



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Talita Rodrigues Paraizo

**Investigação do potencial antitumoral de sementes e brotos de chia
(*Salvia hispanica* L.) sobre células de câncer de mama**

Rio de Janeiro

2024

Talita Rodrigues Paraizo

Investigação do potencial antitumoral de sementes e brotos de chia (*Salvia hispanica* L.) sobre células de câncer de mama

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Danielly Cristiny Ferraz da Costa

Coorientadora: Roberta Fontanive Miyahira

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

P222 Paraizo, Talita Rodrigues
Investigação do potencial antitumoral de sementes e brotos de chia (*Salvia hispanica* L.) sobre células de câncer de mama / Talita Rodrigues Paraizo. – 2024.
58 f.

Orientadora: Danielly Cristiny Ferraz da Costa.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Nutrição.

1. Nutrição – Teses. 2. Digestão – Teses. 3. Compostos Fenólicos – Teses.
I. Costa, Danielly C. Ferraz da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Nutrição. III. Título.

br

CDU 612.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Talita Rodrigues Paraizo

Investigação do potencial antitumoral de sementes e brotos de chia (*Salvia hispanica L.*) sobre células de câncer de mama

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 03 de julho de 2024.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a. Danielly Cristiny Ferraz da Costa (Orientadora)

Instituto de Nutrição - UERJ

Prof.^a Dr.^a. Marta Citelli dos Reis

Instituto de Nutrição - UERJ

Prof.^a Dr.^a. Julia Quarti Cardoso

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu toda força, sabedoria e serenidade para superar as dificuldades encontradas pelo caminho. Por não me fazer desistir e continuar firme na busca pelos meus objetivos. À minha família, por todo o apoio, incentivo e por sempre confiarem no meu potencial. Vocês são essenciais em minha vida e todas as minhas conquistas são graças e por vocês.

Às minhas queridas orientadoras, professoras Danielly Ferraz e Roberta Fontanive, por terem me aceito e me apresentado o mundo novo e enriquecedor da Nutrição Experimental e Compostos Bioativos. Obrigada por me aceitarem como mestranda nesta dissertação, mesmo com todos os obstáculos que surgiram. Agradeço por sempre se mostrarem preocupadas, solícitas e confiantes na minha capacidade.

Agradeço também às amigas que fiz nesse período e a toda ajuda que recebi, seja nas análises de bancada, na manipulação de células ou nas dúvidas sanadas com toda a paciência do mundo.

Obrigada ao meu amor, João Pedro Honorio, que embarcou nessa aventura de viver a dois e compartilhou comigo todas as fases do mestrado. Me apoiou nos momentos difíceis, me aconselhou, foi meu refúgio e aconchego quando achei que não conseguiria. Te agradeço imensamente pelo apoio, calma e horas que doou para me ajudar na conclusão deste objetivo. Sem você isso seria extremamente difícil. Te amo demais.

E por fim, agradeço à agência de fomento CAPES pelo financiamento da pesquisa e bolsa, que permitiram a minha dedicação exclusiva ao projeto. Muito obrigada a todos vocês!

RESUMO

PARAIZO, Talita Rodrigues. *Investigação do potencial antitumoral de sementes e brotos de chia (Salvia hispanica L.) sobre células de câncer de mama*. 2024. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A chia (*Salvia hispanica L.*) é uma planta herbácea cujos benefícios para a saúde são atribuídos principalmente às suas propriedades nutricionais, visto que é composta por uma quantidade considerável de proteínas, ácidos graxos poliinsaturados (principalmente ômega 3), fibras, minerais e diferentes compostos bioativos com ação antioxidante, como os compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são substâncias que apresentam reconhecida capacidade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, e podem ter sua atividade e bioacessibilidade alteradas ao passar pelas etapas do processo de digestão. Além disso, sua capacidade antioxidante também pode ser potencializada através de métodos como a germinação. O objetivo deste estudo foi investigar a capacidade antioxidante, o teor de compostos fenólicos e a atividade antitumoral de sementes e brotos de chia, antes e após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*. As amostras de brotos e sementes de chia foram submetidas ao processo de digestão simulada segundo o protocolo INFOGEST 2.0. O teor de compostos fenólicos foi determinado através do método de Folin-Ciocalteu, a atividade antioxidante através dos métodos FRAP, ABTS e DPPH, e a viabilidade celular através do método de redução de Alamar Blue®. Os resultados demonstraram maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos brotos de chia em relação às sementes antes da digestão, confirmando o papel importante da germinação neste processo. Observou-se que após a digestão simulada, os conteúdos fenólicos totais dos extratos de sementes e brotos de chia aumentaram durante a fase intestinal em cerca de 2,6 e 14 vezes, respectivamente, em comparação aos extratos antes da digestão. Com relação à atividade antioxidante, houve redução após a fase intestinal acima de 50% em todos os métodos analisados para as sementes de chia, com exceção do método ABTS, enquanto o broto apresentou aumento da atividade antioxidante em todos os métodos analisados. A viabilidade celular das linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 apresentou redução apenas ao serem expostas aos brotos de chia digeridos, em 38% e 10%, respectivamente. Dessa forma, os brotos de chia parecem ser opções benéficas à saúde, principalmente devido ao teor de fenólicos e antioxidantes associados.

Palavras-chave: Grãos germinados. Compostos fenólicos. Câncer. Semente. Digestão Simulada.

ABSTRACT

PARAIZO, Talita Rodrigues. *Investigation of the antitumor potential of chia seeds and sprouts (Salvia hispanica L.) on breast cancer cells*. 2024. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Chia (*Salvia hispanica* L.) is a herbaceous plant whose health benefits are mainly attributed to its nutritional properties, as it is composed of a considerable amount of proteins, polyunsaturated fatty acids (mainly omega 3), fibers, minerals and different bioactive compounds with antioxidant action, such as phenolic compounds. Phenolic compounds are substances that have recognized antioxidant, anti-inflammatory and antitumor capacity, and their activity and bioaccessibility can be altered when passing through the stages of the digestion process. In addition, their antioxidant capacity can also be enhanced through methods such as germination. The objective of this study was to investigate the antioxidant capacity, the content of phenolic compounds and the antitumor activity of chia seeds and sprouts, before and after the *in vitro* gastrointestinal digestion process. The samples of chia seeds and sprouts were subjected to the simulated digestion process according to the INFOGEST 2.0 protocol. The phenolic compound content was determined using the Folin-Ciocalteu method, the antioxidant activity was determined using the FRAP, ABTS and DPPH methods, and the cell viability was determined using the Alamar Blue® method. The results demonstrated a higher phenolic compound content and antioxidant activity of chia sprouts compared to seeds before digestion, confirming the important role of germination in this process. It was observed that after simulated digestion, the total phenolic contents of chia seed and sprout extracts increased during the intestinal phase by approximately 2.6 and 14 times, respectively, compared to extracts before digestion. Regarding antioxidant activity, there was a reduction after the intestinal phase of over 50% in all methods analyzed for chia seeds, with the exception of the ABTS method, while the sprout showed an increase in antioxidant activity in all methods analyzed. The cell viability of the MCF-7 and MDA-MB-231 tumor lines was reduced only when exposed to digested chia sprouts, by 38% and 10%, respectively. Thus, chia sprouts appear to be beneficial options for health, mainly due to the associated phenolic and antioxidant content.

Keywords: Sprouted grains. Phenolic compounds. Cancer. Seed. Simulated digestion.

RESUMEN

PARAIZO, Talita Rodrigues. *Investigación del potencial antitumoral de las semillas y brotes de chía (Salvia hispanica L.) sobre células de cáncer de mama*. 2024. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

La chía (*Salvia hispanica L.*) es una planta herbácea cuyos beneficios para la salud se atribuyen principalmente a sus propiedades nutricionales, ya que está compuesta por una cantidad considerable de proteínas, ácidos grasos poliinsaturados (principalmente omega 3), fibra, minerales y diferentes compuestos bioactivos con acción antioxidante, como los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos son sustancias que tienen reconocida capacidad antioxidante, antiinflamatoria y antitumoral, y su actividad y bioaccesibilidad pueden verse alteradas al atravesar las etapas del proceso de digestión. Además, su capacidad antioxidante también se puede potenciar mediante métodos como la germinación. El objetivo de este estudio fue investigar la capacidad antioxidante, el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antitumoral de las semillas y brotes de chía, antes y después del proceso de digestión gastrointestinal in vitro. Se sometieron muestras de brotes y semillas de chía al proceso de digestión simulada según el protocolo INFOGEST 2.0. El contenido de compuestos fenólicos se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu, la actividad antioxidante mediante los métodos FRAP, ABTS y DPPH y la viabilidad celular mediante el método Alamar Blue®. Los resultados demostraron un mayor contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en los brotes de chía en comparación con las semillas antes de la digestión, confirmando el importante papel de la germinación en este proceso. Se observó que después de la digestión simulada, el contenido fenólico total de los extractos de semillas y brotes de chía aumentó durante la fase intestinal aproximadamente 2,6 y 14 veces, respectivamente, en comparación con los extractos antes de la digestión. En cuanto a la actividad antioxidante, hubo una reducción después de la fase intestinal de más del 50% en todos los métodos analizados para las semillas de chía, con excepción del método ABTS, mientras que el brote mostró un aumento en la actividad antioxidante en todos los métodos analizados. La viabilidad celular de las líneas tumorales MCF-7 y MDA-MB-231 mostró una reducción solo cuando se expusieron a brotes de chía digeridos, en un 38% y un 10%, respectivamente. Por tanto, los brotes de chía parecen ser opciones beneficiosas para la salud, principalmente por el contenido fenólico y los antioxidantes asociados.

Palabras clave: Granos germinados. Compuestos fenólicos. Cáncer. Semilla. Digestión simulada.

