



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**

STELLA DE JESUS LOURENÇO DA SILVA

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
CITOTÓXICA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DAS FOLHAS DE *Clidemia hirta* (L.)**

D. DON

Recife
2022

STELLA DE JESUS LOURENÇO DA SILVA

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
CITOTÓXICA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DAS FOLHAS DE *Clidemia hirta* (L)**

D. DON

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof^a Dr^a Teresinha Gonçalves da Silva
Co-orientador: Dr^a Elizabeth Fernanda de Oliveira Borba

Recife
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Stella de Jesus Lourenço da.

Perfil fitoquímico e avaliação das atividades antioxidante e citotóxica dos extratos orgânicos das folhas de *Clidemia hirta* (L.) D. DON / Stella de Jesus Lourenço da Silva. - Recife, 2022.

49 : il., tab.

Orientador(a): Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientador(a): Elizabeth Fernanda de Oliveira Borba

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

1. antineoplásicos. 2. metabolitos secundários. 3. melastomataceae. I. Silva, Teresinha Gonçalves da. (Orientação). II. Borba, Elizabeth Fernanda de Oliveira. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

STELLA DE JESUS LOURENÇO DA SILVA

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
CITOTÓXICA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DAS FOLHAS DE *Clidemia hirta* (L.)**

D. DON

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 25 /11 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 ELIZABETH FERNANDA DE OLIVEIRA BORBA
Data: 06/12/2022 20:15:10-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Co-orientadora: Dr^a Elizabeth Fernanda de Oliveira Borba
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Antibióticos

Documento assinado digitalmente
 MARILIA GRASIELLY DE FARIAS SILVA
Data: 06/12/2022 17:22:07-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Ma. Marília Grasielly de Farias Silva
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Antibióticos

Documento assinado digitalmente
 RODRIGO RIBEIRO ALVES CAIANA
Data: 06/12/2022 20:00:39-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Me. Rodrigo Ribeiro Alves Caiana
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Antibióticos

Dedico este trabalho a Deus, meus amados pais, meus queridos avós, meus irmãos e sobrinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me permitir conhecer e estudar um pouco de sua obra divina através deste trabalho, obrigada por sempre estar ao meu lado e não me deixar desanimar nos momentos difíceis, sem ti nada disso seria possível.

À minha orientadora Prof^a. Dr.^a Tererinha Gonçalves por me acolher em seu laboratório, pelas instruções, pelo incentivo acadêmico, por permitir que esse trabalho fosse realizado e por ser inspiração profissional para mim.

À minha co-orientadora Dr.^a. Elizabeth Borba por me guiar durante minha trajetória acadêmica, por sua disponibilidade, dedicação, pelo assistência na realização deste trabalho e por ser fonte de admiração como profissional, mãe e mulher.

Ao Dr. Tonny Cley pela sua colaroração nas atividades fitoquímicas deste trabalho.

À Ma. Marília Grasielly por sua paciência, instrução e auxílio no desenvolvimento de algumas atividades neste trabalho.

Ao Departamento de Antibióticos (UFPE) por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho em suas dependências, além do apoio da técnica Maria Rodrigues e ao auxiliar técnico Gêneses Medeiros vinculados ao mesmo, assim como todos os funcionários do prédio que contribuíram indiretamente com este trabalho.

Ao CNPQ pelas bolsas de iniciação científica que me auxiliaram financeiramente durante a realização desta pesquisa.

À Universidade Federal de Pernambuco por fornecer recursos e infraestrutura, essenciais na execução deste trabalho, em especial, a Pró-Reitoria para Assuntos Estudantis (PROAES), que me forneceu apoio acadêmico e financeiro para conclusão deste trabalho e curso.

A todos os profissionais do BIOFARMATOX, pela instrução em meus projetos de iniciação científica e auxílio no meu desenvolvimento acadêmico-profissional, em especial, Jéssica, Rayane, Elizabeth, Carol e Marília.

À cada membro do BIOFARMATOX, sem exceções, que de alguma forma contribuiu com a realização deste estudo e também meu muito obrigada pelos momentos revigorantes de descontração, alegria e, não posso esquecer ... dos nossos cafezinhos!

Aos meus pais, Edleusa Maria Lourenço da Silva e José Antônio da Silva, pelo trabalho, apoio e esforço diário, que foram essenciais para me manter estudando e concluir este curso, vocês são minha inspiração e motivação.

Aos meus avós, que foram e são fontes de inspiração pessoal de força e fé, sem vocês parte disso não seria possível.

Aos meus irmãos e sobrinho, pelo cuidado para comigo durante meu processo de aprendizagem e pelos momentos de descontração familiar.

A todos os meus familiares, que me apoiaram direta e indiretamente durante minha trajetória acadêmica, obrigado por compreenderem minha ausência quando estava executando as atividades deste trabalho.

A André Luís, pelo amor, carinho, amizade, incentivo e por me proporcionar bons momentos que foram importantes na conclusão deste trabalho e curso.

Aos meus amigos, que permaneceram ao meu lado, mesmo quando eu não estava presente fisicamente.

A todos que contribuíram de alguma forma para conclusão deste trabalho.

A todos que duvidaram de mim, pois me incentivaram ainda mais a atingir meus objetivos.

A mim mesma, que sem meu esforço, dedicação, determinação, foco e fé não teria conseguido concluir este trabalho.

“Ninguém disse que seria fácil, ninguém nunca disse que seria tão difícil.”

(MARTIN, 2002)

SILVA, Stella de Jesus Lourenço da. **Perfil fitoquímico e avaliação das atividades antioxidante e citotóxica dos extratos orgânicos das folhas de *Clidemia hirta* (L.) D. Don.** 2022. 49 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

O câncer é responsável por milhares de mortes anualmente. Dentre as principais causas para o desenvolvimento da doença, está o estresse oxidativo. Diante disso, as plantas medicinais se destacam por apresentarem fitoconstituintes com potencial farmacológico antineoplásico, incluindo a espécie *Clidemia hirta* (L.) D. DON (Melastomataceae), conhecida como pixirica, caiuia ou peludinha. A *C. hirta* é utilizada pela população para tratar feridas, sintomas gastrointestinais, parasitoses e fluxo menstrual intenso. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil fitoquímico e as atividades antioxidante e citotóxica *in vitro* de *C. hirta* (Ch). Para isso, as partes aéreas de *C. hirta* foram coletadas e submetidas a extração por maceração exaustiva para obter os extratos em hexano (ChHex), acetato de etila (ChAcOEt) e etanol (ChEtOH). A análise fitoquímica foi realizada pelo método de cromatografia em camada delgada (CCD) e o doseamento de flavonoides, fenóis totais e residuais pelo método de Cloreto de Alumínio (AlCl₃) e Folin-Ciocalteu, respectivamente. A capacidade antioxidante de *C. hirta* foi avaliada pelos métodos de ABTS (2,2 AZINO BIS (3-etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e fosfomolibdênio. A atividade citotóxica dos extratos de *C. hirta* foi realizada pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5, dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio) em células saudáveis (L-929 e Vero) e tumorais (HCT-116, HT-29, NCI-H292, MCF-7, HL-60, Jurkat e K-562). Adicionalmente, foram analisadas as alterações morfológicas induzidas pelo extrato ChAcOEt após 72 h de tratamento nas células NCI-H292 nas concentrações de 6,36 µg/mL e 16,72 µg/mL. A análise fitoquímica dos extratos de *C. hirta* permitiu a identificação de esteroides e terpenos (ChHex), taninos e flavonoides (ChAcOEt e ChEtOH). O extrato ChAcOEt apresentou melhor atividade antioxidante entre os demais (ABTS: 239,37 µg/mL ± 11,95; DPPH: 11, 27 µg/mL ± 0,13; e Fosfomolibdênio: 94, 25 % ± 0,03). Os três extratos testados apresentaram percentual de inibição de crescimento celular (IC%) abaixo de 30% para a linhagem L-929 (fibroblastos murinos) e ausência de atividade citotóxica frente às células Vero (células epiteliais de macaco verde). Os extratos ChHex e ChEtOH apresentaram IC% abaixo de 50% em todas as linhagens testadas, exceto o extrato ChHex frente as linhagens Jurkat (IC%: 64,24) e K562 (IC%: 68,07), não sendo promissores para futuros estudos. Já o ChAcOEt se destacou por inibir acima de 70% das células tumorais MCF-7, NCI-H292, Jurkat, HT-29 e K562, além de apresentar valores de Cl₅₀ abaixo de 30 µg/mL. O ChAcOEt causou alterações indicativas de apoptose, como fragmentação nuclear, condensação do núcleo e da cromatina em células NCI-H292. Os extratos em estudo apresentaram atividades antioxidantes e citotóxicas, com destaque para o extrato ChAcOEt, considerado promissor, para a continuidade das investigações acerca do seu potencial anticâncer, mecanismos de ação e a identificação das moléculas responsáveis por tais propriedades.

Palavras-chave: antineoplásicos; metabolitos secundários; melastomataceae.

SILVA, Stella de Jesus Lourenço da. **Phytochemical profile and evaluation of the antioxidant and cytotoxicity activities of organic extracts** from *Clidemia hirta* (L.) D. Don leaves. 2022. 49 p. Undergraduate thesis. (Undergraduate degree in Biomedical sciences) – Federal University of Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

Cancer is responsible for thousands of deaths annually. One of the main causes for the development of the disease is oxidative stress. In view of this, medicinal plants stand out for presenting phytoconstituents with antineoplastic pharmacological potential, including the specie *Clidemia hirta* (Melastomataceae), popularly known as pixirica, caiuia or peludinha. In folk medicine, it is used to treat wounds, gastrointestinal symptoms, parasites, and heavy menstrual bleeding. The purpose of this work was to evaluate the phytochemical profile and the *in vitro* antioxidant and cytotoxic activities of *C. hirta* (Ch) leaves. For this, the aerial parts of *Clidemia hirta* were dried at 37 °C, grounded and the plant extracts were prepared by maceration in hexane (ChHex), ethyl acetate (ChAcOEt), and ethanol (ChEtOH). The phytochemical profile was identified by the thin layer chromatography (TLC) method and the determination of flavonoids, total and tannins by the Aluminum Chloride (AlCl₃) and Folin-Ciocalteu methods, respectively. The antioxidant activity of *C. hirta* was performed using the ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate)), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and phosphomolybdenum assays. The MTT (3-(4,5, dimethylthiazol-2-yl)-2,5 ditetrazolium bromide) test was used to evaluate the cytotoxic activity of *C. hirta* extracts in non-tumor (L-929 and Vero) and tumor (HCT-1, HT-29, NCI-H292, MCF-7, HL-60, Jurkat and K-562) cell lines. Additionally, the morphological alterations induced by ChAcOEt (IC₅₀: 6,36 µg/mL and IC₅₀: 16,72 µg/MI) was evaluated in NCI-H292 after the coloration with the panotic rapid kit. The phytochemical analysis of *C. hirta* extracts revealed the presence of steroids and terpenes (ChHex), tannins, and flavonoids (ChAcOEt and ChEtOH). The ChAcOEt extract showed the greatest antioxidant activity (ABTS: 239.37 µg/mL ± 11.95; DPPH: 11.27 µg/mL ± 0.13; and Phosphomolybdenum: 94.25% ± 0.03). The three *C. hirta* extracts inhibited less than 30% of the L-929 cells (mouse fibroblast cell line) and no cytotoxic activity was observed in the Vero cell line (epithelial cells from green monkey kidney), showing that they do not present relevant cytotoxicity against healthy cells. The ChHex and ChEtOH extracts inhibited less than 50% of all cell lines tested, with exception of ChHex in Jurkat (64.24%) and K-562 (68.07%), not being considered as promising for further studies. Additionally, ChAcOEt showed a growth inhibition percentage (GI%) above 70% in MCF-7, NCI-H292, Jurkat, HT-29, and K-562 cells, and it was also capable of inhibiting 50% of these cells at concentrations below 30 µg/mL. Moreover, ChAcOE caused morphological changes seen in apoptotic processes, such as nuclear fragmentation, chromatin and nucleus condensation in NCI-H292 cells. The extracts evaluated in this study exhibited antioxidant and cytotoxic activities, specially ChAcOE, which should be considered for more detailed investigations about its anticancer activity, the mechanism of action, and identification of the molecules responsible for each one of these biological proprieties.

