Imunizações; 2017 [citado 2017 Jan 10]. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/28/Nota-Informativa-384-CalendarioNacional-de-Vacinacao-2017.pdf>.

_____. Nova Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias de Saúde e impacto ao Sistema Único de Saúde. **Citologia em meio líquido para rastreamento de câncer de colo de útero e lesões precursoras**. BRASÍLIA, 2019.

BRASILEIRO FILHO, G. **Sistema Genital Feminino**. 9th ed. Bogliolo - Patologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1556, 2016.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality

worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin.** v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BREWER, H. R.; JONES, M. E.; SCHOEMAKER, M. J.; ASHWORTH, A.; SWERDLOW, A. J. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. **Breast Cancer Res Treat.** v. 165, n. 1, p. 193-200, 2017.

BRUNI, L.; BARRIONUEVO-ROSAS, L.; ALBERO, G.; SERRANO, B.; MENA, M.; GÓMEZ, D. et al. Centro de Informações ICO/IARC sobre HPV e Câncer (Centro de Informações sobre HPV). **Vírus do papiloma humano e doenças relacionadas na Albânia;** 2014

BUYEL, J. F. Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. **Biotechnology Advances.**, v. 36, n. 2, p. 506-520, 2018.

BYCHKOVSKY, B. L.; FERREYRA, M. E.; STRASSER-WEIPPL, K.; HEROLD, C. I.; DE LIMA, LOPES G, Jr.; DIZON, D. S.; SCHMELER, K. M.; DEL CARMEN, M.; RANDALL, T. C.; NOGUEIRA-RODRIGUES, A.; DE CARVALHO CALABRICH, A. F.; ST LOUIS, J.; VAIL, C. M.; GOSS, P. E. Cervical cancer control in Latin America: a call to action. **Cancer.** v. 122, n. 4, p. 502-14, 2016.

CAESAR LK, CECH NB. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. **Nat Prod Rep.**, v. 36, n. 6, p. 869-888, 2019.

CAILLEAU, R. et al. Breast Tumor Cell Lines from Pleural Effusions. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 53, n. 3, p. 661-674, 1974.

CAIXEIRO, N. J.; KIENZLE, N.; LIM, S. H.; SPRING, K. J.; TOGNELA, A.; SCOTT, K. F.; DE SOUZA, P.; BECKER, T. M. Circulating tumour cells--a bona fide cause of metastatic cancer. **Cancer Metastasis Rev.** v. 33, n. 2-3, p. 747-56, 2014.

CAIRNS, R.; MAK, T. The current state of cancer metabolism. **Nat. Rev. Cancer**, v. 16, p. 613–614, 2016.

CALDERON, L. A.; SOBRINHO, J. C.; ZAQUEO, K. D.; DE MOURA, A. A.; GRABNER, A. N.; MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; NOMIZO, A.; FERNANDES, C. F.; ZULIANI, J. P.; CARVALHO, B. M.; DA SILVA, S. L.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **Biomed Res Int.**, v. 2014, p. 203639., 2014.

CAMPOY, E. M., et al. Intratumor heterogeneity index of breast carcinomas based on DNA methylation profiles. **BMC Cancer**, v. 9, n. 328, p. 2-15, 2019.

CAO, D.; LIU, Y.; YAN, W.; WANG, C.; BAI, P.; WANG, T.; TANG, M.; WANG, X.; YANG, Z.; MA, B.; MA, L.; LEI, L.; WANG, F.; XU, B.; ZHOU, Y.; YANG, T.; CHEN, L.; Projeto, síntese e avaliação da atividade anticâncer in vitro e in vivo de cumarinas substituídas em 4: uma nova classe de inibidores potentes da polimerização da tubulina. **J. Med. Chem.**, v. 59, p. 5721-5739, 2016.

CARSTEN-DENKERT, M. D.; CORNELIA LIEDTKE, M. D.; ANDREW TUTT, M. D.; GUNTER VON MINCKWITZ, M. D. Molecular alterations in triple-negative breast cancer the road to new treatment strategies. **Lancet**. v. 6, 2016.

CARVALHO, M.; CONDÉ, C. S. C. Q.; DA COSTA FERREIRA, M. V.; DRUMONT, B.; HENRIQUE, V. Câncer de mama: tratamento quimioterápico e quimiopreventivo. **ANAIS V SIMPAC**, v. 5, n. 1, p. 277-280, 2015.

CARVALHO, T. G. J.; BALDIVIA, D. S., LEITE, D. F. et al. (2019). Medicinal Plants from Brazilian Cerrado: Antioxidant and Anticancer Potential and Protection against Chemotherapy Toxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 1–16.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v.9, n.2, p.12-17, 2017.

CASSIER, P.; A.; CASTETS, M.; BELHABRI, A.; VEY, N. Targeting apoptosis in acute myeloid leukemia. **British Journal of Cancer**, v. 117, p. 1089-1098, 2017.

CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; PAZ NETO, A. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 10, p. 3697-3701, 2014.

CASTRO-RUIZ, J. E. et al. Affinin (Spilanthol), Isolated from *Heliopsis longipes*, Induces Vasodilation via Activation of Gasotransmitters and Prostacyclin Signaling Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 218, 2017.

CERVARIX® Vacina HPV 16/18: **modelo de texto de bula** [bula de remédio]. Responsável técnico Edinilson da Silva Oliveira. Rio de Janeiro; GlaxoSmithKline Brasil; s.d. [citado 2017 Jul 4]. Disponível em: http://br.gsk.com/media/536179/rec_1502260559220429145_bl_cervarix_inj_gds023_l0467.pdf. 7. Acesso nov/2021.

CHAE, Y. K, ANKER, J. F.; CARNEIRO, B. A.; CHANDRA, S.; KAPLAN, J.; KALYAN A.; SANTA-MARIA, C. A.; PLATANIAS, L. C.; GILES, F. J. Genomic landscape of DNA repair genes in cancer. **Oncotarget**. v. 7, n. 17, p. 23312-21, 2016.

CHANDRASEKARAN, A., IDELCHIK, M. P. S., MELENDEZ, J. A. Redox control of senescence and age-related disease, *Redox Biology*, v. 11, p. 91–102, 2017.

CHANG, J. C. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. **Medicine**, v. 95, n. 1S, p. S20-S25, 2016.

CHANG, Y. X.; ZHANG, Q. H.; LI, J.; ZHANG, L.; GUO, X. R.; HE, J.; ZHANG, P.; MA, L.; DENG, Y. R.; ZHANG, B. L.; GAO, X. M. Simultaneous determination of scopoletin, psoralen, bergapten, xanthotoxin, columbianetin acetate, imperatorin, osthole and isoimperatorin in rat plasma by LC-MS/MS for pharmacokinetic studies following oral administration of Radix Angelicae Pubescentis extract. **J Pharm Biomed Anal**. v. 77: p. 71-5, 2013.

CHAPPELL, G. A.; RAGER, J. E. Epigenetics in chemical-induced genotoxic carcinogenesis. **Current Opinion in Toxicology**, v. 6, p.10-17, 2017.

CHAVOSHI, H.; VAHEDIAN V.; SAGHAEI, S.; BAGHER P.; RAEISI, M.; SAMADI, N. Adjuvant therapy with silibinin improves the efficacy of paclitaxel and cisplatin in MCF-7 breast cancer cell. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 8, p. 2243-2247, 2017.

CHEN, Y.; DE BRUYN KOPS, C.; KIRCHMAIR, J. Data Resources for the Computer Guided Discovery of Bioactive Natural Products. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 9, p. 2099–2111, 2017.

CHEN, H.; LIN, Z.; ARNST, K. E.; MILLER, D. D.; LI, W. Tubulin inhibitor-based antibody-drug conjugates for cancer therapy. **Molecules**. v.22, n.8, p.1281, 2017.

CHEN, M.; XIE, S. Therapeutic targeting of cellular stress responses in cancer. **Thoracic Cancer**, v. 9, n. 12, p. 1575-1582, 2018.

CHENG, Y. B.; LIU, R. H.; HO, M. C.; WU, T. Y.; CHEN, C. Y.; LO, I. W.; HOU, M. F.; YUAN, S. S.; WU, Y. C.; CHANG, F. R. **Alkylamides of *Acmella oleracea*. Molecules.**, v. 20, n.4, p. 6970-6977, 2015.

CHO, Y. C.; BACH, T. T.; KIM, B. R.; VUONG, H. L, CHO, S. *Spilanthes Acmella* inibe as respostas inflamatórias por meio da inibição de NF-κVias de sinalização B e MAPK em macrófagos RAW 264,7. **Mol Med Rep.**, v.16, n.1, p. 339-46, 2017.

CHU, C. S.; RUBIN, S. C.; DI SAIA, P. J.; CREASMAN, W. T.; MANNEL, R. S.; MCMEEKIN, D. S.; MUTCH, D. G. Princípios básicos da quimioterapia. In: editores. *Oncologia ginecológica clínica*. 9a ed. Filadélfia, PA: **Elsevier**; p. 449-469. 2018.

CLIFFORD, R.; GOVINDARAJAH, N.; PARSONS, J. L.; GOLLINS, S.; WEST, N. P.; VIMALACHANDRAN, D. Systematic review of treatment intensification using novel agents for chemoradiotherapy in rectal cancer. **Br J Surg**. v. 105, n. 12, p. 1553-1572, 2018.

COATES, A. S. et al. Tailoring therapies – improving the management of early breast cancer: St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 8, p. 1533-1546, 2015.

COLLINS, G. L. B., PIEIRINA, S. B., Em: **Introdução aos métodos cromatográficos**, 7ª ed., UNICAMP, São Paulo, 1997.

CRUZ, P. B.; BARBOSA, A. F.; ZERINGÓTA, V.; MELO, D.; NOVATO, T.; FIDELIS, Q. C.; FABRI, R. L.; DE CARVALHO, M. G.; OLIVEIRA SABAA-SRUR, A. U.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O. Acaricidal activity 70 of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthal on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Vet Parasitol.** v.15; n. 228, p. 137-143, 2016.

DALLAZEN, J. L.; MARIA-FERREIRA, D.; DA LUZ, B. B.; NASCIMENTO, A. M.; CIPRIANI, T. R.; DE SOUZA, L. M.; GLUGOSKI, L. P.; SILVA, B. J. G.; GEPETTI, P.;

DE PAULA WERNER, M. F. Distinct mechanisms underlying local antinociceptive and pronociceptive effects of natural alkaloids from *Acmella oleracea* compared to synthetic isobutylalkyl amide. **Fitoterapia**. v. 131, p. 225-235, 2018.

DALLAZEN, J. L.; MARIA-FERREIRA D.; DA LUZ, B. B, NASCIMENTO, A. M.; CIPRIANI, T. R.; DE SOUZA, L. M.; FELIPE, L. P. G.; SILVA, B. J. G.; NASSINI, R.; DE PAULA WERNER, M. F. Potencial farmacológico de alquilamidas de flores de *Acmella oleracea* e isobutilalquil sintéticoamida para tratar a dor inflamatória. **Inflammopharmacology**. v. 28, p. 175–186, 2020.

DAMMANN, R. H.; RICHTER, A. M.; JIMÉNEZ, A. P.; WOODS, M.; KÜSTER, M.; WITHARANA, C. Impact of Natural Compounds on DNA Methylation Levels of the Tumor Suppressor Gene RASSF1A in Cancer. **Int J Mol Sci**. v. 18, n.10, p. 2160, 2017.

DA MOTA, F.L; DA SILVA, C. S **Estudo da adsorção do espilantol em solução alcoólica em resinas hidrofóbica**. In: VI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. Pará. Acesso em: 19.08.2021. Disponível em: https://sic.unifesspa.edu.br/images/SI/C2020/Artigos/submissao_16019423380061602697989247.pdf

DANCSOK, A. R.; ASLEH-ALBURAYA, K.; NIELSEN, T. O. Advances in sarcoma diagnostics and treatment. **Oncotarget**, v. 8, n.4, p. 7068, 2017.