PRINCIPAIS ACHADOS

Os achados do presente estudo fornecem novas informações para a utilização dos brotos de chia como uma opção de alimento com elevado valor nutricional, potencial antioxidante e possível potencial citotóxico contra células tumorais em cultura. Por meio da germinação, é possível potencializar os benefícios das sementes, como promover aumento do teor de compostos fenólicos e da capacidade antioxidante. No entanto, é importante ressaltar que a bioacessibilidade dos fenólicos e o potencial antioxidante das sementes e brotos são influenciados pelo processo de digestão *in vitro*. A exposição de células tumorais de mama à fração digerida dos brotos de chia resultou em uma redução da viabilidade celular, o que não foi observado quando as mesmas células foram expostas à fração bruta (não digerida). Nesse sentido, mais estudos são necessários para avaliação do potencial antitumoral de frações digeridas de alimentos, a fim de conhecer melhor os mecanismos envolvidos na liberação de compostos antioxidantes das matrizes alimentares e permitir o acesso da população a novas formas de terapias complementares.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
CFT	Conteúdo Fenólico Total
CO ₂	Dióxido de Carbono
DCNT	Doença Crônica Não Transmissível
DMBA	7, 12 - dimetilbenzantraceno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil1-picrilidrazil
EBC	Extrato de broto de chia
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FE	Ferro
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
FS	Fração Solúvel
FSG	Fluido Simulado Gástrico
FSI	Fluido Simulado Intestinal
FSS	Fluido Simulado Salivar
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAD	Glutamato Descarboxilase
GLOBOCAN	Observatório Global de Câncer
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial de Saúde

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Evolução do desenvolvimento do broto e <i>microgreen</i>	17
Figura 2 - As principais capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de tumores	22
Figura 3 - Efeitos celulares dos fitoquímicos no processo de carcinogênese	24
Figura 1 – Efeitos do extrato de sementes e brotos de chia não digeridos sobre a viabilidade celular da linhagem MCF-7.....	41
Figura 2 – Efeitos do extrato de sementes e brotos de chia não digeridos sobre a viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231	43
Figura 3 - Efeitos da fração digerida de sementes e brotos de chia sobre a viabilidade celular da linhagem MCF-7	44
Figura 4 - Efeitos da fração digerida de sementes e brotos de chia sobre a viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231	46
Tabela 1 - Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de sementes e brotos de chia, antes e após o processo de digestão simulada	38

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1.	REFERENCIAL TEÓRICO	14
1.1.	Chia	14
1.2.	Brotos de chia	16
1.3.	Papel dos compostos bioativos na saúde	19
1.4.	Câncer	21
1.5.	Potencial antitumoral de compostos bioativos	23
2.	JUSTIFICATIVA	27
3.	OBJETIVOS	28
3.1.	Objetivo geral	28
3.2.	Objetivos específicos	28
4.	MANUSCRITO	29
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
	REFERÊNCIAS	55

INTRODUÇÃO

A semente de chia (*Salvia hispanica L.*) é um alimento rico em compostos bioativos, proteínas, fibra alimentar e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), particularmente ácido graxo α -linolênico, pertencente à família dos ácidos graxos Ômega-3. Também é considerada uma boa fonte de antioxidantes devido à presença de polifenóis como os ácidos fenólicos, flavonóis e isoflavonas (HERNANDÉZ-PÉREZ et al, 2020; PELÁEZ et al, 2019).

Os compostos fenólicos presentes nas sementes de chia apresentam propriedades antialérgica, anti-inflamatória, antiproliferativa, antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante, além de atuarem na regulação da parada do ciclo celular e apoptose, etapas importantes no controle da progressão do câncer (GÓMEZ-FAVELA et al, 2017; HERNANDÉZ-PÉREZ et al, 2020).

O câncer é uma condição cada vez mais prevalente na população e a segunda maior causa de mortes em nível global. No mundo, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, e os números aumentam de forma alarmante. Dentre os mecanismos que podem desencadear o câncer está a interrupção do equilíbrio redox tecidual, que produz estresse oxidativo e ocasiona danos celulares (SUNG et al., 2021; INCA, 2022; SAHA et al., 2017).

Um estilo de vida mais saudável está intimamente ligado à melhoria dos hábitos alimentares. Atualmente, um dos meios adotados para se obter essa melhoria é o consumo de alimentos funcionais, presentes de forma cada vez mais frequente na dieta da população. Estes caracterizam-se por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutricional inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), incluindo o câncer (CROWE & FRANCIS, 2013). Tais alimentos, como a chia, são ricos em compostos bioativos, como fibras, fitoquímicos e antioxidantes, que previnem a oxidação lipídica nos alimentos e protegem as células contra a ação dos radicais livres (GUL; SINGH; JABEEN, 2016; KOH; HO; PAN, 2020).

Devido ao teor significativo de compostos bioativos, como os compostos fenólicos, e ácido graxos essenciais, como o ômega-3, a semente de chia pode apresentar potenciais efeitos antioxidantes e citotóxicos em linhagens celulares tumorais. No estudo de El Makawy et al. (2022), o óleo de chia encapsulado demonstrou efeitos positivos na

redução do estresse oxidativo, modulação da expressão de genes supressores de tumor e melhoria da arquitetura tecidual em animais com tumor de mama induzidos por DMBA (7, 12 - dimetilbenzantraceno). Os autores relataram também que o encapsulamento do óleo ajudou a aumentar a solubilidade e estabilidade dos compostos (EL MAKAWY, et al. 2022).

Em outro estudo que avaliou o efeito antioxidante e antitumoral de extratos metanólicos de semente de chia em células tumorais de mama MCF-7, foi observado que houve redução significativa da viabilidade celular após exposição por 24h, a partir da concentração de 10 µg/mL, e que o efeito inibitório foi dose-dependente até a concentração testada de 1000 µg/mL (MUTAR & ALSADOONI, 2019). Já no estudo de Ortega & Campos, com a mesma linhagem celular, só houve redução significativa da viabilidade celular com a exposição das células à concentração de 12,5 µg/mL de óleo de chia (ORTEGA & CAMPOS, 2020).

Atualmente, uma forma de melhoramento da funcionalidade das sementes é a germinação, a qual consiste em um bioprocesso simples e de baixo custo que causa alterações desejáveis na composição química e acessibilidade de nutrientes e compostos bioativos. Desta forma, aumentam-se os níveis de aminoácidos livres, fibra alimentar e outros componentes, visando melhorar o valor nutricional desses alimentos. Tal fenômeno ocorre devido ao aumento dos compostos bioativos e da atividade antioxidante associada a esses compostos (BELTRÁN-OROZCO; MARTÍNEZ-OLGUÍN; ROBLES-RAMÍREZ, 2020; CABRERA-SANTOS et al, 2021). Além disso, a bioacessibilidade dos fenólicos pode ser afetada por diferentes fatores, como a ação de enzimas e pH durante a digestão, fazendo com que os compostos estejam mais ou menos biodisponíveis durante o processo (ZHANG et al, 2020).

No estudo de Gómez-Favela et al. (2017), a germinação das sementes de chia por 6 dias gerou um aumento no teor de proteínas, compostos fenólicos, atividade antioxidante e GABA (ácido γ -aminobutírico), um aminoácido relacionado à ação antiproliferativa contra células cancerígenas e metástase, demonstrando o possível potencial benéfico de sementes germinadas no câncer (GÓMEZ-FAVELA et al, 2017).

Já no estudo de Calvo-Lerma et al. (2020), os autores observaram que a digestão gastrointestinal *in vitro* provoca mudanças na bioacessibilidade dos compostos bioativos de sementes e brotos de chia, levando em consideração o tamanho da substância a ser

digerida, o conteúdo lipídico associado e a rigidez da matriz alimentar. Como resultado, foi observado um aumento na composição fenólica de sementes e brotos de chia após a digestão gastrointestinal *in vitro*, com maior digestibilidade destes compostos nos brotos em relação às sementes. Além disso, houve diminuição da atividade antioxidante após a digestão nas duas estruturas analisadas (CALVO-LERMA et al., 2020).

Apesar de existirem estudos avaliando os efeitos da digestão gastrointestinal *in vitro* em sementes e brotos de chia, ainda não há investigações publicadas sobre os efeitos citotóxicos destas frações digeridas em células tumorais. Assim, o presente trabalho tem como objetivo investigar o potencial antitumoral de sementes e brotos de chia (*Salvia hispanica* L.) sobre células de câncer de mama humana (MCF-7 e MDA-MB-231), antes e após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*.

A presente dissertação será apresentada no formato de artigo e será submetido ao periódico científico *Plant Foods for Human Nutrition* (ISSN:1573-9104), com o título **“Capacidade antioxidante, teor de compostos fenólicos e potencial citotóxico de sementes e brotos de chia sobre células de câncer de mama, antes e após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*”**.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Chia

A chia (*Salvia hispanica L*) é uma planta herbácea, nativa do sul do México e norte da Guatemala, pertencente à família Lamiaceae, e que recentemente foi comercializada como cultura na América do Sul. Os benefícios para a saúde da semente de chia são atribuídos principalmente às suas propriedades nutricionais, visto que é composta por uma quantidade considerável de proteínas, ácidos graxos poliinsaturados, fibras alimentares, minerais e diferentes compostos bioativos com ação antioxidante, como compostos fenólicos, tocoferóis, esteróis, ácido gálico, ácidos p-cumáricos, ácido rosmarínico, cafeico, polifenólico, compostos de epicatequina, quercetina e kaempferol. Além disso, também contém quantidades consideráveis de GABA (ácido gama-aminobutírico), que possui propriedades antidiabéticas, anti-hipercolesterolemia, anti-hipertensivas, anti-inflamatórias, antidepressivas e efeitos antiproliferativos contra células cancerígenas (PAL; RAJ, 2020).

Outra característica importante da semente de chia é o teor de mucilagem, que forma uma camada espessa quando embebida em água, dando origem a uma espécie de gel, que fica ligado à semente e é composto majoritariamente por fibra solúvel. O gel formado é capaz de atuar como espessante, estabilizante e gelificante. Essa característica é responsável pela saciedade durante a ingestão e pelo seu alto potencial como ingrediente funcional a ser adicionado em alimentos, melhorando o valor nutricional de preparações. Além do formato de gel, também podem ser consumidas inteiras, como farinhas, óleos ou misturadas a outros alimentos (MUÑOZ et al., 2012; SALGADO-CRUZ et al., 2013).

Em relação ao conteúdo nutricional, o teor de proteínas e lipídeos das sementes de chia merecem destaque. São compostas por cerca de 19,6% de proteínas, principalmente glutelinas, albuminas e globulinas, além de boa composição de aminoácidos essenciais (PAL; RAJ, 2020); e 21 a 32% de lipídeos, sendo ricas em ácidos graxos poliinsaturados, principalmente ácido graxo linolênico (ômega 3), equivalente a cerca de 60% do teor total, e aproximadamente 20% de ácido linoléico (ômega 6) (PORRAS-LOAIZA et al., 2014). Entretanto, o valor de ácido linolênico pode diminuir do estágio inicial ao estágio maduro em até 23% (PAL; RAJ, 2020).

Em um estudo recente, pesquisadores sequenciaram o genoma da chia e descobriram que 29 genes estão relacionados à biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados e 93 genes contribuem para a propriedade gelificante de suas sementes. Além disso, também encontraram 2.707 genes altamente expressos na semente que provavelmente geram pequenos peptídeos bioativos derivados de proteínas. Quando a proteína da semente é digerida no trato intestinal, esses biopeptídeos são liberados e absorvidos pelo corpo e possuem propriedades potenciais que podem ajudar a aliviar condições humanas, como DM 2, HAS e até mesmo o câncer. Devido a estes fatores, as sementes de chia podem ser consideradas alimentos funcionais (GUPTA et al., 2023).

Outros componentes importantes nas sementes de chia são as fibras alimentares e minerais. A chia possui em torno de 30 a 34g de fibra em 100g de alimento, sendo a maior parte de fibra insolúvel (85-93%) e 7-15% de fibra solúvel, contribuindo no controle de hipercolesterolemia, diabetes, e obesidade, além da regulação do trânsito intestinal (PAL; RAJ, 2020). Os minerais encontrados em maior quantidade nas sementes de chia foram o fósforo, potássio, cálcio e magnésio, além de vitaminas como tiamina, riboflavina, niacina, vitamina E e ácido fólico. Porém, essas quantidades variam de acordo com o tipo de solo, umidade, clima e condições de cultivo (MARCINEK & KREJCIO, 2017; DA SILVA et al., 2016).