Key words: antineoplastic; melastomataceae; secondary metabolites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – As características marcantes do câncer.....	14
Figura 2 – Taxas de incidência de acordo com o câncer, para ambos sexos, no mundo em 2020	15
Figura 3 – Taxas de incidência de câncer na população brasileira de acordo com sexo em 2020.....	15
Figura 4 – Número de mortes no mundo para ambos os sexos em 2020	16
Figura 5 – Funções das espécies reativas de oxigênio (ROS) no câncer	17
Figura 6 – Aspectos morfológicos do arbusto e folhas da espécie <i>Clidemia hirta</i>	20
Figura 7 – Análise morfológica das células NCI-H292 coradas por coloração de panóptico rápido após 72 h de tratamento com controle negativo, positivo ou ChAcOEt.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil Fitoquímico de <i>C. hirta</i>	28
Tabela 2 – Doseamentos de fenólicos, flavonoides e taninos da <i>C. hirta</i>	29
Tabela 3 – Atividade antioxidante dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de <i>Clidemia hirta</i>	30
Tabela 4 – Percentual de inibição de crescimento celular (IC %) dos extratos em hexano, acetato de etila e etanol de <i>C. hirta</i> frente a linhagens saudáveis e cancerígenas avaliado pelo método de MTT após 72 h de tratamento.....	33
Tabela 5 – Concentração ($\mu\text{g/mL}$) que inibe 50 % (CI_{50}) das células cancerígenas avaliada pelo método de MTT após 72 h de tratamento.....	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	O CÂNCER	13
2.1.1	Incidência e mortalidade	15
2.2	ESTRESSE OXIDATIVO.....	17
2.3	TRATAMENTOS ANTINEOPLÁSICOS	18
2.4	PLANTAS MEDICINAIS E SUA RELEVÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS.....	19
2.5	A FAMÍLIA MELASTOMATACEAE E O GÊNERO <i>Clidemia</i>	20
2.5	A ESPÉCIE <i>Clidemia hirta</i>	21
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4	METODOLOGIA	24
4.1	PERÍODO E LOCAL.....	24
4.2	COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO.....	24
4.3	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	24
4.4	ANÁLISE FITOQUÍMICA	24
4.4.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	24
4.4.2	Doseamento de Fenóis Totais	25
4.4.3	Doseamento de Flavonóides	25
4.4.4	Doseamento de Taninos	26
4.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	26
4.5.1	Atividade Sequestradora de Radical Livres pelo Método de ABTS	26
4.5.2	Atividade sequestradora de radicais livres pelo método de DPPH	27
4.5.3	Atividade Sequestradora de Radical Livres pelo Método de Fosfomolibdênio	27
4.6	ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	28
4.6.1	Linhagens Celulares e Cultivo	28
4.6.2	Avaliação da Citotoxicidade	29

4.6.3	Análise Morfológica por Coloração Panótica Rápida	29
4.7	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	ANÁLISE FITOQUÍMICA	30
5.1.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	30
5.1.2	Doseamentos (fenóis, flavonóides e taninos)	32
5.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	33
5.3	ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	34
5.4	MORFOLOGIA	37
6	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

O câncer é definido como um conjunto de doenças caracterizadas pela proliferação descontrolada de células malignas, sustentadas por um microambiente rico em células, nutrientes e fatores de crescimento, que favorecem o desenvolvimento do tumor (HANAHAN, 2022), além disso, o estresse oxidativo também contribui para o desenvolvimento e manutenção dessa patologia (ZHANG J., 2021). Embora a ciência e a tecnologia tenham avançado no tratamento desta enfermidade, ela ainda está entre as 10 principais causas de mortes no mundo (OPAS, 2020), causando milhares de mortes anualmente (IARC, 2020).

Os tratamentos convencionais para o câncer visam reduzir ou eliminar as células tumorais, no entanto, as células saudáveis também são afetadas durante o processo, trazendo complicações clínicas aos pacientes (CHU, 2018; VAIDYA, 2021). Diante dessas limitações, novas medidas terapêuticas precisam ser aplicadas, destacando-se as plantas medicinais como fonte de biomoléculas capazes de originar fármacos menos tóxicos e mais seletivos no combate ao câncer (QU; SAFONOVA; DE LUCA, 2019; SINGH; PANDA; SATAPATHY, 2020).

Diante disso, a família Melastomataceae possui 166 gêneros, entre eles, o gênero *Clidemia* (CLAUSING; RENNER, 2001), que abriga 175 espécies, das quais 50 estão distribuídas no território brasileiro, destacando a espécie *Clidemia hirta*, popularmente conhecida como, caiua, pixirica ou peludinha, que é tipicamente encontrada na região do cerrado e em florestas de galeria (GOLDENBERG; SOUZA; DEQUECH, 2005; MEDEIROS, 2011).

Na medicina popular, o chá de *C. hirta* é utilizado para tratar feridas causadas por *Leshmania braziliensis* e disfunções gastrointestinais (FRANÇA; LAGO; MARSDEN, 1996; REGO et al., 2016), enquanto a infusão das folhas da espécie tem sido usada como antiplasmódica e desregulações menstruais (DEFILIPPS; MAINA; CREPIN, 2004). Na literatura, estudos identificaram a presença de diversas moléculas como, os terpenos, esteroides, taninos e flavonoides em extratos das folhas de *C. hirta* (BOMFIM et al., 2020, 2021). Além disso, o extrato etanólico da espécie é relatado por sua atividade antibacteriana (LOPEZ et al., 2016), e o extrativo em acetato de etila por ausência de toxicidade em *Artemia salina* no estudo de Bomfim et al. (2020).

Diante das consequências dos tratamentos antineoplásicos, o potencial biológico de *C. hirta* e a escassez de estudos que avaliem as atividades antioxidante e citotóxicas da espécie, esse trabalho teve como objetivo contribuir com a descoberta de novas moléculas bioativas oriundas de *C. hirta* através da identificação dos componentes fitoquímicos e avaliação das atividades antioxidantes e citotóxicas desta espécie.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O CÂNCER

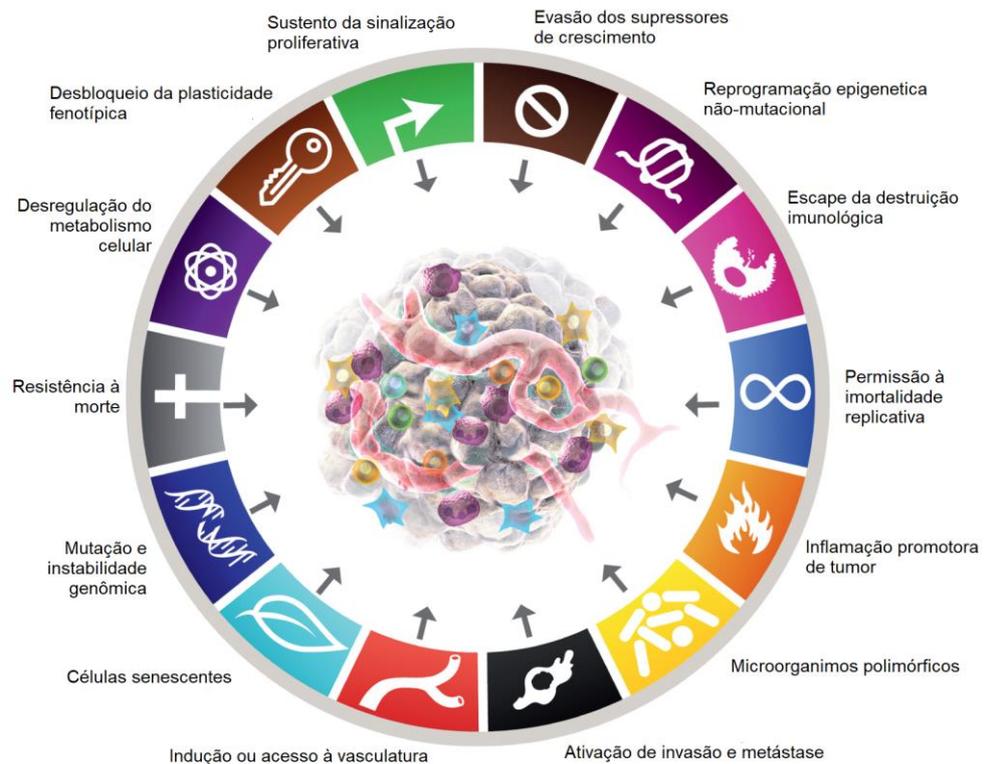
A carcinogênese envolve mecanismos de iniciação, promoção e progressão que resultam na transição de células normais em células tumorais. Esse evento é estimulado por carcinógenos genotóxicos (benzeno, arsênio, etc) e/ou não-genotóxicos (poluição, dieta, etc) (GEORGE; TSUCHISHIMA; TSUTSUMI, 2019; HIDAJAT et al., 2019; BARGUILLA et al., 2020). Esses processos podem agir individualmente ou sinergicamente resultando no dano direto ao DNA por meio de mutações e instabilidade, contribuindo com o desenvolvimento de células cancerígenas (FISHBEIN et al., 2020; ZHANG A. et al., 2020; TANG et al., 2022).

A replicação de células saudáveis é controlada através da manutenção da homeostase no controle do ciclo celular, no entanto, essa condição está alterada em diversas doenças, incluindo o câncer (BATIR; ŞAHIN; ÇAM, 2019; BOUTELLE; ATTARDI, 2021). Essa alteração pode ser influenciada por mutações no gene TP53, que em condições normais se apresenta em níveis necessários para evitar a multiplicação de células mutadas, suprimindo o aparecimento de tumores. Entretanto, quando mutado, por perda ou ganho de função, favorece o desenvolvimento e a multiplicação de células malignas que levam a formação tumoral (MORRIS et al., 2019; GUO et al., 2021; VELEZ et al., 2022).

Esses processos culminam na replicação exacerbada de células malignas sustentadas por um microambiente rico em células, nutrientes, fatores de crescimento e moléculas que atuam favorecendo a tumorigênese e a progressão maligna. Esse ambiente possui algumas características (Figura 1) em comum entre os cânceres que permitem a manutenção e a progressão do tumor, como a

resistência a morte celular, replicação descontrolada, capacidade de invasão e metástase, escape do sistema imune, inflamação promovida pelo tumor, entre outras (HANAHAN, 2022). Diante disso, o conhecimento do microambiente tumoral é um fator essencial na busca de novas moléculas que combatam ao câncer, em especial, direcionadas às características citadas.

Figura 1 – As características marcantes do câncer



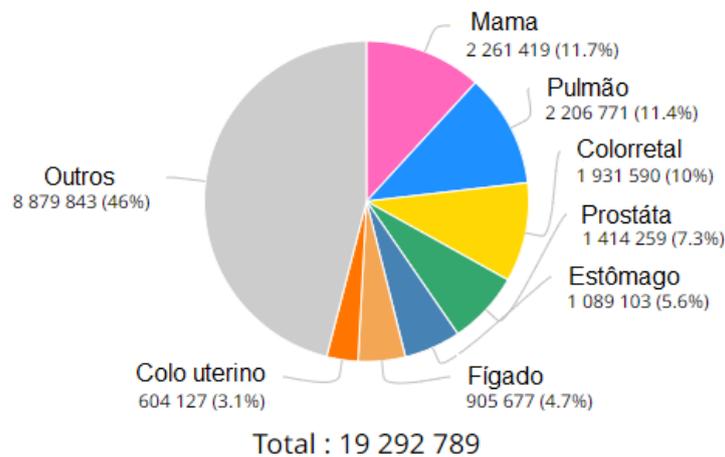
Fonte: HANAHAN, 2022 (adaptada).

O microambiente tumoral é um ambiente multicelular complexo (figura 1), as células que o compõem variam de acordo com o tipo de câncer, mas a presença de células imunes, estromais, vasos sanguíneos e matriz extracelular são comuns a todos os tipos (TRUFFI; SORRENTINO; CORSI, 2020). A presença dessas células é estimulada pelas células tumorais que promovem alterações celulares, físicas e moleculares no organismo do hospedeiro, permitindo o estabelecimento, manutenção, progressão e invasão do tumor (ANDERSON; SIMON, 2020).

2.1.1 Incidência e mortalidade

Segundo os últimos dados publicados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), cerca de 19.292.789 milhões de novos casos de câncer ocorreram no mundo em 2020 (figura 2). Entre esses, a maior parte dos casos foram causados pelos câncer de mama e pulmão (IARC, 2020). No Brasil, esses números chegaram a cerca de 592.212 ocorrências, nos quais o câncer de mama e próstata foram os mais frequentes (figura 3), (INCA, 2020).