DANDIN, V. S.; NAIK, P. M.; MURTHY, H. M.; PARK, S. Y.; PAEK, K. Y. Rapid regeneration and analysis of genetic fidelity and scopoletin contents of micropropagated plants of *Spilanthes oleracea* L. **J. Hort. Sci. Biotechnol**. V. 89, P. 79–85, 2014.

DA ROCHA, C. F. **Estudo do Extrato hidroetanólico de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen sobre a função reprodutiva de ratos Wistar adulto**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amapá, Amapá, 2018.

DA SILVA BORGES, L.; DE SOUZA VIEIRA, M. C.; VIANELLO, F.; GOTO, R.; LIMA, G.; P.; P. Antioxidant compounds of organically and conventionally fertilized jambu (*Acmella oleracea*). **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 32, n. 3, p. 149-158, 2016.

DA SILVA, I. D. R. **Utilização de técnicas hifenadas para o desenvolvimento de programações para Análise de *Acmella oleracea* (L.) RK JANSEN**. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará. Pará, 2016.

DEBERARDINIS, R. J.; CHANDEL, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. **Sci. Adv.**, v. 2, n. 5, 2016.

DE FALCO, M.; DE LUCA, A. Cell cycle as a target of antineoplastic drugs. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 12, p. 1417-1426, 2010.

DE FREITAS-BLANCO, V. S. et al. Development and evaluation of a novel mucoadhesive film containing *Acmella oleracea* extract for oral mucosa topical anesthesia. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. 1-18, 2016.

DELLAMORA, E. D. C. L., et al. **Phytochem. Lett.**, v. 6, p. 67–72, 2013.

DE MORAES, A. V. **Avaliação Genotóxica do extrato fracionado da raiz de *Acmella oleracea* em linhagem tumoral de cancer de laringe humana**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Universidade do Vale da Paraíba. São Paulo, 2018.

DE SANTIS, C. E. et al. Estatísticas do câncer de mama, 2015: convergência das taxas de incidência entre mulheres negras e brancas. **CA Cancer J Clin.** v. 66, n.1, p. 31–42, 2016.

DE SOUZA, G. C.; MATIAS PEREIRA, A. C.; VIANA, M. D.; FERREIRA, A. M.; DA SILVA, I. D. R.; DE OLIVEIRA, M. M. R.; BARBOSA, W. L. R.; SILVA, L. B.; FERREIRA, I. M.; DOS SANTOS, C. B. R.; CARVALHO, J. C. T. *Acmella oleracea* (L) R. K. Jansen Reproductive Toxicity in Zebrafish: An *In Vivo* and *In Silico* Assessment. **Evid Based Complement Alternat Med.** v. 2019, p. 1237301, 2019.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Editora UNESP. p.472-483, 2002.

DIAO, M.K.; LIU, C.Y.; LIUA, H.W.; LIA, J.T.; LI, F.; MEHRYAR, M.M.; WANG, Y.J.; ZHANA, S. B.; ZHOU, Y.; ZHONG, R.; ZENG, Y. Integrated HPV genomes tend to integrate in gene desert areas in the CaSki, HeLa, and SiHa cervical cancer cell lines. **Life Sci.** v. 127, p. 46–52, 2015.

DIAS, A.M.A.; SANTOS, P.; SEABRA, I.J.; JÚNIOR, R.N.C.; BRAGA, M.E.M.; DE SOUSA, H.C. Spilanthol from *Spilanthus acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction, **J. Supercrit. Fluid.** v. 61, p.62–70, 2012.

DIAS, A. M. A; DA SILVA, A. C. S; BOTELHO, J. R. S; JUNIOR, R. N. C.; DE SOUSA, H.C.; BRAGA, M. E. M. Temperature and density effects of the sc CO₂ extraction of spilanthol from *Spilanthus acmella* flowers. The **journal of supercritical fluids**. v. 121, p. 32-40, 2017.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I. G.; STOLER, M.; BROKER, T. R. et al. A biologia e o ciclo de vida dos papilomavírus humanos. **Vacina.** v. 30, n. 5: p. 55-70, 2012.

DRULINER, B. R.; RUAN, X.; SICOTTE, H.; OBRIEN, D.; LIU, H.; KOCHER, J. A.; BOARDMAN, L. Aberrações genéticas precoces em pacientes com câncer colorretal esporádico. **Mol Carcinog.**, v. 57, p. 114-124, 2018.

DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S. A.; SAHA, S. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthus acmella*: a review. **Adv Pharmacol Sci.** 2013.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol. Res.** v. 112, p. 4–29. 2016.

DYSON, N. J. RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. **Genes Dev.** v. 30, p. 1492–1502, 2016.

EL-FAR, M.; SALAH, N.; ESSAM, A.; ABD EL-AZIM, A. O.; EL-SHERBINY, IM. Silymarin nanoformulation as potential anticancer agent in experimental Ehrlich ascites carcinoma-bearing animals. *Nanomedicine (Lond)*. v.13. n. 15. p. 1865-1858. 2018.

EL-GUEZZANE, C., EL-MOUDDEN, H., HARHAR, H. et al. A comparative study of the antioxidant activity of two Moroccan prickly pear cultivars collected in different regions. **Chemical Data Collections**, v. 31, 100637, 2021.

ELLISEN, L. W. Molecular genetics of cancer. **ACP Med.**, 2015.

EL-MAGD, MMOHAMMED, A. et al. Trehalose enhances the antitumor potential of methotrexate against mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 92, p. 870-878, 2017.

ESCOBEDO-MARTÍNEZ C, GUZMÁN-GUTIÉRREZ SL, HERNÁNDEZ-MÉNDEZ MM, CASSANI J, TRUJILLO-VALDIVIA A, OROZCO-CASTELLANOS, LM et al. *Heliopsis longipes*: anti-arthritis activity evaluated in a Freund's adjuvant-induced model in rodents. **Rev. bras. Farmacogn.** v. 27, n. 2, p. 214-9, 2017.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 303: Spilanthol from chemical group 301, EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF). **EFSA J.**, v. 13, 28 p., 2015.

EWALD, PAUL W. Ancient cancers and infection-induced oncogenesis. **International Journal of Paleopathology**, 2017.

FARAJI, F.; EISELE, D. W.; FAKHRY, C. Emerging insights into recurrent and metastatic human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma Laryngoscope investigate **otolaryngology**, v. 2. n.1, p.10-18, 2016.

FARIAS, A. L F.; RODRIGUES, A. B. L.; MARTINS, R. L.; DE MENEZES, R. É.; FARIAS, C. W. F.; DA SILVA DE ALMEIDA, S. S. M. Caracterização Química, Atividades Antioxidantes, Citotóxicas e Microbiológicas do Óleo Essencial da Folha de *Tithonia Diversifolia* (Hemsl) A. Gray (Asteraceae). **Farmacêutica (Basel, Suíça)**, v. 12, n.1, p.34, 2019.

FATIMA, I.; KANWAL, S.; MAHMOOD, T. Evaluation of biological potential of selected species of family Poaceae from Bahawalpur, Pakistan. **Complementary and Alternative Medicine**. v. 18, n. 27. 2018.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. Estado da Arte/State of the Art - *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**, v. 5, n. 1, p. 83–91, 2010.

FEITOZA, LQ.; TERRA, FDS.; GRASELLI, CDSM. Plantas Medicinais e seus Compostos com Potencial Terapêutico no Tratamento do Câncer: Revisão Integrativa. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 67, n.1, e-031114, 2021.

FENGA, C. **Occupational exposure and risk of breast cancer**. Biomed Rep. v. 4, n. 3, p. 282–92, 2016.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, 2018. New York, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, 2019.

FERLAY, J. et al. (ed.). **Cancer today**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. (IARC CAnceRBase, n. 15), 2018. Available at: <https://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/Cancer-Today-Powered-By-GLOBOCAN-2018--2018>. Access in: 9 Sep. 2019.

FERREIRA, D. M.; DA SILVA, L. M.; MENDES, D. A. G. B.; CABRINI, D. A.; NASCIMENTO, A. M.; IACOMIN, I. M.; CIPRIANI, T. R.; SANTOS, A. R. S.; WERNER, M. F. P.; BAGGIO, C. H. Rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen: Gastroprotective and Ulcer Healing Properties in Rats. **PLoS One.**, v. 9, n. 1. 2014.

FINN, R. S.; MARTIN, M.; RUGO, H. S.; JONES, S.; IM, S. A.; GELMON, K.; HARBECK, N.; LIPATOV, O. N.; WALSH, J. M.; MOULDER, S.; GAUTHIER, E.; LU, D. R.; RANDOLPH, S.; DIÉRAS, V.; SLAMON, D. J. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. **N Engl J Med.**, v. 375, n. 20, p. 1925-1936, 2016.

FISCHER, M.; QUAAS, M.; STEINER, L.; ENGELAND, K. The p53-p21-DREAMCDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p. 164-174, 2016.

FOUAD, Y. A; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **Am. J. Cancer Res.**, n. 7, v. 5, p. 1016-1036, 2017.

FRANCA, J. V.; QUEIROZ, M. S. R.; AMARAL, B. P. D.; SIMAS, N. K.; SILVA, N. C. B. D.; LEAL, I. C. R. Métodos distintos de crescimento e extração de *Acmella oleracea* (L.) R. K Jansen aumentando diferentes concentrações de espilantol: um importante composto bioativo na dieta humana. **Science direct - Elsevier**, v. 89, p. 781-789, 2016.

FREITAS-BLANCO, V. S. D. **Extração de espilantol no contexto da química verde e sua aplicação no tratamento da mucosite oral**. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia. Universidade Estadual de Campinas. Piracicaba, São Paulo, 2018.

FRICKE, A.; ULLRICH, P. V.; CIMNIAK, A. F. V.; BECHERER, C.; FOLLO, M.; HEINZ, J.; STARK, G. B. Levels of activated platelet-derived microvesicles in patients with soft tissue sarcoma correlate with an increased risk of venous thromboembolism. **BMC câncer**, v. 17, n.1, p. 527, 2017.

FULAWKA L, HALON, A. Ki-67 **evaluation in breast cancer: The daily diagnostic practice**. **Indian J Pathol Microbiol.** v. 60, n. 2, p. 177, 2017.

FULDA, S. Targeting extrinsic apoptosis in cancer: challenges and opportunities. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. v. 39, p. 20-25, 2015.

GAJULAPALLI, V. N. R.; MALISETTY, V. L.; CHITTA, S. K.; MANAVATHI, B. Oestrogen receptor negativity in breast cancer: a cause or consequence? *Biosci Rep*. v. 36, n. 6, p. e00432, 2016.

GAHL, R. F.; DWIVEDI, P.; TJANDRA, N. Bcl-2 proteins bcl-2 and bax form a network to permeabilize the mitochondria at the onset of apoptosis. *Cell Death and Disease*, v.7, n.10, 2016.

GARDASIL® **vacina papilomavírus humano 6, 11, 16 e 18 (recombinante) [bula de remédio]**. Responsável técnico Fernando C. Lemos. Campinas: Merck Sharp & Dohme Farmacêutica; s.d.

GARLAND, S. M.; KJAER, S. K.; MUÑOZ, N.; BLOCK, S. L.; BROWN, D. R.; DINUBILE, M. J. et al. Impact and effectiveness of the quadrivalent human papillomavirus vaccine: a systematic review of 10 years of realworld experience. *Clin Infect Dis*. 2016;63(4):519-27. 9.

GEORGE, D. R.; EDRIS, W.; HANSON, R.; GILMAN, F. Medicinal plants--the next generation. *Lancet*. v. 387, n. 10015, p. 220-221, 2016.

GEORGAKILAS, A. G.; MARTIN, O. A.; BONNER, W. M. p21: A two-faced genome guardian. *Trends in Molecular Medicine*, v. 23, n. 4, p. 310–319, 2017.