A semente de chia também é rica em compostos bioativos, com destaque para os compostos fenólicos, principalmente: ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido gálico, daidzeína, quercetina e kaempferol (OLIVEIRA-ALVES et al., 2017; MARTÍNEZ-CRUZ; PAREDES-LÓPEZ, 2014; REYES-CAUDILLO et al., 2008). Os compostos bioativos trazem diversos benefícios à saúde, e a composição fenólica é um fator responsável pela alta atividade antioxidante das sementes de chia, capaz de eliminar radicais livres e reduzir o estresse oxidativo. (MARTÍNEZ-CRUZ; PAREDES-LÓPEZ, 2014).

A camada externa das sementes pode dificultar a hidrólise de lipídios e proteínas e dificultar a liberação de compostos bioativos da matriz, reduzindo ainda mais a solubilização com os fluidos digestivos, limitando a biodisponibilidade geral. Logo, alternativas ao consumo direto de sementes de chia podem ser recomendadas. Alguns processos como imersão, germinação, moagem ou fermentação podem aumentar a sua digestibilidade. Entre essas alternativas, a germinação ganhou popularidade por ser um método econômico e simples que permite melhorar o valor nutricional das sementes,

incluindo aumento de compostos fenólicos, conteúdo mineral, proteínas e capacidade antioxidante (CALVO-LERMA et al., 2020; BELTRÁN-OROZCO; MARTÍNEZ-OLGUÍN; ROBLES-RAMÍREZ, 2020; GÓMEZ-FAVELA et al., 2017).

1.2. Brotos de chia

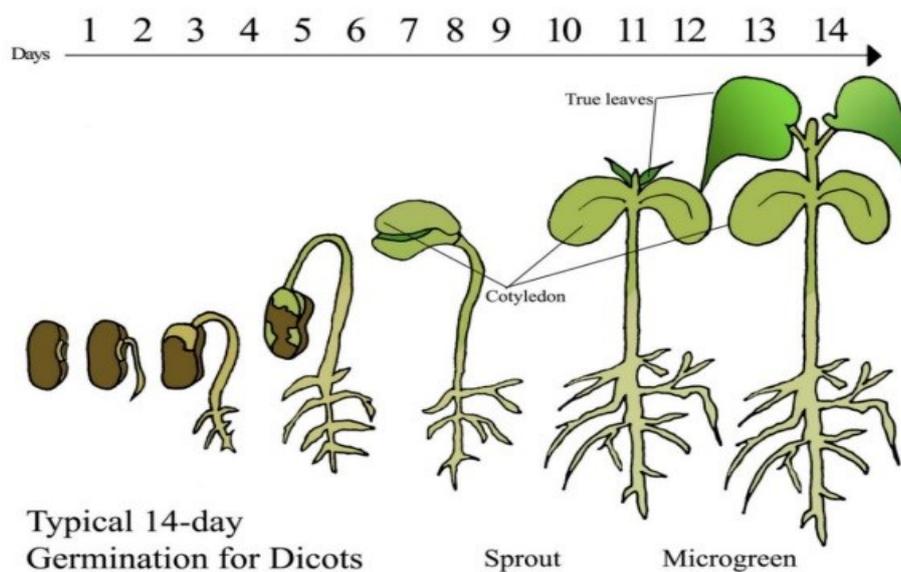
A germinação é um método de baixo custo e simples, no qual se adiciona água às sementes até que tenham desenvolvido o eixo embrionário. Não necessita de adubos, pode ser realizada em pequenos espaços, até mesmo no ambiente doméstico, e em condições climáticas não controladas (GENG et al., 2022). No entanto, alguns fatores ambientais influenciam a germinação, como a temperatura, salinidade, luz e umidade do solo (CABRERA-SANTOS et al., 2021).

O broto é o estágio avançado da germinação das sementes e, segundo o Regulamento da Comissão Europeia, é “o produto obtido da germinação das sementes e seu desenvolvimento em água ou outro meio, colhido antes do desenvolvimento das folhas verdadeiras e que se destina a ser comido inteiro, incluindo a semente” (EUROPEAN COMMISSION, 2013).

Apesar de simples, a germinação requer um acompanhamento cuidadoso para determinar as condições ideais que resultam em um produto seguro e de qualidade (IKRAM et al, 2021). Com relação à temperatura, autores observaram que a velocidade de germinação foi maior em temperaturas entre 25 e 30 °C, tanto na presença quanto na ausência de luminosidade (SORANA et al., 2019; STEFANELLO et al., 2015). Porém, em relação à exposição de luz, não há um consenso definido, pois autores empregaram protocolos diferentes de claro/escuro em seus estudos (ABDEL-ATY 2021; BELTRÁN-OROZCO; MARTÍNEZ-OLGUÍN; ROBLES-RAMÍREZ, 2020; GOMEZ-FAVELA, 2017; PAJAK et al, 2018)

A germinação está associada ao desenvolvimento do embrião para originar uma plântula, e é caracterizado por intensa atividade metabólica e pelo consumo de macronutrientes para posterior síntese de novos nutrientes usados para a nova planta (MAIA et al., 2020). Na figura 1, observa-se os estágios de desenvolvimento da semente ao longo dos dias de germinação, até o estágio de *microgreen*, onde pode-se verificar a presença das primeiras folhas verdadeiras (MAIA et al., 2020).

Figura 1 – Evolução do desenvolvimento do broto e *microgreen*



Fonte: RIGGIO et al., 2019.

Uma ampla gama de brotos tem sido estudada por seu alto valor nutricional e propriedades terapêuticas, e estão cada vez mais presentes na dieta de pessoas que buscam uma estreita relação entre alimentação, saúde e meio ambiente (EBERT, 2022). A germinação é uma estratégia eficaz de desenvolvimento de vegetais para aumentar o conteúdo de fitonutrientes nas sementes, porque reativa seu metabolismo, o que leva ao catabolismo, bem como à degradação de macronutrientes e estimula a síntese de metabólitos secundários que trazem benefícios à saúde (ALOO et al, 2021; GENG et al, 2022). A germinação é capaz de induzir enzimas a quebrar carboidratos, lipídios e proteínas em métodos básicos e estimula proteases envolvidas na digestão de proteínas, melhorando assim a bioacessibilidade de nutrientes (IKRAM et al, 2021).

Promover o consumo de brotos pode ser uma excelente estratégia para incluir alimentos de alto valor nutricional na dieta. Além disso, está de acordo com as diretrizes nutricionais atuais de alguns países que defendem dietas à base de plantas devido à sua relação positiva com a saúde e a sustentabilidade (MAGKOS; TETENS; GJEDSTED BÜGE, 2020).

Com relação à chia, seus brotos podem ser incluídos facilmente na alimentação em forma de saladas, temperos e farinhas (GÓMEZ-FAVELA et al., 2017). Estudos

mostram que a germinação da chia parece ser capaz de melhorar o valor nutricional e funcional das sementes, gerando o aumento do conteúdo proteico, de fibras, de compostos fenólicos e da capacidade antioxidante (BELTRÁN-OROZCO; MARTÍNEZ-OLGUÍN; ROBLES-RAMÍREZ, 2020; GÓMEZ-FAVELA et al., 2017).

Um parâmetro importante a ser considerado nesse processo é o tempo de germinação de cada broto, pois caso ultrapasse o limite considerado ideal, pode haver redução dos compostos bioativos presentes, como ocorrido no estudo de Beltrán-Orozco; Martínez-Olguín & Robles-Ramírez (2020), onde o conteúdo proteico aumentou em 13% durante as 48 horas iniciais e após esse tempo houve uma diminuição à medida que a germinação progrediu. Tal fenômeno pode ser explicado pelo possível uso de proteína para a obtenção de energia ou síntese de outros componentes necessários ao crescimento, além do aumento paralelo de fibras e compostos fenólicos (BELTRÁN-OROZCO; MARTÍNEZ-OLGUÍN; ROBLES-RAMÍREZ, 2020).

Já o conteúdo lipídico das sementes de chia após a germinação, apresentou um declínio significativo de 55,31%, segundo encontrado por Gómez-Favela et al (2017) (GÓMEZ-FAVELA et al., 2017). Em outro estudo, o declínio foi de 10% nos 2 primeiros dias de germinação e 21% no quarto dia (BELTRÁN-OROZCO; MARTÍNEZ-OLGUÍN; ROBLES-RAMÍREZ, 2020). Tal redução durante a germinação pode ser atribuída à produção de energia necessária para a atividade metabólica, como síntese de enzimas, DNA, RNA, proteínas estruturais e outras moléculas biológicas (HERCHI et al., 2015).

Autores observaram que os teores totais de compostos fenólicos e atividade antioxidante também aumentaram após a germinação (BELTRÁN-OROZCO; MARTÍNEZ-OLGUÍN; ROBLES-RAMÍREZ, 2020). Para Gómez-Favela et al (2017), o aumento observado no conteúdo fenólico total (CFT) após 6 dias foi de aproximadamente 47,4%, e de 96,7% na atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS. Além disso, um aumento de 11,4 vezes foi visto no conteúdo de GABA (GÓMEZ-FAVELA et al., 2017).

No estudo de Abdel-Aty et al. (2021) o teor de compostos fenólicos aumentou até o sétimo dia de germinação em 6,4 vezes e, posteriormente, esse conteúdo foi reduzido, possivelmente devido à conversão de fenólicos livres em fenólicos ligados ou consumidos para síntese de parede celular. A capacidade antioxidante também aumentou até o sétimo dia de germinação (ABDEL-ATY et al., 2021). Resultados semelhantes são vistos por

Pajałk et al. (2019), onde os fenólicos aumentaram de 0,92 mg GAE/g na semente para 4,40 mg GAE/g nos brotos de chia (PAJAŁK et al., 2019).

Dessa forma, observa-se que o consumo de brotos de chia pode promover um menor risco de desenvolvimento de DCNTs devido ao seu alto teor de fenólicos e antioxidantes associados (OLIVEIRA-ALVES et al., 2017).

1.3. Papel dos compostos bioativos na saúde

Os compostos bioativos são substâncias de origem vegetal que possuem diversas atividades biológicas benéficas à saúde, e tais benefícios derivam principalmente de sua capacidade antioxidante (MINATEL et al., 2017). Os compostos bioativos existentes podem ser divididos em diversas classes, como: compostos fenólicos, carotenóides, terpenóides, compostos nitrogenados (alcalóides, glicosídeos, glucosinolatos), dentre outros (YUAN et al., 2022).

O maior grupo entre os compostos bioativos encontrados nos vegetais são os compostos fenólicos, metabólitos secundários produzidos pelas plantas que estão relacionados a respostas de defesa contra agressões externas. Possuem reconhecida ação antioxidante promovendo a redução do estresse oxidativo (MINATEL et al., 2017).

