



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

AÇÃO ANTITUMORAL *IN VITRO* E ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO
ACETATO DE ETILA OBTIDA DO EXTRATO DA SEMENTE DE *Euterpe*
oleracea Mart.

São Luís – MA
2021

GABRIEL XAVIER SILVA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTITUMORAL IN VITRO E ANTI-INFLAMAGÓRIA DA
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA OBTIDA DO EXTRATO DA SEMENTE DE *Euterpe
oleracea Mart.***

Defesa de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia no polo da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de DOUTOR em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

Coorientador: Dr. Fernando Almeida de Souza

São Luís – MA

2021

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

XAVIER SILVA, GABRIEL.

AÇÃO ANTITUMORAL IN VITRO E ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO
ACETATO DE ETILA OBTIDA DO EXTRATO DA SEMENTE DE *Euterpe*
oleracea Mart / GABRIEL XAVIER SILVA. - 2021.
61 f.

Coorientador(a): Fernando Almeida de Souza.

Orientador(a): Maria do Desterro Soares Brandão
Nascimento.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia - Renorbio/ccbs, Universidade Federal do
Maranhão, São Luís, 2021.

1. Adenocarcinoma. 2. Antineoplásico. 3. Catequinas.
4. Mama. 5. Polifenóis. I. Almeida de Souza, Fernando.
II. Soares Brandão Nascimento, Maria do Desterro. III.
Título.



Universidade Federal do Maranhão
Av. dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, São Luís - MA, 65080-805 Telefone: (98)
3272-8000 E-mail: renorbio@ufma.br
Homepage: <http://www.renorbio.org.br>

FOLHA DE APROVAÇÃO DE DEFESA DE TESE

ALUNO: Gabriel Xavier Silva

TÍTULO DO PROJETO: Ação antitumoral in vitro e anti-inflamatória da fração acetato de etila obtida do extrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart.

PROFESSORA ORIENTADORA: Maria do Desterro Soares Brandão do Nascimento
COORIENTADOR: Fernando Almeida de Souza

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof ^ª . Dr ^ª . Maria do Desterro S. B. do Nascimento – UFMA (Presidente)	satisfatório	
Prof ^ª . Dr ^ª . Kátia da Silva Calabrese – IOC/FIOCRUZ (Titular)	Satisfatório	
Prof ^ª . Dr ^ª Maria do Socorro de Sousa Cartágenes – UFM (Titular)	satisfatório_	
Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade – UFMA (Titular)	satisfatório	
Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira – UFMA (Titular)	satisfatório	

DATA DA APROVAÇÃO: 22 de janeiro de 2021
HORÁRIO: 15 h

“Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém.”

Romanos 11:36

AGRADECIMENTOS

À orientadora e amiga, Prof^a Dr^a Maria do Desterro Soares Brandão do Nascimento pela competência, exemplo de humanidade e design e acompanhamento da pesquisa.

Ao Professor Dr Fernando Almeida de Souza, meu coorientador, pela orientação segura, dedicação e sobretudo respeito e ajuda durante toda a execução do projeto até a defesa da tese;

À Amanda Mara Teles, por acompanhar a minha trajetória durante todo o doutoramento, por ser mão amiga nos momentos mais difíceis.

A Dra Kátia da Silva Calabrese por permitir que os experimentos no Laboratório de Imunomodulação e Parasitologia;

A todos que direta e indiretamente contribuíram na execução deste trabalho

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos aportados na Pós Graduação, via Proap, que permitiu a mobilidade para realização dos experimentos.

À FAPEMA pelo financiamento do projeto de pesquisa, tornando possível a produção desta e pela concessão de bolsa de doutorado.

RESUMO

Os produtos naturais representam um campo de fonte de moléculas com propriedades farmacológicas para tratar inúmeras doenças, inclusive, o câncer. Dentre as espécies de plantas com potencial terapêutico, o açai (*Euterpe oleracea* Mart) se destaca pelos seus potenciais anti-inflamatório e antitumoral. A fração acetato de etila da semente do açai tem atividade citotóxica em células neoplásicas de mama. Para tanto, faz-se necessário a identificação dos compostos ativos e seus respectivos mecanismos de ação. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação antitumoral *in vitro* e a ação anti-inflamatória *in vivo* da fração acetato de etila obtidas da semente de *E. oleracea* Mart. Realizou-se a partição hidroalcoólica do liofilizado e subsequente fracionamento e obtenção da fração acetato de etila. A fração foi submetida à partição por polaridade em coluna de Sephadex. A fração e as subfrações foram submetidas às análises de massas e cromatografia líquida de alta eficiência. No teste *in vitro* utilizou-se duas linhagens celulares uma sensível a estrógeno: MCF7 (adenocarcinoma mamário), e outra não sensível ao estrógeno, a MDA-MB-231 (carcinoma mamário) e a de glândula mamária hígida, a MCF 10A. Ensaio de viabilidade celular foi realizado com sulforrodamina B e MTT, para determinação da concentração citotóxica para 50% das células e dos índices de seletividade. Para a determinação do mecanismo de morte celular, foi utilizado a citometria de fluxo com a Anexina V e Iodeto de propideo. Para avaliar a atividade anti-inflamatória foram utilizadas células RAW 264.7 e o modelo de edema de pata de camundongo induzido por λ -carragenina *in vivo*. A análise fitoquímica mostrou que a fração é rica em catequina, epicatequina e a pelargodina. Quanto à análise da citotoxicidade, observou-se que o extrato bruto apresentou melhor efeito citotóxico em células MDA-MB-231 do que as frações. Enquanto em células da linhagem MCF7, a fração acetato de etila teve melhor efeito quando comparada com as subfrações. O mecanismo de indução de morte celular em ambas as linhagens estudadas foi a apoptose. Além do mais, nosso estudo foi o primeiro a demonstrar um alto índice de seletividade para células MCF7 em comparação às células normais. A fração acetato de etila demonstrou efeito inibitório na produção de citocinas *in vitro* em células RAW 264.7 estimuladas com LPS e no edema de pata *in vivo*. Assim, podemos concluir que a fração acetato obtida do extrato de semente de *E. oleracea* apresentou potencial antitumoral e anti-inflamatório.

Palavras-chave: Câncer, antineoplásico, mama, adenocarcinoma, polifenóis, catequinas, flavonoides, inflamação

ABSTRACT

Natural products are a field for molecules with pharmacological properties to treat several diseases, including cancer. Among the plant species with phytochemical potential, açai (*Euterpe oleracea Mart*) stands out for its antioxidant and antitumor potentials. The ethyl acetate fraction of the acai kernel has shown a promising cytotoxic activity in breast cancer cells. Therefore, it is necessary to identify the active compounds and their respective mechanisms of action. This work aimed to evaluate the *in vitro* antitumor action and the *in vivo* anti-inflammatory action of the ethyl acetate fraction obtained from the seed of *E. oleracea Mart*. The hydroalcoholic partition of the lyophilisate was performed and subsequent fractionation and ethyl acetate fraction was obtained. The fraction was submitted to Sephadex column polarity for partition. The fraction and subfractions were subjected to mass analysis and high performance liquid chromatography. The fraction and subfractions were subjected to mass analysis and high performance liquid chromatography. For *in vitro* test, two cell lines were used, one sensitive to estrogen: MCF7 (mammary adenocarcinoma), and the other non-sensitive to estrogen, MDA-MB-231 (mammary carcinoma) and the healthy mammary gland, MCF 10A. Cell viability assay was performed with sulforhodamine B to determine the CC₅₀ and selectivity indices. The determination of the mechanism of cell death was performed using flow cytometry with Annexin V and propidium iodide. blot. It was observed that the material studied is rich catechin, epicatechin and pelargonidine. The crude extract has better cytotoxic effect than the fractions in the MDA-MB-231 lineage, and the ethyl acetate fraction effect than the MCF-7 lineage subfractions. The mechanism of cell death induction in both strains studied was apoptosis. Furthermore, our study was the first to demonstrate a high selectivity rate for MCF-7 cells compared to normal cells.

Keywords: Cancer, antineoplastic, breast, adenocarcinoma, *Euterpe oleracea*, polyphenols, catechins, flavanoids, inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT - Catequina
CC₅₀ – Citotoxicidade em 50% das células
CCD – Cromatografia em Camada Delgada
CE - Energia de colisão
CES - Spread de energia de colisão
COMT - Catecol O-Metiltransferase
COX - Ciclo Oxigenases
DAD - Detector de Matriz de Adiodo
EGCG - Epigallocatequina-Galato
DMEM - Meio Dulbecco's Modificado
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
DP - Potencial de desclassificação
EB – Extrato Bruto
ECA - Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA - Etilenodiamino Tetra-Acético
EGCG - Epigallocatequina-galato
EGF - Fator de Crescimento Epidermal
ELISA - Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay
EMS – Espectrometria de Massa Aprimorada
EP - Potencial de entrada
EPI – Analise aprimorada de íons de produtos
ESI-MS - Espectrometria de Massas com Ionização Eletrospray
EUA – Estados Unidos da America
GRO/KC - Citocina do Rato Análoga a Interleucina-8 humana
HER2 - Fator de crescimento epidérmico humano Receptor tipo 2
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IFN γ - Interferon gamma
IL-8 - Interleucina-8
INCA - Instituto Nacional do Câncer
MeEGCG - O-Metila-Epigallocatequina-galato

MS – Espectrometria de Massas

NMBA - N-nitrosometilbenzilamina

ORAC - Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio

RNA - Ácido Ribonucleico

RNS - Espécies reativas de nitrogênio

ROS - Espécies reativas de oxigenio

SE - Soro Equino

SFB - Soro Fetal Bovino

SOD - Superóxido Dismutase

TOL - Tolcapona

TOSC - Capacidade total de eliminação de oxidantes

TRIS - Fosfato Trissódico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 <i>Euterpe oleracea</i>	12
2.2 Carcinogênese e os produtos naturais	12
2.3 Câncer de mama e os flavonoides.....	15
.....	
Capítulo 1: artigo: Inhibitory Effect of Catechin-Rich Açai Seed Extract on LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells and Carrageenan-Induced Paw Edema..	24
Capítulo 2: Depósito de patente	48
CONCLUSÃO.....	53
REFERENCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas são popularmente conhecidas como câncer, uma doença cuja incidência aumenta anualmente, mesmo com o avanço no rastreamento, prevenção e tratamento. O câncer em todo mundo é a segunda principal causa de morte, sendo responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes e dentre as neoplasias malignas, o tumor de mama é a principal causa de mortes em mulheres (WHO, 2021).

Embora o câncer continue como um problema de saúde pública em todo o mundo, houve evolução no tratamento de vários tipos de câncer nos últimos anos. Parte da eficácia do tratamento se deve ao conhecimento dos mecanismos moleculares e da biologia do tumor, o que permitiu respostas clínicas satisfatórias e, conseqüentemente, o aumento da sobrevida do paciente. Para Zugazagoitia et al. (2016) devido às alterações moleculares e as diferentes vias de sinalização do tumor, não existe uma única droga (magic bullet), que seja capaz de levar a cura, por isso, são necessárias combinações de drogas que atuem concomitantemente contra diferentes alvos. Além do tratamento adequado, a prevenção de novos casos, o aumento da sobrevida e melhora na qualidade de vida das pessoas com câncer são uns dos novos desafios da pesquisa atualmente

Os quimioterápicos constituem uma das mais relevantes modalidades terapêuticas empregadas na clínica oncológica. No entanto, por ser um tipo de tratamento sistêmico, as drogas não são seletivas contra as células neoplásicas e agredem também células normais, especialmente aquelas com grande capacidade de renovação, como as da medula óssea, pele e mucosa gastrointestinal, o que induz a vários efeitos colaterais, tais como :alopecia, náuseas, diarreias e mielossupressão são frequentes observados em paciente submetidos a essa modalidade de tratamento. Porém, o nível de toxicidade e seletividade varia entre os fármacos antineoplásicos (INCA,2018).

As características biológicas das neoplasias e os efeitos colaterais dos quimioterápicos induzem a busca constante de novos grupos de fármacos que possam ser utilizados como antineoplásicos. Diante da importância dos quimioterápicos na terapêutica oncológica, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas utilizando os recursos naturais com o intuito de obter novas moléculas com as mais variadas propriedades farmacológicas, entre elas antineoplásica e anti-inflamatória.

Os produtos naturais, principalmente as plantas, configuram como uma boa fonte de novas substâncias com propriedades farmacológicas diversas. Dentre as espécies de plantas com potencial de obtenção de substâncias bioativas encontramos na literatura açai (*Euterpe*

oleracea Mart) do qual tem se identificado substâncias com atividades antioxidantes, anti-inflamatória, hipocolesterolêmica e antineoplásica (Stoner 2009; Johnson et al. , 2012). Em uma pesquisa realizada com voluntários saudáveis foi observado que malvidina e a cianidina presentes na polpa de açaí induziram o aumento significativo da capacidade antioxidante do plasma (Petruk et al. 2017).

Em camundongos foi demonstrado que a ingestão de açaí reduziu a incidência de adenoma e adenocarcinoma de colón experimentalmente induzido por azoximetano/sulfato de dextrano sódico (Choi et al., 2017). Os compostos polifenólicos, glicósidos e de aglicona presentes no açaí induziram apoptose em células HL-60 de leucemia (Del Pozo-Insfran et al., 2006). Outro experimento mostrou que o extrato hidroalcoólico liofilizado do endocarpo de açaí, rico em polifenóis, levou a autofagia em células malignas de adenocarcinomas. (Silva et al. 2014). Sabe-se que as antocianinas e catequinas extraídos dos frutos possuem relevante atividade antioxidante e antitumoral (Rafieian-Kopaei, 2017; Chen et al. 2018).

A literatura aponta, que tanto a polpa quanto o extrato obtido da fruta possuem atividade anti-inflamatória. Camundongos C57BL6 expostos à fumaça de cigarro e tratados com extrato hidroalcoólico da fruta apresentaram menor número de neutrófilos e macrófagos no pulmão quando comparados ao grupo controle, o que demonstra a atividade anti-inflamatória do extrato (Moura et al., 2012). O extrato hidroalcoólico seco e congelado da polpa da fruta interferiu na ativação e proliferação de macrófagos promovendo a parada do ciclo celular devido a redução da ativação de NLRP3 (Machado et al. 2019).

Para avaliar a ação do suco gástrico sobre as propriedades anti-inflamatória foi realizado um experimento usando o extrato de semente de açaí digerido ou não digerido os resultados mostram que houve redução da ativação de NF- κ B e níveis de TNF- α , confirmando que a atividade anti-inflamatória do extrato não é alterada após a ingestão, o que sugere que as sementes de açaí podem usadas para a obtenção de e compostos bioativos para diversos fins (Melo et al., 2020).

Por muitos anos o consumo do açaí ficou restrito a região amazônica, entretanto, passou a ser largamente consumido em todo o país por ser considerado um alimento funcional e com propriedades antioxidantes. De acordo com o IBGE, em 2018 foram consumidos no Brasil 1.8 toneladas de açaí para obtenção de polpa. Considerando que é um alimento amplamente utilizado por muitos brasileiros e, principalmente pelos resultados das pesquisas que mostram que algumas substâncias presentes no açaí tem ação antineoplásica e antioxidantes desenvolvemos um estudo para avaliar a ação antitumoral in vitro em células de tumor de mama

e a atividade anti-inflamatória in vivo e in vitro da fração acetato de etila obtida da semente de *E. oleracea* Mart.