GERBINO, A.; SCHENA, G.; MILANO, S.; MILELLA, L.; BARBOSA, A. F.; ARMENTANO, F.; PROCINO, G.; SVELTO, M.; CARMOSINO, M. Spilanthol from *Acmella Oleracea* Lowers the Intracellular Levels of cAMP Impairing NKCC2 Phosphorylation and Water Channel AQP2 Membrane Expression in Mouse Kidney. *PLoS One*, v.11, n.5, 2016.

GERTSCH J. Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: forth and back to intelligent mixtures. *Planta Med*. v. 77, n. 11, p.1086-98, 2011.

GILABERT-ORIO, R.; RYAN, G. M.; LEUNG, A. W. Y.; FIRMINO, N. S.; BENNEWITH, K. L.; BALLY, M. B. Liposomal Formulations to Modulate the Tumour Microenvironment and Antitumour Immune Response. *Int J Mol Sci*. v.19, n. 10, p. 2922, 2018.

GODONE, R. L. N.; LEITÃO, G. M.; ARAÚJO, N. B.; CASTELLETTI, C. H. M.; LIMA-FILHO, J. L.; MARTINS, D. B. G. Clinical and molecular aspects of breast cancer: Targets and therapies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.106, p. 14-34, 2018.

GOMES, D. B.; ZANCHET, B.; LOCATELI, G.; BENVENUTTI, R. C.; VECCHIA, C. A. D.; SCHÖNELL, A. P.; DIEL, K. A. P.; ZILLI, G. A. L.; MIORANDO, D.; ERNETTI, J.; OLIVEIRA, B.; ZANOTELLI, P.; SANTOS, M. F. C.; BARISSON, A.; BANZATO, T. P.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; FILHO, V. C.; ... ROMAN JUNIOR, W. A. Potencial antiproliferativo de solidagenona isolada de *Solidago chilensis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 28, n. 6, p. 703-709, 2018.

GONÇALVES, J. C.R.; SOBRAL, M. V. **Cultivo de células: da teoria à bancada**-João Pessoa. Ed. UFPB, 2020, 166p.

GONZALEZ, Ó.; ZAFON, C.; CAUBET, E.; GARCIA-BURILO, A.; SERRES, X.; FORT, J. M.; MESA, J. Biopsia selectiva del gânglio centinela em el carcinoma papilar de tireoides em pacientes sin evidencia preoperatoria de metástases ganglionar. **Endocrinología, Diabetes y Nutrición**, v. 64, p. 451-455, 2017.

GOLUBNITSCHAJA, O.; YEGHIAZARYAN, K.; ABRAHAM, J. A.; SCHILD, H. H.; COSTIGLIOLA, V.; DEBALD, M.; KUHN, W. Breast cancer risk assessment: a non-invasive multiparametric approach to stratify patients by MMP-9 serum activity and RhoA expression patterns in circulating leucocytes. **Amino Acids**. v. 49, n. 2, p. 273-281, 2017.

GREENSTEIN, JESSE. P. **Biochemistry of Cancer**. Elsevier, 2016.

GREGER, H. Alkamides: A critical reconsideration of a multifunctional class of unsaturated fatty acid amides, **Phytochemistry Reviews**, v. 15, p. 729-770, 2015.

GREGER, H. Alkamides: a critical reconsideration of a multifunctional class of unsaturated fatty acid amides. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 5, p. 729-770, 2016.

GUEDES, Cristiano. **O livro A vida imortal de conta a história de Henrietta e de como suas células**. v. 20, p.1413-1416, 2013.

GULLEDGE, T. V.; COLLETTE, N. M.; MACKEY, E.; JOHNSTONE, S. E.; MOAZAMI, Y.; TODD, D. A.; MOESER, A. J.; PIERCE, J. G.; CECH, N. B.; LASTER, S. M. Mast cell degranulation and calcium influx are inhibited by an *Echinacea purpurea* extract and the alkylamide dodeca2E,4E-dienoic acid isobutylamide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, p. 166-174, 2018.

GUSMÃO, M. T. A.; GUSMÃO, S. A. L. Jambu da Amazônia *Acmella oleracea* [(L) R. K. Jansen]: características gerais, cultivo convencional, orgânico e hidropônico. Belém: UFRA, 135, 2013.

HAJDU, A. An Ethnopharmacological Survey Conducted in the Bolivian Amazon, and Identification of N-alkylamides and Lignans from *Lepidium meyenii* and *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* with Effects on the Central Nervous System. University of Szeged, Szeged, **Hungary**. 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n.5, p. 646-674, 2011.

HARPER, D. M.; DEMARS, L. R. HPV vaccines: a review of the first decade. **Gynecol Oncol**. 2017;146 (1) : 196-204

HARVEY, A. L.; EDRADA, E. R.; QUINN, R. J. A re-emergência de produtos naturais para a descoberta de medicamentos na era genômica. **Nat Rev droga Discov.**, v. 14, p. 111-29, 2015.

HASANPOURGHADI, M; PANDURANGAN, A. K.; MUSTAFA, M. R. Modulation of oncogenic transcription factors by bioactive natural products in breast cancer. **Pharmacological research** v. 128, p. 376-388, 2017.

HENNIGS, A.; RIEDEL, F.; GONDOS, A, et al. Prognóstico de subtipos moleculares de câncer de mama em cuidados clínicos de rotina: Um grande estudo de coorte prospectivo. **BMC Cancer**. v. 16, n.1, p. 734, 2016.

HILBIG, J.; POLICARPI, P. B.; GRINEVICIUS, V. M. A. S.; MOTA, N. S. R. S.; TOALDO, I. M.; LUIZ, M. T. B.; PEDROSA, R. C.; BLOCK, J. M. Aqueous extract from pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell show activity against breast cancer cell line MCF-7 and Ehrlich ascites tumor in Balb-C mice. **J Ethnopharmacol**. v. 30, n. 211, p. 256-266, 2018.

HISERODT, R. D.; POPE, B. M.; COSSETTE, M.; DEWIS, M. L. Proposed mechanisms for the fragmentation of doubly allylic alkenamides (tingle compounds) by low energy collisional activation in a triple quadrupole mass spectrometer. **J Am Soc Mass Spectrom**. v. 15, n. 10, p. 1462-1470, 2004.

HOMMA, A. K. O. et al. Etnocultivo do jambu para abastecimento da cidade de Belém, Estado do Pará. In: HOMMA, A. K. O. et al. (Org.). Extrativismo Vegetal na Amazônia: História, Ecologia, Economia e Domesticação. 1 ed. Brasília: **Embrapa**, cap. 25, p. 331-343, 2014.

HON, J. D.; SINGH, B.; SAHIN, A.; DU, G.; WANG, J.; WANG, V. Y.; DENG, F. M.; ZHANG, D. Y.; MONACO, M. E.; LEE, P. Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. **Am J Cancer Res**, v. 6, n. 9, 2016.

HORST, K. C.; FERRO, K. E.; HANCOCK, S. L.; ADVANI, R. H.; IKEDA, D. M.; DANIEL, B.; ROSENBERG, S. A.; DONALDSON, S. S.; HOPPE, R. T. Breast Imaging in Women Previously Irradiated for Hodgkin Lymphoma. **Am J Clin Oncol**, v. 39, n. 2, p. 114–119, 2016.

HU, W. X.; DING, C. M.; LI, R. J.; FAN, H. Y.; GUO, Z. J.; LIU, W. Single nucleotide polymorphisms in the mitochondrial displacement loop and age-at-onset of non-small cell lung cancer. **Genet Mol Res**, v. 14, n.1, p. 512-7, 2015.

HUANG, D.; SUN, W.; ZHOU, Y.; LI, P.; CHEN, F.; CHEN, H.; XIA, D.; XU, E.; LAI, M.; WU, Y. et al. Mutações de genes determinantes na progressão e metástase do câncer colorretal. **Cancer Metastasis Ver**. 37, 173-187, 2018.

HUANG, W.; HUANG, C.; HU, S.; PENG, H.; WU, S. Topical Spilanthal Inhibits MAPK Signaling and Ameliorates Allergic Inflammation in DNCB-Induced Atopic Dermatitis in Mice. **International journal of molecular science**, v. 20, n.10, p.13, 2019.

HUANG, W.; PENG, H.; HU, S.; WU, S. Spilanthal from traditionally used *Spilanthes acmella* enhances AMPK and ameliorates obesity in mice fed high-fat diet. **Nutrients**. v. 11, n. 5, p. 991. 2019b.

HUDGENS, STACIE. et al. Evoluton of quality of life at progression in patients with soft tissue sarcoma. **Sarcoma**, v. 2017, 2017.

HYNDMAN, I. J. The Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours, **Cancer Microenvironment**, v. 9, n.1, p. 63-69, 2016.

IJAZ, S.; AKHTAR, N.; KHAN, M. S.; HAMEED, A.; IRFAN, M.; ARSHAD, M. A.; ASRAR, M. S. et al. Plant derived anticancer agents: A green approach towards skin cancers. Biomedicine; **Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1643-1651, 2018.

IKSANNOVA, Alfiya G. et al. In-vitro antitumor activity of new quaternary phosphonium salts, derivatives of 3-hydroxypyridine. **Anti-cancer drugs**, v. 29, n. 7, p. 682-690, 2018.

IMRAN, A, QAMAR, H. Y.; ALI, Q.; NAEEM, H.; RIAZ, M.; AMIN, S.; KANWAL, N.; ALI, F.; SABAR, M. F.; NASIR, I. A. Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article. **Iran J Public Health**. v. 46; n. 11, p.1475-1485, 2017.

INCA: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicações/estimativa_incidencia_cancer_2008.pdf. Acesso em 22 de nov. 2020.

_____. Estimativa 2014: **Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: https://rbc.inca.gov.br/site/arquivos/n_60/v01/pdf/11-resenha-estimativa-2014-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf. Acesso em: 01 jul. 2020.

_____. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: **Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

_____. **Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer de Colo de Útero**. Rio de Janeiro: INCA 2016a. Disponível: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio/deteccao_precoce. Acesso: em 23.out.2019.

_____. **Controle do Câncer de Mama**, Rio de Janeiro: INCA 2016b. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/tratamento. Acesso em: 05 fev. 2020.

_____. **Como é o processo de Carcinogênese?** Rio de Janeiro. INCA. 2017, 2 de jul de 2017. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319

_____. **Tipos de câncer**. Rio de Janeiro, INCA, 2017a. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home>. Acesso em: 22 jun. 2019.

_____. INCA. **Quimioterapia**. Rio de Janeiro, INCA, 2017b. 18 de jul. 2017. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101. Acesso em: 30 de jul. 2019.

_____. INCA. **Radioterapia**. Rio de Janeiro, INCA, 2017c. 18 de jul de 2017. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=100. Acesso em: 28 jun. 2019.

_____. INCA. **Estadiamento**. Rio de Janeiro, INCA, 2018. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=54. Acesso em: 15 de fev. 2018.

_____. INCAa. **Tipos de câncer. MAMA**. Rio de Janeiro, INCA, 2018. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>. Acesso em: 15 de fev. de 2018.

_____. INCAb. **Fatores de risco**. Rio de Janeiro, INCA, 2018. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/no brasil/pr114 programa_controle_cancer_mama/fatores_risco. Acesso em: 15 de fev. 2018.

_____. INCAc. **Sintomas MAMA**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/sintomas>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2020.

_____. INCA. **Tipos de câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>. Acesso em: 5 set. 2019.

_____. INCA. ABC do câncer: **abordagens básicas para o controle do câncer**/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 6. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: INCA, 2020.

IORGA; ANDREA; DARA, LILY; KAPLOWITZ, NEIL. Drug-induced liver injury: cascade of events leading to cell death, apoptosis or necrosis. **International journal of molecular sciences**, v.18, n. 5, p.1018, 2017.

ISRAEL, Y.; RACHMIEL, A; ZIV, G.; NAGLIER, R. Benign and Malignant Salivary Gland Tumors-Clinical and Demographic Characteristics. **Anticancer Research**, v. 36, n. 8, p. 4151-4154, 2016.