Figura 2 – Taxas de incidência de acordo com o câncer, para ambos sexos, no mundo em 2020.



Fonte: Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (IARC), 2020.

Figura 3 – Taxas de incidência de câncer na população brasileira de acordo com sexo em 2020.

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

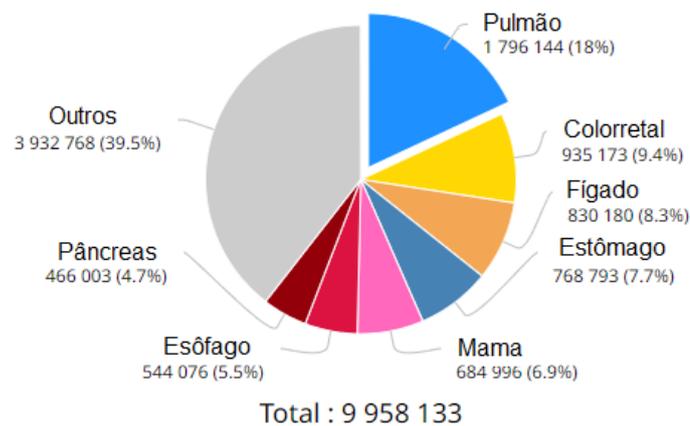
Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%				Mama feminina	66.280
Cólon e reto	20.520	9,1%	Cólon e reto	20.470		9,2%	
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%	Colo do útero	16.590		7,4%	
Estômago	13.360	5,9%	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440		5,6%	
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), 2020.

Diante do aumento no número de casos desta doença, as taxas de mortalidade continuam em ascensão, notando-se que, apenas em 2020, cerca de 9.958.133 óbitos foram causados por neoplasias malignas no mundo (figura 4), alcançando uma taxa de 259.949 mortes no território brasileiro. Entre os diversos cânceres, o câncer de pulmão foi o principal causador desses óbitos no mundo e no Brasil (IARC, 2020). Quando se trata da mortalidade em relação aos sexos, o câncer de pulmão e mama são os principais causadores de mortes pela doença em homens e mulheres, respectivamente, tanto no território brasileiro quanto mundialmente (IARC, 2020; INCA 2020).

Figura 4 – Número de mortes no mundo para ambos os sexos em 2020.



Fonte: Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (IARC), 2020.

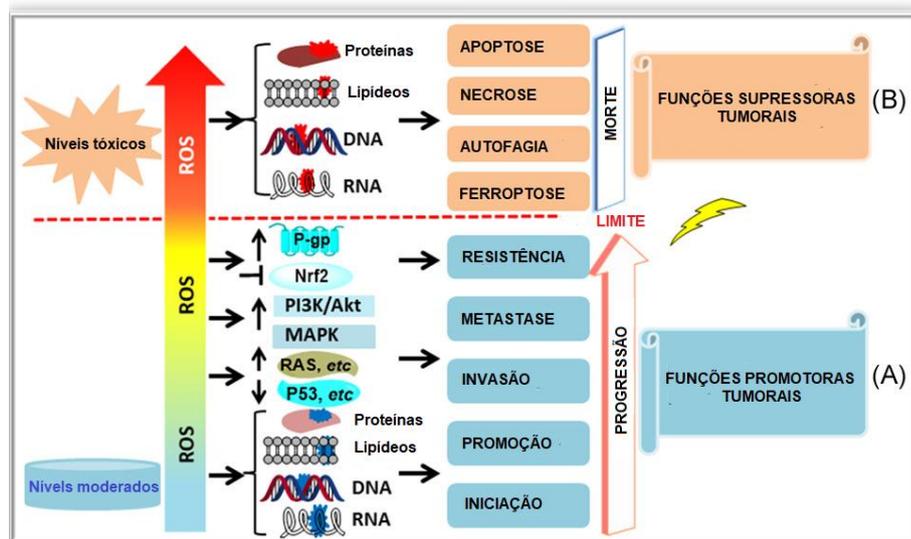
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo pode ser causado pela presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) liberadas pelo metabolismo de células, especialmente geradas pelas mitocôndrias, como: ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxilas ($\cdot OH$) e radical óxido nítrico (NO), etc. Em condições normais, essas moléculas mantêm a homeostase das reações de oxido-redução do organismo, entretanto, em elevadas concentrações podem se ligar a componentes essenciais a sua manutenção, como proteínas, lipídios e nucleotídeos, resultando em danos celulares (SABOGAL-GUÁQUETA et al., 2019; SIES; JONES, 2020).

O controle das espécies reativas de oxigênio é realizado por sistemas biológicos de eliminação de ROS, como as enzimas superóxido desmutase, catalase e glutathione redutase, ou ainda, pela ação de moléculas (ex. polifenóis) que inibam enzimas oxidantes como a xantina oxidase, evitando, assim, danos ao organismo (ZHANG Q. et al., 2020). Entretanto, o aumento dessas moléculas e desbalanço entre esses mecanismos podem favorecer o surgimento ou progressão de doenças, incluindo o câncer (OKA et al., 2020; TEKIN; SEVEN, 2022).

Em diversos cânceres os níveis das espécies reativas de oxigênio está elevado, essas podem se ligar a moléculas essenciais à sobrevivência das células tumorais (DNA, proteínas, etc), levando a morte destas, em contrapartida, em níveis moderados, atuam favorecendo a iniciação, progressão, invasão, metástase e resistência do tumor (figura 5) (ZIŃCZUK et al., 2020; KUNDAKTEPE et al., 2021). Essas células podem ainda se favorecer de mecanismos antioxidantes próprios, que as protejam do estresse oxidativo causado pela quimioterapia, contribuindo com a sua resistência e limitando as opções dos tratamentos antitumorais disponíveis (ZHOU et al., 2019).

Figura 5 – Funções das espécies reativas de oxigênio (ROS) no câncer



Fonte: Zhang J. et al. 2021 (adaptada).

2.3 TRATAMENTOS ANTINEOPLÁSICOS

As terapias antineoplásicas convencionais utilizadas podem ser localizadas

(ressecção cirúrgica, radioterapia, ultrassom, etc), sistêmicas (quimioterapia, terapia hormonal, terapia alvo, imunoterapia, etc) ou, ainda, associadas (terapias locais e sistêmicas), com a escolha dependendo do local afetado, grau de invasão, tipo de tumor, entre outros aspectos (MEDINA et al., 2020). Esses tratamentos podem controlar, diminuir, ou eliminar o tumor, entretanto, podem trazer diversos efeitos colaterais aos pacientes à curto e longo prazo (MATEI et al., 2019; PEZ et al., 2020; JIŘÍ et al., 2021).

Os medicamentos antineoplásicos disponíveis podem ser classificados de acordo com seus mecanismos de ação em: antimetabólitos (controlam a síntese do DNA); agentes alquilantes, agentes intercalantes e inibidores de topoisomerase (agem diretamente na molécula do DNA); e agentes antitubulínicos (interferem na mitose das células) (CHU, 2018; VAIDYA et al., 2021). Os fármacos 5-fluorouracil, doxorrubicina e paclitaxel, respectivamente, representam os grupos supracitados, e são utilizados amplamente nas terapias anticâncer, embora alguns estudos tenham relatado a toxicidade destes medicamentos ou suas formulações, causando efeitos como neurotoxicidade e cardiotoxicidade (ZANG et al., 2019; TRUFFI et al., 2020; MOGHADDAM et al., 2022).

Não obstante, esses tratamentos são invasivos ou apresentam efeitos colaterais que podem prejudicar a saúde e o bem-estar do paciente. Entre os principais sinais e sintomas estão a fadiga, neutropenia, trombocitopenia, alopecia e distúrbios gastrointestinais (náusea, vômito, diarreia, etc) (MATEI et al., 2019; PAULA et al., 2020; GERNIER et al., 2021). Diante dessas limitações, é primordial a busca por novas moléculas antineoplásicas mais seletivas às células cancerígenas e menos tóxicas ao organismo.

2.4 PLANTAS MEDICINAIS E SUA RELEVÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

O uso de plantas medicinais é um recurso utilizado pelos povos antigos para tratar diversas enfermidades. Esse saber milenar continua sendo fonte de estudo para etnofarmacologia, que busca identificar moléculas naturais com potencial em compor novos medicamentos. De posse desse conhecimento, pesquisadores e indústrias farmacêuticas têm desenvolvido pesquisas que visam investigar, identificar, isolar e sintetizar moléculas bioativas derivadas de espécies botânicas,

marinhas, animais, entre outras, a fim de solucionar problemas de interesse clínico (XU et al., 2020; JABIR et al., 2021; İNAN; KOÇ; ÖZÇİMEN, 2021).

As plantas medicinais constituem uma rica fonte de componentes químicos, com diversas propriedades biológicas, incluindo a atividade antineoplásica, sendo cerca de 60 % dos fármacos antineoplásicos derivados desse recurso (TAÏBI et al., 2020). Diante disso, as espécies botânicas têm sido alvo de estudo na busca de novos tratamentos mais seletivos e menos tóxicos direcionados ao câncer (MAJOLO et al., 2019). Os fármacos vimblastina e vincristina extraídos da espécie *Catharanthus roseus*, são apenas alguns dos medicamentos derivados de plantas medicinais (QU; SAFONOVA; DE LUCA, 2019), destacando a importância do estudo das propriedades químicas e farmacológicas das ervas medicinais.

Neste contexto, a análise dos constituintes químicos de extratos botânicos permite identificar e quantificar as principais classes de metabolitos secundários, direcionando a identificação das propriedades farmacológicas e isolamento das moléculas responsáveis por tais atividades que possam ser candidatas à fármacos antitumorais (DHANASEKARAN et al., 2020; YU et al., 2021). Além disso, a avaliação da citotoxicidade e capacidade de proteção contra radicais livres da amostra de interesse é imprescindível para garantir a segurança do produto aos futuros consumidores (SAMMAR, 2019).

2. 5 FAMÍLIA MELASTOMATACEAE E O GÊNERO *Clidemia*

A família Melastomataceae possui cerca de 166 gêneros e quase 5.600 de espécies, predominantemente, espalhadas pelas regiões tropicais do mundo (CLAUSING; RENNER, 2001). No Brasil, ela é considerada a sexta maior família representante das angiospermas, se apresentando, frequentemente, na forma de arbustos, herbáceos ou arbóreos, com cerca de 68 gêneros e mais de 1500 espécies espalhadas apenas no território brasileiro (ROMERO; MARTINS, 2002).

Os gêneros dessa família são predominantemente encontrados no bioma do cerrado, entretando, também podem estar presentes no bioma amazônico e de mata atlântica (GOLDENBERG; SOUZA; DEQUECH, 2012). Entre estes diversos gêneros, se destaca o gênero *Clidemia*, considerado um dos maiores representantes da família Melastomataceae (KRIEBEL; ALMEDA, 2009; SANTOS et al., 2021), abrigando cerca de 175 espécies, das quais 50 encontram-se distribuídas no Brasil

(MATSUMOTO; MARTINS, 2009), incluindo a espécie *Clidemia hirta*.

2.6 A ESPÉCIE *Clidemia hirta*

Clidemia hirta (L.) D. Don é popularmente conhecida como, caiua, pixirica ou peludinha. Esta espécie é principalmente encontrada na região neotropical do globo, enquanto no território brasileiro está presente, especialmente, na região do cerrado e em florestas de galeria (MEDEIROS, 2011; GOLDENBERG; SOUZA; DEQUECH, 2012).

A espécie *C. hirta* possui características arbustivas ramificadas com caule e folhas de coloração verde, podendo alcançar cerca de 1,5 metros de altura. As folhas da espécie são hirsutas e glândulares de cor verde escura na face adaxial e verde clara na face abaxial, com lâmina foliar elíptica apresentando dimensões em média de 5-17 cm x 3-8 cm. Além disso, a espécie também apresenta flores brancas e frutos variando entre verde e roxo, que dependendo do estágio de maturação, podem conter diversas sementes (SILVA T. M. et al., 2021). As características morfológicas da espécie pode ser visualizadas na figura 6.

Figura 6 – Aspectos morfológicos do arbusto e folhas da espécie *Clidemia hirta*



Fonte: Silva T. M. et al. 2021.

A figura 6 representa o aspecto geral (A) do arbusto, a face adaxial (B) e abaxial (C) da espécie *Clidemia hirta*.