A pesquisa teve como objetivos avaliar a ação antitumoral in vitro e anti-inflamatória in vivo da fração de acetato de etila obtida da semente de *Euterpe oleracea* Mart; realizar a identificação taxonômica e obtenção das sementes de *E. oleracea*, Mart.; caracterizar quimicamente os compostos majoritários das frações obtidas; avaliar a viabilidade celular in vitro em células das linhagens MCF7, MDA-MB- 231 e MCF 10A tratadas com as frações obtidas; determinar o índice de seletividade para células tumorais do material vegetal obtido, ; avaliar as alterações ultra estruturais em células de linhagem tumorais tratadas com o material vegetal; determinar os possíveis mecanismos de morte celular de células tratadas com o material vegetal via citometria de fluxo; avaliar a ação da fração acetato de *E. oleracea* na produção de citocinas em células RAW 264.7 estimuladas por LPS; avaliar o efeito da fração acetato de *E. oleracea* no tratamento do edema de pata de camundongos induzido por λ -carragenina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Euterpe oleracea Mart.,

É uma espécie de palmeira nativa da Amazônia popularmente conhecida como açazeiro e é encontrada principalmente estados do Amapá, Pará, Maranhão, Tocantins e Mato Grosso. Também é encontrado na Guiana, Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia e no Suriname (Calzavara, 1972). De acordo com o SEBRAE (2021), a exploração do açaí é importante para a sustentação econômica das populações ribeirinhas do Pará e Amapá, mas também contribui para a economia do Maranhão, Acre e Rondônia.

E. oleracea pertence à família *Arecaceae* que, engloba aproximadamente 200 gêneros e cerca de 2.600 espécies, com distribuição tropical e subtropical (Jones, 1995; Lorenzi et al., 1996). Na Amazônia, a família está representada por 39 gêneros e um número de espécies estimado entre 150 a 180, dentre elas, *Euterpe oleracea*, *Euterpe edulis* e *Euterpe precatoria* são as de maior importância na produção de palmito e frutos (Kahn, 1997).

O fruto do açazeiro, é globoso, tem 1 a 2 cm de diâmetro, peso médio de 1,2 g, epicarpo roxo ou verde na maturação; o mesocarpo, com cerca de 1 mm de espessura, é fibroso envolvendo o endocarpo, volumoso e duro, com forma similar à do fruto, contendo uma semente, com embrião diminuto e endosperma ruminado e abundante (Henderson;;Galeano, 1996).

A semente do açaí preenche a maior parte do fruto, representando 73 % da sua massa. A semente é a estrutura de propagação sexuada e inclui o endocarpo e o mesocarpo, apresenta forma globosa, coloração marrom escuro e diâmetro médio de 11,5 mm. Apresenta uma depressão, a rafe, onde em uma de suas extremidades localiza-se o poro germinativo e, na outra, o hilo. Feixes de fibras partem da região do hilo, formando um tufo de tecido fibroso sobre o poro germinativo, que é facilmente observado quando a polpa é retirada (Aguiar; Mendonça, 2003; Martins et al., 2009).

A inflamação e o desenvolvimento tumoral

Virchow em 1867 propôs a hipótese de que o câncer teria origem em locais de inflamação, sendo assim aventado pela primeira vez a relação entre inflamação e o câncer. Para ele a inflamação favorece a proliferação celular, aumentando as possibilidades de desenvolvimento de tumores (Figueiredo, 2019). Atualmente sabe-se que as células dos processos inflamatórios e seus mediadores químicos são componentes essenciais para o microambiente dos tumores. (Balkwill; Mantovani, 2012).

As células inflamatórias, assim como moléculas do estroma tumoral, atuam na progressão do tumor pois criam um microambiente que acaba sendo favorecido pelas mesmas citocinas que são protagonistas da inflamação crônica associada ao câncer de fígado, estômago e cólon. Nesta perspectiva a inflamação pode ser uma condição que favorece o desenvolvimento de um tumor e promove a progressão de neoplasias incipientes em tumores malignos completos (Cao et al., 2011).

Mantovani et al., (2008) demonstraram que existe uma relação entre câncer e inflamação orquestrada tanto por células inflamatórias quanto mediadores inflamatórios (quimiocinas, citocinas e prostaglandinas) presentes nos tecidos neoplásicos, as quais atuam na remodelação tecidual e angiogênese, semelhante à encontrada em respostas inflamatórias crônicas, e reparação.

A inflamação latente no microambiente tumoral favorece proliferação e sobrevivência de células neoplásicas, angiogênese, metástase e interfere na imunidade adaptativa, na resposta a hormônios e agentes quimioterápicos, As citocinas ativam os mesmos fatores-chave de transcrição em células inflamatórias, células do estroma e células tumorais, resultando na produção de mais mediadores inflamatórios e na geração de um microambiente inflamatório relacionado ao câncer. (Mantovani, 2010).

Em um artigo de revisão Mantovani et al., (2008) descrevem que as vias se convergem, fazendo com as células tumorais ativem o fator nuclear kB (NF-kB), o sinal transdutor e ativador de transcrição 3 (STAT-3) e o fator induzido por hipóxia (HIF-1 α), que são fatores de transcrição que medeiam a produção de citocinas IL-6, IL-8, TNF- α (pró-inflamatórias), quimiocinas, ciclooxigenase 2 (COX2) com consequente produção de prostaglandinas. As células inflamatórias e as células tumorais mantêm a produção dos mediadores químicos o que favorece o desenvolvimento de um microambiente inflamatório propício para o desenvolvimento da célula neoplásica. O óxido nítrico (NO) pode modular vários eventos relacionados ao câncer, tais como: angiogênese, ciclo celular, apoptose, invasão e metástase (Chen et al., 2014), O NO regula a produção de VEGF, que por sua vez, estimula a neoformação vascular, o que pode contribuir para a disseminação das células neoplásicas.

De acordo com Murata (2018) durante o processo inflamatório crônico há alterações epigenéticas causados pelos danos ao DNA mediado por espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ROS/RNS), o que pode ser um importante fator da carcinogênese relacionada à inflamação.

No microambiente inflamatório ocorrem danos não só no DNA, mas, também em proteínas e lipídios. Os fatores que geram a inflamação funcionam como um ímã para as células inflamatórias, que por sua vez, induzido a problemas respiratórios e a produção de citocinas inflamatórias, em que NADH oxidase e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em células inflamatórias e células epiteliais geram superóxido e óxido nítrico (NO) que reagem entre si formando peroxinitrito (ONOO-) altamente reativo, originando o 8-oxodG e 8-nitroguanina (Dechakhamphu et al., 2008). Os peróxidos gerados após a retirada de oxigênio reagem com o ferro, produzindo um radical que por ser altamente reativo pode atacar o DNA, proteínas e lipídios. Thanan et al., (2014) relatam que esses danos causados pela inflamação influenciam negativamente o prognóstico de câncer. Após a exposição a ROS/RNS ou a citocinas pró-inflamatórias alteram a transcrição da proteína DNA metiltransferase1 (DNMT1), que induz aumento do DNA de genes supressores de tumor e microRNAs.

Apte e Voronov, (2002) descrevem que o papel o da interleucina 1 β (IL-1 β) na indução tumoral quando em baixas concentrações induzem uma resposta inflamatória local e é responsável pela a ativação de resposta imunológica protetora, porém em elevadas concentrações contribuem na tumorigênese.

A interleucina 6 (IL-6) também promove progressão tumoral, conforme demonstrado por Chung e Chang, (2003) que constataram níveis séricos elevados de IL-6 em pacientes com

câncer, o que também foi observado em biópsias tumorais (Kai et al., 2005). As interleucinas IL-7 IL-17 foram associadas ao desenvolvimento do câncer e estão relacionadas com a ação desempenhada pelas células T auxiliares no desenvolvimento tumoral.

Enquanto o receptor de quimiocinas CXCR4, é sobre-expresso em células malignas e em diferentes tipos de tumores (câncer colorretal, câncer da mama, fígado e esôfago) em que sua expressão em câncer sólidos primários está diretamente relacionada à frequência de metastização linfática (Salvucci et al., 2006). O fator de transcrição nuclear (NF- κ B) que é responsável pela imunidade inata e inflamação, aparece como o principal promotor endógeno de carcinogênese, pois acaba atuando tanto em células malignas quanto em células inflamatórias. Quando em contato com células tumorais e epiteliais expostas a carcinogênicos, o fator NF- κ B promove a sobrevivência e a proliferação celular através da ativação de genes que codificam proteínas importantes do ciclo celular e da via anti-apoptótica, a invasão, metástase e angiogênese (Karin et al., 2006)

Carcinogênese e os produtos naturais

A carcinogênese é um processo complexo, que ocorre em uma sequência de eventos dependentes de fenômenos genéticos e epigenéticos, que culminam com alterações moleculares e celulares distintas (Brasileiro Filho, 2018; Sonnenschein; Soto, 2016). É um processo irreversível, que envolve uma cadeia de eventos extracelulares e intracelulares (Spada et al, 2008).

A genética celular e molecular da carcinogênese é utilizada para a identificação de oncogenes, genes supressores de tumor, genes específicos que codificam enzimas metabolizadoras de carcinógenos, enzimas e proteínas de reparo do DNA, reguladores do ciclo celular e apoptose. Também permitiram identificar fatores que medeiam a invasão tumoral, metástases e angiogênese. Embora, não esteja bem esclarecido quais os salvos moleculares e celulares dos compostos fitoquímicos quimiopreventivos (Surh, 2003). Há diversos compostos e produtos naturais capazes de interferir na produção e/ou ativação dos principais fatores de transcrição, quimiocinas e citocinas do processo inflamatório e das células neoplásicas ou outro tipo celular presente no microambiente (Atherino, 2020).

As substâncias quimiopreventivas foram classificadas por Wattenberg,(1985) em duas categorias principais: bloqueadores e supressores.

As substâncias bloqueadoras impedem que os agentes neoplásicos atinjam os locais alvos e sofram uma ativação metabólica ou mesmo interajam subsequentemente o DNA, RNA

e proteínas. Por outro lado, as substâncias supressoras inibem a transformação maligna das células iniciadas, quer na fase de promoção quer na fase de progressão. Os fitoquímicos quimio preventivos podem bloquear ou reverter à fase pré-maligna da carcinogênese em múltiplos estágios. Eles também podem parar ou pelo menos retardar o desenvolvimento e progressão de células pré neoplásicas em malignas (Surh et al, 2003).

O consumo de frutas e vegetais está associado à redução ao risco de muitas doenças, incluindo câncer, aterosclerose e doenças neurovegetativas, que estão relacionados com níveis elevados de estresse oxidativo (Surh et al, 2003; Spada et al, 2008).

O pó liofilizado da polpa de açaí demonstrou ser um poderoso antioxidante contra o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), no ensaio superóxido dismutase (SOD) de eliminação e também excelente contra o radical peroxila ($RO_2^{\cdot-}$) e de capacidade de absorção grande aos radicais oxigenados (ensaio da capacidade de absorção do radical oxigênio - ORAC) comparado a outras frutas e vegetais e leve em relação aos radicais peroxinitrito ($ONOO^-$) e hidroxila (OH^-), por testes ORACFL (capacidade de absorbância de fluoresceína do radical oxigênio). Além disso, o pó liofilizado de açaí mostrou ser um potente inibidor das ciclo-oxigenases: COX-1 e da COX-2. Estes achados podem ter um valor significativo no papel antioxidante que influencia diretamente a ação antineoplásica da *E. oleracea* (Schauss et al, 2006).

Lichtenthaler et al (2005) também verificaram a capacidades antioxidantes do fruto açaí roxo pelo ensaio capacidade scavenging oxidante total (TOSC) obtendo resultados excelentes contra os radicais peroxila, bons contra o peroxinitrito, e pobres contra os radicais hidroxila comparados aos valores obtidos com sucos de frutas e vegetais europeus.

Alguns compostos podem ter ação semelhante às enzimas, uma vez que são capazes de neutralizar espécies reativas, como ânion superóxido e hidrogênio peróxido (Spada et al, 2008). Também foi relatado que lignanas e outros constituintes do açaí possuem atividades antioxidantes e cito protetoras in vitro (Stoner, 2009). Polifenóis do açaí também induzem a apoptose em células leucêmicas humanas HL 60 (Del Pozo-Insfran et al, 2006; Stoner et al, 2009). A propriedade mais descrita da maioria dos polifenóis é a capacidade de atuar como antioxidantes capazes de sequestrar radicais livres e espécies reativas de oxigênio.

Stoner (2009) fez estudo comparativo das frutas morango, mirtilo, framboesa vermelha e framboesa preta, noni, goji e o açaí, e observaram a atividade destas plantas em inibir tumores, induzidos por n-nitrosometilbenzilamina (NMBA), em células de esôfago de ratos. Concluíram que todas as frutas foram efetivas na redução da incidência e multiplicação dos tumores, porém não tiveram efeito significativo no tamanho do tumor. Todas as frutas de forma semelhante

reduziram os níveis séricos de interleucina 5 (IL-5) e de GRO/KC (citocina do rato análoga a interleucina-8 humana (IL-8) quando comparados com o grupo controle. Também foram observados aumento da expressão de IL 5 no adenocarcinoma pulmonar de camundongo induzido por N-nitroso-bis-(2-hidroxiopropil)-amina que receberam dieta á base dessas frutas (Stoner et al., 2010).

Além disso foi observado o consumo de framboesas pretas e com 5% de açaí aumentaram significativamente o nível de interferon gama (IFN γ) no soro comparado com resultados das dietas com as outras frutas. As dietas com framboesa preta e com o açaí exibiram significativos níveis séricos de IFN- γ e ativaram macrófagos liberadores de IFN- γ induzindo apoptose através da via Fas/FasL em células de glioma (Spada et al, 2008). Os elagitaninos e as antocianinas dos frutos têm sido demonstrados, em múltiplos estudos, que produzem efeitos quimo preventivos in vitro e in vivo (Stoner et al, 2009).

Os radicais livres são continuamente formados como subprodutos do metabolismo aeróbio no corpo humano. Eles são geralmente espécies reativas de oxigênio (EROS ou ROS) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN ou RNS). O mais comum ROS e RNS in vivo são os superóxidos (O₂⁻), radical hidroxila (OH²⁻), radical peroxila (RO₂⁻), óxido nítrico (-NO) e peroxinitrito (ONOO). Estes ROS foram associados a muitas doenças degenerativas incluindo doenças vasculares, diabetes, câncer e do envelhecimento em geral. Frutas com altos teores de antioxidantes inibem a carcinogênese esofágica induzida por NMBA através da regulação da expressão das citocinas (Del Pozo-Insfran et al, 2006).

Câncer de mama e os flavonoides

A glândula mamária é um órgão dinâmico, que sofre profundas modificações no epitélio ao longo da vida reprodutiva da mulher. Histologicamente é composto por uma rede de ductos sustentada por um estroma composto por células adiposas, fibroblastos e células de defesa. Essas constantes modificações no tecido epitelial podem contribuir para o desenvolvimento de alterações patológicas (Fu et al. 2019).

Dentre todos as neoplasias malignas, o câncer da glândula mamária é o mais comum entre as mulheres, com uma estimativa de 2.100.000 casos novos segundo a Organização Mundial da Saúde (2019). Apesar de termos evoluídos como um melhor diagnostico e um tratamento mais eficiente, a taxa de mortalidade ainda é alta, sendo a segunda causa de morte por câncer em mulheres nos Estados Unidos (Kushi et al. 2012; Avtanski; Poretsky, 2018,).

O tratamento para pacientes com câncer é instituído a partir de uma avaliação clínica detalhada que identifica o tipo e a frequência deste. Os tratamentos mais utilizados são cirurgia, quimioterapia e radioterapia, isoladamente ou em combinação. No entanto, o tratamento pode desencadear uma série de efeitos colaterais que, juntamente com os efeitos deletérios causados pelo próprio câncer, podem diminuir a qualidade de vida do paciente. Os produtos naturais são um recurso alternativo amplamente aceito por causa da diversidade em relação à estrutura e ao mecanismo biológico de ação, sendo seus compostos amplamente utilizados na terapia do câncer (WHO, 2012; American Cancer Society 2018; Bray et al.2018).

A atividade das catequinas na prevenção do câncer foi estudada em uma variedade de modelos animais. Diferentes linhagens celulares também foram realizadas na tentativa de elucidar os mecanismos das ações das catequinas sobre as células neoplásicas (Yang et al. 2011; Yang & Wang 2011).