IYER, D. R.; RIND, N. 'The intra-S checkpoints responses to DNA damage' **Genes**. v. 8, n. 74, p. 1-25, 2017.

JAFARINIA, M.; JAFARINIA, M. Uma revisão das propriedades medicinais de algumas plantas da família Asteraceae no sistema imunológico. **Rep. Saúde**; v. 5. p. 1–7, 2019.

JAHANAFROOZ, ZOREH. et al. Silibinin to improve cancer therapeutics, as an apoptic inducer, autophagy modulator, cell cycle inhibitor, and micro RNAs regulator, **Life Sciences**, 2018.

JAMEEL, E.; UMAR, T.; KUMAR, J.; HODA, N. Coumarin: A Privileged Scaffold for the Design and Development of Antineurodegenerative Agents. **Chem. Biol. Drug Des.** v. 87, p. 21-38, 2016.

JHAN, J. R, ANDRECHEK, E. R. Câncer de mama triplo-negativo e o potencial para terapia direcionada. **Farmacogenômica**. v, 18, n. 17, p. 1595–1609, 2017.

JIANG, K.; XING. Y.; QUAN, Q.; SUN, Q.; TIAN, J.; LIU, C.; SONG, X.; WANG, X.; LIU, Y. Synthesis and biological evaluation of N-Alkylamide derivatives as anti-tumor agents. **J. Tradit. Chin. Med Sci**. v. 7, p. 393–403, 2020.

JOHNSON, A.; SKOTHEIN, J. M. Startand the restriction point. **Journal Current Opinion in Cell Biology**, v. 25, n. 6, p. 717-723, 2013.

JOPKIEWICZ, S. The process of cancer. Part I. The role of selected factors in the induction of carcinogenesis. **J. Educ. Health Sport.**, v. 9, n. 5, p. 416-429, 2019.

JOSHI, V.; SHARMA, G.D.; JADHAV, S. K. ALKAMIDES: Multifunctional bioactive agents in *Spilanthes* spp. **J. Sci. Res.** v. 64, p.198–206, 2020.

KAISER, A. M.; ATTARDI, L. D. Deconstructing networks of p53-mediated tumor suppression in vivo. **Cell Death Differ.** v. 25, p. 93–103, 2018.

KANNAIYAN, R.; MAHADEVAN, D. A comprehensive review of protein kinase inhibitors for câncer therapy. **Expert review of anticâncer therapy**, v.18, n.12, p. 1249-1270, 2018.

KANTH, P.; GRIMMETT, J.; CHAMPINE, M.; BURT, R.; SAMMADER, J. Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Magnagement. **American Journal of Gastroenrology**. v.112, n. 10, p.1509-1525, 2017.

KARMAHAPATRA, S.; KIENTZ, C.; SHETTY, S.; YALOWICH, J. C.; RAKOTONDRAIBE, L. H. Capsicodendrin from *Cinnamosma fragrans* Exhibits Antiproliferative and Cytotoxic Activity in Human Leukemia Cells: Modulation by Glutathione. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 3, p. 625-629, 2018.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 155-176, 2016.

KAVYA, M. D. & PATTAR, P. V. (2016). Antibacterial activity and phytochemical screening of *Spilanthes acmella* Murr. Against selected pathogenic microorganisms, **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, 7(2), 310-314.

KEATING, G. M. Bevacizumab: a review of its use in advanced cancer. **Drugs**. v. 74, n. 16, p. 1891-1925, 2014.

KGATLE, M. M; SPEARMAN C. W.; KALLA, A.A; HAIRWADZI, H. N. Estresse Oxidativo Induzido por Vírus Oncogênicos de DNA, Danos Genômicos e Alterações Epigenéticas Aberrantes. **Oxid Med Cell Longev**. v. 2017, p. 3179421, 2017.

KHAN, H. Medicinal Plants in Light of History: Recognized Therapeutic Modality. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 19, n. 3, p. 216-219, 2014.

KIM, K. H.; KIM, E. J.; KWUN, M. J.; LEE, J. Y.; BACH, T. T.; EUM, S. M.; CHOI, J. Y.; CHO, S.; KIM, S. J.; JEONG, S. I.; JOO, M. A supressão da inflamação pulmonar pelo extrato de metanol de *Spilanthes acmella* Murray está relacionada à regulação diferencial de NF-κB e Nrf2. **J Ethnopharmacol**. v. 217, p. 89–97. 2018.

KLOSS, L. C.; ALBINO, A. M.; SOUZA, R. G.; LIMA, R. A. Identificação de classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper umbellatum* L. (PIPERACEAE). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 3 n. 2, p. 118-128, 2016.

KNIJNENBURG TA, WANG L, ZIMMERMANN MT, CHAMBWE N, GAO GF, CHERNIACK AD, FAN H, SHEN H, WAY GP, GREENE CS *et al* (2018) Paisagem

genômica e molecular da deficiência de reparo de dano de DNA em todo o atlas do genoma do câncer. *Cell Rep* 23, 239-254.e236.

KOCH, A.; TAMEZ, P.; PEZZUTO, J.; SOEJARTO, D. Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 95-99, 2005.

KOCYIGIT, A.; GULER, E. M.; DIKILITAS, M. Role of Antioxidant Phytochemicals in Prevention, Formation and Treatment of Cancer. In: CRISTIANA, F. **Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells**. IntechOpen. p. 21-45, 2017.

KOFF, J. L.; RAMACHANDIRAN, S.; BERNAL-MIZRACHI, L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 2, p. 2942-55, 2015.

KOOTI, W.; SERVATYARI, K.; BEHZADIFAR, M. et al. Effective medicinal plant in cancer treatment, part 2: review study. **J Evid Based Complementary Altern Med**. v. 22, n. 4, p. 982-95, 2017.

KUETE V, NGNINTEDO D, FOTSO GW, et al. Cytotoxicity of seputhecarpan D, thonningiol and 12 other phytochemicals from African flora towards human carcinoma cells. **BMC Complement Altern Med**. v. 18, p. 36, 2018.

KUIPERS, E. J.; GRADY, W. M. LIEBERMAN, D.; SEUFFERLEIN, T.; SUNG, J.J.; BOELEN, P. G., et al. Colorectal câncer. **Nature Reviews**, v. 1, p. 51, 2016.

KUMAR, P.; AGGARWAL, R. Uma visão geral do câncer de mama triplo-negativo. **Arch Gynecol Obstet**. 2016; 293 (2): 247–269.

LACERDA, A. S. **Caracterização do potencial anticancer do composto A398, um derivado inédito da podofilotoxina**. (Tese) Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2012.

LAGNIKA, L.; AMOUSSA, A. M.; ADJILEYE, R. A.; LALEYE, A.; SANI, A. Avaliação antimicrobiana, antioxidante, de toxicidade e fitoquímica de extratos de *Acmella uliginosa*, um vegetal com folhas consumido em Bénin, África Ocidental. **BMC Complement Altern Med**. v. 16, p. 34, 2016.

LALCHHANDAMA K., LALTHANPUII PB, ZOKIMI Z. A planta com dor de dente (*Acmella oleracea*) exibe atividade anti-helmíntica em tênias parasitas e lombrigas. **Pharmacog. Mag**. v. 16, p. 193, 2020.

LALTHANPUII, P. B.; LALAWMPUII, R.; LALHLENMAWIA, H.; VANLALDINPUIA, K.; LALCHHANDAMA, K. 2017. **Constituintes químicos e algumas propriedades biológicas do fitoterápico tradicional *Acmella oleracea* (Asteraceae)** In: Lalchandama K, editor. Ciência e Tecnologia para o Futuro de Mizoram.

LALTHANPUII, P. B.; LALCHHANDAMA K. Composição química e atividade anti-helmíntica de amplo espectro de uma cultivar de planta para dor de dente, *Acmella oleracea*, de Mizoram, Índia. **Pharm Biol**. v. 58, n. 1, p. 393-399, 2020.

LAMBERTINI, M.; PINTO, A. C.; AMEYE, L.; JONGEN, L.; MASTRO, L. D.; PUGLISI, F.; POGGIO, F.; BONOTTO, F.; FLORIS, G.; VAN ASTEN, K.; WILDIERS, H.; NEVEN, P.; AZAMBUJA, E.; PAESMANS, M.; AZIM, H. The prognostic performance of Adjuvant! Online and Nottingham Prognostic Index in young breast cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 115, 2016.

LANDRY, J. J. M.; PYL, P. T.; RAUSCH T, ZICHNER T, TEKKEDIL MM, STÜTZ AM, JAUCH A, AIYAR RS, PAU G, Delhomme N, Gagneur J, Korbel JO, Huber W, Steinmetz LM. The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. G3: **Genes, Genomes, Genetics**. v.3. n.8. p.1213–1224. 2013.

LE, Q. V.; YANG, G.; WU, Y.; JANG, H. W.; SHOKOUHIMEHR, M.; OH, Y. K. Nanomaterials for modulating innate immune cells in cancer immunotherapy. **Asian Journal of pharmaceutical Sciences**. v. 14, n. 1, p. 16-29, 2019.

LEE, D. H. et al. Nuclear and mitochondrial DNAs microsatellite instability and mitochondrial DNA copy number in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of lung: **a pilot study**. **Apmis**, v. 123, n. 12, p. 1048-1054, 2015.

LEE, Y. H.; KIM, B.; HWANG, S. R. et al, Rapid characterization of metabolites in soybean using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS) and screening for α -glucosidase inhibitory and antioxidant properties through different solvent systems. **Journal of food and drug analysis** 26. 277-291. 2018.

LEMOS, et al. Espilantol, uma molécula promissora para o tratamento de distúrbios inflamatórios: um estudo *in vitro* e *in silico*. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 17, n. 2, abr/jun. 2021.

LENG, T. C.; PING, N. S.; LIM, B. P.; KENG, C. L. Detection of bioactive compounds from *Spilanthes acmella* (L.) plants and its various in vitro culture products. **J Med Plant Res**. v.5, p.371-8, 2011.

LI, Z.; HU, P.; TU, J. câncer de mama Yu N. Luminal B: padrões de recorrência e resultado clínico. **Oncotarget**. 2016; 7 (40): 1–10.

LI, W.; DENG, Y.; CHU, Q.; ZHANG, P. Gut microbiome and cancer immunotherapy. **Cancer Letters**. v. 447, p. 41-47, 2019.

LIBERA, L. S. D.; DE SOUZA ALVES, G. N.; DE SOUZA, H. G.; CARVALHO, M. A. S. Avaliação da infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) em exames citopatológicos. **RBAC**. 2016;48(2):138-43.

LIM, T. K. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Dordrecht, The Netherlands: **Springer**, 2016.

LIMA JÚNIOR, J. P.; FRANCO, R. R., SARAIVA, A. L. et al. (2021). Anacardium humile St. Hil as a novel source of antioxidant, antiglycation and α -amylase inhibitors molecules with potential for management of oxidative stress and diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, 268, 113667.

LIN, Z. P.; ZHU, Y. L.; RATNER, E. S. Targeting Cyclin-Dependent Kinases for Treatment of Gynecologic Cancers. *Frontiers in Oncology*, v. 8, p. 303, 2018.

LIU Y, YADEV VR, AGGARWAL BB, NAIR MG. Inhibitory effects of black pepper (*Piper nigrum*) extracts and compounds on human tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzymes, lipid peroxidation and nuclear transcription factor-kappa-B. *Nat Prod Commun*. 2010. Aug; 5 (8): 1253-7.

LIU, M.; GUO, F. Atualizações recentes sobre imunoterapia contra o câncer. *Precis Clin Med*. (2018) 1: 65–74.

LIU, Y.; YIN, T.; FENG, Y.; CONA, M. M.; HUANG, G.; LIU, J.; SONG, S.; JIANG, Y.; XIA, Q.; SWINNEN, J. V.; BORMANS, G.; HIMMELREICH, U.; OYEN, R.; NI, Y. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for Imaging-based preclinical theragnostic research. *Quant. Imaging Med. Surg.*, v. 5, n. 5, p. 708-729, 2015.