Os compostos fenólicos são divididos de acordo com sua estrutura molecular, em dois grandes grupos: flavonóides (flavonóis, flavonas, flavan-3-óis, flavanonas, antocianidinas, isoflavonas); e não-flavonóides (ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas, lignanas). Quimicamente, os compostos fenólicos são constituídos de anéis aromáticos ligados a uma ou mais hidroxilas (ARNOSO; DA COSTA; SCHMIDT, 2019). O número e a posição do grupo hidroxila em um composto fenólico específico leva à variação em seu potencial antioxidante. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é atribuída à capacidade de eliminar os radicais livres, doar átomos de hidrogênio, elétrons ou cátions metálicos quelatos (MINATEL et al., 2017).

A concentração dos compostos fenólicos depende do tipo do vegetal, da estação do ano, estágios de desenvolvimento e maturação, colheita, condições de cultivo, de solo, armazenamento depois de colhidos, entre outros fatores (ARNOSO; DA COSTA; SCHMIDT, 2019; KOTECHA; TAKAMI; ESPINOZA, 2016).

Os polifenóis antioxidantes também podem exercer efeitos de supressão da produção de espécies reativas, reparando e/ou eliminando danos às células. Além da possibilidade de atuar induzindo a biossíntese de antioxidantes endógenos ou enzimas de defesa, bem como, inibir enzimas responsáveis pela geração endógena de espécies reativas de oxigênio (YAHFOUFI et al., 2018).

Além disso, alguns polifenóis como as lignanas, isoflavonas, quercetina e kaempferol são considerados fitoestrógenos, pois quando consumidos, são convertidos por enzimas metabólicas no intestino, a compostos semelhantes ao estrogênio humano 17β -estradiol. e competem pelo receptor de estrogênio.

Os efeitos dos compostos fenólicos na saúde dependem de muitos fatores, como sua estrutura química, interações com a matriz alimentar e liberação durante o processo digestivo gastrointestinal, bem como fatores genéticos e estado nutricional do hospedeiro. Assim, métodos de processamento que promovam a liberação de fenólicos da matriz alimentar podem ser uma boa estratégia para melhorar a bioeficácia de alimentos que contêm compostos fenólicos (TOMÉ-SÁNCHEZ, I.; MARTÍN-DIANA, 2020).

A bioacessibilidade de compostos fenólicos pode ser afetada por diferentes concentrações nos tecidos vegetais, variações na estrutura da parede celular e a ligação de compostos fenólicos na matriz alimentar. O pH dos fluidos oral, gástrico e intestinal desempenha um papel na atividade antioxidante dos fenólicos, pois a transição de um meio ácido para um alcalino pode aumentar a atividade antioxidante desses compostos devido à desprotonação das porções hidroxila dos anéis aromáticos. Além disso, a hidrólise enzimática no estômago e intestino pode contribuir para a liberação de outros compostos com atividade antioxidante, como peptídeos e aminoácidos livres (TOMÉ-SÁNCHEZ et al, 2021).

De acordo com alguns autores, os compostos fenólicos podem ser liberados das matrizes alimentares durante a digestão sob a ação da pepsina, tripsina e do pH ambiente, e então absorvidos no intestino, o que pode explicar o aumento de polifenóis durante as fases gástrica e intestinal. Tal efeito também pode ser observado em processos de digestão simulada de alimentos, onde as fases gástrica e entérica do processo digestivo são reproduzidas *in vitro* (ZHANG et al, 2020).

O consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos está associado a inúmeros benefícios à saúde humana, por possuírem reconhecida atividade antioxidante e anti-

inflamatória, além de reduzirem o risco de DCNTs, como o câncer (CROWE & FRANCIS, 2013).

1.4.Câncer

Atualmente, o câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Tal condição apresenta-se como um dos maiores problemas de saúde pública no cenário mundial e sua incidência e taxas de mortalidade aumentam de forma expressiva (SUNG et al., 2021). As transições demográfica e epidemiológica pelas quais a população está passando refletem diretamente neste aumento. A mudança nos modos de vida e hábitos alimentares da população, como o excesso de álcool, obesidade e sedentarismo, além da exposição a poluentes ambientais favorecem o aumento da incidência e da mortalidade por câncer (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020).

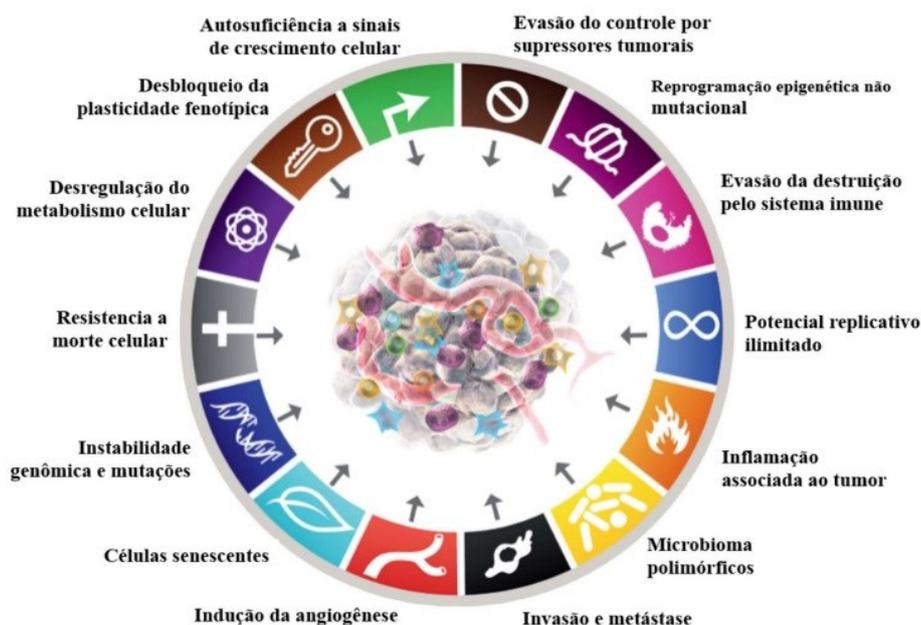
Segundo as estimativas do *Global Cancer Observatory* (Globocan), elaboradas pela *International Agency for Research on Cancer* (Iarc), em 2020, ocorreram 19,3 milhões de casos novos de câncer no mundo (FERLAY et al., 2020). O câncer de mama feminino é o mais incidente, correspondendo a 11,7% do total de novos casos, seguido pelo câncer de pulmão (FERLAY et al., 2021; SUNG et al., 2021). No Brasil, a estimativa para o triênio de 2023 a 2025 aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer, com destaque para o câncer de próstata em indivíduos do sexo masculino e do câncer de mama na população feminina (INCA, 2022).

As células tumorais de mama podem ser classificadas em positivas ou negativas para o receptor de estrogênio (do inglês, ER), o receptor de progesterona (do inglês, PR) e o fator de crescimento epidérmico humano 2 (do inglês, HER2), e essas proteínas têm relação direta com o prognóstico da doença e resposta à terapia de escolha. As células conhecidas como triplo-negativas não expressam receptores para nenhum dos hormônios listados anteriormente, o que dificulta a ligação de alvos terapêuticos na prática clínica e os tornam tipo de cânceres mais agressivos (CAMPOY et al, 2019)

O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação celular desordenada, com células que tendem a invadir outros tecidos e órgãos (INCA, 2019). Algumas características são adquiridas durante o desenvolvimento tumoral como: autossuficiência

a sinais de crescimento celular; desregulação do metabolismo e resistência à morte celular; mutações; inflamação; metástase, entre outras (Figura 2) (HANAHAN, 2022).

Figura 2 – As principais capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de tumores



Fonte: Adaptado de HANAHAN, 2022.

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são substâncias químicas altamente reativas formadas por moléculas de oxigênio reduzido que desempenham um papel importante nas vias de sinalização celular. Porém, um desequilíbrio entre a produção de EROS e a defesa antioxidante do organismo é considerado estresse oxidativo, que pode provocar danos moleculares e injúria tecidual. O estresse oxidativo tem sido relacionado à iniciação e progressão tumoral, induzindo danos e mutações ao DNA, inflamação, instabilidade do genoma e proliferação celular (SAHA et al., 2017).

Apesar da origem majoritariamente hormonal do câncer de mama, a produção de citocinas e a inflamação também estão sendo reconhecidas como importantes no desenvolvimento e na progressão desse tipo de câncer (FABIAN et al., 2015).

Nesse sentido, o consumo de alimentos ricos em compostos anti-inflamatórios e antioxidantes pode ser benéfico, atuando no controle de espécies reativas de oxigênio e redução do estresse oxidativo (PIOTROWSKI; KULCENTY; SUCHORSKA, 2020).

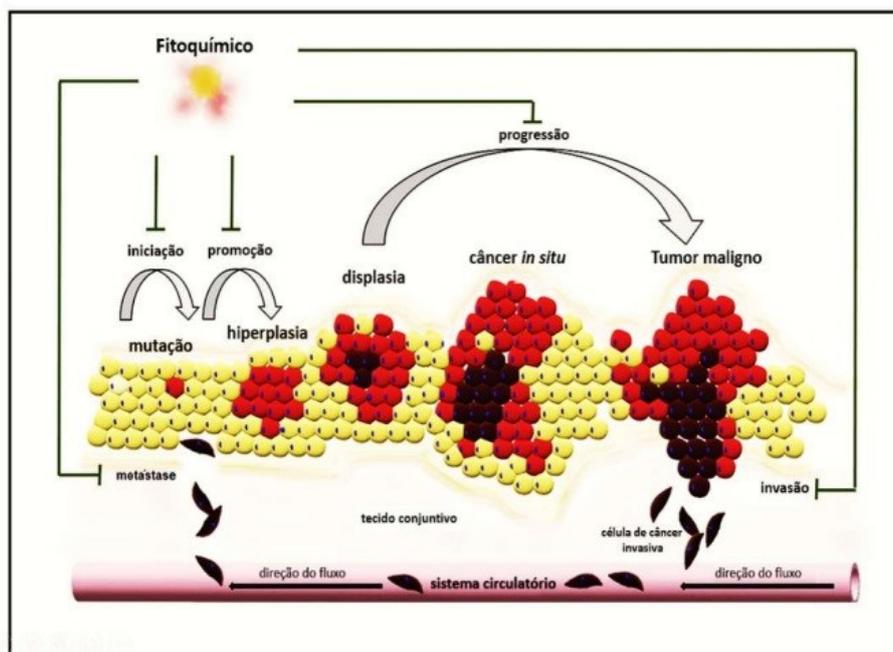
1.5. Potencial antitumoral de compostos bioativos

Inúmeras evidências epidemiológicas, clínicas e experimentais relacionam o câncer a fatores nutricionais. Esse fenômeno está atrelado a uma gama de compostos já identificados, obtidos através da dieta, que possuem potencial para estimular o crescimento tumoral. Contudo, é também através da dieta que podemos obter substâncias com ação protetora contra o câncer (KOH; HO; PAN, 2020). Tal efeito é atribuído aos compostos bioativos ou fitoquímicos, presentes naturalmente nos alimentos de origem vegetal, e possuem inúmeras atividades biológicas com benefícios à saúde, como a capacidade ativa de bloqueio e supressão de várias etapas do desenvolvimento tumoral (SHIRAHIGUE; CECCATO-ANTONINI, 2020).