A ação antioxidante das catequinas está bem estabelecida em modelo *in vitro* (Hong et al. 2010). Entretanto, no modelo *in vivo* só pode ser observada em animais que estão sob estresse oxidativo; por exemplo, em ratos velhos (mas não em ratos jovens) (Shim et al. 2010) e em fumantes (M. Li et al. 2007). Em modelos animais para carcinogênese, ROS são induzidas pelo tratamento com agentes cancerígenos, e foi demonstrado que catequinas reduzem a formação de 8-hidroxi-desoxiguanosina (8-oxo-dG), um marcador bem estabelecido para danos oxidativos no DNA que podem induzir em erro a indução mutações (Rathore et al. 2012). Como as ROS endogenamente formadas são importantes na promoção da carcinogênese, as catequinas podem ter papéis importantes na extinção dessas espécies em diferentes estágios da carcinogênese. Em estudos em humanos, foi demonstrado que a administração de catequinas a fumantes por 4 semanas reduz significativamente o número de células positivas para 8-oxo-dG (Li et al. 2007). Tais ações antioxidantes de chás ricos em catequinas podem diminuir o risco de carcinogênese.

As catequinas reduzem as espécies reativas de oxigênio, como radical superóxido, íon oxigênio, radical hidroxila, radical peroxila, óxido nítrico, dióxido de nitrogênio e peroxinitrito (Sang et al. 2011).

Os flavonoides são fortes quelantes de íons metálicos, de modo que a quelação de íons livres impede a oxidação de catequinas e a formação de ROS. As estruturas di-hidroxi ou tri-hidroxi vicinais não apenas contribuem para a atividade antioxidante das catequinas, como também aumentam sua suscetibilidade à oxidação do ar sob pH alcalino ou neutro, principalmente na presença de vestígios de íons cuproso ou férrico. A auto oxidação pode gerar

ânion superóxido e peróxido de hidrogênio e leva à formação de dímeros de catequina (como as teasinensinas) que são instáveis (Hong et al. 2002; Hou et al. 2003).

Acredita-se que isso ocorra devido às reações em cadeia mediadas por ânion superóxido fora das células, porque as catequinas podem ser estabilizadas pela adição de superóxido dismutase (SOD) (Hou et al. 2003). Essa auto oxidação ocorre em condições de cultura de células, e os ROS gerados pela catequina podem induzir muitas alterações celulares e causar morte celular (Yang ; Wang 2011).

Há estudos *in vitro* e *in vivo* que mostram a associação entre o consumo de chá verde e a diminuição do risco de câncer de mama. Nesse tipo de chá foram identificados mais de dez compostos de catequina, como por exemplo, o EGCG que é o mais abundante e possui efeitos supressores mais ativos no câncer de mama (Xiang et al. 2016).

Apesar de haver forte evidência de que as formulações ricas em catequinas têm papel protetor contra o câncer em modelos animais (Yang et al. 2011; Yang ;Wang 2011), em humanos estudos epidemiológicos não ratificaram esses efeitos preventivos. Os dados experimentais não puderam ser extrapolados para os humanos por causas de inúmeras variáveis tais como fatores de estilo de vida, diferenças genéticas e outros fatores interferentes que reduzem o poder de detectar um efeito preventivo do câncer.

Os dados existentes na literatura acerca das catequinas na prevenção de câncer de mama são controversos por diversos fatores. Primeiro, os efeitos supressores do chá rico em catequinas no câncer de mama diferem entre os vários tipos de chá. As pesquisas mostram que redução no risco de câncer de mama estava geralmente associada ao consumo de chá verde, em vez do consumo de chá preto. Os principais componentes bioativos do chá são as catequinas. O chá preto possui cerca de 80% das catequinas que são oxidadas e convertidas em pigmentos de chá laranja e vermelho (teaflavinas e tearubigina) durante a oxidação. Isso pode explicar por que o consumo de chá preto não foi associado à diminuição do risco de câncer de mama (Yang; Wang, 2011).

Segundo, há resultados contraditórios em diferentes populações investigadas. Um risco aumentado de câncer de mama na população de mulheres na pós- menopausa. A relação entre o chá verde, que é rico em catequinas, e o risco de câncer de mama diferiu entre as populações e entre as mulheres na pós-menopausa (Li et al. 2016). Pesquisas realizadas com homens e mulheres deram resultados diferentes. Beber chá mostrou uma forte associação com maior risco de câncer de mama em homens, mas nenhuma associação com o desenvolvimento de câncer de mama em mulheres (Rosenblatt et al. 1999).

Houve uma associação significativa entre a frequência de ingestão de chá verde e a diminuição do risco de câncer de mama entre mulheres com genótipo de enzima conversora de angiotensina (ECA) de alta atividade. No entanto, não foi observada associação entre a frequência de ingestão de chá verde e o risco de câncer de mama entre mulheres com atividade de genótipo de baixa ECA (Yuan et al. 2005). Esses resultados controversos podem ser devido às diferenças no status fisiológico entre várias populações, que deram respostas diferentes às catequinas.

Por último, estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram resultados contraditórios devido à baixa biodisponibilidade e biotransformação de catequinas. Quando uma espécie de catequina foi incubada com microsomas de fígado de rato a 1-100 μM por 30 min *in vitro*, ela se ligou seletivamente ao catecol-o-metil transferase (COMT) (Samavat et al. 2016). No entanto, testes *in vivo* mostraram que a suplementação com uma dose alta de catequina não prejudica a atividade de COMT (Yuan et al, 2011).

Enquanto Samavat et al. (2019) ao realizarem teste de biodisponibilidade usando catequina em camundongos revelaram uma ampla distribuição de radioatividade nos órgãos-alvo, incluindo sistema digestório, fígado, pulmão, pâncreas, glândula mamária, cérebro, rim, útero e ovário. Por outro lado, a radioatividade no sangue foi baixa, sendo cerca de 2% da radioatividade total administrada 6 horas após a administração, e o status foi mantido por 24 horas e 37,1% da radioatividade total administrada foi excretada nas fezes e 6,6% na urina nesse mesmo período.

A modificação química das catequinas que ocorrem no trato digestivo pode levar à sua baixa biodisponibilidade. Sob condições fisiológicas, o COMT pode metabolizar as catequinas resultando em uma redução da biodisponibilidade oral assim como reduzindo possíveis atividades biológicas. Verificou-se que a combinação de catequina e tolcapona (TOL) (um inibidor de COMT) melhora a biodisponibilidade e sinergicamente o efeito supressor de câncer, inibindo a metilação da catequina mediada por COMT *in vivo* (Suganuma et al. 1999).

As diferenças no efeito supressor das catequinas no câncer de mama entre várias populações podem estar relacionadas à diferenciação na biodisponibilidade das catequinas entre diferentes populações, devido a variações no estado fisiológico. A atividade da catequina como prevenção do câncer vem sendo testada em diferentes modelos animais que podem estar associadas a vários mecanismos. Em um mesmo modelo experimental, uma catequina oriunda de chá, pode exibir atividades inibitórias do câncer por mais de um mecanismo (Yang; Wang 2011).

É interessante considerar a possibilidade de que essas ações funcionem sinergicamente para exercer os efeitos preventivos contra o câncer de mama. Informações precisas sobre os mecanismos de prevenção do câncer por catequinas em humanos são ainda difíceis de obter. As ações dos polifenóis do chá na redução do estresse oxidativo e no aprimoramento da eliminação metabólica de agentes cancerígenos não estão bem elucidadas (Chow et al. 2007; Tang et al. 2008).

Tais ações serão difíceis de verificar em estudos de intervenção em humanos, usando o câncer como um parâmetro. Estudos de coorte grandes e bem delineados podem ser extremamente importantes para compreender a atividade preventiva das catequinas no tratamento do câncer. A relação entre o consumo de chá e o risco de câncer pode se tornar mais clara se quantificarmos melhor o consumo de catequinas, corrigirmos os fatores do estilo de vida e considerarmos os polimorfismos genéticos dos indivíduos.

Capítulo 1: artigo: Inhibitory Effect of Catechin-Rich Açai Seed Extract on LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells and Carrageenan-Induced Paw Edema..

Publicado na revista Foods, Fator de impacto: 4,092

Article

Inhibitory Effect of Catechin-Rich Açaí Seed Extract on LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells and Carrageenan-Induced Paw Edema

Gabriel Silva Xavier ¹, Amanda Mara Teles ², Carla Junqueira Moragas-Tellis ³, Maria do Socorro dos Santos Chagas ³, Maria Dutra Behrens ³, Wendel Fragoso de Freitas Moreira ⁴, Ana Lucia Abreu-Silva ⁴, Kátia da Silva Calabrese ^{5,*}, Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento ^{1,*} and Fernando Almeida-Souza ^{4,5,†}

Foods **2021**, *10*(5), 1014; <https://doi.org/10.3390/foods10051014>

Received: 15 January 2021 / Revised: 3 February 2021 / Accepted: 4 February 2021 /

Published: 6 May 2021

(This article belongs to the Special Issue

Abstract

Açaí berry is a fruit from the tree commonly known as açaízeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) originated from the Amazonian region and widely consumed in Brazil. There are several reports of the anti-inflammatory activity of its pulp and few data about the seed's potential in inflammation control. This work aimed to evaluate the effect of catechin-rich açaí extract on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells and carrageenan-induced paw edema. The treatment with *E. oleracea* ethyl acetate extract (EO-ACET) was used in an in vitro model performed with macrophages stimulated by LPS, in which pro-inflammatory markers were evaluated, and in an in vivo model of acute inflammation, in which edema inhibition was evaluated. EO-ACET showed an absence of endotoxins, and did not display cytotoxic effects in RAW 264.7 cells. LPS-stimulated cells treated with EO-ACET displayed low levels of nitrite and interleukins (IL's), IL-1 β , IL-6 and IL-12, when compared to untreated cells. EO-ACET treatment was able to inhibit carrageenan-induced paw edema at 500 and 1000 mg/kg, in which no acute inflammatory reaction or low mast cell counts were observed by histology at the site of inoculation of λ -carrageenan. These findings provide more evidence to support further studies with *E. oleracea* seeds for the treatment of inflammation.

Keywords: inflammation; *Euterpe oleracea*; fruit; nitric oxide; cytokines; histology; mast cells

1. Introduction

The use of dietary supplements of botanical origin has been widespread worldwide and the advancement of studies in this area has been possible due to the involvement of the National Center for Complementary and Alternative Medicine, the Office of Dietary Supplements, as

well as other components of the National Institute of Health. The use of these supplements has health, as well as economic, implications [1,2]. However, it is very important to draw attention to the veracity of information contained on product labels, which may be configured if it does not comply with the uniformity test of dosage forms. Therefore, many studies described in the literature show the need for the better quality control of these products and the existence of stricter rules [3].

Compounds from plant foods are cheap sources of products with anti-inflammatory and antioxidant properties. The increasing interest of consumers in foods with high health potential made the pomace from berries a good source of bioactive compounds [4]. These studies seem to look for compounds that can simultaneously inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX), which are called double COX/5-LOX inhibitors. In this field, anthocyanins are identified as compounds that have anti-inflammatory activity. Various processed fruit products have traditionally been used to treat colds and flu [5].

Euterpe oleracea Mart. belongs to the Arecaceae family and is commonly known as “açazeiro”. It is the most popular large palm tree (**Figure 1A**) from the floodplain Amazon region, measuring from 6 to 14 m in height. The fruit is a small berry, with a size that varies between 1 to 2 cm in diameter and weighs an average of 1.2 g (**Figure 1B**). The epicarp (bark) and the mesocarp (pulp) is dark purple when ripe. Mesocarp measures approximately 1–2 mm thick and surrounds the endocarp, which is a bulky and hard structure, whose shape follows that of the fruit, which contains a seed. The açai seed fills most of the fruit, representing 73% of its mass, presenting a globose shape, dark brown color and an average diameter of 11.5 mm (**Figure 1C**) [6,7,8,9].

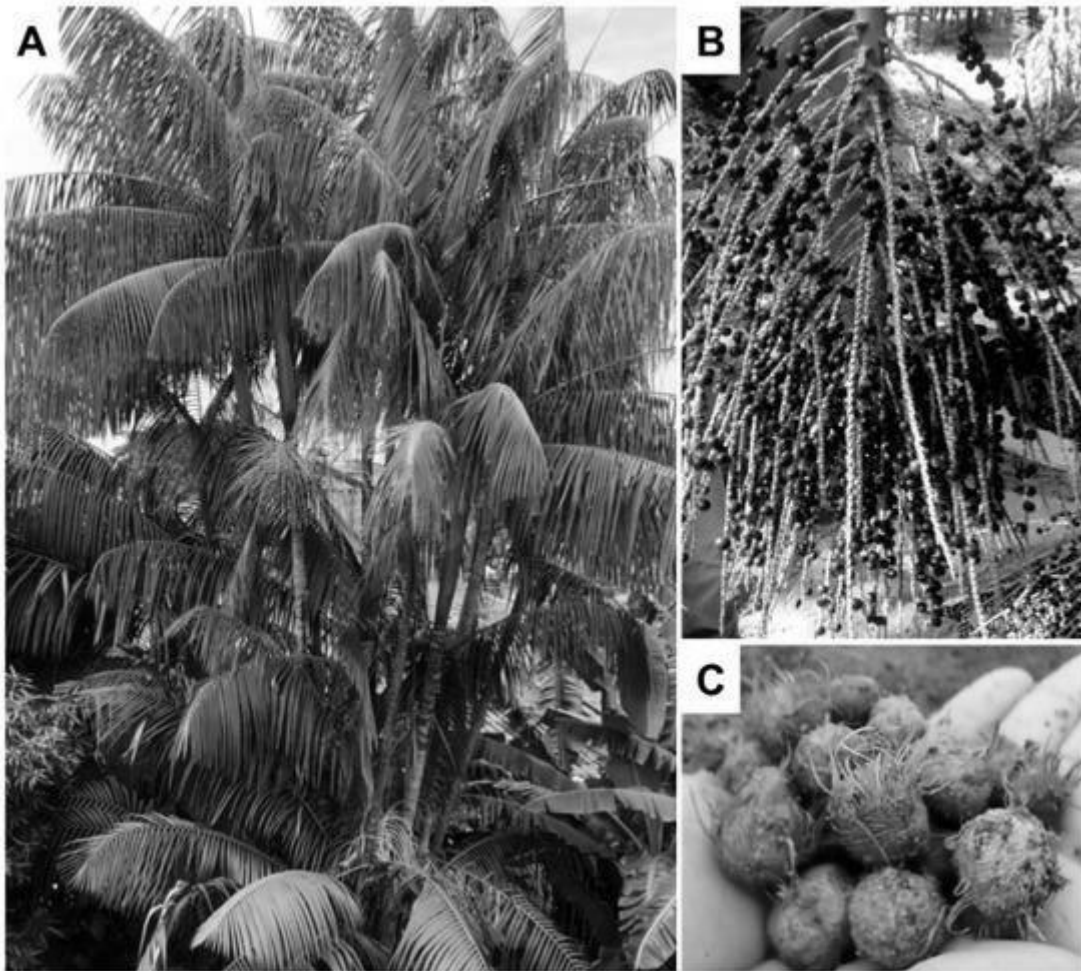


Figure 1. *Euterpe oleracea* tree (A), fruits (B) and seeds (C).

Different parts of *E. oleracea* have been studied for chemical composition and pharmacological properties [10]. The oil extracted from the pulp or seed of the fruit presents mainly fatty acids, whose oleic acid (47.58%), palmitic (24.06%) and linoleic (13.58%) acids are the major compounds, while palmitoleic, vaccenic, lauric and stearic acids were minor constituents [11]. High concentrations of (+)-catechin and procyanidin oligomers have also been found in *E. oleracea* pulp and oil extracts [12].

The fruit açai, is widely consumed by the population in Brazil [13]. Besides the nutritional value, açai berry presents antioxidant properties due to its high level of phenolic compounds, such as anthocyanins [14], which also exerts anti-inflammatory, anti-proliferative and cardioprotective activities [15]. A variety of phenolic compounds identified in *E. oleracea*, such as the flavonoids quercetin, vitexin, luteolin, chrysoeriol and dihydrocaempferol, and the anthocyanins cyanidin-3-rutinoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-sambioside and peonidine-3-rutinoside, showed antioxidant effect [16].