LIU, H.; WANG, H., LI; C., ZHANG; T., MENG; X.; ZHANG, Y. et al. Spheres from cervical cancer cells display stemness and cancer drug resistance. *Oncol Lett*. v. 12, n. 3, p. 2184-2188, 2016.

LOGAN, I. E. et al. Antiproliferative and cytotoxic activity of xanthohumol and its non-estrogenic derivatives in colon and hepatocellular carcinoma cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 5, p. 1203–1215, 2019.

LORANS, M.; DOW, E.; MACRAE, F. A.; WINSHIP, I. M.; BUCHANAN, D. D. (2018). Atualização sobre câncer colorretal hereditário: melhorando a utilidade clínica do teste de painel multigênico. *Clin Colorectal Cancer* 17, e293 – e305.

LORENZI H., MATOS FJA *Plantas Medicinais do Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas*. Nova Odessa, SP, EUA: Instituto Plantarum; 2002.

LORENZI H., MATOS FJA *Plantas Medicinais do Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2008, p. 113.

LOU, C.; ZHU, Z.; ZHAO, Y.; ZHU, R.; ZHAO, H. Arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L., inhibits metastasis of human breast cancer cells through the downregulation of MMP-2/-9 and heparanase in MDA-MB-231 cells. *Oncol Rep*. 2016.

MAES, A. et al. **The therapeutic potential of cell cycle targeting in multiple myeloma**, v. 8, n.52, p. 90501-90520, 2017.

MAJOLO, F.; DE OLIVEIRA BECKER DELWING, L. K.; MARMITT, D. J.; BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; GOETTERT, M. I. Plantas medicinais e compostos naturais bioativos para o tratamento do câncer: Avanços importantes para a descoberta de drogas. *Phytochem. Lett*. 2019; **31**: 196–207.

MAKKI J. Diversity of Breast Carcinoma: **Histological Subtypes and Clinical Relevance**. *Clin Med Insights Pathol*. 21 de dezembro de 2015;8: 23–31.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and câncer: a changing paradigma. **Nat Rev Cancer**, 2009; 9: 153-166.

MALLADI, S. et al. Metastatic latency and immune evasion through autocrine inhibition of WNT. **Cell**, v. 165, p. 45-60, 2016.

MARSTON, A; HOSTETTMANN, K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. **J. Chromatogr. A**. 2006; 1112 (1–2): 181–194.

MARZVANYAN, Anna et al. Herbal Medicine in the Mitigation of Reactive Oxygen Species, Autophagy, and Cancer: A Review. **Critical Review™ in Oncogenesis**, v.23, n.5-6, 2018.

MATOS, M.; MURA, F.; VAZQUEZ-RODRIGUEZ, S.; BORGES, F.; SANTANA, L.; URIARTE, E.; OLEA-AZAR, C.; Study of coumarin-resveratrol hybrids as potent antioxidant compounds. **Molecules**. 2015 Feb 16;20 (2): 3290-308.

MASSAGUÉ, J. et al. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, p. 298-306, 2016.

MAURMANN, L. et al. A novel cisplatin mediated apoptosis pathway is associated with acid sphingomyelinase and FAZ proapoptotic activation in ovarian câncer. **Apoptosis**, v. 20, n. 7, p. 960-974, 2015.

MCARTHUR, K.; KILE, B. T, Apoptotic Caspases Multiple or Mistaken Identities? **Trends in Cell Biology**, v.28, n.6, p.475-493, 2018.

MEDINA, E. M.; TURNER, J. J.; GORDAN, R et al. Punctuated evolution and transitional hybrid network in na ancestral cell cycle off ungi, **eLife**, v. 5, 2016.

MEDLINEPLUS. **Cervical cancer**. 2016. Disponível em: <https://medlineplus.gov/ency/article/000893.htm>. Acesso: setembro/2019.

MEHTA, A. M.; MOOIJ, M.; BRANKOVIT, I.; OUBURG, S.; MORRÉ, S. A.; JORDANOVA, E. S. Cervical Carcinogenesis and Immune Response Gene Polymorphisms: A Review. **J. Immunol. Res.**, v. 2017, p. 1-13, 2017.

MENDOZA, M. F, M. **Avaliação da atividade citotóxica de *Tithonia diversifolia* (TD) in vitro em linhagem de carcinoma colorretal HCT-116**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Ceará - Fortaleza, 2020.

MFENGWANA, P. H.; MASHELE, S. S.; MANDUNA, I. T. Cytotoxicity and cell cycle analysis of *Asparagus larycinus* Burch. and *Senecio asperulus* DC. on breast and prostate cancer cell lines. **Heliyon**. 2019 May 11; 5 (5): e01666.

MIN, L. I. et al. Autophagy as a potential target for sarcoma treatment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1868, n.1, p. 40-50, 2017.

MIRKOVIC, J.; HOWITT, B.E.; RONCARATI, P.; DEMOULIN, S.; SUAREZ-CARMONA, M.; HUBERT, P. et al. Carcinogenic HPV infection in the cervical squamo-columnar junction HHS Public Access. **J Pathol** [Internet]. 2015 [cited 2018 Aug 21]; 236 (3): 265–71. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4457596/pdf/nihms673747.pdf>

MISHRA, A.; ROY, S.; MAITY, S.; YADAV, R. K.; KESHARI, A. K.; SAHA, S. Antiproliferative effect of flower extracts of *Spilanthes paniculata* on hepatic carcinoma cells. **Int. J. Pharm. Sci.** v. 7, p. 130-134, 2015.

MOLIN, G. T. D.; CALVINATTO, A. W.; FÁTIMA, C. Utilização de plantas medicinais e fitoterápicos por pacientes submetidos à quimioterapia de um centro de oncologia de Ijuí/RS. **Colet**, 2015.

MORAES, S. Z. C., SHAN, A. Y. K. V., MELO, M. A. O. et al. (2020). Antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz. **Journal of Ethnopharmacology**, 254, 112563-0.

MORGAN, D. O. Cycli-dependent kinases, engines, clocks, and microprocessors. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.13, p.451-457, 1997.

MORO, S. D. S. et al. *Acmella oleracea* extract increases collagen content and organization in partially transected tendons. **Microsc Res Tech**. 2021 May 11.

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

MÜLLER-COAN, B. G.; CAETANO, B. F. R.; PAGANO, J. S.; DE OLIVEIRA, D. E. Cancer Progression Goes Viral: The Role of Oncoviruses in Aggressiveness of Malignancies. **Trends in Cancer**, 2018.

NABI, N. G. & SHRIVASTAVA, M. (2016). Estimation of total flavonoids and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* leaves. **UK journal of pharmaceutical and Biosciences**, 4(6), 29-34.

NAKATANI, N.; NAGASHIMA, M. Pungent alkalamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.56, p. 759-762, 1992.

NASCIMENTO, A. M. et al. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v. 85, p. 137-142, 2013.

NASCIMENTO, L. E. S. **Jambu (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen) hidropônico e convencional: uma comparação baseada nas propriedades físico-químicas e composição fitoquímica**. Dissertação (Mestrado em Ciência Agrárias). Universidade Federal de Santa Catarina., Florianópolis, p.101. 2019.

NAVARRO-GONZÁLEZ, I. et al. Nutritional composition and antioxidant capacity in edible flowers: characterization of phenolic compounds by HPLC-DAD-ESI/MSn. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, n. 1, p. 805-822, 2014.

NCI, 2015. **O que é câncer**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/aboutcancer/understanding/what-is-cancer>. Acesso em: 12 out. 2019.

NCI. 2016. **What Is Cancer?** 2016. Disponível em: < <http://www.cancer.gov/aboutCancer/what-is-cancer> >. Acesso em: 16 de fevereiro de 2020.

NCCN. NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. Clinical Practice Guidelines (NCCN Guidelines). **Breast Cancer**. Versão 4. 2017. Estados Unidos da América: NCCN, 2018. Available at: https://www.nccn.org/professionals/Physician_gls/default.aspx. Access in: 12 ago. 2018.

NEGRONI, A.; CUCCHIARA, S.; STRONATI, L. Apoptosis, necrosis, and necroptosis in the gut and intestinal homeostasis. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.

NEVES, D. A. et al. Chemical and nutritional characterization of raw and hydrothermal processed jambu (*Acmella oleracea* (L.) RK Jansen). **Food Research International**, 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG., G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod**. 2020 Mar 27; 83 (3): 770-803.

NGUYEN, VT; SCARLETT, C. J. Cytotoxic activity of extracts and fractions from *Paramignya trimera* root and *Phyllanthus amarus* Against pancreatic cancer cell lines. **J. Cancer Res Ther**. 2019; 15 (1): 245-9.

NOONE, A. M.; CRONIN, K. A.; ALTEKRUSE, S.F. et al. Cancer incidence and survival trends by subtype using data from the surveillance epidemiology and results program, 1992-2013. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 26. n. 4. p. 32-41, 2017.

NOMURA, E. C. O. **Avaliação do potencial terapêutico do extrato etanólico e da fração rica em alquilamidas obtidos das flores de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, em modelos de nocicepção em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná, CURITIBA, 2013.

NUNES, K. D. M. **Processamento térmico e estádio fenológico na atividade antioxidante do jambu**. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, São Paulo, 2016.

NUNES, R. A. L.; MORALE, M. G.; SILVA, G. A. F.; VILLA, L. L.; TERMINI, L. Innate immunity and HPV: friends or foes. **Clinics.**, v. 73, p. 1-7, 2018.

OCANA, A.; PANDIELLA, A. Visando vulnerabilidades oncogênicas no câncer de mama triplo negativo: bases biológicas e estudos clínicos em andamento. **Oncotarget**. 2017; 8 (13): 22218-22234.

OLIVEIRA, R. Dá para unir qualidade a custo acessível no tratamento contra o câncer? Rev. Onco&. Ano 6, n. 32, São Paulo: julho/agosto 2016. Disponível em:<http://revistaonco.com.br/wp-content/uploads/2016/07/ONCO_32_ED.INTERNET-1-1.pdf>.

OLIVEIRA, P. R.; CASTRO, K. N. C.; ANHOLETO, L. A.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleracea* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 8, p. 744–753, 2016b.

OLIVEIRA, P. R., ANHOLETO, L. A., RODRIGUES, R. A. F., BECHARA, G. H., CASTRO, K. N. C.; MATHIAS, M. I. C. (2018). The potential of *Acmella oleracea* (Jambu) extract in the control of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. **International Journal of Acarology**, 44 (4-5), 192-197. 4

OZFILIZ-KILBAS, P. et al. Cyclin-dependent kinase inhibitors, roscovitine and purvalanol, induce apoptosis and autophagy related to unfolded protein response in He La cervical cancer cells. **Molucrl Biology Reports**, v.45, n. 5. p. 815-828, 2018.

PAJUELO-LOZANO, Natalia et al. XPA, XPC and XPD modulate sensitivity in gastric cisplatin resistance cancer cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p.119, 2018.

PATEL, S. S.; RAGHUWANSHI, R.; MASOOD, M. et al. Medicinal plants with acetylcholinesterase inhibitory activity. **Rev. Neurosci. Aop**. 2018.

PAULRAJ, J.; GOVINDARAJAN, R.; PALPU, P. The genus *Spilanthes* ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological properties: a review. **Adv Pharmacol Sci**. 2013; 2013: 510298.

PEREIRA, T. M.; VITÓRIO, F.; AMARAL, R. C.; ZANONI, K. P. S.; MURAKAMI, N. Y. and KÜMMERLE, A. E. Microwave-Assisted Synthesis and Photophysical Studies of Novel Fluorescent N-acylhydrazones and Semicarbazones-7-OH-Coumarin Dyes. **New J. Chem**. 2016, 40, 8846-8854.