Estudos mostram que o efeito antitumoral dos fitoquímicos resulta da capacidade destes compostos em: atuar modulando o estresse oxidativo e alterações epigenéticas, como metilação do DNA e acetilação de histonas; favorecer o reparo do DNA; regular a transcrição dos fatores NF-kB e STAT3; modular a microbiota intestinal; induzir a supressão tumoral por meio da supressão da angiogênese e indução de apoptose; inibir ou reduzir a proliferação celular; participar das vias de sinalização, por meio da interrupção da iniciação tumoral e proliferação; e atuar no estágio pré-maligno, inibindo ou retardando a progressão e a invasão tumoral (Figura 3) (KOH; HO; PAN, 2020; BOSS et al., 2016; GEORGE; CHANDRAN; ABRAHAMSE, 2021).

Os fitoquímicos podem atuar em três abordagens existentes envolvidas na quimioprevenção do câncer: quimioprevenção primária, secundária e terciária. A primária envolve intervenções destinadas a evitar que indivíduos saudáveis apresentem características de alto risco, como predisposição genética para prevenir o desenvolvimento de determinados tipos de câncer. A secundária é desenvolvida principalmente para o tratamento de tumores pré-malignos, para prevenir a progressão do câncer. A terciária visa apoiar os pacientes com histórico de câncer para prevenir novas recaídas do câncer ou o desenvolvimento de novos tumores primários (GEORGE; CHANDRAN; ABRAHAMSE, 2021).

Figura 3 – Efeitos celulares dos fitoquímicos no processo de carcinogênese



Fonte: Adaptado de KOH, HO & PAN, 2020.

Os fitoquímicos possuem potencial para atuar com efeito protetor, bem como para aumentar a eficácia da quimioterapia e, em alguns casos, melhorar alguns dos efeitos colaterais dos agentes quimioterápicos. Já foi relatado para alguns fitoquímicos específicos, oriundos de alimentos (resveratrol, quercetina, epigallocatequina-3-galato, curcumina, ácido gálico e ácido tânico), a atuação eficiente junto a fármacos, resultando na diminuição da proliferação, da sobrevivência celular e indução de apoptose das células de câncer (KOH; HO; PAN, 2020).

Além disso, alguns compostos bioativos como as lignanas, isoflavonas, quercetina e kaempferol são considerados fitoestrógenos, polifenóis derivados de plantas, que quando consumidos, são convertidos por enzimas metabólicas no intestino, a compostos com estrutura química semelhantes ao estrogênio humano 17β -estradiol, e por isso são capazes de reconhecer e interagir com os receptores de estrogênio. A microbiota intestinal modifica a estrutura química dos fitoestrógenos antes de sua absorção e faz com que tais compostos apresentem fraca atividade estrogênica e, às vezes, antiestrogênica. A ação antiestrogênica dos fitoestrógenos tem um efeito inibitório sobre a ligação do estrogênio com seu receptor (ER), que pode ser considerada um mecanismo primário pelo qual estes compostos previnem o câncer de mama (TANWAR et al., 2020).

Com relação à chia, diversos compostos bioativos podem estar relacionados ao possível potencial antitumoral associado, entre eles os compostos fenólicos, como o ácido rosmarínico; aminoácidos essenciais, como o ácido γ -aminobutírico (GABA); e ácidos graxos poliinsaturados, como o ácido linolênico (ômega 3) (NIKMARAM et al., 2017; MOTYKA et al., 2023).

O ácido graxo linolênico (ômega 3), além de sua reconhecida capacidade antiinflamatória, também pode contribuir para efeitos antitumorais em células de câncer de mama. Apesar de promover efeitos antioxidantes no corpo ao neutralizar a ação de radicais livres, em células tumorais, o ômega 3 parece estar associado a efeitos pró-oxidantes e apoptóticos (MANNI et al., 2015). No estudo conduzido por Fabian et al. (2015), a ingestão de ômega 3 foi inversamente proporcional ao risco de desenvolvimento e progressão da doença (FABIAN et al., 2015).

O ácido rosmarínico é um composto fenólico encontrado, entre outros alimentos, na semente de chia, que possui reconhecido potencial antitumoral com efeito apoptótico em várias linhagens celulares, incluindo as de câncer de mama (LI et al., 2018). Segundo alguns autores, suas concentrações aumentam durante a germinação, resultando em um potencial antioxidante ainda maior nos brotos (SALGADO et al., 2023; MOTYKA et al., 2023).

Outro composto com potencial antitumoral presente na semente de chia é o ácido γ -aminobutírico (GABA), um aminoácido não proteico de quatro carbonos, produzido pela descarboxilação de Ácido L-glutâmico, e considerado um dos principais neurotransmissores inibitórios no sistema nervoso central. Tem sido associado a diversos efeitos benéficos à saúde como efeitos antidiabéticos, antiinflamatórios, hipocolesterolêmicos, ação antiproliferativa e antimetastática contra células cancerígenas (NIKMARAM et al., 2017). Em um estudo avaliando os efeitos da germinação, foi observado que as concentrações de GABA também aumentaram em 11,4 vezes nos brotos de chia em comparação com as sementes, o que pode ser explicado pela catalisação da produção de GABA pela glutamato descarboxilase (GAD) durante a germinação (GÓMEZ-FAVELA et al., 2017).

Nesse sentido, autores têm realizado estudos com extratos de sementes e óleo de chia para avaliação da viabilidade celular em células tumorais. Os resultados apresentam

diferenças nas conclusões obtidas dependendo da forma em que são expostas às células, com redução significativa da viabilidade por extratos de sementes a partir da concentração de 10 µg/mL, enquanto no óleo de chia, apenas a menor concentração (12,5 µg/mL) obteve redução (MUTAR & ALSADOONI, 2019; ORTEGA & CAMPOS, 2020).

Outro aspecto que parece influenciar o potencial antitumoral de compostos bioativos é a liberação desses compostos da matriz alimentar no processo de digestão. Segundo autores, nos brotos de chia, a proteólise completa durante a digestão parece ser alcançada no final da fase gástrica. Este resultado é plausível, considerando que durante a germinação, as proteínas de armazenamento são hidrolisadas em peptídeos e aminoácidos por enzimas proteolíticas, levando ao aumento da bioacessibilidade deste composto e à atividade antioxidante associada. Tal aumento pode também apresentar efeito citotóxico em células tumorais (CALVO-LERMA et al., 2020).

Nesse sentido, ressalta-se a importância da realização de estudos *in vitro* para ampliar a compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão e controle do câncer, principalmente nos casos mais incidentes, como o câncer de mama.

2. JUSTIFICATIVA

O consumo de alimentos ricos em compostos bioativos, como a chia (*Salvia hispanica* L.), oferece benefícios à saúde devido aos componentes presentes, principalmente os compostos fenólicos, com reconhecida capacidade antioxidante e possível controle do desenvolvimento tumoral. Tal capacidade sofre influência de fatores como liberação da matriz alimentar, enzimas e reações que ocorrem no corpo durante a digestão. Além disso, técnicas que promovem o melhoramento de sementes, como a germinação, têm se apresentado como uma boa opção para a potencialização do efeito antioxidante destes alimentos.

O câncer de mama é uma doença com alta taxa de incidência na população. Independentemente da condição socioeconômica do país, a incidência desse câncer se configura entre as primeiras posições das neoplasias malignas femininas e merece atenção especial por parte de profissionais de saúde e pesquisadores.

Devido à escassez de artigos que avaliem a correlação do efeito antioxidante de sementes e brotos de chia com o câncer de mama, e a atividade biológica dos compostos bioativos presentes em tais alimentos após digestão simulada, torna-se necessária a elaboração de mais estudos para a investigação do possível potencial antitumoral destes alimentos após o processo de digestão.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Investigar a capacidade antioxidante, o teor de compostos fenólicos e o potencial citotóxico de sementes e brotos de chia sobre células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), antes e após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos:

- Determinar o teor de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante de sementes e brotos de chia, antes e após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*;
- Avaliar o efeito do extrato bruto e da fração digerida das sementes e brotos de chia, sobre a viabilidade celular nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231;
- Comparar os resultados obtidos entre sementes e brotos de chia, antes e após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*.

4. MANUSCRITO

Capacidade antioxidante, teor de compostos fenólicos e potencial citotóxico de sementes e brotos de chia sobre células de câncer de mama, antes e após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*

Talita Rodrigues Paraizo¹, Roberta Fontanive Miyahira¹, Vívian de Vasconcelos Lopes¹, Flavia de Oliveira Brito¹, Juliana Delvizio Vidal¹, Beatriz Neris Lima¹, Carolina Beres¹, Danielly Cristiny Ferraz da Costa¹

¹ Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro/RJ, Brasil

* Autor correspondente: Miyahira, RF. robertamiyahira@gmail.com. Endereço: Rua São Francisco Xavier, 524, 12º andar, sala 12006 D – Maracanã, Rio de Janeiro/RJ – CEP: 20550-013; telefone: (21) 2334-0679

RESUMO

A chia (*Salvia hispanica* L.) é uma planta herbácea cujos benefícios para a saúde são atribuídos principalmente às suas propriedades nutricionais, visto que é composta por uma quantidade considerável de proteínas, ácidos graxos poliinsaturados (principalmente ômega 3), fibras, minerais e diferentes compostos bioativos com ação antioxidante, como os compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são substâncias que apresentam reconhecida capacidade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, e podem ter sua atividade e bioacessibilidade alteradas ao passar pelas etapas do processo de digestão. Além disso, sua capacidade antioxidante também pode ser potencializada através de métodos como a germinação. O objetivo deste estudo foi investigar a capacidade antioxidante, o teor de compostos fenólicos e o potencial citotóxico de sementes e brotos de chia em células de câncer de mama, antes e após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*. As amostras de brotos e sementes de chia foram submetidas ao processo de digestão simulada segundo o protocolo INFOGEST 2.0. O teor de compostos fenólicos foi determinado através do método de Folin-Ciocalteu, a atividade antioxidante através dos métodos FRAP, ABTS e DPPH, e a viabilidade celular através do método de Alamar Blue®. Os resultados demonstraram maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos brotos de chia em relação às sementes antes da digestão, confirmando o papel importante da germinação neste processo. Observou-se que após a digestão simulada, os conteúdos fenólicos totais dos extratos de sementes e brotos de chia aumentaram durante a fase intestinal em cerca de 2,6 e 14 vezes, respectivamente, em comparação aos extratos antes da digestão. Com relação capacidade antioxidante, houve redução após a fase intestinal acima de 50% em todos os métodos analisados para as sementes de chia, com exceção do método ABTS, enquanto o broto apresentou aumento da capacidade antioxidante em todos os métodos analisados. A viabilidade celular das linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 apresentou redução apenas ao serem expostas aos brotos de chia digeridos, em 38% e 10%, respectivamente. Dessa forma, os brotos de chia parecem ser opções benéficas à saúde, principalmente devido ao teor de fenólicos e antioxidantes associados.

Palavras-chave: Grãos germinados. Compostos fenólicos. Câncer. Semente. Digestão Simulada.