A *C. hirta* é utilizada na medicina tradicional para tratar diversos males. O chá das folhas da espécie é utilizado para tratar feridas causadas por *Leshmania braziliensis*, palpitações, diarreia, prisão de ventre, gastrite e náuseas (FRANÇA et

al., 1996; GIRALDI; HANAZAKI, 2010; REGO et al., 2016). Já a infusão das folhas da espécie tem sido usada como antiplosmódica e para tratar mulheres com fluxo menstrual intenso (DEFILIPPS; MAINA; CREPIN, et al., 2004). Outras partes da planta também são utilizadas no preparo de chás, como as flores e frutos em casos de doenças localizadas nos rins e bexiga, respectivamente (CRUZ; KAPLAN, 2004).

Estudos químicos identificaram a presença de diversas moléculas como, terpenos, esteroides, taninos e flavonoides em extratos das folhas de *C. hirta* (BONFIM, et al., 2020, 2021). A presença de compostos fenólicos são relacionadas a atividade antioxidante de extratos botânicos (VALVERDE-MALAVÉ et al., 2019; LIMA et al., 2020), já os flavonoides e esteroides são relatados por suas propriedades anti-inflamatórias (LIMA et al., 2020; ALHAWARRI et al., 2021). Na literatura, o extrato etanólico de *C. hirta* é relatado por sua atividade antibacteriana (LOPEZ et al., 2016) e anticâncer promissoras (NARASIMHAM et al., 2017). Enquanto que no estudo de Bomfim et al. (2020), o extrato em acetato de etila não apresentou toxicidade contra *Artemia salina*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o perfil fitoquímico, atividades antioxidante e citotóxica dos extratos em hexano, acetato de etila e etanol das folhas de *Clidemia hirta*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar as partes aéreas de *C. hirta* (Ch);
- Obter os extratos em hexano (ChHex), acetato de etila (ChAcOEt) e etanol (ChEtOH) das folhas de *C. hirta*;
- Realizar a identificação e quantificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos de *C. hirta*;
- Avaliar a atividade antioxidante das soluções extrativas;
- Investigar a citotoxicidade dos extratos em linhagens normais e tumorais;
- Realizar a análise morfológica das células em que os extratos apresentaram atividade anticâncer promissora.

4 METODOLOGIA

4.1 PERÍODO E LOCAL

As atividades descritas neste projeto foram realizadas nas dependências do laboratório de Prospecção Farmacotoxicológica de Produtos naturais (BIOFARMATOX) alocado departamento de antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), entre os meses de novembro de 2021 à junho de 2022.

4.2 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

A espécie *C. hirta* foi coletada em uma restinga de mata atlântica no município de Barreiros – PE, e identificada no Herbário do Instituto Agrônomo de Pesquisa (IPA), onde uma exsicata foi mantida sob número de tombo 92. 961.

4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

As folhas foram secas em estufa por 4 dias a 50 °C. O material extrativo foi obtido por maceração exaustivas das folhas secas trituradas de *C. hirta*. Posteriormente, as folhas foram imersas em 2 L de hexano (ChHex), acetato de etila (ChAcOEt) e etanol (ChEtOH), com troca dos solventes a cada 48 horas por um período de 7 dias. Após essa etapa, as soluções extrativas filtradas foram secas em evaporador rotativo para obter o extrato bruto.

4.4 ANÁLISE FITOQUÍMICA

4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A identificação do perfil fitoquímico dos extratos foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) segundo Wagner e Bladt (2001) e Waksmundzka-Hajnos et al. (2008). O extrato foi pesado e ressuspendido de acordo com o solvente utilizado para extração a fim de obter a concentração final de 5 mg/mL. Como fase fixa foi utilizada placas com sílica gel F₂₅₄. Os padrões e reveladores químicos específicos estão descritos no quadro 1.

Quadro 1 - Classes e respectivos reveladores do perfil fitoquímico

CLASSES	REVELADOR	COLORAÇÃO	UV/VIS
Alcaloides	Dragendorff	Laranja	VIS
	Mayer	Branco	VIS
	Wagner	Marrom	VIS
Antraquinonas	KOH 5%	Laranja-avermelhadas	UV/VIS
Cumarinas	KOH 5%	Verde-azuladas	UV/VIS
Flavonoides	AlCl ₃	Amarelo-esverdeado	UV
	Anisaldeído-sulfúrico	Amarelo	VIS
	Sulfato cérico	Amarelo	VIS
Óleos essenciais	Anisaldeído sulfúrico	Vermelho-amarronzadas	VIS
Terpenoides: esteroides e triterpenos	Liebermann-Burchad	Rosa/roxo: triterpenos, Azul/verde: esteroides	VIS
	Vanilina-sulfúrica	Roxo: terpenos	VIS
Taninos	FeCl ₃	Preto	VIS

Fonte: autoria própria.

AlCl₃: cloreto de alumínio; FeCl₃: cloreto férrico, KOH: hidróxido de potássio; VIS: luz visível; UV: luz ultravioleta.

4.4.2 Doseamento de Fenóis Totais

Esta análise foi realizada segundo Silva T. M. S. et al. (2006). Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,2 mL do extrato (1,0 mg/mL), 500 µL de Folin-Ciocalteu (10% v/v), 1 mL de Na₂CO₃ (7,5% p/v) e 1 mL de água destilada. Após repouso de 30 min, as leituras foram efetuadas a 760 nm. O teor de fenóis totais foi expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.4.3 Doseamento de Flavonóides

Esta análise foi realizada segundo Barroso M. et al. (2011). Em um tubo de ensaio foram adicionados 1 mL de extrato (1 mg/mL), 4 mL de água destilada e 300 µL de NaNO₂ (25 %). Após 5 minutos foram acrescentados 300 µL de AlCl₃ (10 %), 2 mL de NaOH (1 mol/L) e 2,4 mL de água destilada. Posteriormente, as leituras foram efetuadas a 510 nm. O teor de flavonoides totais foi expresso como miligramas

equivalente de rutina por grama de amostra (mg ER/g). O ensaio foi feito em triplicata.

4.4.4 Doseamento de Taninos

Esta análise seguiu a metodologia proposta por Shad et al. (2012). Em um tubo de ensaio foram adicionados 500 µL do extrato (1 mg/mL) e 2,5 mL de Folin-Ciocalteu (10 %). Após agitação por 3 minutos, 2 mL de Na₂CO₃ (20 %) foram acrescentados. Em seguida, a solução ficou em repouso por 2 horas e ao final desse período, as leituras foram efetuadas a 725 nm. O teor de taninos totais foi expresso em miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de amostra (mg EAT/g). O teste foi executado em triplicata.

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1 Atividade Sequestradora de Radical Livres pelo Método de ABTS

O ensaio do radical ABTS (2,2 AZINO BIS (3-etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfônico) sal de diamônio foi utilizado segundo o método descrito por ZHU et al. (2011) e RUFINO et al. (2007). As soluções de ABTS 7 mM e persulfato de potássio (K₂SO₃) 2,4 mM foram misturadas e mantidas na ausência da luz para reagir durante 12 h à temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi diluída adicionando 1 mL de solução de ABTS dissolvido em 65 mL de etanol, com ajuste da absorbância em 0,70 nm ± 0,05 nm sob comprimento de onda de 734 nm com o auxílio de um espectrofotômetro (HAN et al., 2011). As concentrações da solução padrão de Trolox utilizadas neste teste foram de 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 µg/mL. A solução de Trolox + Etanol foram o controle negativo do experimento. Alíquotas de 2,7 mL do radical ABTS foram acrescentadas em tubos de ensaio contendo 300 µL das soluções extrativas de *C. hirta* (31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL). Após o tempo de reação (6 min) no sonificador, as absorbâncias foram lidas em triplicata por espectrofotometria (λ = 734 nm). A atividade antioxidante equivalente ao trolox foi determinada pelo percentual de sequestro ± desvio padrão. Os resultados foram expressos em CI₅₀ (concentração de extrato em µg/mL capaz de inibir a formação de 50 % do radical

ABTS). E o percentual de eliminação do radical ABTS (%) foi calculado através da fórmula:

$$ABTS (\%) = \frac{Abs. \text{ controle negativo} - Abs. \text{ amostra}}{Abs. \text{ controle negativo}} \times 100$$

Abs: absorvância.

4.5.2 Atividade sequestradora de radicais livres pelo método de DPPH

A redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi determinada pela mudança colorimétrica medida em 517 nm em espectrofotômetro (RUFINO, et al., 2007; BRAND-WILLIAMS, et al., 1995). Para a execução do teste, os extratos de *C. hirta* foram diluídos em etanol (EtOH) e preparados em diferentes concentrações (1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL). Após o preparo das soluções, a reação foi realizada adicionando-se 1 mL da amostra teste e 1 mL da solução de DPPH (23,6 mg/mL) em tubos de ensaio em triplicata. Após 30 minutos, a absorvância foi lida com auxílio de um espectrofotômetro ($\lambda = 517 \text{ nm}$). O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo variando entre concentrações de 0,5 a 4 µg/mL. Já o controle negativo foi preparado com a adição 1 mL de DPPH em 1 mL de EtOH. A atividade antioxidante dos extratos foi expressa como CI_{50} , ou seja, a concentração do extrato (µg/mL) capaz de inibir a formação de 50 % dos radicais livres por DPPH. O percentual de eliminação de radicais DPPH (%) foi obtido pela fórmula:

$$DPPH (\%) = \frac{Abs. \text{ controle negativo} - Abs. \text{ amostra}}{Abs. \text{ controle negativo}} \times 100$$

Abs: absorvância.

4.5.3 Atividade Sequestradora de Radical Livres pelo Método de Fosfomolibdênio

A atividade antioxidante através da redução do complexo fosfomolibdênio foi realizada através da metodologia proposta por Pietro e colaboradores (1999). Para isto, o complexo foi formado em meio aquoso com a adição de 0,498 g de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), 0,494 g de molibdato de amônio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$) e 60 mL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4), ajustado para o volume final de 100 mL com água destilada. As amostras extrativas de *C. hirta* foram diluídas em etanol afim de obter a concentração de 1 mg/mL. Partindo desta concentração, alíquotas de 100 μL de cada extrato foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1 mL do reagente fosfomolibdênio. O branco foi composto por 1 mL do reagente e 100 μL de etanol. O ácido ascórbico foi utilizado como padrão e foi tido como 100 % da atividade antioxidante total. Em seguida, todos os tubos foram colocados em banho-maria a 95 °C por 90 minutos. Após o resfriamento das amostras, a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro ($\lambda = 695 \text{ nm}$). O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em percentual da atividade antioxidante em relação ao ácido ascórbico (AAR%), calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{AA\% em relação à vitamina C} = \frac{\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}}{\text{Abs. padrão} - \text{Abs. branco}} \times 100$$

Abs: absorbância.

4.6 ATIVIDADE CITOTÓXICA

4.6.1 Linhagens Celulares e Cultivo

As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram: HL-60 (leucemia pró-mioclítica aguda), Jurkat (leucemia aguda de células T), HCT-116 (câncer de cólon), HT-29 (câncer de cólon), MCF-7 (câncer de mama), NCI-H292 (carcinoma pulmonar mucoepidermóide), K-562 (leucemia mielóide crônica). As linhagens L-929 (fibroblasto murino) e VERO (células epiteliais de macaco verde) foram as linhagens saudáveis utilizadas.

As células foram cultivadas em frascos de cultura utilizando meio DMEM ou RPMI-1640, acrescido de 1 % de antibióticos e suplementado com 10 % de soro

fetal bovino (SFB), incubadas a 37 °C em atmosfera com 5 % de CO₂. As células foram mantidas no laboratório do BIOFARMATOX, Departamento de Antibióticos – UFPE.

4.6.2 Avaliação da Citotoxicidade

A atividade citotóxica foi determinada através do método de redução do sal MTT (brometo de 3-(4,5, dimetiliazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio). As células foram semeadas (2×10^5 células/poço, para linhagens aderidas, e $0,3 \times 10^6$, para linhagens em suspensão) em placas de 96 poços e incubadas durante 24 h.

Para as linhagens em suspensão (HL-60, Jurkat e K-562), as substâncias foram adicionadas no mesmo dia do semeio. Para linhagens aderidas, após 24 h de incubação, os extratos foram adicionados aos poços na concentração de 50 µg/mL e incubados por 72 h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e o meio de cultivo como controle negativo.