PINHEIRO, M. T.; BASTOS, D. D. C.; RODRIGUES, A. B. L.; RAMOS, R. S.; ALMEIDA, S. S. M. S. Antioxidant and cytotoxic potential of aqueous crude extract of *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen. **J Chem Pharm Res.**, v. 7, n.12, p. 562-569, 2015.

PINHEIRO, M. T. Avaliação fitoquímica e da atividade antioxidante, citotóxica, inseticida e repelente de extratos vegetais das folhas de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, *Acmella ciliata* (Kunth.) Cass e *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) contra *Aedes aegypti*. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia). Universidade Federal do Amapá, Amapá, 2016.

PINHO, M. P. **Enriquecimento antigênico de linhagens tumorais: estratégias para abordagens imunoterapêuticas personalizadas**. Dissertação (Mestrado em Imunologia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 128 f. 2014.

PIRES, I. V.; DA SILVA, A. E. Caracterização e capacidade antioxidante do jambu (*Spilanthes oleracea* L.) *in natura* procedente do cultivo convencional e de hidroponia. **Braz. J. of Develop.**, v. 6, n. 10, p.74624- 74626, 2020.

PIVA, J. APARECIDA DE ALMEIDA CHAVES et al. Biochemical imaging of normal, adenoma, and colorectal adenocarcinoma tissues by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and morphological correlation by histopathological analysis: preliminary results. **Res. Biomed. Eng.**, v. 31, n. 1, p. 10-18, 2015.

POLO, M. D. E. L. H.; ELIZABETH, D.; REJ, B. et al. Surgical considerations when reporting MRI studies of soft tissue sarcoma of the limbs. **Skeletal Radiology**. v. 46, p. 1667-1678, 2017.

POPRAC, P., JOMOVA, K., SIMUNKOVA, M. et al. (2017). Targeting free radicals in oxidative stressrelated human diseases, **Trends in Pharmacological Sciences**, 38 (7), 592–607.

PORSANI, M.Y.H.; CARVALHO, L.A.R.; PEREIRA, C.S.; PALUDETTI, M.; ZANGERONIMO, M.G., PEREIRA, L.J. The use of papain gel cream and sunflower oil in promoting healing in a wound in dogs: three case reports. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n.5, p.1201-1206, 2016.

PRABHU, V. V.; DEVARAJ, N. Tirocina Quinase do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico: um Alvo Potencial no Tratamento do Carcinoma Pulmonar de Células Não Pequenas. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v. 36, p. 151-158, 2017.

PRACHAYASITTIKUL, S.; PRACHAYASITTIKUL, V.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, S. High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: a review. **EXCLI Journal**. v. 12, p. 291-312, 2013.

PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K. Reactive oxygen species (ROS) and câncer: role of antioxidative nutraceuticals. **Cancer letters**, v.387, p. 95-105, 2017.

PRITCHETT, J. C.; NAESENS, L.; MONTOYA, J. (2014). **Tratamento de infecções por HHV-6: A eficácia laboratorial e o uso clínico de agentes anti-HHV-6**. Herpesvírus humanos HHV-6A, HHV-6B e HHV-7. Diagnóstico e Gestão Clínica; 2014; Edição: 3ª; pp. 311 - 331 *Editora: Elsevier; Amsterdam*.

PYE, C. R.; BERTIN, M. J.; LOKEY, R. S.; GERWICK, W. H.; LININGTON, R. G. Retrospective analysis of natural products provides insight for future discovery trends. **PNAS**, v. 114, n. 22, p. 5601-5606, 2017.

QU, Y.; SAFONOVA, O.; DE LUCA, V. Conclusão da via canônica para montagem de medicamentos anticâncer vincristina / vinblastina em *Catharanthus roseus*. **The Plant Journal**, v. 97, n. 2, p. 257-266, 2019.

RAJ, A. J.; BISWAKARMA, S.; PALA, N. A. et al. Indigenous uses of ethnomedicinal plants among forest-dependent communities of Northern Bengal, India. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. 14:8. 2018.

RALPH, A. C. L. **Análise dos marcadores de células Tronco Tumorais em Linhagens Tumorais Resistentes ao Estresse**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 130 f. 2019.

RAMSEWAK R.S.; ERICKSON, A. J.; NAIR, M. G. N-isobutilamidas bioativas dos botões de flores de *Spilanthes acmella*. **Fitoquímica**. 1999; 51: 729–32.

RANG, H.P.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. In: Farmacologia. Rio de Janeiro: Elsevier; p. 904. 2012.

RANG, H. P et al. Rang e Dale: **Farmacologia**. 8. ed. [S.l]: Elsevier, 2016. 717. p.

RAYAN, A.; RAIYN, J.; FALAH, M. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. **PLoS One**. 2017 Nov 9; 12 (11): e0187925.

REYMOND, N.; D'AGUA, B. B.; RIDLEY, A. J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 12, p. 858-70, Dec 2013.

RIBEIRO, V. P., ARRUDA, C., EL-SALAM, M. A. et al. (2018). Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review, **Pharmaceutical Biology**, 56 (1), 253-268.

RICCI, R. **Estudo das alterações de proteoglicanos e glicosaminoglicanos em linhagens celulares de câncer colorretal humano**. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de São Paulo, 2009.

RICHARD J. H. **Cancer Concepts: A Guidebook for the Non-Oncologist**, Updateded. Worcester, MA: University of Massachusetts Medical School; 2016.

RIOS, M. Y., Natural Alkamides: Pharmacology, Chemistry and Distribution, in: VALLISUTA, O. (Org.). **Drug Discovery Research in Pharmacognosy**. In Tech, 2012. p. 107-144.

RIOS, M. R., OLIVO, H. F. Natural and synthetic alkylamides: applications in paintherapy. In: Atta-Ur-Rahman (Ed.), Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier, **New York**, 2014, pp. 79–118.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L., et al. **Cell Viability Assays**. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

ROACH, B. L. et al. Identification and characterization of a novel phoshoregulatory site on cyclin-dependent kinase5. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 504, n.4, p. 753-758, 2018.

ROCHA, C. F. D.; MEDEIROS, Y. D. S. L.; CARVALHO, H. O., et al. Ação do extrato hidroetanólico das flores de *Acmella oleracea* (L) R. K. Jansen sobre o desempenho reprodutivo de ratas Eistar: Um popular afrodisíaco feminino da Amazônia. **J Ethnopharmacol**. 2018; 214: 301-8.

RODRIGUES, D. S. et al. Influência da adubação com nitrogênio e fósforo na produção de jambu, *Acmella oleracea* (L) R. K. Jansen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 1, p. 71-76, 2014.

RODRIGUES, P. S. M.; BERTOLIN, A. O.; FUCASE, T. M. et al. Avaliação da atividade citotóxica dos extratos etanólicos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* Mart. sobre células normais e tumorais. **J Health Biol Sci**. 2017; 5 (1):16-23.

ROGERS, C. et al. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. **Nature communications**. v.8, p.14128, 2017.

ROKHFOROZ, P.; JAMSHIDI, A. A.; SARVESTANI, N. N. Adaptive robust control of cancer chemotherapy with extended Kalman filter observer. *Informatics in Medicine Unlocked*, v. 8, p. 1-7, 2017.

ROMÃO, N. F; SILVA, F. C; FERRAZ, A. B. F. Análise fitoquímica e potencial antioxidante do extrato das flores de *Spilanthes acmella*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 2, n. 2, p 23-32, 2015.

ROMERO-LAORDEN, N.; CASTRO, E. Inherited mutations in DNA repairs genes and câncer risk. **Current Problems in Cancer**. 2017.

RONDANELLI, M. et al. *Acmella oleracea* for pain management. *Fitoterapia*. 2020 Jan; 140:104419.

ROSENQUIST, R.; ESTELLER, M.; PLASS, C. Introduction: Epigenetics in câncer. **Seminars in Cancer Biology**, 2017.

RUBOVSKY, G; HORVÁTH, Z. Recent Advances in the Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer. **Journal of breast cancer**, v. 20, n. 2, p. 119-131, 2017.

RUSSO, C et al. Evaluation of acute and chronic ecotoxicity of cyclophosphamide, ifosfamide their metabolites transformation products and UV treated samples. **Environmental Pollution**, v. 233, p. 356-363, 2018.

SABAA, M. et al. Anticancer activity of salicin and fenofibrate. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v.390, n.10, p. 1061-1071, 2017.

SAFARDEH, ELHAM; SHOTORBANI, SIAMAK SANDOGHCHIAN; BARADARAN, BEHZAD. Herbal medicine as inducers of apoptosis in câncer treatment. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 4. n. 421-427, 2014.

SAIED, EMAN M.; ALSHENAWY, HANAN ALSAED. Prostatic carcinogenesis: More insights. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, 2017.

SAITO, R. F.; LANA, M. V. G.; MEDRANO, R. F. V.; CHAMMAS, R. **Fundamentos de oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu, 501p. 2015.

SALEM, M. L.; ATTIA, Z. I.; GALAL, S. E. M. Acute inflammation induces immunomodulatory effects on myeloid cells associated with anti-tumor responses in a tumor mouse model. **Journal of advanced research**, v. 7, n. 2, p. 243-253, 2016.

SAMPAIO, L. C.; ALMEIDA, C. F. (2009). Vitaminas Antioxidantes na Prevenção do Câncer do Colo Uterino. **Rev. Bras.de Cancerol.** 55, 289-296.

SAMPAIO, I. M. G., SILVA JUNIOR, M. L., CHAGAS, E. S., BITTENCOURT, R. F. P. M., COSTA, V. C. N., SOUZA, D. L., SANTOS, W. A. S., & TEIXEIRA, B. J. B. (2020). Evaluation of the Nondestructive Method Efficiency of Estimating Nitrogen Content in Jambu Plants Grown in Hydroponic System. **Journal of agricultural studies**, 8, 466-479.

SANGUINETTI, A. et al. Male breast cancer, clinical presentation, diagnosis and treatment: twenty years of experience in our Breast Unit. **International Journal of Surgery Case Reports**, v. 20, suppl. 20, p. 8-11, 2016.

SANTOS J, BRITO M, FERREIRA R, MOURA AP, SOUSA T, BATISTA T, MANGUEIRA V, LEITE F, CRUZ R, VIEIRA G, LIRA B, ATHAYDE-FILHO P, SOUZA H, COSTA N, VERAS R, BARBOSA-FILHO JM, MAGALHÃES H, SOBRAL M. Th1-Biased Immunomodulation and *In Vivo* Antitumor Effect of a Novel Piperine Analogue. **Int J Mol Sci**. 2018 Sep 1;19 (9): 2594.

SANTOS, L. S. **Estudo do potencial citotóxico do alcaloide aporfínico xilopina**. Dissertação (Dissertação em Biotecnologia). Fundação Oswaldo Cruz. Bahia, 2018, p. 74.

SAVADI, R.V.; YADAV, R.; YADAV, N. Study on immunomodulatory activity of ethanolic extract of *Spilanthes acmella* Murr. leaves. **Indian Journal of Natural Products and Resources**. v.1 (2), p.204-207, 2010.

SAVAGE, K. I.; HARKIN, D. P. BRCA1, uma proteína 'complexa' envolvida na manutenção da estabilidade genômica. **FEBS J**. 2015; 282: 630–646.

SAVAS, P.; SALGADO, R.; DENKERT, C. et al. Relevância clínica da imunidade do hospedeiro no câncer de mama: dos TILs à clínica. **Nat Rev Clin Oncol**. 2016; 13: 228–41.

SASAGAWA, T.; TAKAGI, H.; MAKINODA, S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. **J Infect Chemother**. 2012;18(6):807-15.

SCHMID, P.; ADAMS, S.; RUGO, H.S.; SCHNEEWEISS, A.; BARRIOS, C.H.; IWATA, H.T. et al. Atezolizumab e Nab-paclitaxel no câncer de mama triplo-negativo avançado. **N Engl J Med**. (2018).