1. Introdução

A semente de chia (*Salvia hispanica L.*) é um alimento rico em compostos bioativos, proteínas, fibra alimentar e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), particularmente ácido graxo α -linolênico, pertencente à família dos ácidos graxos Ômega-3. Também é considerada uma boa fonte de antioxidantes devido à presença de polifenóis como os ácidos fenólicos, flavonóis e isoflavonas [1, 2]

Os compostos fenólicos presentes nas sementes de chia apresentam propriedades antialérgica, anti-inflamatória, antiproliferativa, antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante, além de atuarem na regulação da parada do ciclo celular e apoptose, etapas importantes no controle da progressão do câncer [3, 1].

O câncer é uma condição cada vez mais prevalente na população e a segunda maior causa de mortes em nível global. No mundo, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, e os números aumentam de forma alarmante. Dentre os mecanismos que podem desencadear o câncer está a interrupção do equilíbrio redox tecidual, que produz estresse oxidativo e ocasiona danos celulares [4-6].

Um estilo de vida mais saudável está intimamente ligado à melhoria dos hábitos alimentares. Atualmente, um dos meios adotados para se obter essa melhoria é o consumo de alimentos funcionais, presentes de forma cada vez mais frequente na dieta da população. Estes caracterizam-se por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis, incluindo o câncer. Tais alimentos, como a chia, são ricos em compostos bioativos, como fibras, fitoquímicos e antioxidantes, que previnem a oxidação lipídica nos alimentos e protegem as células contra a ação dos radicais livres [7,8].

Devido ao teor significativo de compostos bioativos, como os compostos fenólicos, e ácido graxos essenciais, como o ômega-3, a semente de chia pode apresentar potenciais efeitos antioxidantes e citotóxicos em linhagens celulares tumorais. No estudo de El Makawy et al. [9], o óleo de chia encapsulado demonstrou efeitos positivos na redução do estresse oxidativo, modulação da expressão de genes supressores de tumor e melhoria da arquitetura tecidual em animais com tumor de mama induzidos por DMBA (7, 12 - dimetilbenzantraceno). Os autores relatam também que o encapsulamento do óleo ajudou a aumentar a solubilidade e estabilidade dos compostos [9].

Em outro estudo que avaliou o efeito antioxidante e antitumoral de extratos de semente de chia em células tumorais de mama MCF-7, foi observado que houve redução significativa da viabilidade celular após exposição por 24h, a partir da concentração de 10 µg/mL, e que o efeito inibitório foi dose-dependente até a concentração testada de 1000 µg/mL. Já no estudo de Ortega & Campos com a mesma linhagem celular, só houve redução significativa da viabilidade celular com a exposição das células a uma concentração de 12,5 µg/mL de óleo de chia [10, 11].

Atualmente, uma forma de melhoramento da funcionalidade das sementes é a germinação. Consiste em um bioprocesso simples e de baixo custo que causa alterações desejáveis na composição química e acessibilidade de vitaminas e minerais. Desta forma, aumentam-se os níveis de aminoácidos livres, fibra alimentar e outros componentes, visando melhorar o valor nutricional desses alimentos. Tal resultado ocorre devido ao aumento dos compostos bioativos e da atividade antioxidante associada a esses compostos [12, 13]. Além disso, a bioacessibilidade dos fenólicos pode ser afetada por diferentes fatores, como a ação de enzimas e pH durante a digestão, fazendo com que os compostos estejam mais ou menos biodisponíveis durante o processo [14].

No estudo de Gómez-Favela et al. [3], a germinação das sementes de chia por 6 dias gerou um aumento no teor de proteínas, compostos fenólicos, atividade antioxidante e GABA (ácido γ -aminobutírico), um aminoácido relacionado à ação antiproliferativa contra células cancerígenas e metástase, demonstrando o possível potencial benéfico de sementes germinadas no câncer [3].

Já no estudo de Calvo-Lerma et al. [15], os autores observaram que a digestão gastrointestinal *in vitro* provoca mudanças na bioacessibilidade dos compostos bioativos de sementes e brotos de chia, levando em consideração o tamanho da partícula a ser digerida, o conteúdo lipídico associado e a rigidez da matriz alimentar. Como resultado, foi observado um aumento na composição fenólica de sementes e brotos de chia após a digestão gastrointestinal *in vitro*, com maior digestibilidade destes compostos nos brotos em relação às sementes. Além disso, houve diminuição da atividade antioxidante após a digestão nas duas estruturas analisadas [15].

Apesar de existirem estudos avaliando os efeitos da digestão gastrointestinal *in vitro* em sementes e brotos de chia, ainda não há investigações publicadas sobre os efeitos citotóxicos destas frações digeridas em células tumorais. Assim, o presente trabalho tem

como objetivo investigar a capacidade antioxidante, teor de compostos fenólicos e potencial citotóxico de sementes e brotos de chia (*Salvia hispanica* L.) sobre células de câncer de mama humana (MCF-7 e MDA-MB-231), antes e após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Aquisição e germinação das sementes de chia (*Salvia hispanica* L.)

As sementes de chia foram adquiridas em comércio local e os experimentos realizados em triplicata. Antes do processo de germinação, 10 g de sementes de chia foram sanitizadas em solução de hipoclorito de sódio em temperatura ambiente por 10 minutos e depois lavadas com água filtrada. As sementes foram então colocadas dentro de uma bandeja plástica, contendo papel próprio para germinação de sementes. A germinação da semente de chia foi realizada à temperatura ambiente (25°–30° C), durante 12 horas no escuro e 12 horas na presença de luz. Foi borrifada água filtrada no período da manhã e da noite, de forma a manter a umidade constante. No sexto dia de germinação, as amostras foram coletadas e congeladas a – 80°C [16]. As sementes e brotos de chia foram liofilizados (Liofilizador modelo L-101, marca Liotop) e moídos até a obtenção de um pó fino que foi utilizado nas análises posteriores. Todos os resultados foram expressos em base seca.

2.2 Digestão simulada das sementes e brotos de chia

A digestão simulada foi realizada conforme o protocolo INFOGEST 2.0, que contempla três fases de digestão gastrointestinal *in vitro*: oral, gástrica e intestinal [17]. Para a execução do protocolo INFOGEST 2.0, inicialmente foram determinadas as atividades das enzimas digestivas e de concentração de sais biliares e preparadas as soluções de estoque de eletrólitos dos fluidos simulados salivar (FSS), gástrico (FSG) e intestinal (FSI) na concentração de 1,25x. Ambos os processos foram realizados conforme descrito por Minekus et al. [18]. Posteriormente foi iniciado o procedimento de digestão gastrointestinal *in vitro*). A primeira etapa realizada foi a fase oral, com duração de 30 minutos, na qual foram diluídos 5 g das amostras (semente ou broto de chia) no FSS na proporção de 1:1 (peso/peso) para obtenção de um produto pastoso deglutível. A amilase salivar foi adicionada na forma de saliva. O processo de mastigação foi simulado através de maceração com bastão de vidro. Após essa etapa, foi adicionado $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ para atingir a concentração total de 1,5 mM. Por fim, a solução foi incubada a 37°C, em incubadora com agitação, por 2 minutos. Em seguida, foi realizada a fase gástrica (2-3 horas), na qual foi aquecida a solução de estoque de FSG a 37°C e depois adicionada ao bolo oral na proporção de 1:1 (vol/vol). A partir de então, foi adicionado HCl 1M para

atingir o pH de 3,0 e, em seguida, a solução de $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ para atingir a concentração final de 0,15 mM em FSG. Posteriormente, foram adicionadas a solução de pepsina, para atingir, a atividade de 2000 U/mL na mistura de digestão final. Por fim, as amostras foram incubadas a 37°C, em incubadora com agitação, por 2h. Após, foi iniciada a fase intestinal com o aquecimento da solução de estoque de FSI em banho-maria a 37°C que foi adicionada ao quimo gástrico para atingir a proporção de 1/1 (vol/vol). Posteriormente, o pH foi ajustado para 7,0 a partir da adição de NaOH 1M e a solução biliar foi adicionada ao FSI/quimo gástrico para atingir a concentração final de 10 mM. Em seguida, essa solução foi para um misturador a 37°C por pelo menos 30 minutos para atingir a solubilização completa da bile. Após esse período, foi adicionada a solução de $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ para atingir a concentração de 0,6 mM em FSI. Em seguida, também foi adicionada pancreatina na solução FSI em quantidade necessária para atingir a atividade de tripsina de 100 U/mL na mistura final. As amostras foram então incubadas a 37°C, em incubadora com agitação, por 2h, a partir do ponto em que a pancreatina foi adicionada. Posteriormente, as amostras digeridas foram resfriadas em banho de gelo e centrifugadas a 4000 rpm, a 4°C, por 30 minutos, para obtenção da fração solúvel (FS). As análises de compostos fenólicos, atividade antioxidante e atividade antitumoral foram realizadas a partir da amostra resultante da fase intestinal da digestão.

2.3. Extração dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram extraídos da semente e do broto de chia antes da digestão gastrointestinal *in vitro* utilizando solução de metanol/água (80/20) na proporção de 1/10 (p/v) overnight sob agitação constante e em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram colocadas em uma centrífuga refrigerada (4000 rpm a 4°C) por 30 minutos. Os sobrenadantes foram evaporados completamente usando um evaporador rotativo a vácuo. As análises de teor de fenólicos totais e de atividades antioxidantes foram realizadas nos laboratórios do Instituto de Nutrição da UERJ.

2.4. Teor de fenólicos totais

Para determinação do teor de fenólicos totais nas amostras, foi utilizado o método Folin-Ciocalteu, descrito no trabalho de Singleton et al. [19]. com adaptação para microvolumes. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 20µL da amostra diluída em curva padrão ácido gálico e 100µL de Folin-Ciocalteu à 10%. Após cinco minutos, foram adicionados 75µL de carbonato de sódio à 7,5% e o conteúdo da placa foi

levemente agitado para homogeneização. A leitura da placa foi realizada a 740nm (Biochrom Asys UVM 340). Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico/g de amostra em base seca.

2.5. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada através de três métodos distintos: FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), ABTS (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil). O método FRAP foi realizado de acordo com o descrito por Müller et al. [20], com leitura a 595nm, e os resultados foram expressos em equivalente a sulfato ferroso (μM) por grama de amostra. Os métodos ABTS e DPPH foram determinados de acordo com Al-Duais et al. [21], com leitura de 730nm e 517nm, respectivamente. Os resultados foram expressos em atividade antioxidante equivalente de trolox para o método ABTS e percentual de atividade antioxidante para o método DPPH.

2.6. Preparo das amostras para ensaios de viabilidade celular

2.6.1. Amostra não digerida

Após a extração de compostos fenólicos das sementes e dos brotos de chia, o sobrenadante foi separado por filtração com funil de separação. O líquido filtrado foi submetido a um evaporador rotativo a vácuo e o produto obtido foi ressuscitado e diluído em meio de cultura DMEM. Foram feitas diluições seriadas do estoque com o meio de cultura, que foram preparadas imediatamente antes do uso.