The literature shows that both the pulp and the ethanolic extract of the fruit have anti-inflammatory action. It was demonstrated that C57BL/6 mice exposed to cigarette smoke and treated with hydroalcoholic fruit extract showed a lower number of neutrophils and macrophages in the lung when compared to the control group, which demonstrates the anti-inflammatory activity of the açai fruit extract [17]. Other experiments showed that both dried and frozen hydroalcoholic extract of the fruit pulp interfered with the activation and proliferation of macrophages, promoting the arrest of the cell cycle due to the reduction of NOD-like receptor family pyrin domain containing protein 3 (NLRP3) activation [18].

The anti-inflammatory activity of açai is often associated with the presence of flavonoids, such as catechin and epicatechin, both in the pulp fruit [18] and in the seeds [19]. Catechin's anti-inflammatory effect is well described alone, acting via the regulation of Toll-like receptor (TLR) 2/4 and inflammasome signaling [20], or in combination with other compounds, suppressing the production of inflammatory cytokines in mouse macrophages in vitro in association with baicalin and β -caryophyllene [21], and inhibiting the activation of TLR4-MyD88-mediated nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathways in RAW 264.7 macrophages in association with quercetin [22].

The use of digested or undigested açai seed extract, rich in catechin and epicatechin, shows that there was a reduction in the activation of NF- κ B and levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), confirming that the anti-inflammatory activity of the extract is not altered after ingestion, which suggests the açai seeds may be used to obtain and bioactive compounds for various purposes [19]. However, besides the use of the in vitro digested açai seed extract, the study only performed in vitro experiments, which limits the evidence of the possible anti-inflammatory potential of the açai seed. Thus, this work aimed to evaluate the effect of catechin-rich açai extract on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells and the in vivo model of acute inflammation carrageenan-induced paw edema.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

The fruits of *E. oleracea* used in this study came from Parque da Juçara, São Luís, Maranhão, Brazil (latitude -2.6274201 , longitude -44.2922708). The collection was carried out in the dry period in September 2017. A sample of the specimen was stored under exsiccate number 30, issued by Herbário Rosa Mochel of the Nucleus of Biological Studies of the State University of Maranhão (UEMA). To obtain the seeds, the fruits were washed in running water and in

distilled water at 60 °C for 5 min, and the pulp was removed with the aid of a pulper. The seeds were placed to dry in an oven at 47 °C. After drying, the fibers covering the seed were removed manually.

2.2. Obtaining of Ethyl Acetate Extract from E. oleracea Seed

The dried seeds were ground in a manual mill to facilitate the extraction process. Then, 500 g of the crushed açai seeds were weighed and added to 400 mL of 70% hydroethanolic solution. The mixture remained under constant agitation for 2 h and was then left to rest for extraction by maceration, with four successive changes of solvent, for four days. After the extraction process, the resulting extract was filtered on Whatman filter paper #1, and the solvent concentrated on a low-pressure rotary evaporator (Fisatom Equipamentos Científicos Ltd.a., São Paulo, Brazil) at 40 °C. The hydroethanolic extract was then lyophilized (LIOTOP model 202, Fisatom Equipamentos Científicos Ltd.a., São Paulo, Brazil) at a temperature of -30 to -40 °C and a vacuum of 200 mm Hg. *E. oleracea* hydroethanolic extract (EO-HE), 15 g, was diluted in 200 mL of methanol:water (8:2; v/v) solution and partitioned in a liquid separation funnel, using solvents of increasing polarity (chloroform, ethyl acetate and water). The partition resulted in fractions named EO-CLO, EO-ACET, and EO-AQ, respectively. All the fractions were subjected to evaporation under reduced pressure to obtain dry matter and were then identified and kept at -20 °C. Before the biological assays, the fractions were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 100× the final concentration for in vitro assays, and the final test concentrations in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) culture medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) presented less than 0.5% DMSO. For in vivo assays, PBS was used to solubilize the EO-ACET to the final doses. Dilution extracts were prepared immediately before use.

2.3. Thin Layer Chromatography (TLC) Analysis

The hydroalcoholic extract and fractions were preliminarily analyzed by Thin Layer Chromatography (TLC) using silica gel 60 F254 in an aluminum chromatography sheet (20 cm × 20 cm × 0.15 mm; Merck, Darmstadt, Germany) previously activated in an oven at 105 °C for 2 h. As a mobile phase, the mixture of solvents methanol: chloroform: formic acid (8.5:1.5:0.5 v/v/v) was used. After elution, chromatograms were evaluated under visible and ultraviolet light at wavelengths of 254 and 365 nm, followed by spraying with sulfuric vanillin reagent (1% in methanol) and subsequent heating at 110 °C for 2 min.

2.4. Analysis by High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Diode-Array Detection and Mass Spectrometry (HPLC-DAD-MS)

The HPLC analysis was carried out with a modified C18 column 250 mm × 4.6 mm × 5 μm (Shim-pack CLCDS, Shimadzu, Canby, Oregon). The solvents used were (A) water acidified with 5% formic acid and (B) methanol HPLC grade. The elution gradient established was 15% B for 5 min, 15 to 80% B in 25 min, and maintaining 80% B isocratic for 15 min to rebalance the column, using a flow rate of 1.0 mL/min. The mass detection was performed in a positive mode with a capillary voltage of 2500 V; end plate offset: 2000 V; capillary output 110 V, skimmer 1 20 V, skimmer 2 10 V, dry gas (N₂) temperature 325 °C and flow 11 L/min, nebulizer 60 psi, sweep range from 200 to 800 *m/z* temperature set at 25 °C. Dual online DAD detection was performed using 280 and 520 nm as the wavelengths of choice.

2.5. Quantification of Endotoxins

The quantification of endotoxin in the EO-ACET dilutions (125, 250 and 500 μg/mL) was carried out following the recommendations of Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) [23].

2.6. Cell Culture

RAW 264.7 cell line murine macrophages (ATCC® TIB-71™) were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Gaithersburg, MD, USA), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 μg/mL) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 37 °C and 5% CO₂ in culture flasks.

2.7. Cytotoxicity Assay

RAW 264.7 cells (2×10^6 cells/mL, 100 μL per well) were incubated overnight in 96 well plates for adhesion. The medium and non-adherent cells were removed, and the adherent cells were treated with 100 μL of different concentrations of EO-ACET (125, 250 and 500 μg/mL), diluted in DMEM. Wells without cells only with the medium were used as blanks, and wells with cells and DMSO 1% were used as a control. Wells with cells treated with LPS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 10 μg/mL and with dexamethasone (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 100 μM. After 48 h of treatment, cell viability assay was performed using the colorimetric MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) method [24], with modifications [25]. Briefly, 10 μL of MTT at 5 mg/mL was added and incubated for two hours at 37 °C and 5% CO₂. The supernatants were removed, and the formazan crystals were solubilized with 100 μL of DMSO. The absorbance was obtained with a spectrophotometer at 540 nm wavelength. Cytotoxicity was expressed as a percentage, as described elsewhere [26].

2.8. EO-ACET Treatment in RAW 264.7 Macrophages Stimulated with LPS

RAW 264.7 macrophages (2×10^6 cells/mL) were incubated in 24-well plates overnight. After the removal of non-adherent cells, the adherent cells were treated with EO-ACET at 125, 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$ concentrations, or with dexamethasone (100 μM) for one hour, and then stimulated, or not, with LPS (10 $\mu\text{g/mL}$). Cells non-treated and non-stimulated, and cells non-treated and stimulated were used as controls. All treatment dilutions were carried out in DMEM medium. After 48 h, the supernatant was collected for the quantification of nitrite and cytokines interleukin (IL) 1 beta (IL-1 β), IL-6 and IL-12.

2.9. Nitrite and Cytokines Quantification

Nitrite levels in cell culture supernatant were determined by the Griess method [27]. Then, 50 μL of supernatant was added to 50 μL of Griess reagent (25 μL of sulfanilamide 1% in 2.5% H_3PO_4 solution and 25 μL of N-(1-naphthyl) ethylenediamine 0.1% solution) in 96-well plates. After 10 min protected from light, the absorbance of the plate was measured in a spectrophotometer at 540 nm. The results were expressed in NaNO_2 (μM), based on a standard curve with known concentrations of sodium nitrite (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), at 100 to 3.1 μM NaNO_2 , obtained for serial dilution 1:2 [28]. The cytokine quantification of IL-1 β , IL-12 and IL-6 (BD OptEIA™) was performed following the manufacturer's specifications.

2.10. Animals and Ethical Statement

Female BALB/c mice from six to eight weeks of age were obtained from the Institute of Science and Technology in Biomodels (ICTB/FIOCRUZ) and maintained under pathogen-free conditions at a controlled temperature, with food and water ad libitum. The experiments were conducted in accordance with the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and approved by the Ethics Commission for the Use of Animals of the Oswaldo Cruz Institute, license number CEUA/IOC—L053/2016, 28 December 2016.

2.11. Paw Edema Induced by λ -Carrageenan

The paw edema was carried out as described by Oliveira et al. (2019) [29]. Mice were separated into six groups of five animals. Four groups were pre-treated with 250, 500 or 1000 mg/kg of EO-ACET by gavage, or dexamethasone (5 mg/kg solubilized in PBS, intramuscular route), and two groups were pre-treated with PBS by gavage. After one hour, 25 μL of λ -carrageenan 1% was injected into the left hind footpad. The control group was inoculated with PBS and pre-treated with PBS. After 1, 2, 3 and 4 h of λ -carrageenan inoculation, footpad swelling was measured using a Schnelltaster dial gauge caliper (Kröplin GmbH, Hessen, Germany). The edema thickness was expressed in millimeters and obtained from the difference between the inoculated footpad at the evaluation time and its own basal level at time 0 before inoculation.

The animals were euthanized, four hours after λ -carrageenan inoculation, with 250 μ L intraperitoneal injection of a 1:1 mixture of ketamine (100 mg/mL; Syntec, BRA) and xylazine (20 mg/mL; Syntec, BRA). Fragments of footpad edema were collected for histological analysis.

2.12. Histology Analysis

Skin fragments from footpad were fixed in 10% buffered formalin and routinely processed for paraffin embedding. Tissue sections at 5 μ m thick were stained with Hematoxylin-Eosin (HE) and Giemsa using the modified Wolbach method for the quantification of mast cells. Tissues were observed, analyzed by a researcher with expertise, blinded to the experimental groups. In HE staining, the inflammatory parameters analyzed were edema, congestion and inflammatory infiltrate. Mast cells counting were performed under a light microscope and representative areas in five fields were selected [29].

2.13. Statistical Analysis

The results are represented as mean \pm standard deviation and were analyzed by Kruskal–Wallis followed by Dunn’s multiple comparisons tests ($p < 0.05$) or by analysis of variance (two-way ANOVA) followed by Bonferroni’s multiple comparisons test ($p < 0.05$). Statistical analyses were carried out with GraphPad Prism 7.00 software package (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Chemical Characterization of *E. oleracea* Seed Extracts

Thin-layer chromatography with catechin standard showed the presence of catechin in *E. oleraceae* hydroalcoholic extract (EO-HE) and ethyl acetate fraction (EO-ACET), slight evidence in chloroform fraction (EO-CLO) and absence in aqueous fraction (EO-AQ) (**Figure 2A**). The HPLC-MS analysis confirmed this result, as observed in the four chromatograms shown in **Figure 2B**. The signs found in each chromatogram, with their respective relative percentage areas and their tentative identification, are described in **Table 1**.

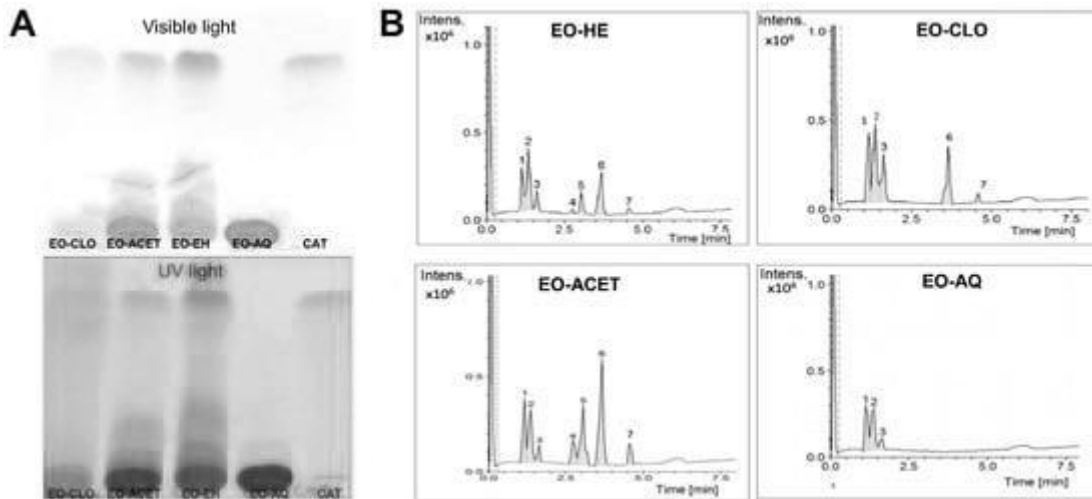


Figure 2. Chromatograms obtained by thin-layer chromatography (A) and high-performance liquid chromatography coupled to the mass spectrometer (B) of the hydroalcoholic extract of *Euterpe oleracea* seeds (EO-HE) and fractions obtained using chloroform (EO-CLO), ethyl acetate (EO-ACET) and water (EO-AQ), showing the presence of seven main signs.

Table 1. Constituents found in *Euterpe oleracea* seed extracts with their respective molecular pseudo-ions, relative percentage areas and their tentative identification.

3.2. EO-ACET Is Endotoxin-Free and Not Displayed Cytotoxicity

The endotoxin quantification shows endotoxin absence in all EO-ACET dilutions used in macrophage treatment. Cytotoxicity assay performed with the same treatment conditions of posterior experiments did not show significant alteration in the percentage of viable cells (**Figure 3**).

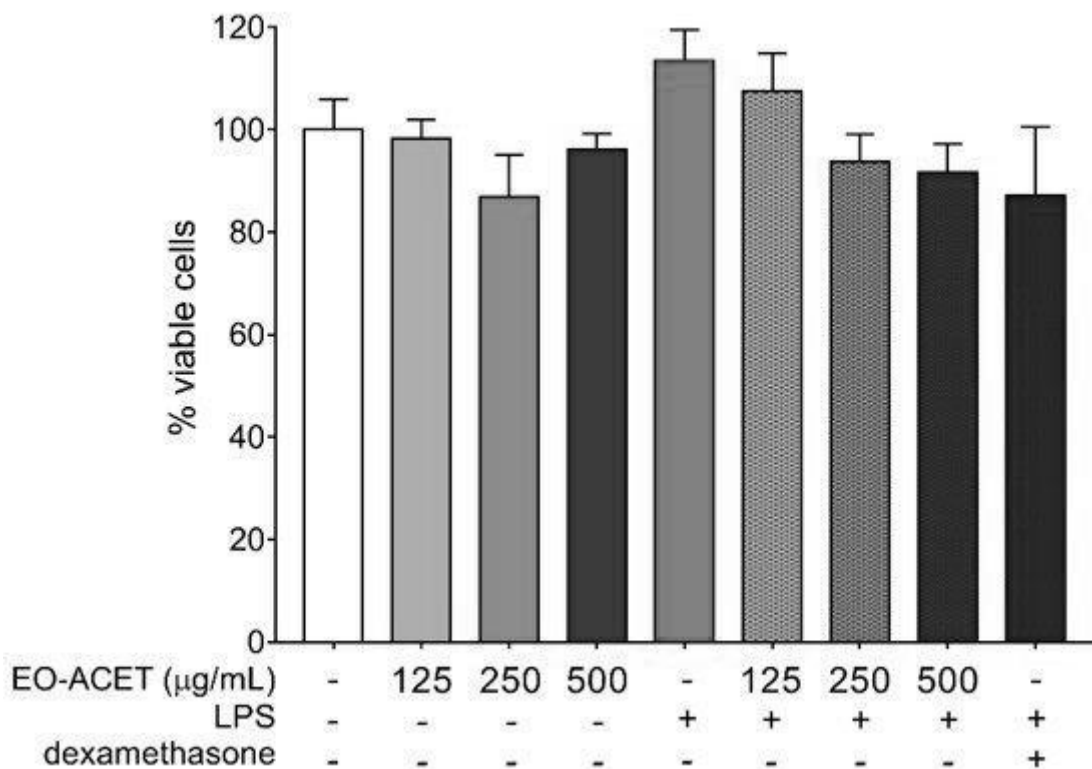


Figure 3. Cytotoxicity of *Euterpe oleracea* ethyl acetate fraction (EO-ACET) in RAW 264.7 cells after 48 h of treatment with EO-ACET (purple columns) or dexamethasone (blue column) at 100 µM and stimulated, or not, with LPS (red column) at 10 µg/mL. Data represent the mean \pm standard deviation of the experiment performed in sextuplicate.