Três horas antes de completar o tempo de incubação, foram adicionados 25 µL de MTT em cada poço (5 mg/mL) e, posteriormente, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço para a dissolução dos cristais de formazan (MOSMANN, 1983). A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

Em seguida, as soluções extrativas de *C. hirta* que atingiram o percentual de inibição de crescimento celular ≥ 70 % foram escolhidas para determinação da CI₅₀ (concentração que inibe 50 % do crescimento em relação ao controle negativo) e os respectivos intervalos de confiança (CI 95 %) foram calculados a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prisma* 8.0.

4.6.3 Análise Morfológica por Coloração Panótica Rápida

A linhagem NCI-H292 foi plaqueada em placas de 24 poços na concentração de 2×10^5 células/poço. Após 24 h de incubação, foram adicionados, o extrato nas respectivas concentrações (CI₅₀ e $2x$ CI₅₀), o controle positivo (doxorrubicina) ou, o controle negativo (DMEM). Posteriormente, as placas foram mantidas em incubadora de CO₂ por 72 h.

Passado o tempo de incubação, as células foram lavadas com 1 mL de tampão PBS estéril, tripsinizadas com 500 µL de tripsina e o meio foi neutralizado com 500 µL de meio DMEM em cada poço, em seguida, os conteúdos de cada poço foram colocados em eppendorfs e centrifugados (1200 rpm por 5 min). Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuscitado em 500 µL de meio DMEM.

Para coloração, 50 µL de suspensão de cada amostra foi processada em citocentrífuga para preparação da lâmina (1.500 rpm por 5 minutos). Em seguida, as lâminas foram fixadas, coradas pelo kit panóptico rápido e submetidas a secagem, para posterior análise em microscópio óptico (400x).

4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

As análises estatísticas foram realizadas no *GraphPad 8.0* e *Microsoft Excel* (2016). Os valores foram obtidos através de média e desvio padrão dos ensaios em triplicata, considerando-se um $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL FITOQUÍMICO

5.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A tabela 1 mostra o resultado do perfil fitoquímico dos extratos ChHex, ChAcOEt e ChEtOH. O extrato hexânico de *C. hirta* revelou as classes dos esteroides e triterpenos, já o extrato acetato de etila e etanólico apresentaram flavonoides e taninos.

Tabela 1 - Perfil Fitoquímico de *C. Hirta*

C. hirta	ChHex	ChAcOEt	ChEtOH
Alcaloides	-	-	-
Antroquininas	-	-	-
Quinonas	-	-	-
Cumarinas	-	-	-
Flavonoides	-	+	+

Taninos	-	+	+
Saponinas	-	-	-
Esteroides	+	-	-
Triterpenos	+	-	-

Fonte: autoria própria
 (+) Detectado a presença da classe; (-) Não detectado;
 ChHex, ChAcOEt, ChEtOH, extratos em hexano, acetato de etila e etanol das
 folhas de *C. hirta*, respectivamente.

Bonfim e colaboradores (2020) investigaram o extrato em acetato de etila das folhas de *C. hirta* e identificaram a presença de taninos, terpenos e esteroides em sua composição. Por sua vez, no presente estudo o extrato ChAcOEt também apresentou flavonoides e taninos, embora não tenham sido identificados terpenos e esteroides no conteúdo extrativo. Além disso, o mesmo autor relatou a presença de taninos no extrato em hexano da mesma espécie (BONFIM et al., 2021), diferindo dos resultados encontrados para o extrativo ChHex, que não apresentou esta classe de metabolitos em sua composição.

A existência de flavonoides e taninos no extrato etanólico de *C. hirta* também foi detectada por Zain et al. (2021), os quais relataram a presença desses metabolitos além de saponinas e fenóis, corroborando os resultados identificados para a solução extrativa ChEtOH.

Em comparação com outros trabalhos, é possível perceber que os extratos oriundos das folhas de *C. hirta* podem apresentar diferentes classes de metabolitos secundários para um mesmo solvente. Essa diferença pode ser explicada devido às variações na técnica de secagem, método de preparação, armazenamento dos extratos, estação do ano e local de coleta do material botânico, entre outros (ADEGBAJU et al., 2020; NG et al., 2020).

Os taninos e flavonoides são classes pertencentes aos compostos fenólicos, ou seja, esses metabolitos secundários estão extensivamente presentes em diversas espécies botânicas e possuem várias propriedades biológicas (AYAD; AKKAL, 2019). A presença dessas moléculas tem sido relacionada à atividade anticâncer (MUNIYANDI, et al., 2019) e antioxidante de plantas medicinais (LIMA et al., 2020). Enquanto os terpenos e esteroides têm sido relatados por sua atividade anti-inflamatória, antioxidante (ALHAWARRI et al., 2021), antibacteriana (LEMILEMU et al., 2020) e anticâncer (AMNA et al., 2019). A identificação desses metabolitos nos extratos ChHex, ChAcOEt e ChEtOH aponta para propriedades farmacológicas

promissoras de espécie, uma vez que esses estão relacionados a diferentes atividades biológicas.

5.1.2 Doseamentos (fenóis, flavonoides e taninos)

A tabela 2 representa a quantidade de compostos fenólicos, flavonoides e taninos presentes nos extratos em acetato de etila e etanol de *C. hirta*. O extrato em hexano foi ocultado, pois não apresentou quantidade de fenóis, flavonoides e taninos relevantes. Os resultados indicam que o extrato acetato de etila apresentou maior quantidade de fenólicos e flavonoides, enquanto que o etanólico mostrou possuir um valor superior de taninos.

Tabela 2 - Doseamentos de fenólicos, flavonoides e taninos de *C. hirta*.

Extrato	Fenólicos mg EQ A.G./g	Flavonoides mg EQ Rut. /g	Taninos mg EQ A.T./g
ChAcEOt	388,57	441,25	223,1
ChEtOH	135,65	21,03	713,44

Fonte: autoria própria.

ChHex, ChAcOEt, ChEtOH, extratos em hexano, acetato de etila e etanol das folhas de *C. hirta*, respectivamente; mg EQ/g: miligramas equivalentes de ácido gálico, ácido tânico e rutina por grama de extrato.

A quantificação de fenóis totais do extrato em acetato de etila das folhas de *C. hirta* também foi avaliada por Bonfim et al. (2020), que identificaram uma quantidade de fenólicos totais ($197,18 \pm 1,35$ mg EGA/g) e flavonoides totais ($123,52 \pm 2,27$ mg/ EQ/ mg) inferior aos valores encontrados neste estudo para os extrativos ChAcEOt e ChEtOH, que foram quase duas vezes maiores. Por outro lado, o extrato etanólico de *C. hirta* avaliado por Zain e colaboradores (2021) apresentou teores de fenóis e flavonoides (524.99 EQA.G/g e 507.92 mg EQ Q/g de extrato) superiores em comparação aos resultados encontrados para o extrativo ChEtOH neste estudo (tabela 2).

Na literatura, os estudos que avaliam a quantidade de taninos totais da espécie *C. hirta* em etanol são escassos. No entanto, o extrativo ChEtOH avaliado neste estudo, se destacou por sua rica composição em taninos totais ($713,44$ mg EQ A.T/g). Além disso, a presença desses compostos também foi relatada na solução extrativa em acetona (70 %) das folhas de *C. hirta*, resultando em $521,3 \pm 84,3$ mg

EQ A.T/g de extrato (ALONSO-AMELOT et al., 2011), reafirmando a existência de taninos na espécie.

5. 2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A tabela 3 mostra a atividade antioxidante determinada para ChHex, ChAcOEt e ChEtOH a partir dos métodos de DPPH, ABTS e fosfomolibdênio. Os extratos apresentaram capacidade antioxidante relevantes nas três metodologias realizadas, no entanto, o extrato ChAcOEt se destacou por apresentar maior atividade em baixas concentrações nos métodos de ABTS (CI_{50} : $239,37 \pm 11,95 \mu\text{g/mL}$) e DPPH (CI_{50} : $11,27 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$), além de elevado percentual de atividade antioxidante relativa ao ácido ascórbico (94,25 %) pela metodologia de fosfomolibdênio.

Tabela 3 - Atividade antioxidante dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de *Clidemia hirta*.

Amostra	ABTS CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP	DPPH CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP	Fosfomolibdênio AAR (%)
ChHex	>500	$661,39 \pm 0,01$	$83,85 \pm 0,02$
ChAcOEt	$239,37 \pm 11,95$	$11,27 \pm 0,13$	$94,25 \pm 0,03$
ChEtOH	>500	$10,74 \pm 0,14$	$83,48 \pm 0,06$

Fonte: autoria própria.

CI_{50} : concentração que inibe 50 % a formação de radicais \pm desvio padrão em relação ao trolox (ABTS) e ácido ascórbico (DPPH); AAR (%): atividade antioxidante relativa em relação à ácido ascórbico; ChHex, ChAcOEt, ChEtOH, extratos em hexano, acetato de etila e etanol das folhas de *C. hirta*, respectivamente.

A avaliação da atividade antioxidante por diferentes métodos é importante, pois estes possuem sensibilidades e afinidades distintas quanto às substâncias antioxidantes analisadas (CHAVES et al., 2020). Por exemplo, o método de ABTS e fosfomolibdênio permitem uma identificação mais abrangente de compostos hidrofílicos e lipofílicos (KUSKOSKI et al., 2005; AGUILAR ET AL., 2013), ao passo que o DPPH pode apresentar desvantagens quando a amostra antioxidante não for solúvel em solventes orgânicos polares, como o metanol e etanol (STAŠKO et al., 2007). Diante disso, foi possível observar que a técnica de DPPH foi mais sensível, uma vez que conseguiu detectar substâncias antioxidantes presentes nos extratos ChAcOEt e ChEtOH mesmo em baixas concentrações.

É possível notar na literatura que o extrato etanólico das folhas de *C. hirta* apresentou atividade antioxidante em baixas concentrações quando avaliado pelo método de DPPH, (CI₅₀: 5 µg/mL) por Narasimham et al. (2017), corroborando os resultados observados para os extratos ChAcOEt e ChEtOH, os quais foram capazes de eliminar 50 % dos radicais livres presentes nas concentrações de 11,27 µg/mL e 10,74 µg/mL, respectivamente.

Por sua vez, Bonfim et al. (2020) identificaram que extrato em acetato de etila das folhas de *C. hirta* foi capaz de reduzir 63,54 % de radicais livres através do método de DPPH. Embora o autor não tenha identificado a CI₅₀ do extrato, é possível perceber que a atividade antioxidante encontrada em seu estudo condiz com os resultados obtidos para ChAcOEt, avaliados pela mesma metodologia.

O extrato ChEtOH revelou atividade antioxidante promissora, conseguindo reduzir 50 % dos radicais livres em baixa concentração (CI₅₀: 10,74 µg/mL), quando comparado ao estudo de Zain e colaboradores (2021), que apresentou a mesma capacidade em uma concentração superior (CI₅₀: 161.37 µg/mL).

Além disso, outro estudo também avaliou a atividade antioxidante do extrato em etanol (50 %) dos frutos de *C. hirta* pelo método de ABTS, identificando uma CI₅₀ de 28,7 ± 1,0 µg/mL (ASSUNÇÃO-JÚNIOR et al., 2022). Diante disso, é possível identificar que esta espécie é rica em compostos antioxidantes tanto nas folhas como nos frutos, os quais podem beneficiar a população mundial através da geração novos produtos farmacológicos com base nessas propriedades para tratar ou prevenir doenças, incluindo o câncer.

5.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA

Na avaliação citotóxica dos extratos, foi observado que os mesmos não foram citotóxicos para as células saudáveis (L929 e VERO) e apresentaram citotoxicidade frente a diferentes linhagens de células cancerígenas, mostrando uma atividade antitumoral *in vitro* promissora e seletiva (tabela 4). O extrato ChAcOEt se destacou por apresentar percentuais de inibição de crescimento celular > 70 %, frente as células HT-29 (78,82 %), K562 (74,42 %), NCI-H292 (93,55 %) e MCF-7 (88,39 %), enquanto os demais extratos apresentaram percentual de inibição abaixo de 50 %,

com exceção do extrato ChEtOH, que conseguiu inibir 64,24 % e 68,07 % das linhagens leucêmicas Jurkat e K-562, respectivamente.