2.6.2. Amostra digerida

Após a digestão simulada, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi separado da parte sólida por filtração com funil de separação e posteriormente passado através de um filtro de seringa de membrana de náilon com poro de 0,22 μm . Foram feitas diluições com 25%, 50% e 75% da fração digerida e seus respectivos brancos no meio de cultura DMEM.

2.7. Cultura de células

As linhagens tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) utilizadas foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) Gibco® contendo 4,5

g/L de glicose, suplementado com 2,0 g/L de HEPES, 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB) Gibco® e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) Gibco®, sendo submetidas a no máximo 20 passagens. As culturas foram mantidas a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

2.8. Tratamento das células

As células MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de 96 poços até a confluência de 60-70% e incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Após 24h, foram expostas à diferentes concentrações dos extratos de sementes e brotos de chia ou às frações digeridas das respectivas amostras, diluídos em meio de cultura, por 24h e 48h. As condições de controle foram mantidas apenas em meio de cultura.

2.9. Viabilidade celular por redução de Alamar Blue®

Após o tratamento, as células foram expostas a 10% do reagente de Alamar Blue® diluído em meio de cultura por 3 horas e mantidas a 37°C em estufa, na presença de 5% de CO₂. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro, a absorbância foi avaliada nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm, e os dados foram expressos em percentual de viabilidade em relação ao controle.

2.10. Análise estatística

A análise foi realizada em triplicata para todas as determinações. Os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão. Os dados foram analisados estatisticamente por meio do teste *t* de student para verificação das diferenças significativas. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação do teor de compostos fenólicos total e capacidade antioxidante

Os resultados referentes às análises de compostos fenólicos e capacidade antioxidante de sementes e brotos de chia estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 – Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de sementes e brotos de chia, antes e após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*

Amostras	Teor fenólico total (mg GAE/g)	ABTS (.M Trolox/g)	FRAP (.M Sulfato ferroso /g)	DPPH (%AA)
	Pré-digestão			
Média ± DP				
Semente	2.30 ± 0.03dD	31.55 ± 0.33dD	29.02 ± 0.34cC	31.95 ± 0.32cC
Broto	3.22 ± 0.02cC	58.89 ± 0.85cC	54.06 ± 0.48bB	69.20 ± 0.83bB
Pós-digestão				
Média ± DP				
Semente	5.98 ± 0.08bB	111.60 ± 1.98bB	7.87 ± 0.17dD	19.50 ± 2.17dD
Broto	44.95 ± 0.34aA	1107.00 ± 11.93aA	62.72 ± 0.82aA	145.50 ± 8.04aA

Legenda: Teor fenólico total: GAE/g equivalentes de ácido gálico por grama. FRAP: Método de potencial antioxidante redutor férrico, capacidade antioxidante equivalente; ABTS: Trolox, radical livre; DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, capacidade de absorção de radical oxigênio. DP - Desvio padrão. Letras minúsculas na mesma coluna representam diferença estatística entre sementes e brotos antes da digestão e sementes e brotos após a digestão. Letras maiúsculas na mesma coluna representam diferença estatística entre sementes antes e semente após a digestão e entre broto antes e broto após a digestão. Nível de significância $p < 0,05$.

Ao comparar os valores de sementes e brotos de chia antes da digestão, observando a influência da germinação, pode-se observar que ocorreu um aumento de 40% no teor de compostos fenólicos dos brotos comparado à semente. Já com relação à capacidade antioxidante (CA), houve aumento de pelo menos 86% pelos três métodos analisados, sugerindo que a germinação é capaz de gerar compostos fenólicos com capacidade antioxidante. Além disso, outros compostos podem ser formados durante a germinação da semente de chia além dos polifenóis, incluindo vitaminas e a ativação da clorofila, que possui alta CA [3, 22]. Resultados semelhantes foram encontrados em outro estudo conduzido por PAJAK et al [23], que observaram maior teor de polifenóis bioacessíveis em brotos do que em sementes de chia [23].

Beltrán-Orozco; Martínez-Olguín & Robles-Ramírez [12], observaram um aumento de 3 vezes no teor de fenólicos totais e aumento também na capacidade antioxidante de mais de 100% pelos métodos ABTS e DPPH, após 4 dias de germinação [12].

Resultados diferentes ao do presente estudo, com relação ao teor de compostos fenólicos totais foram encontrados por Salgado et al. [24], no qual o CFT foi reduzido nos brotos de chia cultivados por 3 e 6 dias em comparação às sementes não germinadas. Porém, em tal estudo, a germinação ocorreu com ausência de luz, o que pode ter impactado no teor de fenólicos final. Já a capacidade antioxidante aumentou na avaliação pelos métodos FRAP, ABTS e DPPH [24], semelhante ao presente estudo. Cabe ressaltar, que os valores da CA dos vegetais podem variar de acordo com a estação do ano, a região de cultivo e a variedade da semente, além de dependerem também do processo de germinação e do método de extração dos compostos [25].

Ao avaliar a influência da digestão, no presente estudo, observou-se que os conteúdos fenólicos totais de sementes e brotos de chia aumentaram após a fase intestinal da digestão gastrointestinal *in vitro* em cerca de 2,6 e 14 vezes, respectivamente, em comparação aos extratos antes da digestão. Calvo-Lerma et al [15] observaram que o CFT de brotos de chia também aumentaram após a fase entérica da digestão em aproximadamente 1,4 vezes e que seus polifenóis eram mais bioacessíveis que a semente inteira [15].

Em estudo avaliando brotos de outras matrizes alimentares, foi visto que o teor de compostos fenólicos de brotos de lentilha aumentou após a fase entérica da digestão, enquanto nos brotos de brócolis foi observada redução de CFT após a fase intestinal [26].

Com relação à capacidade antioxidante, houve redução após a fase intestinal em todos os métodos analisados para as sementes de chia, com exceção do método ABTS, que apresentou aumento na fase entérica quando comparada a semente antes da digestão. Os fluidos gástrico e intestinal interferem na capacidade antioxidante dos fenólicos devido à desprotonação das porções hidroxila dos anéis aromáticos. Uma possível explicação para a diminuição da CA nas sementes de chia após a digestão gastrointestinal *in vitro*, aponta para a degradação de outros componentes bioativos com capacidade antioxidante, apesar do aumento dos fenólicos totais. A redução na capacidade antioxidante também pode estar relacionada às moléculas bioativas liberadas interagindo entre si de forma antagônica [15].

Um estudo comparou a capacidade antioxidante de diferentes polifenóis e suas combinações. Os resultados mostraram que a maioria das atividades de eliminação de DPPH nessas combinações levou à redução da CA total quando diferentes compostos fenólicos são digeridos simultaneamente [27].

Os brotos de chia após a digestão apresentaram aumento significativo da CA em todos os métodos analisados, com destaque para o método ABTS, que resultou em um aumento de 18 vezes na capacidade antioxidante do broto após a digestão, em comparação ao extrato não digerido.

As diferenças entre os resultados de capacidade antioxidante podem estar relacionadas aos compostos formados após a digestão, suscetíveis a reações e radicais livres de acordo com cada método de avaliação antioxidante. Dessa forma, o maior resultado na avaliação da CA pelo método ABTS em todas as condições analisadas, pode ser explicado devido: à maior sensibilidade e reatividade deste método aos antioxidantes dos compostos fenólicos, à possibilidade de avaliação em amplas faixas de pH e à solubilidade do radical ABTS em água e solventes orgânicos, permitindo a determinação da capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos sem ser afetado pela força iônica. Além disso, o comprimento de onda utilizado em sua avaliação é maior, o que o torna menos sujeito à interferência de amostras coloridas [28].

No estudo de Miyahira et al. [26], a capacidade antioxidante de brotos de trigo avaliada pelos métodos ABTS e DPPH também aumentou após a digestão gastrointestinal *in vitro*. Entretanto, a avaliação pelo método FRAP apresentou redução na amostra digerida. Já os brotos de brócolis e lentilha apresentaram redução da CA pelos métodos FRAP e ABTS, demonstrando que os resultados podem variar de acordo com a matriz alimentar analisada [26].

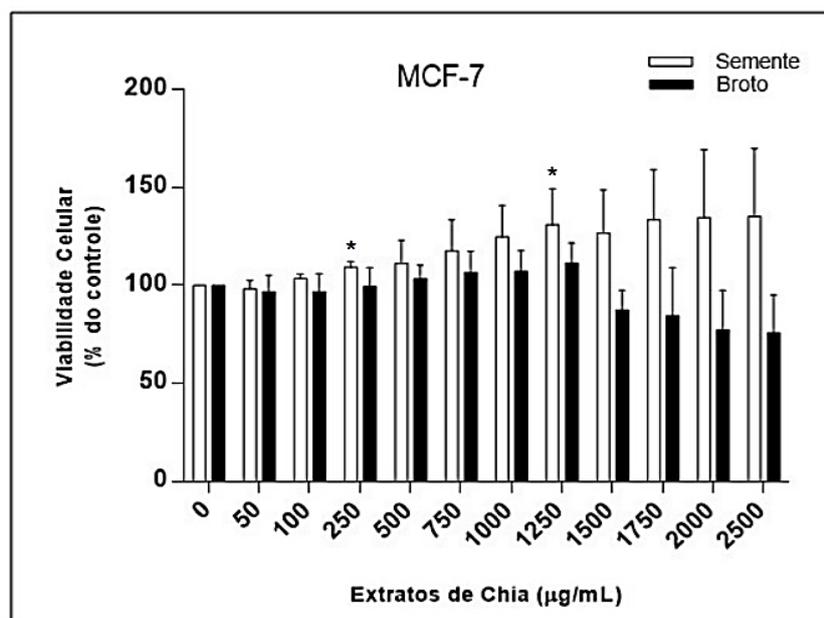
É importante ressaltar que condições como cinética de transporte, competição no local de absorção *in vivo* ou hidrólise da microbiota não são considerados no processo de digestão gastrointestinal *in vitro*, configurando uma limitação do estudo. Porém, os estudos que avaliam o efeito da digestão sobre a capacidade antioxidante em frações digeridas de alimentos ainda são reduzidos [29].

3.2. Avaliação do potencial citotóxico

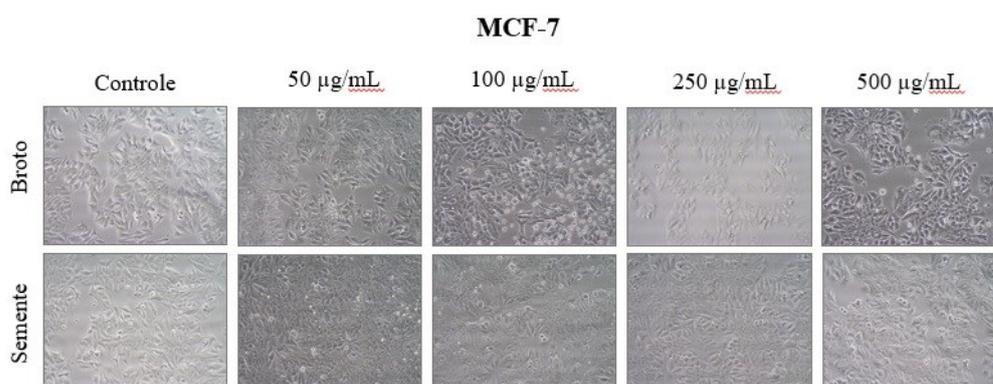
Com o objetivo de avaliar o efeito citotóxico dos extratos não digeridos de sementes e brotos de chia, sobre células tumorais de mama, as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram expostas a diferentes concentrações dos extratos, por 24h e 48h, e submetidas ao ensaio de viabilidade celular por redução do reagente de Alamar Blue®. Como não houve diferença nos ensaios de viabilidade entre os dois tempos, serão apresentados apenas os dados obtidos após 24h de exposição. Tais resultados estão apresentados na Figura 1.