3.3. EO-ACET Reduced Levels of Pro-Inflammatory Markers in RAW 264.7 Cells Stimulated with LPS

The treatment of RAW 264.7 macrophages without LPS stimulation with EO-ACET at the highest concentration analyzed, 500 µg/mL, did not alter the levels of nitrite or cytokines in the cell culture supernatant. However, LPS-stimulated cells treated with EO-ACET showed low levels of all four pro-inflammatory markers analyzed when compared to untreated and LPS-stimulated cells. Treatment with EO-ACET at 125 and 500 µg/mL displayed low levels of nitrite ($p = 0.0237$ and $p = 0.0028$, respectively; **Figure 4A**), while only at 500 µg/mL did they present low levels of IL-1 β ($p = 0.0058$; **Figure 4B**). The inhibitory effect of EO-ACET was more evident in IL-6 (**Figure 4C**) and IL-12 quantification (**Figure 4D**). All the three concentrations analyzed (125, 250 and 500 µg/mL) showed low levels of IL-6 ($p < 0.0001$, $p = 0.0002$ and $p = 0.0166$, respectively) and IL-12 ($p = 0.0194$, $p = 0.0059$ and $p = 0.0257$, respectively). The reference drug dexamethasone treatment presented low levels of nitrite ($p = 0.0001$) and cytokines IL-1 β ($p = 0.0093$), IL-6 ($p < 0.0001$) and IL-12 ($p = 0.0002$), as expected (**Figure 4**).

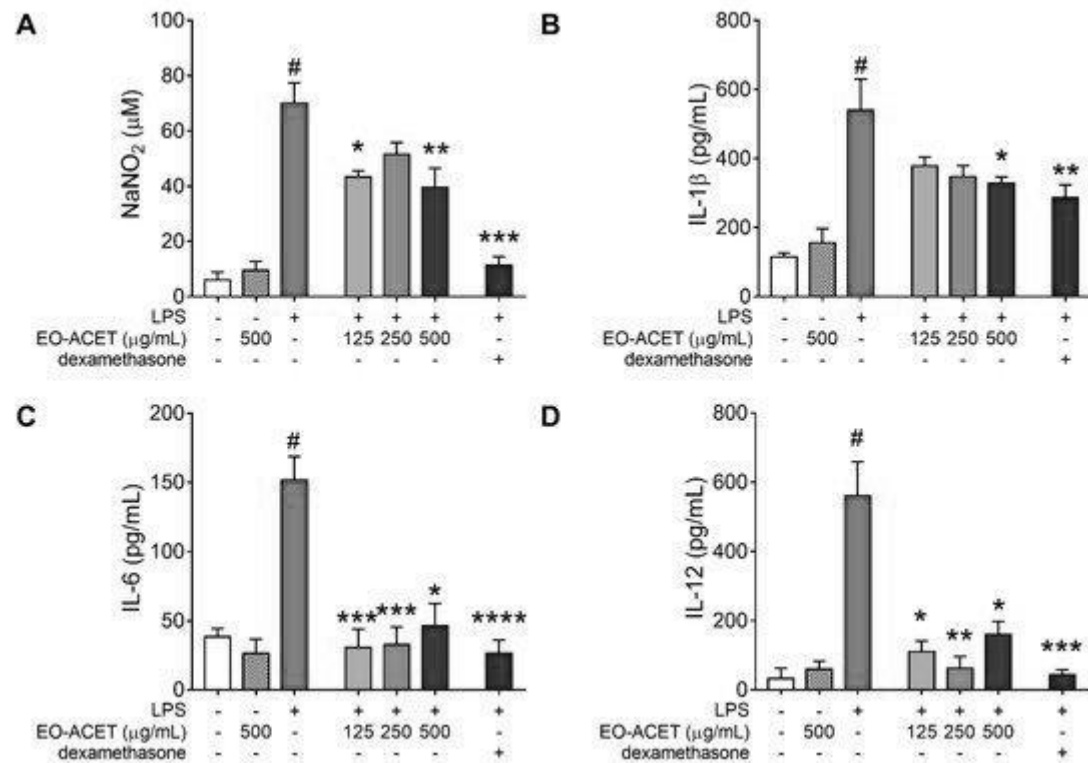


Figure 4. Pro-inflammatory factors in RAW 264.7 cells stimulated by LPS and treated with *Euterpe oleracea* ethyl acetate fraction (EO-ACET). Levels of nitrite (A) and cytokines (B–D) in culture supernatants of cells treated with EO-ACET (purple columns) or dexamethasone (blue column), 100 µM. Data represent the mean ± standard deviation of the experiment performed at least in triplicate. # $p < 0.001$ compared with the group without stimulation or treatment (white column); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ when compared with the stimulated and untreated group (red column) after Kruskal–Wallis analysis, followed by Dunn’s multiple comparisons tests.

3.4. EO-ACET Inhibited Paw Edema Induced by λ -Carrageenan

The treatment with EO-ACET demonstrated lower edema thickness than the PBS group four hours after λ -carrageenan inoculation (**Figure 5A** and **Table 2**). After four hours, EO-ACET treatment inhibited edema in a dose-dependent manner at 500 and 1000 mg/kg (**Figure 5B**). The histological analysis showed that the animals treated with 1000 mg/kg presented the same results as the animal treated with dexamethasone; in other words, no acute inflammatory reaction was observed at the site of inoculation of carrageenan, as evidenced by histology of mast cells (**Figure 6**). Regarding the participation of the mast cells in the process, the groups treated with EO-ACET at 500 and 1000 mg/kg presented lower mean mast cell numbers in comparison with the untreated and stimulated group (**Figure 7**).

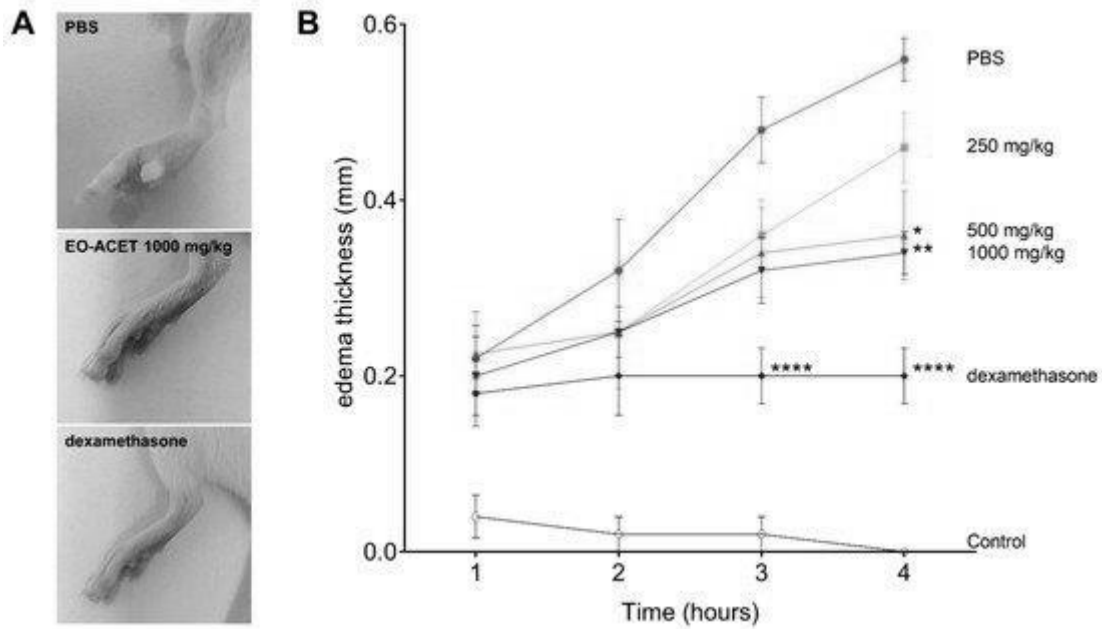


Figure 5. Paw edema of BALB/c mice inoculated with of λ -carrageenan and treated with *Euterpe oleraceae* ethyl acetate fraction (EO-ACET). Macroscopy (A) and kinetic of edema thickness (B) of animals inoculated with 25 μ L of λ -carrageenan 1% and treated with 100 μ L EO-ACET (purple lines) at 250, 500 or 1000 mg/kg by gavage or with dexamethasone (blue line) at 5 mg/kg via the intramuscular route. Data represent the experiment carried out in quintuplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, when compared with PBS group (red line), after analysis of variance (two-way ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparisons tests.

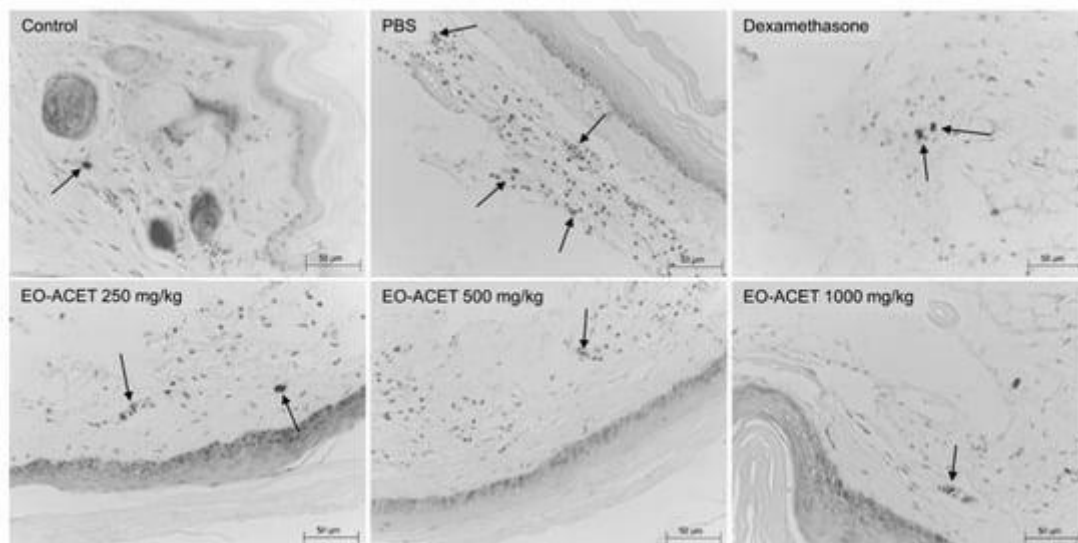


Figure 6. Mast cells (arrows) histology of BALB/c mice inoculated with of λ -carrageenan and treated with *Euterpe oleraceae* ethyl acetate fraction (EO-ACET). Animals inoculated with 25

μL of λ -carrageenan 1% and treated with 100 μL EO-ACET by gavage or with dexamethasone 5 mg/kg via the intramuscular route. Wolbach Giemsa Stain.

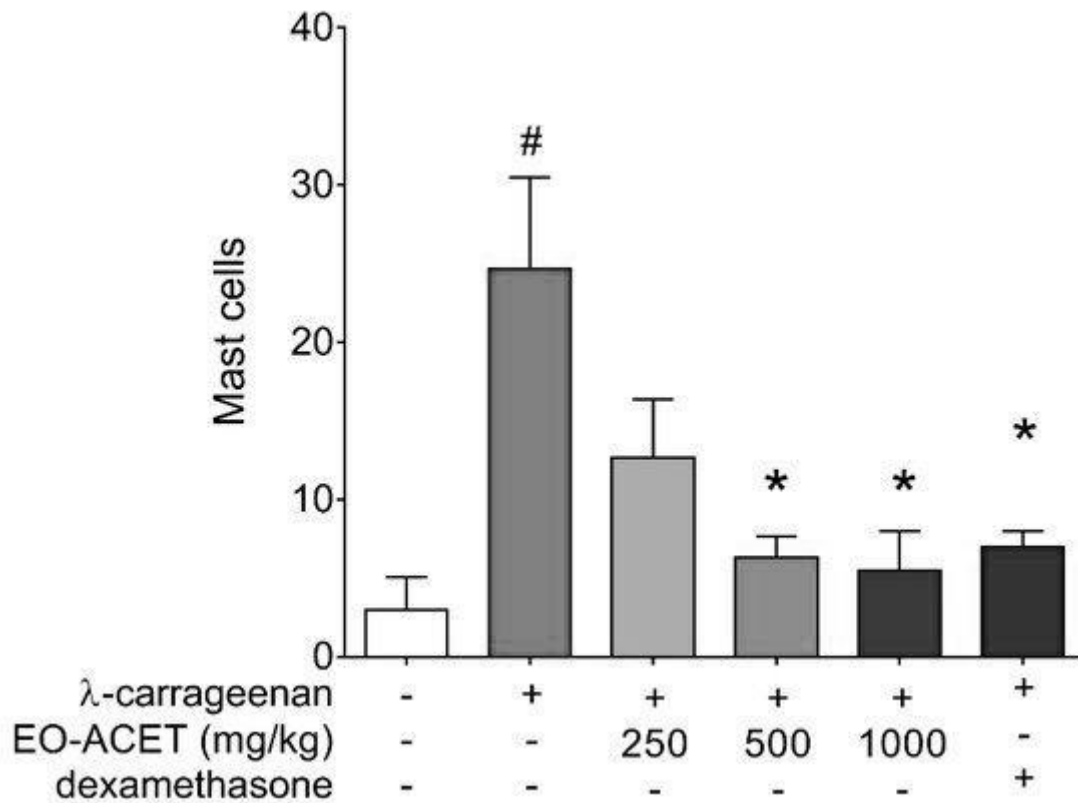


Figure 7. Mast cells counting in BALB/c mice footpad inoculated with of λ -carrageenan and treated with ethyl acetate fraction of *Euterpe oleraceae* (EO-ACET). Animals inoculated with 25 μL of λ -carrageenan 1% and treated with 100 μL EO-ACET (purple columns) by gavage or with dexamethasone (blue column) at 5 mg/kg via the intramuscular route. Data represent the mean \pm standard deviation of the experiment performed at least in triplicate. # $p < 0.001$ compared with the group without stimulation or treatment (white column); * $p < 0.05$, when compared with the stimulated and untreated group (red column) after Kruskal–Wallis analysis followed by Dunn’s multiple comparisons tests.

Table 2. Thickness in millimeters and percentage of λ -carrageenan 1% paw edema inhibition in BALB/c mice treated with ethyl acetate fraction of *Euterpe oleraceae*.

4. Discussion

The study demonstrated the anti-inflammatory properties of the ethyl acetate fraction from *E. oleracea* used in Brazil. First, it was performed a chemical characterization of the extract and their fractions obtained with chloroform, ethyl acetate, and water to define the catechin-rich one to be used in the biological experiments. The phytochemical analysis showed that in the

ethyl acetate fraction, mainly catechins and pelargonidin were identified, which differ from the previous results of our laboratory, in which a predominance of proanthocyanidin A2, trimeric and tetrameric procyanidins was observed [30]. Other studies also describe the occurrence of catechins and epicatechin in the açai seed [31,32].

Although the seeds of the present study were collected in the same place and the same season as Freitas et al. [30], several factors may have interfered, such as the edaphoclimatic conditions, rainfall index and, mainly, the storage time that in the present work was not longer. Among the factors that cause the instability of anthocyanins are pH, copigmentation, light, temperature, metals and oxygen [33,34].

In an overview of food, therapeutic and industrial applications of Brazilian fruits of Arecaceae family, de Souza et al. considered açai, from the physicochemical perspective, as a good supplement in the human diet due to its high content of compounds with known pharmacological properties and/or health benefits [35], such as oleic acid [36], anthocyanins [37], carotenoids [38] and phenolic compounds [39]. These compounds are related to the powerful antioxidant activity of berries [40] and other underused wild plants seeds [41] such as the acai seed. The “superfruit” nomination given to açai fruit is due to the variety of bioactive compounds and their antioxidant ability.