Tabela 4 - Percentual de inibição de crescimento celular (IC %) dos extratos em hexano, acetato de etila e etanol de *C. hirta* frente a linhagens saudáveis e cancerígenas avaliado pelo método de MTT após 72 h de tratamento

Linhagens	IC % ± Desvio padrão			
	ChHex	ChAcOEt	ChEtOH	Doxo
L-929	22,41 ± 1,93	28,44 ± 1,23	23,31 ± 0,87	85,85 ± 0,91
Vero	S/A	S/A	S/A	12,00 ± 0,38
HCT-116	7,59 ± 1,85	50,56 ± 4,08	39,60 ± 2,18	70,60 ± 1,64
HT-29	12,61 ± 1,58	78,82 ± 1,80	S/A	73,45 ± 2,53
HL-60	34,41 ± 1,39	16,02 ± 1,17	7,95 ± 2,58	94,14 ± 1,43
K-562	68,07 ± 3,29	74,42 ± 5,70	S/A	81,04 ± 6,53
Jurkat	64,24 ± 4,34	58,84 ± 4,09	41,49 ± 1,81	84,25 ± 1,94
NCI-H292	25,05 ± 1,02	93,55 ± 1,70	20,85 ± 1,78	98,00 ± 0,50
MCF-7	45,16 ± 3,86	88,39 ± 1,37	16,75 ± 0,60	72,11 ± 0,60

Fonte: autoria própria

Os resultados foram obtidos por cálculo de média ± erro padrão da média (SEM). S/A: sem atividade; ChHex, ChAcOEt, ChEtOH, extratos em hexano, acetato de etila e etanol das folhas de *C. hirta*, respectivamente; Doxo: doxorubicina (controle positivo).

Segundo Aritizabal et al. (2013), extratos de plantas são considerados promissores para investigações farmacológicas quando apresentam citotoxicidade ausente frente a células saudáveis. Nesse sentido, se enquadram nessa descrição os extratos ChHex, ChAcOEt e ChEtOH, uma vez que não demonstraram efeito citotóxico frente as células Vero. Aritizabal e colaboradores (2013), investigaram o perfil citotóxico do extrato butanólico de *C. hirta* e observaram que o extrato em estudo apresentou citotoxicidade parcial frente a linhagem Vero (CI₅₀: 45,28 µg/mL), o que não ocorreu neste estudo, provavelmente pela diferença de polaridade dos extratos estudados e a diferença dos constituintes fitoquímicos que os compõem, resultando na ausência de citotoxicidade para a mesma célula testada (ARITIZABAL et al. 2013).

Para melhor avaliar a atividade anticancerígena *in vitro* de *C. hirta*, as amostras que apresentaram percentual de inibição de crescimento celular acima de 70%, segundo a tabela 4, foram escolhidas para avaliação da concentração que inibe 50% (CI₅₀) das células. Sendo assim, a CI₅₀ calculada para as linhagens MCF-

7, NCI-H292, Jurkat, HT-29 e K-562 frente ao extrativo ChAcOEt encontra-se sumarizada na tabela 5.

Tabela 5 - Concentração ($\mu\text{g/mL}$) que inibe 50 % (CI_{50}) das células cancerígenas avaliada pelo método de MTT após 72 h de tratamento.

Amostra	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) Intervalo de confiança (IC 95%)				
	HT-29	K562	Jukart	NCI-H292	MCF-7
ChAcOEt	19,56 (16,04 - 23,76)	8,04 (6,82 - 9,54)	13,17 (11,34 - 15,45)	6,361 (5,55 - 7,25)	68,18 (61,03 -78,84)
Doxo	13,93 (11,29 - 18,22)	0,16 (6,44 - 8,84)	7,53 (6,44 - 8,84)	0,20 (0,89 - 0,34)	0,27 (0,17 - 0,39)

Fonte: autoria própria

Os resultados foram obtidos por cálculo de média \pm desvio padrão. A CI_{50} (concentração que inibe 50 % do crescimento celular) e os respectivos intervalos de confiança (CI 95 %) foram calculados a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prisma* 8.0. ChAcOEt: extrato em acetato de etila das folhas de *C. hirta*.

Para extratos brutos, o Instituto Nacional do Câncer do Estados Unidos (NCI), relata que um extrato pode ser considerado ativo quando apresenta $\text{CI}_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ frente a células cancerígenas (HENNEBELLE et al., 2008; MESA-ARANGO et al., 2009). Diante disso, é possível afirmar que o extrato ChAcOEt possui atividade anticâncer bastante promissora, pois se mostrou ativo frente as linhagens NCI-H292 (CI_{50} : 6,36 $\mu\text{g/mL}$), Jurkat (CI_{50} : 13,17 $\mu\text{g/mL}$), HT-29 (CI_{50} : 19,56 $\mu\text{g/mL}$) e K-562 (CI_{50} : 8,04 $\mu\text{g/mL}$) em concentrações inferiores a 30 $\mu\text{g/mL}$. Ademais, o mesmo extrato apresentou a menor CI_{50} entre os demais frente a linhagem NCI-H292, destacando o potencial anticâncer de *C. hirta* em células de câncer de pulmão, considerado o mais letal do mundo.

A citotoxicidade dos extratos em etanol, éter petróleo e clorofórmio frente a linhagem DLA (linfoma ascítico de Dalton) também foi avaliada por Narasimham e colaboradores (2017), identificada com valores de CI_{50} iguais a 68 $\mu\text{g/mL}$, 160 $\mu\text{g/mL}$ e 172 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esses dados apontam para atividade citotóxica não promissora de extratos etanólicos de *C. hirta* frente a linhagens cancerígenas, assim como foi visto para ChEtOH neste estudo.

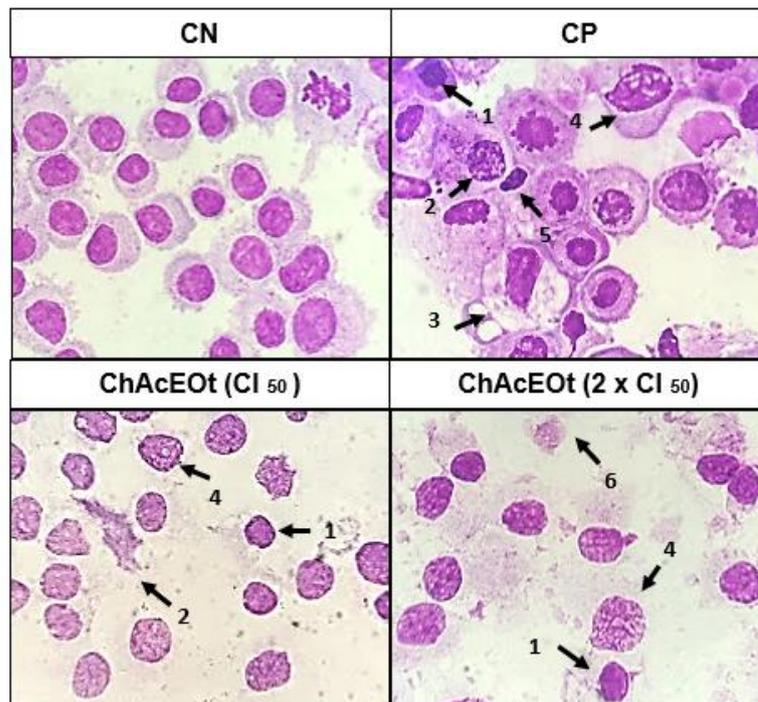
Adicionalmente, o extrato metanólico das folhas de *C. hirta* apresentou atividade citotóxica frente a linhagem HeLa (carcinoma cervical humano) com CI_{50} de 37,18 $\mu\text{g/mL}$ (ARBIASTUTIE et al., 2017), inferindo-se que essa espécie pode apresentar citotoxicidade frente a outras linhagens cancerígenas não avaliadas neste trabalho.

Ademais, vale ressaltar que este é o primeiro estudo que avalia a atividade citotóxica de *C. hirta* frente as linhagens HCT-116, HL-60, HT-29, Jurkat, K562, NCI-5292 e MCF-7, sendo o primeiro a investigar as alterações morfológicas provocadas pelo extrato ChAcOEt em células NCI-H292, destacando tais achados e fomentando assim o desenvolvimento de novos estudos que possibilitem o melhor entendimento dos fatores moleculares e farmacológicos envolvidos na atividade desse extrato e seus isolados químicos.

5.4 MORFOLOGIA

Diante do potencial antitumoral *in vitro* apresentado pelo extrato ChAcOEt frente a linhagem NCI-H292, esta foi escolhida para análise das alterações morfológicas provocadas pela amostra em questão. Como apresentado na figura 7, o extrato ChAcOEt (CI_{50} : 6,36 $\mu\text{g/mL}$; $2 \times CI_{50}$: 16,72 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de causar alterações celulares como, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e do núcleo das células NCI-H292.

Figura 7 – Análise morfológica das células NCI-H292 coradas por coloração de panóptico rápido após 72 h de tratamento com controle negativo, positivo ou ChAcOEt.



Fonte: autoria própria

Controle negativo (CN): meio DMEM; Controle positivo (CP): doxorrubicina (CI_{50} : 0,20 $\mu\text{g/mL}$); ChAcEOt (CI_{50} : 6,36 $\mu\text{g/mL}$); ChAcEOt ($2 \times CI_{50}$: 16,72 $\mu\text{g/mL}$). Os números indicam as alterações morfológicas observadas: 1 (condensação nuclear), 2 (fragmentação nuclear), 3 (vacualizações citoplasmáticas), 4 (condensação da cromatina), 5 (picnose), 6 (resto celular).

A análise das alterações morfológicas de drogas auxilia na determinação do mecanismo de morte celular e identificação do mecanismo de ação induzido por substâncias candidatas à fármacos (BARROSO P., 2021). Diante disso, após a avaliação morfológica das células NCH-H292 frente ao extrato ChAcEOt, segundo a classificação de morte celular de Kroemer (2009), foi possível identificar alterações celulares características de morte celular por apoptose, como fragmentação nuclear, condensação da cromatina e do núcleo.

O trabalho de Bonfim e colegas (2020) avaliou as alterações morfológicas das células THP-1 (leucemia monocítica aguda) após tratamento com o extrato em acetato de etila das folhas de *C. hirta* na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e identificou que o mesmo foi capaz de induzir a formação de corpos apoptóticos, denotando um processo de morte celular semelhante ao observado a partir das alterações morfológicas induzidas pelo extrativo ChAcEOt.

Não obstante, a atividade tumoral por mecanismos apoptóticos se estende à família Melastomataceae. O estudo de Barroso (2021) identificou que frações do extrato etanólico (FACL, FRCL) da espécie *Miconia ferruginata* (MELASTOMATACEAE) conseguiram induzir a apoptose de células de câncer de mama (MDA-MB-231 e 4T1), exibindo alterações morfológicas, como condensação nuclear, fragmentação, presença de blebs e a formação de corpos apoptóticos. Além disso, foi identificado um aumento no número de células na fase final de apoptose através da técnica de marcação dupla com anexina-V e PI (iodeto de propídio) por citometria de fluxo, corroborando os resultados apresentados por outros estudos da literatura bem como os desenvolvidos no presente trabalho.