SCHOLZEN, T.; GERDES J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol.** março de 2000; 182 (3): 311–22.

SCHRAM, ALISON M. et al. Fusions in solid tumours: diagnostic strategies. Targeted therapy, and acquired resistance. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v.14, n.12, p.735, 2017.

SCHULTZE, E. et al. Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules overcome the triple-negative breast cancer cell resistance to tretinoin and show synergistic effect on cytotoxicity induced by doxorubicin and 5-fluorouracil. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 404-409, 2017.

SÉBE, P.; FERRETI, L.; SAVOIE, P. H., MOREL-JOURNEL, N.; FLÉCHON, A., MUREZ, T.; DURAND, X. Recommandations en onco-urologie 2016-2018 du CCAFU: Tumeurs malignes du pénis. **Progrès en Urologie**, v.27, p. S167-S169, 2016.

SENGER, J.-L.; ADAMS, S. J.; KANTHAN, R. Invasive lobular carcinoma of the male breast – a systematic review with an illustrative case study. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v.9, p. 337–345, 2017.

SERAFIM, V. D. L., et al. New Thiophene-Acridine Compounds: **Synthesis, Antileishmanial Activity**, DNA Binding, Chemometric and Molecular Docking Studies. p. 0–2, 2018.

SEREGHETI, T. M. Q.; PINTO, A. P. R.; DA C GONÇALVES, M.; DOS S ANTUNES, A.; DA S ALMEIDA, W. A.; MACHADO, R. S.; SILVA, J. N.; FERREIRA, P.M.P.; PESSOA, C.; DOS SANTOS, V.M.R.; DO NASCIMENTO, A.M. Antiproliferative and photoprotective activities of the extracts and compounds from *Calea fruticosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** (2020), 53 (9): e9375.

SHAFIEI-IRANNEJAD, V.; SAMADI, N.; YOUSEFI, B.; SALEHI, R.; VELAEI, K.; ZARGHAMI, N. Metformin enhances doxorubicin sensitivity via inhibition of doxorubicin efflux in P-gp-overexpressing MCF-7 cells. **Chemical biology e drug design**, 2017.

SHAH. VIDHI V. et al. 5-Fluorouracil in the treatment of keloids and hypertrophic scars: a comprehensive review of the literature. **Dermatology and Therapy**, v.6, n. 2, p. 169-183, 2016.

SHANMUNGAM, M. K.; ARFUSO, F.; ARUMUGAM, S. et al. Role of novel histone modifications in cancer. **Oncotarget**, v.9, n.13, p. 11414-11426, 2018.

SHARMA, K.; ZAFAR, R. Occurrence of taraxerol and taraxasterol in medicinal plants. **Pharmacogn Rev.** v. 9, n.17, 2015.

SHARMA, R.; ARUMUGAM, N. N-alquilamidas de *Spilanthes* (syn: *Acmella*): Estrutura, purificação, caracterização, atividades biológicas e aplicações - uma revisão. **Future Foods**.V. 3, p. 100022, 2021.

SIAUCINAITE, R. et al. Evolution Shapes the Gene Expression Response to Oxidative Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p.30040, 2019.

SIDDIQUI, I. A.; SANNA, V.; AHMAD, N.; SECHI, M.; MUKTAR. H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1348, n. 1, p. 20-31, 2015.

SIES H, BERNDT C, JONES DP. Oxidative Stress. **Annu Rev Biochem.** 2017 Jun 20; 86:715-748.

SIES, H., JONES, D. P. Espécies reativas de oxigênio (ROS) como agentes de sinalização fisiológica pleiotrópica. **Nat Rev Mol Cell Biol** 21, 363–383 (2020).

SILVA, C. A. P. **Avaliação da citotoxicidade do extrato de *Spilanthes oleracea* e seu potencial uso no tratamento do câncer.** 70f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso). Curso de Ciências Biológicas - Faculdade de Educação e Artes da Universidade do Vale da Paraíba, 2012.

SILVA, M.; DAERRANTE, P. R. Câncer Colorretal: Fatores de risco, diagnóstico e tratamento. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 13, n. 33, p. 133-140, 2016.

SILVEIRA, N.; SAAR, J.; SANTOS, A. D.; BARISON, A.; SANDJO, L. P.; KAISER, M.; SCHMIDT, T. J.; BIAVATTI, M. W. A New Alkamide with an Endoperoxide Structure from *Acmella ciliata* (Asteraceae) and its *in vitro* Antiplasmodial Activity. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 765, 2016.

SIMAS NK, DA COSTA LIMA DELLAMORA E., SCHRIPSEMA J., LAGE CLS, DE OLIVEIRA FILHO AM, WESSJOHANN L., PORZEL A., KUSTER RM 2-feniletilamidas acetilênicas e novas isobutilamidas de *Acmella oleracea* (L.) R. K Jansen, uma especiaria brasileira com atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*. **Phytochem. Lett.** 2013; 6: 67–72.

SINGH, R.; LETAI, A.; SAROSIEK, K. Regulation of apoptosis in health and disease the balancing act of BCL-2 family proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.20, n.3, p.175-193, 2019.

SOARES, C. P.; LEMOS, V. R.; DA SILVA, A. G.; CAMPOY, R. M.; DA SILVA, C. A. P.; MENEGON, R. F.; ROJAHN, I.; JOAQUIM, W. M. Effect of *Spilanthes acmella* hydroethanolic extract activity on tumour cell actin cytoskeleton. **Cell Biol. Int.** 2014. 38, 131–135, 2014.

SOLIMAN N. A.; YUSSIF S. M. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. **Cancer Biology & Medicine**, v.13, n.4, p. 496-504, 2016.

SOUCHEK, J. J.; DAVIS, A. L.; HILL, T. K.; HOLMES, M. B.Q. I. B.; SINGH, P. K. et al. Combination treatment with orlistat-containing nanoparticles and taxanes is synergistic and enhances microtubule stability in taxane-resistant prostate cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 16, n. 9, p.1819-1830, 2017.

SOULE, H. D., et al. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1409-1416, 1973.

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. C. I. O *Papilomavírus humano*: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 51, n. 2, p. 155-160, 2005.

SOUZA, L. F.; DIAS, R. F.; GUILHERME, F. A. G.; COELHO, C. P. Plantas medicinais referenciadas por raizeiros no município de Jataí, estado de Goiás. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. 2016; 18 (2):451-461.

SPELMAN, K.; DEPOIX, D.; MCCRAY, M.; MOURAY, E.; GRELLIER, P. The traditional medicine *Spilanthes acmella*, and the alkylamides spilanthol and undeca2E-ene-8,10-diynoic acid isobutylamide, demonstrate *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity. **Phytotherapy Research: PTR**, v. 25, n. 7, p. 1098–101, 2011.

SRIVASTAVA, SHIKHA et al. Quercetin a natural flavonoid intercacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. **Scientific reports**, v. 6, p. 24049, 2016.

STEIN, R.; BERGER, M.; DE CECCO B, S.; MALLMANN, L. P.; TERRACIANO, P. B.; DRIEMEIER, D.; RODRIGUES, E.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; KONRATH, E. L. Chymase inhibition: A key factor in the anti-inflammatory activity of ethanolic extracts and spilanthol isolated from *Acmella oleracea*. **J Ethnopharmacol.**, v. 24, n. 270, p. 113610 2021.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**. v. 574. p.193– 203. 2015.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). World Cancer Report: 2014. Lyon: **IARC**, 2014.

STUBBS, M. C.; KRIVTSOV, A. V. Murine Retrovirally- Transduced Bone Marrow Engraftment Models of MLL- Fusion-Driven Acute Myelogenous Leukemias (AML). **Current protocols in pharmacology**, v.78, p. 1442. 1-14.42.19, 2017.

SU, S. et al. CD10+GPR77 Cancer- Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. **Cell**, v. 172, p. 841-856, 2018.

SUNG, H., FERLAY, J.; SIEGEL, R. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, (2021).

SUWANJANG, W. et al. Neuroprotective effect of *Spilanthes acmella* Murr. on pesticide-induced neuronal cells death. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 1, p. 35-41, 2017.

SWAIN, S. M.; BASELGA, J.; KIM, S. B.; RO, J.; SEMIGLAZOV, V.; CAMPONE, M.; CIRUELOS, E.; FERRERO, J. M.; SCHNEEWEISS, A.; HEESON, S.; CLARK, E.; ROSS, G.; BENYUNES, M. C.; CORTÉS, J. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel

in HER2-positive metastatic breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 372, n. 8, p. 724–34, 19 fev. 2015.

SZVARÇA, R. R. et al. Regras de Associação Temporal em Câncer de Mama. **Rev. de Eng. e Tecnologia**, v. 7, n. 4, p. 84-90, 2016.

TANIA, M. P.; CASTILO, B. D. D.; LOBATO, A. B. R.; SILVA, R. R. Antioxidant and cytotoxic potential of aqueous crude extract of *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. 2015, 7 (12): 562-569.

TANSI, F. L.; RÜGER, R.; BÖHM, C.; KONTERMANN, R. E.; TEICHGRAEBER, U. K.; FAHR, A.; HILGER, I. Potential of activatable FAP-targeting immunoliposomes in intraoperative imaging of spontaneous metastases. **Biomaterials**, 2016.

TARIQ, A.; SADIA, S.; PAN, K.; ULLAH, I.; MUSSARAT, S.; SUN, F.; ABIODUN, O.O.; BATBAATAR, A.; LI, Z.; SONG, D. et al. A systematic review on ethnomedicines of anticancer plants. **Phytother. Res.** v. 31, p. 202–264, 2017.

TEH, J. L. F.; APLIN, A. E. Arrested developments: CDK4/6 inhibitor resistance and alterations in the tumor immune microenvironment. **Clinical Cancer Research**, p. clincanres. 1067, 2018, 2018.

TREVISAN, L. F. A.; SOUSA, R. V.; BERTOLUCCI, S. K. V.; RODRIGUES, O. G. Tratamento alternativo em gatos acometidos por DITUIF. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n.4, p.1099-1103, 2016.

UK, C. R. **Types of treatment for breast cancer**, 2016. Disponível em: < <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/breast-cancer/treatment/which-treatmentfor-breast-cancer#surgery> >.

UTHPALA, T. G.G. planta Navaratne SB *Acmella oleracea*; Identificação, aplicações e uso como uma fonte de alimento emergente - revisão. **Food Rev. Int.** 2020: 1-16.

VAKIFAHMETOGLU-NORBERG, H; OUCHIDA, A.T.; NORBERG, E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 482, n.3, p.426-431, 2017.

VALERIO, L. G. J. R.; GONZALES, G. F. Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*): a critical synopsis. **Toxicol Rev.** 2005; 24 (1):11-35.

VERYSER, L.; WYNENDAELE, E.; TAEVERNIER, L.; VERBEKE, F.; JOSHI, T. TATKE, P.; DESPIEGELEER, B. N-alkylamides: from plant to brain. **Func. Foods Health Dis.**, v. 4, p. 264-275, 2014.

VERYSER, L.; TAEVERNIER, L.; ROCHE, N.T.; BLONDEEL, P. Implementation of a single quad MS detector in high-throughput transdermal research of plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.115, p. 594-602, 2015.

VERYSER L, TAEVERNIER L, JOSHI T, TATKE P, WYNENDAELE E, BRACKE N, et al. Mucosal and blood-brain barrier transport kinetics of the plant N-alkylamide

spilanthol using *in vitro* and *in vivo* models. **BMC Complement Altern Med.** 2016 Jun 13; 16:177.

VIEIRA, G. T.; OLIVEIRA, T. T.; MONEIRO, L. P.; KANASHIRO, M. M.; COSTA, M. R.; PEREIRA, W. L. Avaliação citotóxica do extrato de Croton urucurana Baill contra linhagens de células leucêmicas humanas U937 e THP1. **Ciência e Natura**, v. 39, n. 3, p. 512-519, 2017.