Qualitative analysis by TLC revealed that EO-HE and EO-ACET displayed the presence of catechin, and the relative percentage area obtained by HPLC-DAD-MS confirmed this result, with EO-ACET exhibiting the higher amount of catechin and epicatechin between the analyzed fractions. Thus, EO-ACET was used in further experiments.

Before the in vitro treatment of RAW 264.7 cells, EO-ACET was subjected to an evaluation of the endotoxin quantity. Endotoxins induce pro-inflammatory effects [42] that would alter the in vitro and in vivo evaluation of the anti-inflammatory activity of *E. oleracea* seed extract. In addition, repeated exposure to LPS may induce a state of tolerance that reprograms the inflammatory response, resulting in reduced inflammatory cytokine production in vitro and in vivo [43] that would also modify EO-ACET anti-inflammatory response. The absence observed in this endotoxin analysis ensures that the fraction is free of contamination and that all the posterior experiments made with it had no interference of endotoxins.

The RAW 264.7 murine macrophages were used to assess anti-inflammatory activity, since they consist of a good in vitro model for the inhibition of the pathways that lead to the induction and production of pro-inflammatory enzymes and cytokines [29,44]. The lower levels of nitrite and cytokines observed in the supernatant of cells treated with EO-ACET indicates an

inhibitory effect in the production of pro-inflammatory marker nitrite, IL-1 β , IL-6 and IL-12 by macrophages.

Nitrite was used as an indirect way to quantify the amount of nitric oxide (NO) in culture supernatants. The NO originated from the conversion of L-arginine to L-citrulline by the NO synthase (NOS) enzyme that has three isoforms—neuronal (nNOS); endothelial NOS (eNOS); inducible NOS (iNOS)—which is induced by pro-inflammatory factors such as cytokines or endotoxins and is widely expressed in macrophages [23,45]. The lower quantification observed in RAW 264.7 cells treated with EO-ACET revealed its inhibitory effect in NO production, as well as in the cytokines production.

The IL-1 β is typically activated in macrophages after inflammasome sensing of infection or danger, leading to caspase-1 processing and driving inflammation after the release from macrophages [46]. The TLR4 receptor in monocytes and macrophages, when activated by LPS, induces IL-12 production and stimulates macrophages to produce other pro-inflammatory cytokines, driving inflammation [47]. On the other hand, IL-6 may have contextual protective or exacerbating roles during inflammation [48]. The inhibitory in vitro effect of EO-ACET treatment in IL-1 β , IL-6 and IL-12 production by RAW 264.7 cells suggests a potential anti-inflammatory in vivo.

The anti-inflammatory activity of *E. oleracea* was also verified by a RAW 264.7 murine macrophage model using phytohemagglutinin. Açai extract at 1 μ g/mL modulated redox status by decreasing NLRP3 inflammasome levels and reducing pro-inflammatory cytokines IL-1 beta, IL-6, TNF- α , and IFN- γ , and the decreasing production of anti-inflammatory cytokine IL-10 [18]. In addition, the anti-inflammatory and antihypertensive effects of the açai seed extract, rich in phenolic compounds, were attributed to the modulating of redox status by the positive modulation of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway in human endothelial cells (HUVEC) [49].

In vitro experiments are important tools to evaluate a specific situation and control variables that cannot be controlled in vivo, and to provide insight into the mechanism of action of drugs candidate. However, in vitro studies also have their limitations in research involving inflammation. Inflammation is a complex process, involving several cells, biochemical mediators, and signaling molecules, that is not possible to mimic in vitro. In addition, is difficult to reproduce the same in vitro results in vivo due to pharmacokinetics and pharmacodynamics parameters [29,50]. Thereby, we carried out an in vivo acute inflammation model of

carrageenan-induced paw edema in BALB/c mice to evaluate the anti-inflammatory activity of ethyl acetate fraction obtained from *E. oleracea* seed extract.

The animals treated with EO-ACET demonstrated edema inhibition, noticed by the lower increase in the thickness footpad when compared to untreated animals. The inhibitory activity was also higher in the highest doses, suggesting an ascending anti-inflammatory dose response. The edema event happens due to vascular alterations that initiate with the transitory constriction of the small vessels and posterior vasodilatation [51], generating deregulation of the osmotic balance. Furthermore, vasodilatation also allows leukocyte migration to the inflammatory site, producing additional inflammatory factors that sustain and potentiate the inflammation.

The in vivo anti-inflammatory activity of the *E. oleracea* seed extract was also observed in an experiment with C57BL/6 mice, in which açai seed extract supplementation protected from obesity-associated hepatic steatosis and fibrosis, reducing oxidative stress, NF- κ B expression and pro-inflammatory markers IL-6 and TNF- α [52].

Mast cells are one of the leucocytes that can migrate through vasodilatation, integrating a critical first line of defense against endogenous and environmental threats, and being intrinsically involved in the pathogenesis of skin inflammation. They are found mainly in vascularized tissues and have cytoplasmic granules that are rich in a wide variety of mediators as histamine, prostaglandins, heparin and serotonin [53,54]. We observed a decrease in the mast cell count in the footpads of animals treated with EO-ACET at the same treatment doses, which also inhibited edema increase, suggesting that mast cells may be involved in edema inhibition caused by EO-ACET treatment.

5. Conclusions

Overall, the results observed in vitro, with the inhibition of pro-inflammatory markers suggesting an anti-inflammatory activity of *E. oleracea* seed, was confirmed by the inhibition of carrageenan-induced paw edema induced by EO-ACET treatment. These findings add to the other descriptions of the inflammatory activity of açai pulp fruit, and our results confirmed that the *E. oleracea* seed, which is rich in catechins, has anti-inflammatory potential. This study provides more evidence to support further studies with *E. oleracea* seeds for the treatment of inflammation.

Author Contributions

Conceptualization, G.S.X., C.J.M.-T., M.D.B. and F.A.-S.; methodology, G.S.X., A.M.T., C.J.M.-T., M.d.S.d.S.C., W.F.d.F.M. and F.A.-S.; formal analysis, G.S.X., C.J.M.-T., A.L.A.-S. and F.A.-S.; resources, M.D.B., A.L.A.-S., K.d.S.C., M.d.D.S.B.N. and F.A.-S.; data

curation, C.J.M.-T., M.D.B., A.L.A.-S. and F.A.-S.; writing—original draft preparation, G.S.X., A.M.T., C.J.M.-T., A.L.A.-S. and F.A.-S.; writing—review and editing, G.S.X., A.M.T., C.J.M.-T., M.d.S.d.S.C., M.D.B., W.F.d.F.M., A.L.A.-S., K.d.S.C., M.d.D.S.B.N. and F.A.-S.; visualization, G.S.X., C.J.M.-T., A.L.A.-S. and F.A.-S.; supervision, M.D.B., A.L.A.-S., K.d.S.C., M.d.D.S.B.N. and F.A.-S.; project administration, M.D.B., A.L.A.-S., K.d.S.C., M.d.D.S.B.N. and F.A.-S.; funding acquisition, M.D.B., A.L.A.-S., K.d.S.C., M.d.D.S.B.N. and F.A.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research was funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Brasil—CAPES) (grant number Finance Code 001). The APC was funded by the Oswaldo Cruz Institute (Instituto Oswaldo Cruz—IOC). Fernando Almeida-Souza is a postdoctoral researcher fellow of CAPES (grant number 88887.363006/2019-00). Dr. Ana Lucia Abreu-Silva is a research productivity fellow of the National Scientific and Technological Development Council (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq) (grant number 309885/2017-5).

Institutional Review Board Statement

The experiments with animals were conducted in accordance with the guidelines for experimental procedures of the Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (the National Council for the Control of Animal Experimentation) (CONCEA) and approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais (the Animal Research Ethics Committee) of the Instituto Oswaldo Cruz (CEUA-IOC/FIOCRUZ), License nº L053/2016.

Data Availability Statement

All datasets presented in this study are included in the article.

Acknowledgments

We would like to thank the Farmanguinhos Analytical methods platform.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rapaka, R.S.; Coates, P.M. Dietary supplements and related products: A brief summary. *Life Sci.* **2006**, *78*, 2026–2032. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mulabagal, V.; Keller, W.J.; Calderón, A.I. Quantitative analysis of anthocyanins in *Euterpe oleracea* (açai) dietary supplement raw materials and capsules by Q-TOF

- liquid chromatography/mass spectrometry. *Pharm. Biol.* **2012**, *50*, 1289–1296. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mannino, G.; Di Stefano, V.; Lauria, A.; Pitonzo, R.; Gentile, C. Vaccinium macrocarpon (Cranberry)-Based Dietary Supplements: Variation in Mass Uniformity, Proanthocyanidin Dosage and Anthocyanin Profile Demonstrates Quality Control Standard Needed. *Nutrients* **2020**, *12*, 992. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 4. Helkar, P.B.; Sahoo, A.K.; Patil, N.J. Review: Food Industry By-Products used as a Functional Food Ingredients. *Int. J. Waste Resour.* **2016**, *6*, 1–6. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 5. Szymanowska, U.; Baraniak, B. Antioxidant and Potentially Anti-Inflammatory Activity of Anthocyanin Fractions from Pomace Obtained from Enzymatically Treated Raspberries. *Antioxidants* **2019**, *8*, 299. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 6. Petruk, G.; Illiano, A.; Del Giudice, R.; Raiola, A.; Amoresano, A.; Rigano, M.M.; Piccoli, R.; Monti, D.M. Malvidin and cyanidin derivatives from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) counteract UV-A-induced oxidative stress in immortalized fibroblasts. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2017**, *172*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 7. Aguiar, M.O.; Mendonça, M.S.d. Morfo-anatomia da semente de *Euterpe precatoria* Mart. (Palmae). *Rev. Bras. Sementes* **2003**, *25*, 37–42. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 8. Martins, C.C.; Bovi, M.L.A.; Nakagawa, J.; Machado, C.G. Secagem e armazenamento de sementes de juçara. *Rev. Árvore* **2009**, *33*, 635–642. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 9. Reis, R.C.d.C. Palmeiras (Arecaceae) das restingas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Bot. Bras.* **2006**, *20*, 501–512. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 10. de Almeida Magalhães, T.S.S.; de Oliveira Macedo, P.C.; Converti, A.; Neves de Lima, Á.A. The Use of *Euterpe oleracea* Mart. As a New Perspective for Disease Treatment and Prevention. *Biomolecules* **2020**, *10*, 813. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 11. de Almeida Magalhães, T.S.S.; de Oliveira Macedo, P.C.; Kawashima Pacheco, S.Y.; Silva, S.S.D.; Barbosa, E.G.; Pereira, R.R.; Costa, R.M.R.; Silva Junior, J.O.C.; da Silva Ferreira, M.A.; de Almeida, J.C.; et al. Development and Evaluation of Antimicrobial and Modulatory Activity of Inclusion Complex of *Euterpe oleracea* Mart Oil and β -Cyclodextrin or HP- β -Cyclodextrin. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 942. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

12. Pacheco-Palencia, L.A.; Talcott, S.T.; Safe, S.; Mertens-Talcott, S. Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and oil in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
13. Cedrim, P.C.A.S.; Barros, E.M.A.; Nascimento, T.G. Propriedades antioxidantes do açai (*Euterpe oleracea*) na síndrome metabólica. *Braz. J. Food Technol.* **2018**, *21*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
14. Carvalho, C.A.; Ferreira Ferreira da Silveira, T.; Mattietto, R.A.; Padilha de Oliveira, M.D.; Godoy, H.T. Chemical composition and antioxidant capacity of açai (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Yamaguchi, K.K.; Pereira, L.F.; Lamarão, C.V.; Lima, E.S.; da Veiga-Junior, V.F. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. *Food Chem.* **2015**, *179*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. de Oliveira, N.K.S.; Almeida, M.R.S.; Pontes, F.M.M.; Barcelos, M.P.; de Paula da Silva, C.H.T.; Rosa, J.M.C.; Cruz, R.A.S.; da Silva Hage-Melim, L.I. Antioxidant Effect of Flavonoids Present in *Euterpe oleracea* Martius and Neurodegenerative Diseases: A Literature Review. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* **2019**, *19*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Moura, R.S.; Ferreira, T.S.; Lopes, A.A.; Pires, K.M.; Nesi, R.T.; Resende, A.C.; Souza, P.J.; Silva, A.J.; Borges, R.M.; Porto, L.C.; et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomed. Int. J. Phytother. Phytopharm.* **2012**, *19*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Machado, A.K.; Cadoná, F.C.; Assmann, C.E.; Andrezza, A.C.; Duarte, M.M.M.F.; Branco, C.S.; Zhou, X.; de Souza, D.V.; Ribeiro, E.E.; da Cruz, I.B.M. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) has anti-inflammatory potential through NLRP3-inflammasome modulation. *J. Funct. Foods* **2019**, *56*, 364–371. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
19. Melo, P.S.; Massarioli, A.P.; Lazarini, J.G.; Soares, J.C.; Franchin, M.; Rosalen, P.L.; Alencar, S.M. Simulated gastrointestinal digestion of Brazilian açai seeds affects the content of flavan-3-ol derivatives, and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Heliyon* **2020**, *6*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
20. Lee, H.A.; Song, Y.R.; Park, M.H.; Chung, H.Y.; Na, H.S.; Chung, J. Catechin ameliorates *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation via the regulation of

- TLR2/4 and inflammasome signaling. *J. Periodontol.* **2020**, *91*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
21. Yamaguchi, M.; Levy, R.M. The combination of catechin, baicalin and β -caryophyllene potentially suppresses the production of inflammatory cytokines in mouse macrophages in vitro. *Exp. Ther. Med.* **2019**, *17*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 22. Li, T.; Li, F.; Liu, X.; Liu, J.; Li, D. Synergistic anti-inflammatory effects of quercetin and catechin via inhibiting activation of TLR4-MyD88-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Phytother. Res. PTR* **2019**, *33*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 23. Almeida-Souza, F.; de Souza, C.a.S.; Taniwaki, N.N.; Silva, J.J.; de Oliveira, R.M.; Abreu-Silva, A.L.; Calabrese, K.a.S. Morinda citrifolia Linn. fruit (Noni) juice induces an increase in NO production and death of Leishmania amazonensis amastigotes in peritoneal macrophages from BALB/c. *Nitric Oxide* **2016**, *58*, 51–58. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 24. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 25. Teles, A.M.; Silva-Silva, J.V.; Fernandes, J.M.P.; Calabrese, K.D.S.; Abreu-Silva, A.L.; Marinho, S.C.; Mouchrek, A.N.; Filho, V.E.M.; Almeida-Souza, F. Aniba rosaeodora (Var. amazonica Ducke) Essential Oil: Chemical Composition, Antibacterial, Antioxidant and Antitrypanosomal Activity. *Antibiotics* **2020**, *10*, 24. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 26. Mondêgo-Oliveira, R.; de Sá Sousa, J.C.; Moragas-Tellis, C.J.; de Souza, P.V.R.; Dos Santos Chagas, M.D.S.; Behrens, M.D.; Jesús Hardoim, D.; Taniwaki, N.N.; Chometon, T.Q.; Bertho, A.L.; et al. *Vernonia brasiliiana* (L.) Druce induces ultrastructural changes and apoptosis-like death of Leishmania infantum promastigotes. *Biomed. Pharmacother. Biomed. Pharmacother.* **2021**, *133*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 27. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 131–138. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 28. Almeida-Souza, F.; Silva, V.D.D.; Silva, G.X.; Taniwaki, N.N.; Hardoim, D.J.; Buarque, C.D.; Abreu-Silva, A.L.; Calabrese, K.D.S. 1,4-Disubstituted-1,2,3-Triazole Compounds Induce Ultrastructural Alterations in Leishmania amazonensis