6 CONCLUSÃO

Os extratos ChHex, ChAcOEt e ChEtOH apresentaram constituintes fitoquímicos apolares (esteroides e terpenos) e polares (flavonoides e taninos), os quais estão relacionados a atividade antioxidante e citotóxica encontradas neste estudo. Os três extratos avaliados apresentaram atividade antioxidante, já em relação a atividade citotóxica, os extrativos ChHex e ChEtOH não apresentaram citotoxicidade promissora frente as linhagens tumorais testadas. Por outro lado, o extrato ChAcOEt se destacou dentre os demais por apresentar melhor atividade antioxidante e citotoxicidade frente várias linhagens cancerígenas (MCF-7, NCI-H292, Jurkat, HT-29, K562), assim, este deve ser considerado como relevante para futuras investigações mais detalhadas acerca da sua atividade anticâncer, em especial, direcionada às células de carcinoma pulmonar (NCI-H292), na qual o extrato se apresentou mais citotóxico. Além disso, esses achados despertam o interesse na identificação e elucidação dos possíveis mecanismos de ação das moléculas responsáveis por tais propriedades, afim de gerar subsídios para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos no combate ao câncer. Não obstante, a ausência de citotoxicidade relevante dos extratos estudados sobre células saudáveis possibilita avanços nos estudos farmacológicos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ADEGBAJU, O. D.; OTUNOLA, G. A.; AFOLAYAN, A. J. Effects of growth stage and seasons on the phytochemical content and antioxidant activities of crude extracts of *Celosia argentea* L. **Heliyon**, [England], v. 6, n. 6, p. e04086, june 2020. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04086>>. Acesso em: 16 out. 2022.
- ALHAWARRI, M. B. et al. Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Inhibition of Acetylcholinesterase Potentials of *Cassia timoriensis* DC. Flowers. **Molecules**, [Switzerland], v. 26, n. 9, p. 2594, apr. 2021. Disponível em: < <https://doi.org/10.3390/molecules26092594>>. Acesso em: 20 out. 2022.
- ALONSO-AMELOT, M.; OLIVEROS, A.; ARELLANO, E. Exhaustive extraction of phenolics and tannins from some sun-exposed forbs and shrubs of the tropical Andes. **Ciencia**, Venezuela, v. 13, n. 4, oct. 2011. Disponível em: < https://web.archive.org/web/20180513160246id_/http://produccioncientificaluz.org/index.php/ciencia/article/viewFile/9284/9272>. Acesso em: 20 out. 2022.
- AMNA, U. et al. Evaluation of cytotoxic activity from Temurui (*Murraya koenigii* [Linn.] Spreng) leaf extracts against HeLa cell line using MTT assay. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, [India]v. 10, n. 2, p. 51, june 2019. Disponível em: < [10.4103/japtr.JAPTR_373_18](https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR_373_18)>. Acesso em: 18 out. 2022.
- ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C.. The tumor microenvironment. **Current Biology**, [England], v. 30, n. 16, p. R921-R925, aug. 2020. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>>. Acesso em: 13 out. 2022.
- ARBIASTUTIE, Y. et al. The potential of understorey plants from Gunung Gede Pangrango National Park (West Java, Indonesia) as cervix anticancer agents. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, [Indonesia], v. 18, n. 1, p. 109-115, jan. 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.13057/biodiv/d180115>>. Acesso em: 20 out. 2022.
- ARISTIZABAL, L. S. R.; MARÍN, D.; GONZÁLEZ, F. J. J. Atividade ictiotóxica e citotóxica de extratos vegetais Chrysobalanaceae, Melastomataceae, Rubiaceae e Rutaceae, da flora colombiana. **Scientia et Technica Año XVIII**, [S.l.], vol. 18, n. 3, p. 548- 552, oct. 2013. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84929154016>>. Acesso em: 20 out. 2022.
- ASSUNÇÃO-JÚNIOR, S. O. et al. Amazonian Melastomataceae blueberries: Determination of phenolic content, nutritional composition, and antioxidant and anti-glycation activities. **Food Research International**, v. 158, p. 111519, aug. 2022. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111519>>. Acesso em: 19 out. 2022.
- AYAD, R.; AKKAL, S. Phytochemistry and biological activities of algerian *Centaurea* and related genera. In: Atta-ur-Rahman. **Studies in Natural Products Chemistry**. ed. 63 New York: Elsevier, 2019, p. 357-414.

BARBOSA, I. R., SANTOS, C., SOUZA, D. Pancreatic cancer in Brazil: mortality trends and projections until 2029. **Arquivos de gastroenterologia**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 230–236, sep. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0004-2803.201800000-59>>. Acesso em: 26 jan. 2022.

BARGUILLA, I. et al. Role of As3mt and Mth1 in the genotoxic and carcinogenic effects induced by long-term exposures to arsenic in MEF cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [United States], v. 409, p. 115303, dec. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115303>>. Acesso em: 23 out. 2022.

BARROSO, M. et al. Flavored waters: influence of ingredients on antioxidant capacity and terpenoid profile by HS-SPME/ GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, United States, v. 59, p. 5062-5072, apr. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1519-6984.242112>>. Acesso em: 08 dez 2021.

BARROSO, P. R. **Miconia ferruginata DC.(Melastomataceae): estudo biomonitorado para triagem biológica de extratos e frações com atividade anticâncer**. Tese de doutorado. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. 2021.

BATIR, M. B.; ŞAHİN, E.; ÇAM, F. S. Evaluation of the CRISPR/Cas9 directed mutant TP53 gene repairing effect in human prostate cancer cell line PC-3. **Molecular Biology Reports**, [Netherlands], v. 46, n. 6, p. 6471-6484, nov. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11033-019-05093-y>>. Acesso em: 13 out. 2022.

BOMFIM, E. M. S. et al. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and chemical profile of species of *Miconia Ruiz Pav.*, *Clidemia D. Don* and *Tibouchina Aubl.*(Melastomataceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, Nigeria, v. 14, n. 1, p. 1-6, jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/JMPR2019.6846>>. Acesso em: 15 dez. 2021.

BOMFIM, E. M. S. et al. Phytochemical composition and biological activities of extracts from ten species of the family Melastomataceae Juss. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 82, , e242112, june 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1519-6984.242112>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

BOUTELLE, A. M.; ATTARDI, L. D. p53 and tumor suppression: it takes a network. **Trends in cell biology**, [England], v. 31, n. 4, p. 298-310, apr. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.12.011>>. Acesso em: 13 out. 2022.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, feb. 1995. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)>. Acesso em: 10 dez. 2021.

CHAVES, N.; SANTIAGO, A.; ALÍAS, J. C. Quantification of the antioxidant activity of plant extracts: Analysis of sensitivity and hierarchization based on the method used. **Antioxidants**, [Switzerland], v. 9, n. 1, p. 76, feb. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antiox9010076>>. Acesso em: 16 out. 2022.

CHU, E. et al. Cancer chemotherapy. In: BERTRAM, B. G. **Basic and clinical pharmacology**. ed. 14. San Francisco: Lange, 2018. p. 948-976.

CLAUSING, G., RENNER, S. S. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. **American Journal of Botany**, [New Jersey], v. 88, p. 486-498, mar. 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.2307/2657114>>. Acesso em: 17 dez. 2021.

CRUZ, A.V. M; KAPLAN, M. A. C. Estudo comparativo do perfil químico e do uso popular de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae. *Revista Floresta e Ambiente*, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

DEFILIPPS, R. A.; MAINA, S. L.; CREPIN, J. **Medicinal plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana)**. USA: National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, 2004.

DHANASEKARAN, S. Phytochemical characteristics of aerial part of *Cissus quadrangularis* (L) and its in-vitro inhibitory activity against leukemic cells and antioxidant properties. **Saudi journal of biological sciences**, [Saudi Arabia], v. 27, n. 5, p. 1302-1309, may 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.005>>. Acesso em: 10 out. 2022.

FISHBEIN, A. et al. Resolution of eicosanoid/cytokine storm prevents carcinogen and inflammation-initiated hepatocellular cancer progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [United States], v. 117, n. 35, p. 21576-21587, june 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2007412117>. Acesso em: 22 out. 2022.

FRANÇA, F., LAGO, E. L., MARSDEN, P. D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 29, n. 3, p. 229-232, june 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0037-86821996000300002>>. Acesso em: 12 dez. 2021.

GEORGE, J.; TSUCHISHIMA, M.; TSUTSUMI, M. Molecular mechanisms in the pathogenesis of N-nitrosodimethylamine induced hepatic fibrosis. **Cell death & disease**, [England], v. 10, n. 1, p. 1-9, jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41419-018-1272-8>>. Acesso em: 23 out. 2022.

GERNIER, F. et al. Chronic fatigue, quality of life and long-term side-effects of chemotherapy in patients treated for non-epithelial ovarian cancer: national case-control protocol study of the GINECO-Vivrovaire rare tumors INCa French network for rare malignant ovarian tumors. **BioMed Central Cancer**, [London], v. 21, n. 1, p. 1-12, oct. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12885-021-08864-8>>. Acesso em: 20 jan. 2022.

GIRALDI, M; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, v. 24, p. 395-406, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-33062010000200010>>. Acesso em: 27 nov. 2021.

GOLDENBERG, R., SOUZA, C. M. F., DEQUECH, H. B. Clidemia, *Ossaea e Pleiochiton (Melastomataceae) no estado do Parana, Brasil*. **Hoehnea**, [São Paulo], v. 32, n. 3, p. 453-466, jan. 2005. Disponível em: <http://arquivos.ambiente.sp.gov.br/hoehnea/2016/12/323_T09_24_07_2015.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2021.

GUO, Y. et al. Loss of TRIM31 promotes breast cancer progression through regulating K48-and K63-linked ubiquitination of p53. **Cell death & disease**, [England], v. 12, n. 10, p. 1-13, oct. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41419-021-04208-3>>. Acesso em: 12 out. 2022.

HAN, L. et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total phenol from betel (*Areca catechu* L.) nut seed and evaluation of antioxidant activity in vitro. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 46, p. 9289-9296, oct. 2011. Disponível em: <10.5897/AJB11.703>. Acesso em: 10 dec. 2021.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, [Philadelphia], v. 12, n. 1, p. 31-46, jan. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>>. Acesso em: 25 out. 2022.

HENNEBELLE, T. et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of ethnopharmacology**, [Ireland], v. 116, n. 2, p. 211-222, mar. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000600010>>. Acesso em: 22 out. 2022.

HIDAJAT, M. et al. Lifetime exposure to rubber dusts, fumes and N-nitrosamines and cancer mortality in a cohort of British rubber workers with 49 years follow-up. **Occupational and Environmental Medicine**, [England], v. 76, n. 4, p. 250-258, feb. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/oemed-2018-105181>>. Acesso em: 23 out. 2022.

İNAN, B.; KOÇ, R. Ç.; ÖZÇİMEN, D. Comparison of the anticancer effect of microalgal oils and microalgal oil-loaded electrosprayed nanoparticles against PC-3, SHSY-5Y and AGS cell lines. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, [England], v. 49, n. 1, p. 381-389, apr. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21691401.2021.1906263>>. Acesso em: 10 ago. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Atlas de mortalidade online**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo01/consultar.xhtmlL#panelResultado>>. Acesso em: 30 out. 2022.

INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Global Cancer observatory**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr>>. Acesso em: 30 out. 2022.

JABIR, M. S. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Annona muricata* extract as an inducer of apoptosis in cancer cells and inhibitor for NLRP3 inflammasome via enhanced autophagy. **Nanomaterials**, [Switzerland], v. 11, n. 2, p. 384, feb. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/nano11020384>>. Acesso em: 10 ago. 2022.

JIŘÍ, K. et al. Proton pencil-beam scanning radiotherapy in the treatment of

nasopharyngeal cancer: dosimetric parameters and 2-year results. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, [Germany], v. 278, n. 3, p. 763-769, june 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00405-020-06175-5>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

KRIEBEL, R.; ALMEDA, F. Three new species in the neotropical genus *Clidemia* (Melastomataceae: Miconieae). **Brittonia**, New York, v. 61, n. 3, p. 206-217, set. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12228-009-9098-4>>. Acesso em: 10 out. 2022.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death & differentiation**, [England], v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>>. Acesso em: 21 out. 2022.

KUNDAKTEPE, B. P. et al. The evaluation of oxidative stress parameters in breast and colon cancer. **Medicine**, [S.I.], v. 100, n. 11, mar. 2021. Disponível em: <[10.1097/MD.00000000000025104](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000025104)>. Acesso em: 24 out. 2022.

KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Food Science and Technology**, [United States], v. 25, p. 726-732, dez. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>>. Acesso em: 16 out. 2022.

LEMILEMU, F. et al. Antibacterial steroids from roots of *Bersama abyssinica*. **Ethiopian Journal of Sciences and Sustainable Development**, [Ethiopia], v. 7, n. 1, p. 27-34, out. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.20372/ejssdastu:v7.i1.2020.156>>. Acesso em: 18 out. 2022.

LIMA, T. C. et al. Evidence for the involvement of IL-1 β and TNF- α in anti-inflammatory effect and antioxidative stress profile of the standardized dried extract from *Miconia albicans* Sw.(Triana) Leaves (Melastomataceae). **Journal of ethnopharmacology**, [Ireland], v. 259, p. 112908, sep. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112908>>. Acesso em: 18 out. 2022.

LOPEZ, T. et al. Secondary metabolite accumulation, antibacterial and antioxidant properties of in vitro propagated *Clidemia hirta* L. extracts are influenced by the basal culture medium. **Comptes Rendus Chimie**, [S.I.], v. 19, n. 9, p. 1071-1076, sep. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.03.012>>. Acesso em: 12 dez. 2021.

MAJOLO, F. et al. Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery. **Phytochemistry Letters**, [Amsterdã], v. 31, p. 196-207, apr. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.04.003>>. Acesso em: 15 dez. 2021.