VILLARREAL-GARZA, C.; MOHAR, A.; BARGALLO-ROCHA, J. E.; LASAGONSEBATT, F.; REYNOSO-NOVERÓN, N.; MATUS-SANTOS, J.; CABRERA, P.; ARCE-SALINAS, C.; LARA-MEDINA, F.; ALVARADO-MIRANDA, A.; RAMÍREZ-UGALDE, M. T.; SOTO-PÉREZ-DE-CELIS, E. Molecular subtypes and prognosis in young mexican women with breast cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 17, n. 3, p. e95–e102, 2016.

VISCONTI, R.; DELLA MONICA, R.; GRIECCO, D. Cell cycle checkpoint in câncer: A therapeutically targetable double-edged sword, **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 35, n.1, p. 1-8, 2016.

WANG, H; ZHANG, X. ROS reduction does not decrease the anticancer efficacy of X-Ray in two breast cancer cell lines. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

WELTE, T., KIM, I. S., TIAN, L., GAO, X., WANG, H., LI, J., HOLDMAN, X. B., HERSCHKOWITZ, J. I., POND, A., XIE, G., KURLEY, S., NGUYEN, T., LIAO, L., DOBROLECKI, L. E., PANG, L., MO, Q., EDWARDS, D. P., HUANG, S., XIN, L., XU, J., ... ZHANG, X. H. (2016). Oncogenic mTOR signalling recruits myeloid-derived suppressor cells to promote tumour initiation. **Nat. Cell. Biol.**, v. 18, p. 632-644.

WEINBERG, R. A. (2014). The Biology of cancer (Second edi). **Garland Sciences**.

WEINBERG, F.; RAMNATH, N.; NAGRATH, D. Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1191, 2019.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). ICO. **Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre)**. Human papillomavirus and related cancers in world. Summary Report 2016. Geneva: WHO; 2016. [cited 2017 July 3]. Available from: http://betterhealthcareforafrica.org/blog/wpcontent/uploads/2017/01/WHOICO_Report_HPВ_ZW2016.pdf. 2.S.

_____. **Cancer Factsheet** N°297. Updated February 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em 06/10/2020.

_____. **International Agency for Research on Cancer**. Globocan 2020. Acesso em: 10/02/2020.

WILASINEE SUWANJANG, BONGKOT KHONGNIAM, SUJITTRA SRISUNG, SUPALUK PRACHAYASITTIKUL, VIRAPONG PRACHAYASITTIKUL, Neuroprotective effect of *Spilanthes Acmella* Murr. on pesticide-induced neuronal cells death, Asian Pacific **Journal of Tropical Medicine**, 1-7, 2017.

WONG; E., Introduction to neoplasia, 2008. <http://www.pathophys.org/introneoplasia/> Acesso em: 01 de abril de 2018.

WOLFF, R. K.; HOFFMAN, M. D.; WOLFF, E. C.; HERRICK, J. S.; SAKODA, L.C.; SAMOWITZ, W. S.; SLATTERY, M. L. (2018) Análise de mutação de adenomas e carcinomas do cólon: motoristas precoces e tardios. **Genes Chromosom Cancer** 57, 366-376.

WU, X-Q.; HUANG, C.; JIA, Y-M.; SONG, B-A.; LIN, J.; LIU, X-H. Novel coumarin-dihydropyrazolethio-ethanone derivatives: Design, synthesis and anticancer activity. **Eur. J. Med.Chem.** 2014, 74, 717-725.

YADAV, NK, ARYA, RK, DEV, K., SHARMA, C., HOSSAIN, Z., MEENA, S., ARYA, KR, GAYEN, JR, DATTA, D., & SINGH, RK (2017). Extrato alcoólico de *Eclipta alba* mostra atividade antioxidante e anticâncer *in vitro* sem exibir efeitos toxicológicos. **Medicina oxidativa e longevidade celular**, 2017, 9094641.

YAEGER, R.; CHATILA, W. K.; LIPSYC, M. D.; HECHTMAN, J.F.; CERCEK, A.; SANCHEZ - VEJA, F.; JAYAKUMARAN, G.; MIDDHA, S.; ZEHIR, A.; DONOGHUE, M. T. A. *et al* (2018) O sequenciamento clínico define a paisagem genômica do câncer colorretal metastático. **Cancer Cell** 33, 125-136.e123.

YAMANE, LAIS THIEMI; PAULA, ENEIDA DE; JORGE, MICHELLE PEDROZA; FRESITAS-BLANCO, VERÔNICA SANTANA DE; JUNIOR, ÍLIO MONTANARI; FIGUEIRA, GLYN MARA; ANHOLETO, LUÍS ADRIANO; OLIVEIRA, PATRÍCIA ROSA DE; RODRIGUES, RODNEY ALEXANDRE FERREIRA. *Acmella oleracea* e *Achyrocline satureioides* como fontes de produtos naturais no tratamento tópico de feridas. Evid 27. **Based Complement Alternat Med**, v. 2016, p.1-9, 2016.

YANG, R., YUAN, B. C., MA, Y. S. *et al.* (2017). The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb. **Pharmaceutical Biology**, 55, 5–18.

YASMIN, R.; SIRAJ, S.; HASSAN, A.; KHAN, A. R. ABBASI, R.; AHMAD, N. Epigenetic regulation of inflammatory cytokines and associated genes in human malignancies. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.

YUAN, H. *et al.* The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 559, 2016.

ZAVERI, LAMUK.; DHAWAN, JYOTSNA. Cycling to meet fate: connecting pluripotency to the cell cycle. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, 2018.

ZENG, Y. *et al.* Validado método LC-MS/MS para a determinação de scopoletina no plasma de ratos e sua aplicação para estudos farmacocinéticos. **Moléculas**, v. 20, n. 10, p. 18988-19001, 2015.

ZHANG, W. LI, Z.; ZHOU, M.; HOU, X.; LUO, H.; LIU, H.; HAN, X.; YAN, G.; DING, Z.; LI, R. Synthesis and biological evaluation of 4-(1,2,3-triazol-1-yl) coumarin derivatives as potential antitumor agents. **Bioorg. Med. Chem. L.** 2012, 24, 799-807.

ZHAO, Y.; DONG, Q.; LI, J.; ZHANG, K.; QIN, J.; ZHAO, J.; SUN, Q.; WANG, Z.; WARTMANN, T.; JAUCH, K.W.; NELSON, P.J. Targeting cancer stem cells and their niche: **perspectives for future therapeutic targets and strategies**. In Seminars in Cancer Biology. Academic Press. August, 2018.

ZOU, Y.; LIU, F. Y.; WU, J. WAN, L.; FANG, S. F.; ZHANG, Z. Y.; LUO, Y.; CHEN, M. H.; HUANG, M. Z.; HE, M.; HUANG, O. P. Mutational analysis of the RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway in 260 Han Chinese patients with cervical carcinoma. **Oncol Lett**. 2017 Aug;14 (2): 2427-2431.

ANEXO I – CERTIDÃO DO SISGEN



Ministério do Meio Ambiente CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A7C63F0

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: A7C63F0
Usuário: Unifap
CPF/CNPJ: 34.868.257/0001-81
Objeto do Acesso: Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso: Pesquisa

Espécie

Acmella oleracea

Título da Atividade: Purificação e isolamento das substâncias obtidas da *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Asteraceae) por cromatografia contracorrente e avaliação da atividade antitumoral in vitro em linhagens celulares de câncer de mama, útero e ovário utilizando técnicas de biologia molecular modernas.

Equipe

Clarissa Silva Lima	Unifap
Rozilene Valadares Martins	UNIFAP
Elza Caroline Alves Muller	UNIFAP
Joasean Fachine Tavares	UFPB
Mariana Vieira Sobral	UFPB
Niko Radulovic	Universidade de Niš
Fábio Boylan	Trinity College Dublin

Parceiras Nacionais

24.098.477/0001-10 / Universidade Federal da Paraíba

Parceiras no Exterior

Trinity College Dublin,

Data do Cadastro: 09/04/2020 13:01:06
Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

ANEXO II - LABORATÓRIO DE BOTÂNICA - HERBÁRIO



Embrapa
Amazônia Oriental

LABORATÓRIO DE BOTÂNICA-HERBÁRIO
LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

1) Dados do Solicitante

Pessoa Física ou Jurídica: GEILSON ALCÂNTARA DA SILVA			
CPF ou CNPJ:		C.I. ou Inscrição Estadual:	
Endereço: Rod. Mário Covas, 658			
Bairro: Coqueiro	CEP: 67133-060	Cidade: Ananindeua	UF: PA
Tel: 91 9 8087 8865	FAX:	E-mail: geilsonalcantara@gmail.com	

2) Dados do Material para Análise – N° do NID: 03/2019 (controle do Laboratório)

Local de Origem: Curuçambá/Ananindeua-Pa		Quantidade de Amostras: 01
Tipo de Amostra: (X) Fértil () Estéril		
Nome do Coletor: GEILSON ALCÂNTARA DA SILVA		
Data de Entrada no Laboratório: 30.01.2019		Analisado por: Ednaldo Augusto
Destino e/ou Utilização do Laudo: TCC		Supervisionado por: Helena Joseane

3) Processo utilizado para Identificação:
 Comparação com exsicatas do acervo do herbário IAN.
 Classificação dos gêneros em família segundo APG III.
 Lista de espécie da Flora do Brasil.

RESULTADO DAS ANÁLISES

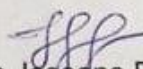
Cod.	Nome Comum	Nome Científico	Família
01 (IAN: 197967)	Jambú	<i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K.Jansen	Asteraceae

Obs: Prazo de permanência do material no laboratório: 60 dias; a partir dessa data, o material ficará a critério do laboratório.

“Não tem acesso a patrimônio genético”

Laudo digitado em: 05.02.2019

Supervisionado em:
 Recebido em:
 P/Orlando



Helena Joseane Raiol Souza
Curadora do Herbário IAN Embrapa Amazônia Oriental

Ministério da
Agricultura e do
Abastecimento

Empresa Brasileira de
Pesquisa Agropecuária

Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n
Bairro do Marco
CEP: 66.095-100 – Belém-Pa

Telefax (091) 3276-8945
Fone: 32041143/320411-
regina@cpatu.embrapa.br

ANEXO III - SUMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

Home
(author/home.html)

Submissions

Active (1)
(author/submissions/inreview/)

Archive (0)
(author/submissions/archive/)

Orders

Saved orders (0)
(author/orders/saved/)

Placed Orders (0)
(author/orders/placed/)

Submission #25018

Summary

ID 25018
Date Submitted 13/09/2021
Journal Anticancer Research
Submitted by Clarissa Silva Lima
Authors Rozilene Valadares Martins, Rodrigo Alves Soares Cruz, Elizabeth Viana Moraes da Costa, Elza Caroline Alves Muller, Josean Fechine Tavares, Marianna Vieira Sobral, Geilson Alcantara da Silva, Maria Aparecida Correa dos Santos, Clarissa Silva Lima
Title Phytochemicals in *Acmella oleracea* hydroethanolic extract and their antiproliferative activity against human cancer cell lines
Original File 1631560778.docx (/data/uploads/1631560778.docx)
Comments Macapá (Brazil) September 13, 2021

Dear Editor,

I'm sending the manuscript entitled "**Phytochemicals in *Acmella oleracea* hydroethanolic extract and their antiproliferative activity against human cancer cell lines**", for evaluation, for publication in the Journal of Anticancer Research (AR) and I affirm that: There is not financial conflict of interest and the research is original, the manuscript is not published elsewhere, in any language, and is not under simultaneous consideration by any other journal. The access to the genetic resources and / or associated traditional knowledge is according the legislation of The National System for Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge Management (SisGen). All Authors agree that the contents of the manuscript are confidential and will not be copyrighted, submitted, or published elsewhere (including the Internet), in any language, while acceptance by the Journal is under consideration.

Respectfully,

Professor Clarissa Silva Lima

Status

Submission Status: Submission In Review
Initiated: 13/09/2021
Last Modified: 14/09/2021