- Promastigote: An in Vitro Antileishmanial and in Silico Pharmacokinetic Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6839. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
29. Oliveira, I.S.S.; Colares, A.V.; Cardoso, F.O.; Tellis, C.J.M.; Chagas, M.S.S.; Behrens, M.D.; Calabrese, K.S.; Almeida-Souza, F.; Abreu-Silva, A.L. Vernonia Polysphaera Baker: Anti-inflammatory Activity in Vivo and Inhibitory Effect in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0225275. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
30. Freitas, D.D.S.; Morgado-Díaz, J.A.; Gehren, A.S.; Vidal, F.C.B.; Fernandes, R.M.T.; Romão, W.; Tose, L.V.; Frazão, F.N.S.; Costa, M.C.P.; Silva, D.F.; et al. Cytotoxic analysis and chemical characterization of fractions of the hydroalcoholic extract of the *Euterpe oleracea* Mart. seed in the MCF-7 cell line. *J. Pharm. Pharmacol.* **2017**, *69*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Rodrigues, R.B.; Lichtenthaler, R.; Zimmermann, B.F.; Papagiannopoulos, M.; Fabricius, H.; Marx, F.; Maia, J.G.; Almeida, O. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
32. Barros, L.; Calhella, R.C.; Queiroz, M.J.R.P.; Santos-Buelga, C.; Santos, E.A.; Regis, W.C.B.; Ferreira, I.C.F.R. The powerful in vitro bioactivity of *Euterpe oleracea* Mart. seeds and related phenolic compounds. *Ind. Crop. Prod.* **2015**, *76*, 318–322. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
33. Sakurai, K.; Shen, C.; Shiraishi, I.; Inamura, N.; Hisatsune, T. Consumption of Oleic Acid on the Preservation of Cognitive Functions in Japanese Elderly Individuals. *Nutrients* **2021**, *13*, 284. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
34. Romualdo, G.R.; de Souza, I.P.; de Souza, L.V.; Prata, G.B.; Fraga-Silva, T.F.C.; Sartori, A.; Borguini, R.G.; Santiago, M.C.P.A.; Fernandes, A.A.H.; Cogliati, B.; et al. Beneficial effects of anthocyanin-rich peels of Myrtaceae fruits on chemically-induced liver fibrosis and carcinogenesis in mice. *Food Res. Int.* **2021**, *139*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. De Souza, F.G.; de Araújo, F.F.; de Paulo Farias, D.; Zanotto, A.W.; Neri-Numa, I.A.; Pastore, G.M. Brazilian fruits of Arecaceae family: An overview of some representatives with promising food, therapeutic and industrial applications. *Food Res. Int.* **2020**, *138*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

36. He, F.; Liang, N.N.; Mu, L.; Pan, Q.H.; Wang, J.; Reeves, M.J.; Duan, C.Q. Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules* **2012**, *17*, 1571–1601. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
37. Oyarzún, P.; Cornejo, P.; Gómez-Alonso, S.; Ruiz, A. Influence of Profiles and Concentrations of Phenolic Compounds in the Coloration and Antioxidant Properties of *Gaultheria poeppigii* Fruits from Southern Chile. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2020**, *75*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
38. Katsimbri, P.; Korakas, E.; Kountouri, A.; Ikonomidis, I.; Tsougos, E.; Vlachos, D.; Papadavid, E.; Raptis, A.; Lambadiari, V. The Effect of Antioxidant and Anti-Inflammatory Capacity of Diet on Psoriasis and Psoriatic Arthritis Phenotype: Nutrition as Therapeutic Tool? *Antioxidants* **2021**, *10*, 157. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
39. Vega-Ruiz, Y.C.; Hayano-Kanashiro, C.; Gámez-Meza, N.; Medina-Juárez, L.A. Determination of Chemical Constituents and Antioxidant Activities of Leaves and Stems from *Jatropha cinerea* (Ortega) Müll. Arg and *Jatropha cordata* (Ortega) Müll. Arg. *Plants* **2021**, *10*, 212. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Olson, K.R.; Gao, Y.; Briggs, A.; Devireddy, M.; Iovino, N.A.; Licursi, M.; Skora, N.C.; Whelan, J.; Villa, B.P.; Straub, K.D. ‘Antioxidant’ Berries, Anthocyanins, Resveratrol and Rosmarinic Acid Oxidize Hydrogen Sulfide to Polysulfides and Thiosulfate: A Novel Mechanism Underlying Their Biological Actions. *Free Radic. Biol. Med.* **2021**. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Niyukuri, J.; Raiti, J.; Ntakarutimana, V.; Hafidi, A. Lipid composition and antioxidant activities of some underused wild plants seeds from Burundi. *Food Sci. Nutr.* **2020**, *9*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
42. Sattar, A.A.; Abate, W.; Fejer, G.; Bradley, G.; Jackson, S.K. Evaluation of the proinflammatory effects of contaminated bathing water. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **2019**, *82*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
43. Seeley, J.J.; Ghosh, S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J. Leukoc. Biol.* **2017**, *101*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
44. Sheu, M.-J.; Deng, J.-S.; Huang, M.-H.; Liao, J.-C.; Wu, C.-H.; Huang, S.-S.; Huang, G.-J. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Dichondra repens* Forst. and its reference compounds. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1010–1018. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

45. Bredt, D.S. Endogenous Nitric Oxide Synthesis: Biological Functions and Pathophysiology. *Free Radic. Res.* **1999**, *31*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Pyrillou, K.; Burzynski, L.C.; Clarke, M.C.H. Alternative Pathways of IL-1 Activation, and Its Role in Health and Disease. *Front. Immunol.* **2020**, *11*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
47. Silveira, L.S.; Antunes, B.M.; Minari, A.L.; Dos Santos, R.V.; Neto, J.C.; Lira, F.S. Macrophage Polarization: Implications on Metabolic Diseases and the Role of Exercise. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **2016**, *26*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
48. McGonagle, D.; Sharif, K.; O'Regan, A.; Bridgewood, C. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun. Rev.* **2020**, *19*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
49. Soares, E.R.; Monteiro, E.B.; de Bem, G.F.; Inada, K.O.P.; Torres, A.G.; Perrone, D.; Soulage, C.O.; Monteiro, M.C.; Resende, A.C.; Moura-Nunes, N.; et al. Up-regulation of Nrf2-antioxidant signaling by Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) extract prevents oxidative stress in human endothelial cells. *J. Funct. Foods* **2017**, *37*, 107–115. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
50. Eze, F.I.; Uzor, P.F.; Ikechukwu, P.; Obi, B.C.; Osadebe, P.O. In vitro and In vivo Models for Anti-inflammation: An Evaluative Review. *INNOSC Theranostics Pharmacol. Sci.* **2019**, *2*, 13. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
51. Kumar, H.; Kawai, T.; Akira, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* **2011**, *30*, 16–34. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Romão, M.H.; de Bem, G.F.; Santos, I.B.; de Andrade Soares, R.; Ognibene, D.T.; de Moura, R.S.; da Costa, C.A.; Resende, Â.C. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed extract protects against hepatic steatosis and fibrosis in high-fat diet-fed mice: Role of local renin-angiotensin system, oxidative stress and inflammation. *J. Funct. Foods* **2020**, *65*, 103726. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
53. Heger, K.; Fierens, K.; Vahl, J.C.; Aszodi, A.; Peschke, K.; Schenten, D.; Hammad, H.; Beyaert, R.; Saur, D.; van Loo, G.; et al. A20-deficient mast cells exacerbate inflammatory responses in vivo. *PLoS Biol* **2014**, *12*, e1001762. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. El Ansari, Y.S.; Kanagaratham, C.; Oettgen, H.C. Mast Cells as Regulators of Adaptive Immune Responses in Food Allergy. *Yale J. Biol. Med.* **2020**, *93*, 711. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]

Capitulo 2: Depósito de Patente

ANEXO: Depósito de Patente

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT****Número do Processo:** BR 10 2019 024774 6**Dados do Depositante (71)**

Depositante 1 de 1**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CNPJ:** 06279103000119**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** Cidade Universitária Dom Delgado, Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga.**Cidade:** São Luis**Estado:** MA**CEP:** 65080-805**País:** Brasil**Telefone:** (98) 32728710**Fax:****Email:** nit-dapi@ufma.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 25/11/2019 às 15:27, Petição 870190122707

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FITOTERAPICO ANTINEOPLASICO E ANTITUMORAL

Resumo: A referida invenção compreende a obtenção de um fitoterápico a partir de uma fração da semente do açaí com atividade antineoplásica e antitumorigênica a partir de diferentes apresentações, tais como cápsula, solução, xarope, comprimidos, pó, pasta, supositório e pellets com ação antineoplásica e antitumorigênica contra células neoplásicas de mama para tratamento isolado ou associado de quimioterápicos de uso humano.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 25/11/2019 às 15:27, Petição 870190122707

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4**Nome:** GABRIEL XAVIER SILVA**CPF:** 60239569393**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Fiel:** Veterinário, patologista (veterinário) e zootecnista**Endereço:** São Luis**Cidade:** São Luis**Estado:** MA**CEP:** 65051-410**País:** BRASIL**Telefone:** (98) 987 728695**Fax:****Email:** xaviersilva.g@gmail.com**Inventor 2 de 4****Nome:** MARIA DO DESTERRO SOARES BRANDÃO NASCIMENTO**CPF:** 04492900349**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Fiel:** Médico**Endereço:** São Luis**Cidade:** São Luis**Estado:** MA**CEP:****País:** BRASIL**Telefone:** (98) 981 890191**Fax:****Email:** cnsd_ma@uol.com.br**Inventor 3 de 4**

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 25/11/2019 às 15:27, Petição 870190122707

3. CONCLUSÃO

A fração acetato de etila demonstrou efeito inibitório na produção de citocinas in vitro em células RAW 264.7 estimuladas com LPS e no edema de pata in vivo.

fração de acetato de etila,

A fração de acetato de etila independente do tempo de tratamento foi cinco vezes mais seletiva para a célula-alvo que para célula controle MCF 10A

O mecanismo de indução de morte celular em ambas as linhagens estudadas foi a apoptose.

A fração acetato obtida do extrato de semente de *E. oleracea* apresentou potencial antitumoral e anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS

- AESOIY, R. et al. An Autocrine VEGF/VEGFR2 and p38 Signaling Loop Confers Resistance to 4-Hydroxytamoxifen in MCF-7. **Breast Cancer Cells. Mol Cancer Res.** v. 6. n.10, p. 631-638, 2008
- AGUIAR, J.P.L.; MARINHO, H.A.; REBÊLO, Y.S.; SHRIMPTON, R. Aspectos nutritivos de alguns frutos da Amazônia. **Acta Amaz**, v.10, n.4, p.755-758.1980
- ALMEIDA-SOUZA, F. et al. 1,4-Disubstituted-1,2,3-Triazole Compounds Induce Ultrastructural Alterations in *Leishmania amazonensis* Promastigote: An in Vitro Antileishmanial and in Silico Pharmacokinetic Study. **Int J. Mol. Sc. V.s** 2020, 21, doi:10.3390/ijms21186839.
- ALMEIDA-SOUZA, F. et al. *Morinda citrifolia* Linn. fruit (Noni) juice induces an increase in NO production and death of *Leishmania amazonensis* amastigotes in peritoneal macrophages from BALB/c. **Nitric Oxide**, v. 58, p. 51-58, 2016. doi:10.1016/j.niox.2016.06.004.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. 2018. “Types of Cancer Treatment | American Cancer Society.” Types of Cancer Treatment. 2018.
- ATHERINO, M.C. et al. Cytotoxicity and Uptake of Lajoenia pacari Extract in Mammary Carcinoma Cells. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 30, p; 43–53, 2020. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00034-4>
- AVTANSKI, D.; PORETSKY, L. Phyto-polyphenols as potential inhibitors of breast cancer metastasis. **Mol. Med.**, v.24, p. 1- 17, 2018
- BALKWILL, F. R 1, ALBERTO MANTOVANI. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. **Semin Cancer Biol**, v.22, n.1, p.:33-40. 2012. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.12.005
- BARROS, L. et al. The powerful in vitro bioactivity of *Euterpe oleracea* Mart. seeds and related phenolic compounds. **Ind Crops Prod**, v. 76, p.318-322, 2015. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.086>.
- BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo - patologia Geral**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018
- BRAY, F. et al.. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **Cancer J Clin.**, v.68, n.6, p.394-424, 2018. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- BREDT, D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radic Res.**, v. 31, n. 6, p. 577-596, 1999. doi: 10.1080/10715769900301161
- CALZAVARA, B.B.G. As possibilidades do açazeiro no estuário amazônico. **Bol Facul Cienc Agra**, n.5, p.165-230, 1972.

- CEDRIM, P.C.A.S.; BARROS, E.M.A.; NASCIMENTO, T.G. Propriedades antioxidantes do açaí (*Euterpe oleracea*) na síndrome metabólica. **Braz J. Food Technol.** v.21, p. e2017092., 2018 <https://doi.org/10.1590/1981-6723.09217>
- CHEN, Y. et al. Pelargonidin induces antitumor effects in human osteosarcoma cells via autophagy induction, loss of mitochondrial membrane potential, G2/M cell cycle arrest and downregulation of PI3K/AKT signaling pathway. **JBUON**, v. 23, n.3, 735-740, 2018
- CHENG H. et al.. Nitric oxide in cancer metastasis. *Cancer Lett*, v. 353, n.1, p. 1-7. 2014. doi: 10.1016/j.canlet.2014.07.014.
- CHOI, YJ et al. et al. Açaí berries inhibit colon tumorigenesis in azoxymethane/dextran sulfate sodium-treated mice. **Gut Liver**, v. 11, n.2, 243–52, 2017. doi: 10.5009/gnl16068
- CHOW, H.-H. S et al. “Modulation of Human Glutathione S-Transferases by Polyphenon E Intervention. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 16, n.8, p. 1662–66, 2007. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0830>. 2007.
- CREW, K. D. et al. Effects of a green tea extract, Polyphenon E, on systemic biomarkers of growth factor signalling in women with hormone receptor-negative breast cancer. **J Hum Nutr Diet.**, v.28, n.3, p 272–282, 2015.
- CREW, K. D. et al. Phase IB Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Dose Escalation Study of Polyphenon E in Women with Hormone Receptor-Negative Breast Cancer. **Cancer Prev Res.**, p.5, n. 9, p. 1144-54, 2012. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-12-0117.
- DEL POZO-INSFRAN, D. et al. Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. **Food Res Int** v,39, n.6, p.:696-703, 2006.doi: 10.1016/j.foodres.2006.01.014
- EL ANSARI, Y.S. et al. Mast Cells as regulators of adaptive immune responses in food allergy. **Yale J Biol Med**, v. 93, n.5, p.711-718, 2020.
- EZE, F.I. et al. In vitro and In vivo Models for Anti-inflammation: An Evaluative Review. **INNOSC Theranostics Pharmacol. Sc.** V.2, n.2, p.3-17, 2019. doi:10.36922/itps.v2i2.775.
- FARIAS FILHO, M.C et al. Ações de responsabilidade socioambiental de agroindústrias de polpa de açaí. REUNA, Belo HorizonteMG, Brasil, v.18, n.4, p.21-36, 2013.
- FERREIRA V., C.A. et. al. Chemical composition and antioxidant capacity of açaí (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps. *J. Sci. Food Agric.*, v. 97, n.5, p. 1467-1474. 2017doi:10.1002/jsfa.7886.
- FIGUEIREDO, C.R.L.V. O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** vol.55 n.3, P. 321-332 2019. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20190029>

- FREITAS, D. S. et al. Cytotoxic analysis and chemical characterization of fractions of the hydroalcoholic extract of the *Euterpe oleracea* Mart. seed in the MCF-7 cell line. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.69, p.714–721, 2017.
- FU, N. et al. Stem cells and the differentiation hierarchy in mammary gland development. **Physiol Rev.** v. 100, n.2, p.489-523, 2020. <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2018>. 2019.
- GREEN, L.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, p. 131-138, 1982.
- GREEN, L.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and nit Aesoy, R. et al. An Autocrine VEGF/VEGFR2 and p38 Signaling Loop Confers Resistance to 4-Hydroxytamoxifen inMCF-7. **Breast Cancer Cells. Mol Cancer Res**, v.6, n. 10, p.1630-8, 2008. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-21722008;6(10).
- HE, F. et al. Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. **Molecules**, p.17, n.2, p. 1571–1601, 2012 doi:10.3390/molecules17021571.
- HEGER, K. et al. A20-deficient mast cells exacerbate inflammatory responses in vivo. **PLoS Biol.**, v.12, p. e1001762. 2014doi:10.1371/journal.pbio.1001762.
- HENDERSON, A., GALEANO, G. “Euterpe, Prestoea, and Neonicholsonia (Palmae).” *Flora Neotropica*, vol. 72, 1996, p. 1–89. JSTOR, www.jstor.org/stable/4393873. Accessed 14 May 2021.
- HENDERSON, A., GALEANO, G. “Euterpe, Prestoea, and Neonicholsonia (Palmae).” *Flora Neotropica*, vol. 72, 1996, p. 1–89. JSTOR, www.jstor.org/stable/4393873. Accessed 14 May 2021.
- HONG BYUN E, FUJIMURA Y, YAMADA K, TACHIBANA H. TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-kDa laminin receptor. **J Immunol.**, v.185, n.1, p.33-45, 2010. doi: 10.4049/jimmunol.0903742.
- HOU, W. C.,et al. Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in leaves of different cultivars of *Liriope spicata* L. on 10% SDS-PAGE gels. *Botanical Bull Acad Sinica*, v.44, n. 1, p. 37-41, 2003.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.Rio de Janeiro: IBGE, 2019.Disponível: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101662.pdf>. Acesso em: 09 jan. 2021.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
International Tree Crops Journal. v.2, p.217-244, 1983.