MATEI, D. et al. Adjuvant chemotherapy plus radiation for locally advanced endometrial cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 24, p. 2317-2326, june 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1813181>>. Acesso em: 19 ago. 2022.

MATSUMOTO, K.; MARTINS, A. B. *Aciotis* D. DON. In: WANDERLEY, M .G. L.;

SHEPHERD G. J. T. S.; MELHEM, A. M.; GIULIETTI, S. E. M. (Eds.). **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP, 2009.

MEDEIROS, J. D. **Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies**. 1. ed. Brasília: MMA/SBF, 2011.

MEDINA, M. A. et al. Triple-negative breast cancer: a review of conventional and advanced therapeutic strategies. **International journal of environmental research and public health**, [Switzerland], v. 17, n. 6, p. 2078, mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph17062078>>. Acesso em: 19 ago. 2022.

MESA-ARANGO, A. C. et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) NE Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 878-884, sep. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000600010>>. Acesso em: 21 out. 2022.

MOGHADDAM, Z. et al. Evaluation of 5-fluorouracil-induced cardiotoxicity: role of cardiac biomarkers. **Experimental Oncology**, [Ukraine], v. 44, n. 1, p. 60-66, mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-1.17496>. Acesso em: 19 ago. 2022.

MORRIS, J. P. et al. α -Ketoglutarate links p53 to cell fate during tumour suppression. **Nature**, [London], v. 573, n. 7775, p. 595-599, sep. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1577-5>>. Acesso em: 12 out. 2022.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, [Amsterdã], v. 65, n. 1-2, p. 55 – 63, dec. 1983. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)>. Acesso em: 20 dez. 2021.

MUNIYANDI, K. et al. Phenolics, tannins, flavonoids and anthocyanins contents influenced antioxidant and anticancer activities of *Rubus* fruits from Western Ghats, India. **Food Science and Human Wellness**, [S.I.], v. 8, n. 1, p. 73-81, mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.005>>. Acesso em 16 out. 2022.

NARASIMHAM, D. et al. Evaluation of in vitro anticancer and antioxidant activities from leaf extracts of medicinal plant *Clidemia hirta*. **International Journal of Pharmaceutical Science**, [S.I.], v. 9, n. 4, p. 149-153, feb. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i4.16843>>. Acesso em: 20 out. 2022.

NG, Z. X.; YONG, Phaik H.; LIM, S. Y. Customized drying treatments increased the extraction of phytochemicals and antioxidant activity from economically viable medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, [Netherlands] v. 155, p. 112815, nov. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112815>>. Acesso em: 16 out. 2022.

NIU, B. et al. Application of glutathione depletion in cancer therapy: Enhanced ROS-based therapy, ferroptosis, and chemotherapy. **Biomaterials**, v. 277, p. 121110, oct. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121110>>. Acesso em: 10 July 2022.

OKA, S. et al. ROS control in human iPS cells reveals early events in spontaneous carcinogenesis. **Carcinogenesis**, [England], v. 41, n. 1, p. 36-43, jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/carcin/bgz081>>. Acesso em: 23 out. 2022.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **OMS revela principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo entre 2000 e 2019**. PAHO, dec. 2020. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/9-12-2020-oms-revela-principais-causas-morte-e-incapacidade-em-todo-mundo-entre-2000-e>>. Acesso em: 05 fev. 2022.

PAULA, D. P. et al. Impact of protocol change on individual factors related to course of adverse reactions to chemotherapy for breast cancer. **Supportive Care in Cancer**, [Heidelberg] v. 28, n. 1, p. 395-403, may 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00520-019-04841-x>. Acesso em: 20 jan. 2022.

PEZ, M. et al. Long-term outcome after intraoperative radiotherapy as a boost in breast cancer. **Strahlentherapie und Onkologie**, [Germany], v. 196, n. 4, p. 349-355, june 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00066-019-01525-7>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

PRIETO, P., PINEDA, M., AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, Orlando, v. 269, n. 2, p. 337-341, may 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>>. Acesso em: 11 dez. 2021.

QU, Y., SAFONOVA, O., DE LUCA, V. Completion of the canonical pathway for assembly of anticancer drugs vincristine/vinblastine in *Catharanthus roseus*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 257-266, sep. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/tpj.14111>>. Acesso em: 15 dez. 2021.

REGO, C. A. R. M. et al. Levantamento etnobotânico em comunidade tradicional do assentamento Pedra Suada, do município de Cachoeira Grande, Maranhão, Brasil. **Acta Agronômica**, [S.l.], 65, n. 3, p. 284-291, jul. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v65n3.50240>. Acesso em: 12 dez. 2021.

REN, Z. et al. Redox signaling by glutathione peroxidase 2 links vascular modulation to metabolic plasticity of breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [Washington, DC], v. 119, n. 8, p. e2107266119, feb. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.2107266119>>. Acesso em: 10 July 2022.

ROMERO, R., MARTINS, A. B. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 19- 24, mar. 2002. <<https://doi.org/10.1590/S0100-84042002000100004>>. Acesso em: 20 jan. 2022.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, Fortaleza, Ceará, v. 1, p. 1-4, jul 2007. Disponível em:

<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426953/1/Cot127.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2021.

SABOGAL-GUÁQUETA, A. M. et al. Linalool attenuates oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated by glutamate and NMDA toxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [France], v. 118, p. 109295, oct. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109295>>. Acesso em: 24 out. 2022.

SAMMAR, M. et al. Correlation between cytotoxicity in cancer cells and free radical-scavenging activity: In vitro evaluation of 57 medicinal and edible plant extracts. **Oncology Letters**, [Greece], v. 18, n. 6, p. 6563-6571, nov. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3892/ol.2019.11054>>. Acesso em: 10 out. 2022.

SHAD, M. et al. Optimization of extraction efficiency of tannins from *Cichorium intybus* L.: Application of response surface methodology. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, Nigeria, v. 6, p. 4467-4474, July 2012. Disponível em: <<https://10.5897/JMPR11.928>>. Acesso em: 08 dez. 2021.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 7, p. 363-383, June 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>. Acesso em: 23 out. 2022.

SILVA, T. M. et al. Morphoanatomical study of *Clidemia hirta* (L.) D. Don. **Research, Society and Development**, [Brazil], v. 10, n. 7, p. e1310716159, nov. 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16159>>. Acesso em: 10 set. 2022.

SILVA, T. M. S. et al. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, [San Diego], v. 19, n. 6-7, p. 507-511, Sep-Nov 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.12.011>>. Acesso em: 15 dez. 2021.

SINGH, Y. D., PANDA, M. K.; SATAPATHY, K. B. Ethnomedicine for drug discovery. In: Jayanta K. P., Amrithesh C. S., Gitishree D. **Advances in pharmaceutical biotechnology**. Singapore: Springer, 2020. p. 15-28. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-981-15-2195-9_2>. Acesso: 15 dez. 2021.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática. **Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 3ª. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 704p, 2008.

STAŠKO, A. et al. The potential pitfalls of using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. **Free Radical Research**, [England], v. 41, n. 4, p. 379-390, Mar. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10715760600930014>. Acesso em: 16 out. 2022.

TAÏBI, K. et al. Ethnopharmacological study of natural products used for traditional cancer therapy in Algeria. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [Saudi Arabia], v. 28, n. 11, p. 1451-1465, Nov. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.09.011>>. Acesso em: 10 out. 2022.

TANG, M. et al. DNA damage, DNA repair and carcinogenicity: Tobacco smoke versus electronic cigarette aerosol. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, [S.l.], v. 789, p. 108409, june 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108409>>. Acesso em: 23 out. 2022.

TEKIN, S.; SEVEN, E. Assessment of serum catalase, reduced glutathione, and superoxide dismutase activities and malondialdehyde levels in keratoconus patients. **Eye**, v. 36, n. 10, p. 2062-2066, aug. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41433-021-01753-1>>. Acesso em: 23 out. 2022.

TODOROVA, V. K. et al. Biomarkers of inflammation, hypercoagulability and endothelial injury predict early asymptomatic doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. **American Journal of Cancer Research**, [United States], v. 10, n. 9, p. 2933, sep. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7539772/pdf/ajcr0010-2933.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2022

TRUFFI, M.; SORRENTINO, L.; CORSI, F. Fibroblasts in the tumor microenvironment. **Tumor Microenvironment**, [Switzerland], p. 15-29, feb. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-37184-5_2>. Acesso em: 13 out. 2022.

VAIDYA, J. S. Principles of cancer treatment by radiotherapy. **Surgery (Oxford)**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 193-201, apr. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.02.002>>. Acesso em: 20 jan. 2022.

VALVERDE-MALAVAR, C. L. et al. Hydrolysable tannins and biological activities of *Meriania hernandoi* and *Meriania nobilis* (Melastomataceae). **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 746, feb. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules24040746>>. Acesso em: 13 out. 2022.

VELEZ, M. G. et al. Differential impact of tumor suppressor gene (TP53, PTEN, RB1) alterations and treatment outcomes in metastatic, hormone-sensitive prostate cancer. **Prostate cancer and prostatic diseases**, [England], v. 25, n. 3, p. 479-483, july 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41391-021-00430-4>>. Acesso em: 12 out. 2022

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Nova York: Springer, 2001.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M., SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry**. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1201/9781420046786>>. Acesso em: 05 dez. 2021.

XU, B. et al. Immunomodulatory and antineoplastic efficacy of common spices and their connection with phenolic antioxidants. **Bioactive Compounds in Health and Disease**, [United States], v. 3, n. 2, p. 15-31, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.31989/bchd.v3i2.687>>. Acesso em: 10 ago. 2022.

- YIN, Z. et al. Predicting the cytotoxicity of chemicals using ensemble learning methods and molecular fingerprints. **Journal of Applied Toxicology**, [New Jersey], v. 39, n. 10, p. 1366-1377, feb. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jat.3785>>. Acesso em: 15 jan. 2022.
- YU, M. et al. Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. **Scientific reports**, [England], v. 11, n. 1, p. 1-14, may 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89437-4>. Acesso em: 10 out. 2022.
- ZAIN, Z. W. M.; AZIMAN, N.; AANI, S. N. A. Phytochemical screening, Antioxidant activity, Total Phenolic Content and Total Flavonoid Content of Ethanol Extract of *Melastoma malabathricum*, *Clidemia hirta*, *Chromolaena odorata* and *Ageratum conyzoides*. In: **1st Postgraduate seminar on agriculture and forestry 2021 (psaf 2021)**, Malaysa, p. 47, oct. 2021..
- ZANG, X. et al. Prevention of paclitaxel-induced neuropathy by formulation approach. **Journal of Controlled Release**, [Netherlands], v. 303, p. 109-116, june 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.04.013>>. Acesso em: 19 ago. 2022.
- ZHANG, A. L. et al. Role of H3K18ac-regulated nucleotide excision repair-related genes in arsenic-induced DNA damage and repair of HaCaT cells. **Human & experimental toxicology**, [England], v. 39, n. 9, p. 1168-1177, feb. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0960327120903482>>. Acesso em: 23 out. 2022.
- ZHANG, J. et al. Small molecules regulating reactive oxygen species homeostasis for cancer therapy. **Medicinal Research Reviews**, [United States], v. 41, n. 1, p. 342-394, sep. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/med.21734>>. Acesso em: 24 out. 2022.
- ZHANG, Q. et al. Identification of six flavonoids as novel cellular antioxidants and their structure-activity relationship. **Oxidative medicine and cellular longevity**, [United States], v. 2020, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2020/4150897>>. Acesso em: 23 out. 2022.
- ZHARA, K. et al. A study of oxidative stress in cervical cancer-an institutional study. **Biochemistry and Biophysics Reports**, [Amsterdã], v. 25, p. 100881, mar. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100881>>. Acesso em: 10 july 2022.
- ZHOU, Y. et al. YAP promotes multi-drug resistance and inhibits autophagy-related cell death in hepatocellular carcinoma via the RAC1-ROS-mTOR pathway. **Cancer Cell International**, [S.I.], v. 19, n. 1, p. 1-15, july 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12935-019-0898-7>>. Acesso em: 25 out. 2022.
- ZIŃCZUK, J. et al. Pro-oxidant enzymes, redox balance and oxidative damage to proteins, lipids and DNA in colorectal cancer tissue. Is oxidative stress dependent on tumour budding and inflammatory infiltration?. **Cancers**, v. 12, n. 6, p. 1636, june 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/cancers12061636>>. Acesso em: 24 out. 2022.