- JOHNSON , R.;BRYANT, S.; HUNTLEY , A.L. Green tea and green tea catechin extracts: an overview of the clinical evidence. **Maturitas**, v.73, n.4, p.:280-7, 2012. doi: 10.1016/j.maturitas.2012.08.008.
- JONES, D.L. **Palms: throughout the world**. Washington: Smithsonian Institution. 1995.
- KAHN, F. Les palmiers de l'eldorado. Paris: Éditions de l'Oprstom. 252p. 1997.
- KAHN, F.; GRANVILLE, J. Palms in forest ecosystems of Amazonia. **Ecol. Stud**, n.95, 226p. 1992.
- KAI, I et al.. Involvement of proinflammatory cytokines IL-1beta and IL-6 in progression of human gastric carcinoma. **Anticancer Res**. v.25, n. 2A, p.709-2005
- KARIN, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. **Nature**, v.41. n.092, p.431-6. 2006 doi: 10.1038/nature04870. PMID: 16724054.
- KHAN, F. Ecology of economically important palms in peruvian Amazonia. In: BALICK, M.J.,ed. The palm- tree of life: biology, utilization and conservation. **Advan Econom Botany**, v.6, p.42-49, 1986.
- KUMAR, A. et al. Estradiol-induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cell is mediated by estrogen receptors α and β . **Int. J. Oncol.** 36, p. 1067-1080, 2010.
- KUMAR, H. et al. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int Rev Immunol**, v. 30, p. 16-34, 2011.doi:10.3109/08830185.2010.529976.
- KUSHI, L. H. et al. "American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for Cancer Prevention." **CA: C. J. Clinicians**. v. 62, n.1, p. 30–67, 2012. <https://doi.org/10.3322/caac.20140>. 2012.
- LEE, H.A et al. Catechin ameliorates *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation via the regulation of TLR2/4 and inflammasome signaling. **J. Periodontol**, v. 91, n.5, p. :661-670, 2020. doi:10.1002/JPER.18-0004.
- LI, X.M. Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats. **Int J Biol Macromol**. v.40, n.5, p.:461-5, 2007.doi: 10.1016/j.ijbiomac.2006.11.002..
- LI, M. et al. Evaluation of Breast Cancer Risk Associated with Tea Consumption by Menopausal and Estrogen Receptor Status among Chinese Women in Hong Kong. **Cancer Epidemiol**.v.40, p. 73-78, 2016. doi: 10.1016/j.canep.2015.11.013
- LI, T. et al. Synergistic anti-inflammatory effects of quercetin and catechin via inhibiting activation of TLR4-MyD88-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways. **Phyther Res.** , v.33, n.3, 756-767, 2019, 33, doi:10.1002/ptr.6268.

- LICHTENTHÄLER, R; et al. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits. **Int J Food Sci Nutr**, 56:1, 53-64, 2005. doi: 10.1080/09637480500082082
- LIM, Y. C. et al. Endoxifen, a Secondary Metabolite of Tamoxifen, and 4-OH-Tamoxifen Induce Similar Changes in Global Gene Expression Patterns in MCF-7 Breast Cancer Cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 2, p. :503-512, 2006. Aug;318(2):503-12. doi: 10.1124/jpet.105.100511
- LORENZI, H., SOUZA, H.M., COSTA, J.T.M., CERQUEIRA, L.S.C. & BEHR, N. 1996. Palmeiras do Brasil: nativas e exóticas. Editora Plantarum. Nova Odessa.
- MACHADO, A.K et al. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) has anti-inflammatory potential through NLRP3-inflammasome modulation. **J.Funct. Foods**. v 56, p.364 - 371, 2019. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.034>.
- MANTOVANI A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr Mol Med*. 2010 Jun;10(4):369-73. doi: 10.2174/156652410791316968. PMID: 20455855.
- MANTOVANI, A., ALLAVENA, P., SICA, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v.454, p. 436–444 , 2008. <https://doi.org/10.1038/nature07205>
- MELO, P.S. et al. Simulated gastrointestinal digestion of Brazilian açai seeds affects the content of flavan-3-ol derivatives, and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Heliyon** . v. 6, n.10, p. e05214., 2020. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05214. 3;6(10):
- MONDÊGO-OLIVEIRA, R. et al. *Vernonia brasiliiana* (L.) Druce induces ultrastructural changes and apoptosis-like death of *Leishmania infantum* promastigotes. **Biomed Pharmacother**, v.133, p.111025, 2021. doi:10.1016/j.biopha.2020.111025.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, p. 55-63, 1983 doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- MOURA R.S et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. **Phytomed.**, v.19, p.262-69, 2012;19. doi: 10.1016/j.phymed.2011.11.004
- MURATA, M. Inflammation and cancer. *Environ Health Prev Med.* , v.23, n.1, p:50, 2018. doi: 10.1186/s12199-018-0740-1
- OLIVEIRA, I.S.S. et al. *Vernonia polysphaera* Baker: Anti-inflammatory Activity in Vivo and Inhibitory Effect in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. **Plos One**, v. 14, p.1-19. 2019. doi:10.1371/journal.pone.0225275.

- OYARZÚN, P. et al. Influence of profiles and concentrations of phenolic compounds in the coloration and antioxidant properties of *Gaultheria poeppigii* fruits from Southern Chile. **Plant Foods Hum Nutr.** v.75, p. 532-539, 2020. doi:10.1007/s11130-020-00843-x.
- PERINI, J. A. et al. *Euterpe oleracea* extract inhibits tumorigenesis effect of the chemical carcinogen DMBA in breast experimental cancer. **BMC Complement Altern Med**, v. 18, p. 116, (2018). doi: 10.1186/s12906-018-2183-z
- PETRUK G et al Malvidin and cyanidin derivatives from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) counteract UV-A-induced oxidative stress in immortalized fibroblasts. **J Photochem Photobiol**, v.. 172, p. :42-51, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.05.013>
- PETRUK G et al Malvidin and cyanidin derivatives from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) counteract UV-A-induced oxidative stress in immortalized fibroblasts. **J Photochem Photobiol**, v.. 172, p. :42-51, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.05.013>
- PRODUÇÃO AGRÍCOLA MUNICIPAL 2018. 2018 <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613>. Date accessed:Jan 9, 2021. Produção Agrícola Municipal 2018. 2018 <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613>. Date
- PYRILLOU, K.; BURZYNSKI, L.C.; CLARKE, M.C.H. Alternative pathways of il-1 activation, and its role in health and disease. **Front. Immunol.**, v.11, p.1-17, 2020. doi:10.3389/fimmu.2020.613170.
- RAFIEIAN-KOPAEI, M. A review of plant-based compounds and medicinal plants effective on atherosclerosis. **J Res Med Sci**, 2017 DOI: 10.4103/1735-1995.202151
- RATHORE, S.; SALMÉRON, I., PANDIELLA, S.S. P. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. **Food Microbiol.**, v. 30, n.1, p. 239-244, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.09.001>.
- RODRIGUES, R.B. et al. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **J Agric Food Chem.**, v. 54, n.12, p. 4162-7, 2006. doi: 10.1021/jf058169p
- ROSENBLATT, K A et al. The relationship between diet and breast cancer in men (United States). **Cancer Causes Control** : v. 10, n.2, p. 107–13. 1999.
- SALVUCCI, O et al.. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. **Breast Cancer Res Treat.** v.97, n. 3, p.:275-83, 2006.doi: 10.1007/s10549-005-9121-8. Epub 2005 Dec 13. PMID: 16344916.
- SAMAVAT, H. et al. “Green Tea Catechin Extract Supplementation Does Not Influence Circulating Sex Hormones and Insulin-Like Growth Factor Axis Proteins in a Randomized

- Controlled Trial of Postmenopausal Women at High Risk of Breast Cancer. **J. Nutr**, v.149, n.4, p. 619–27, 2019. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy316>. 2019.
- SAMAVAT, H. et al. Effects of green tea catechin extract on serum lipids in postmenopausal women: a randomized, placebo-controlled clinical trial. **Am. J. Clin. Nutr**, v. 104, n.6, p.1671–82. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.137075>. 2016.
- SATTAR, A.A. et al. Evaluation of the proinflammatory effects of contaminated bathing water. **J. Toxicol. Environ. Health Part A**, v. 82, p. 1076-87, 2019, doi:10.1080/15287394.2019.1694113.
- SCHAUSS. AG et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). **J Agric Food Chem**. 2006 Nov v.54, n.22, p.:8604-10. doi: 10.1021/jf0609779. PMID: 17061840.
- SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – Características do Empreendedor. Acesso em: abril /2021. Site Disponível em: [Respostas.sebrae.com.br/a-importancia-do-acai-no-norte-do-brasil-e-o-vies-sustentavel-de-sua-producao/#:~:text=A%20explora%C3%A7%C3%A3o%20do%20a%C3%A7a%C3%AD%20%C3%A9,sustenta%C3%A7%C3%A3o%20econ%C3%B4mica%20das%20popula%C3%A7%C3%B5es%20ribeirinhas.&text=O%20forte%20crescimento%20do%20mercado,sido%20o%20indutor%20dessa%20expans%C3%A3o](https://respostas.sebrae.com.br/a-importancia-do-acai-no-norte-do-brasil-e-o-vies-sustentavel-de-sua-producao/#:~:text=A%20explora%C3%A7%C3%A3o%20do%20a%C3%A7a%C3%AD%20%C3%A9,sustenta%C3%A7%C3%A3o%20econ%C3%B4mica%20das%20popula%C3%A7%C3%B5es%20ribeirinhas.&text=O%20forte%20crescimento%20do%20mercado,sido%20o%20indutor%20dessa%20expans%C3%A3o).
- SEELEY, J.J.; GHOSH, S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. **J Leukoc Biol**, v.101, n.1., p. 107-119, 2017. doi: 10.1189/jlb.3MR0316-118RR.
- SHAH, K. N.; FARIDI, J. S. Estrogen, tamoxifen, and Akt modulate expression of putative housekeeping genes in breast cancer cells. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.125, n. 3-5, p.:219-25, 2011. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.03.005
- SHEU, M.-J. et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Dichondra repens* Forst. and its reference compounds. **Food Chem.**, c. 132, n.2, p.1010-18, 2012. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.140>.
- SHIM JY, KIM MH, KIM HD, AHN JY, YUN YS, SONG JY. Protective action of the immunomodulator ginsan against carbon tetrachloride-induced liver injury via control of oxidative stress and the inflammatory response. **Toxicol Appl Pharmacol**. v.242, n. 3, p:318-252010. doi: 10.1016/j.taap.2009.11.005.
- SILVA, D.F. et al. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. **BMC Comp. Altern Med** v. 14 , n.1, p.175, 2014. doi: 10.1186/1472-6882-14-175
- SILVEIRA, L.S. et al. Macrophage Polarization: Implications on Metabolic Diseases and the Role of Exercise. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.**, v. 26, n. 2, p. 115-132, 2016. doi:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2016015920.

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A.M. Carcinogenesis explained within the context of a theory of organisms. **Prog Biophys Mol Biol.** v.122, n.1, p.70-76, . 2016; doi:10.1016/j.pbiomolbio.2016.07.004

SPADA, P.D,S et al . Frozen fruit pulp of *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. **Journal of Medicinal Food**, v.12, n. 5, p., 2008. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0236>

STONER, G.D, WANG, L.S., CASTO ,B.C. Laboratory and clinical studies of cancer chemoprevention by antioxidants in berries. **Carcinogenesis**, v. 29, n.9, p. 1665-74, 2008.doi: 10.1093/carcin/bgn142.

STONER, G.D. Foodstuffs for preventing cancer: the preclinical and clinical development of berries. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 2, n.3, p. 187-94, 2009. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-08-0226. Epub 2009 Mar 3.

SUGANUMA, M, S. et al. Green Tea and Cancer Chemoprevention. **Mut. Res.**, v.428, n.1–2, p. 339–44, 1999. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(99\)00059-9](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(99)00059-9)

SURH YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat Rev Cancer**, v.3, n.10, p.:768-80, 2003. doi: 10.1038/nrc1189. PMID: 14570043.

TAKANASHI, K. et al. Epicatechin oligomers longer than trimers have anti-cancer activities, but not the catechin counterparts. **Sci. Rep.**, v. 7, p.7791, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-08059-x

TANG, L. et al. modulation of aflatoxin biomarkers in human blood and urine by green tea polyphenols intervention. **Carcinogenesis**, v.29, n.2, p.411–17., 2008. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn008>. 2008.

TELES, A.M et al. *Aniba rosaeodora* (Var. amazonica Ducke) essential oil: chemical composition, antibacterial, antioxidant and antitrypanosomal activity. **Antibiotics**, v.10, n.1, p.24, 2020. doi:10.3390/antibiotics10010024.

THANAN, R. et al.. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. **Int J Mol Sci.**, v.16, n.1, p.193-217, 2014. doi: 10.3390/ijms16010193.

VORONOV E, CARMY Y, APTE RN. The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. **Front Physiol.**, v. 5, p. 114, 2014. doi:10.3389/fphys.2014.00114

Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* 1985 Jan;45(1):1-8. PMID: 3880665.

WHO. 2012. “Global Cancer Observatory.” *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base.* 2012.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Breast cancer: prevention and control. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/> . Acesso em: 09 jan. 2021
- YAMAGUCHI, K.K.; PEREIRA, L.F.; LAMARÃO, C.V.; LIMA, E.S.; DA VEIGA-JUNIOR, V.F. Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. **Food Chem.**v.179, p.137-151, 2015.doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.055.
- YAMAGUCHI, M.; LEVY, R.M. The combination of catechin, baicalin and β -caryophyllene potentially suppresses the production of inflammatory cytokines in mouse macrophages in vitro. **Exp Ther Med** , 15, n.5, p. 4312-4318, 2019. doi:10.3892/etm.2019.7452..
- YANG, C. S.; WANG, H.. Mechanistic issues concerning cancer prevention by tea catechins. **Mol Nutr, Food Res.** v. 55, n. 6, p.819–31. 2011.<https://doi.org/10.1002/mnfr.201100036>. 2011.
- YING, L. et al. An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. *Cancer Res*, v. 67, p. 1407-10, 2007.
- YING, L., HOFSETH, L.J. An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. **Cancer Res.** v. 67, p. 1407-10, 2007. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2149. PMID: 17308075.
- YUAN, J.M. et al. “Green tea intake, ACE gene polymorphism and breast cancer risk among chinese women in Singapore.” **Carcinogenesis.** v. 26, n.8, p. 1389–94, 2005. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi080>. 2005.
- YUAN, Jian-Min, SUN, C.; BUTLER, L. M. Tea and cancer prevention: epidemiological studies. **Pharmacol Res,** v. 64, 2, p. 123–35, 2011.<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.03.002>. 2011.
- ZUGAZAGOITIA, J. Current Challenges in Cancer Treatment. **Clinical Therap,** v. 38, n.7, p. 1551-66, 2016