Figura 1 – Efeitos do extrato de sementes e brotos de chia não digeridos sobre a viabilidade celular da linhagem MCF-7

A



B



Legenda: As células foram cultivadas em meio DMEM enriquecido com 10% SFB e 1% de ATB até atingirem a confluência de 70%. Depois, foram expostas a diferentes concentrações dos extratos de semente e brotos de chia diluídos no meio de cultura por 24 h. A viabilidade celular foi mensurada por Alamar Blue® após 24 h de exposição (A) e as imagens do tratamento foram obtidas em microscópio óptico com aumento de 20 x (B). Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão, comparando os tratamentos em relação ao controle (n=3). Foram considerados estatisticamente diferentes (*) aqueles em que $p < 0,05$.

A figura 1B mostra o efeito da exposição dos extratos de sementes e brotos de chia às células MCF-7 nas concentrações iniciais testadas. Comparando as imagens aos resultados da figura 1A, nota-se que não houve redução significativa com relação ao controle - e nas concentrações de 250 e 1250 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de semente de chia, a atividade mitocondrial aumentou. Pode-se inferir que, nessas condições, os extratos analisados não foram tóxicos para as células tumorais, pois não reduziram sua viabilidade.

No estudo de Ortega & Campos [11], no qual foram realizados tratamentos com óleo de semente de chia em células de câncer de mama MCF-7, houve aumento da viabilidade celular nas condições testadas entre 50 e 400 $\mu\text{g/mL}$, apresentando redução significativa apenas na menor concentração testada, de 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Isso pode ter ocorrido pois na presença de altas concentrações do óleo, as concentrações de ácido linoléico (ω 6) aumentam, o que demonstrou aumentar a proliferação de células de câncer de mama. Já em concentrações menores do óleo, parece haver predominância de ácido linolênico (ω 3) e consequente redução da viabilidade celular [11]. No estudo de Manni et al., foi visto que uma dieta com maior proporção n-3:n-6 é inversamente proporcional ao risco de desenvolvimento e progressão do câncer de mama [30].

Em outro estudo, foi avaliado o efeito do óleo de semente de chia na viabilidade de células de câncer de cólon (Caco2) e de câncer de mama (MCF-7) tratadas com diferentes concentrações de óleo hidrolisado (12,5–400 $\mu\text{g/mL}$) por 48 h, e observou-se que todas as concentrações de óleo de semente de chia reduziram significativamente a viabilidade de células de câncer de cólon (Caco2), cuja melhor redução foi de 23,88%, com a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$. Porém, em células MCF-7, as maiores concentrações (200 e 400 $\mu\text{g/mL}$) também aumentaram a viabilidade das células tumorais. Tal diferença pode estar relacionada ao tipo celular, visto que células tumorais intestinais parecem ser mais afetadas pela exposição aos compostos bioativos da chia do que células do tecido mamário [31].

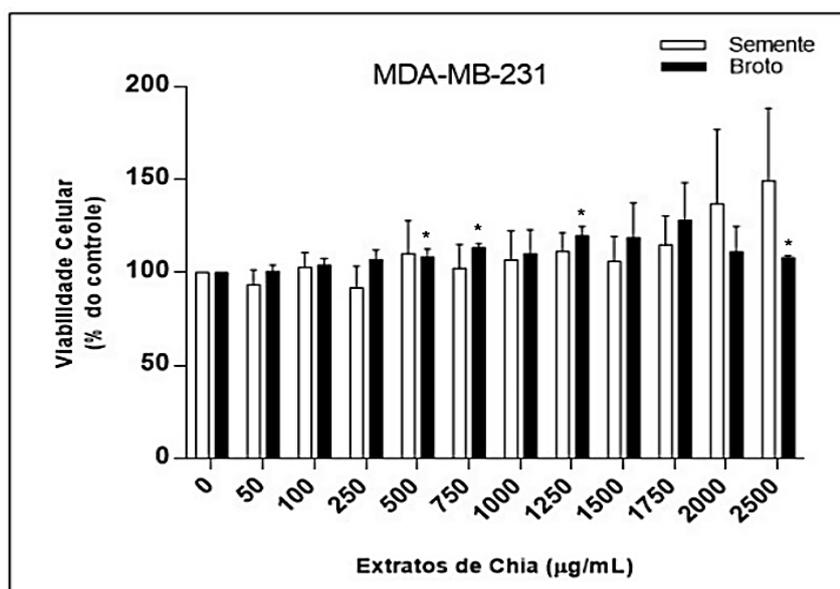
No caso do presente estudo, foi utilizado o extrato das sementes para o tratamento nas células, e não o óleo, porém, é possível que o teor de ácido linoléico presente nas sementes de chia também tenha sido o principal contribuinte para o aumento da viabilidade celular em concentrações mais elevadas [11].

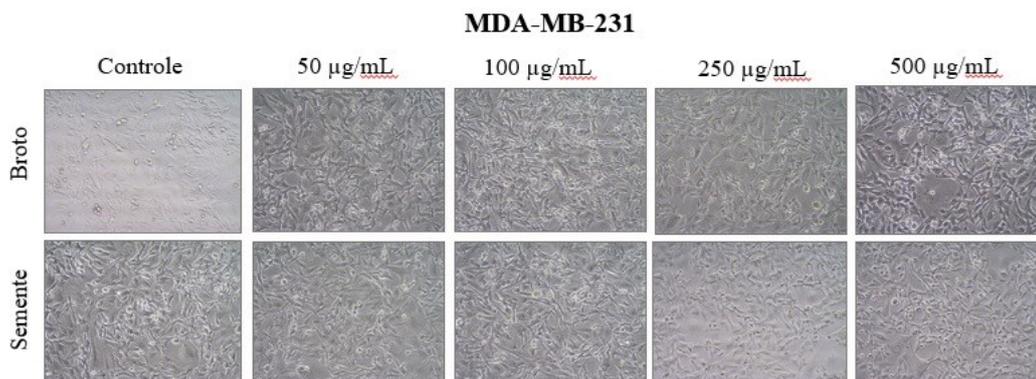
Em outro estudo, Mutar & Alsadooni [10] avaliaram o efeito antioxidante e antitumoral de extratos metanólicos de semente de chia em células tumorais de mama MCF-7, foi observado que houve redução significativa da viabilidade celular após exposição por 24h, a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, e que o efeito inibitório foi dose-dependente até a concentração testada de 1000 $\mu\text{g/mL}$ [10].

Após exposição das células MDA-MB-231 aos extratos brutos analisados, nenhuma das concentrações testadas apresentou redução significativa da viabilidade celular, e nas concentrações de 500, 750, 1250 e 2500 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de broto de chia, a atividade mitocondrial aumentou (Figura 2).

Figura 2 - Efeitos do extrato de sementes e brotos de chia não digeridos sobre a viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231

A



B

Legenda: As células foram cultivadas em meio DMEM enriquecido com 10% SFB e 1% de ATB até atingirem a confluência de 70%. Depois, foram expostas a diferentes concentrações dos extratos de semente e brotos de chia diluídos no meio de cultura por 24 h. A viabilidade celular foi mensurada por Alamar Blue® após 24 h de exposição (A) e as imagens do tratamento foram obtidas em microscópio óptico com aumento de 20 x (B). Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão, comparando os tratamentos em relação ao controle (n=3). Foram considerados estatisticamente diferentes (*) aqueles em que $p < 0,05$.

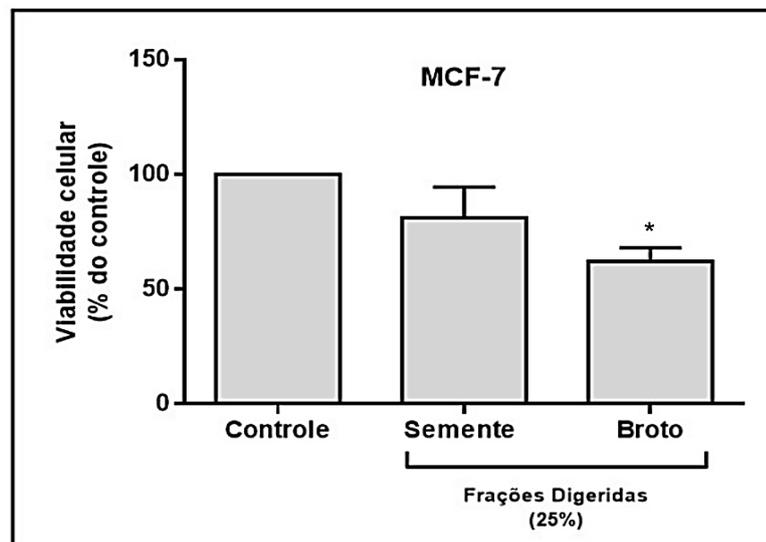
No estudo de González-Montoya et al. [32], que avaliou o potencial citotóxico de frações peptídicas de brotos de soja após 6 dias de germinação em células de câncer de mama, verificou-se que as células MDA-MB-231 foram mais sensíveis às frações peptídicas dos brotos que as células MCF-7 [32].

As frações digeridas das sementes e brotos de chia foram analisadas considerando como controle o valor do branco da digestão simulada, composto pela mesma quantidade em mililitros de água e enzimas, sem as amostras. Foram feitas diluições com 25% a 75% das frações digeridas e seus respectivos brancos, acrescentadas ao meio de cultura celular. Nestas condições, apenas a concentração a 25% do branco não foi tóxica para as células, e desta forma, serão apresentados apenas os resultados referentes ao tratamento nas concentrações de 25% das frações digeridas e seus respectivos brancos.

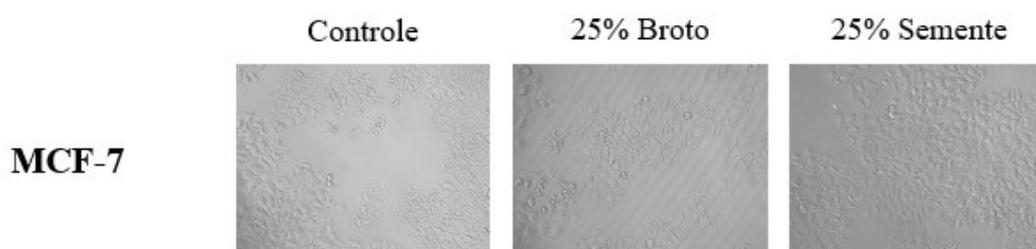
Os resultados da exposição das amostras digeridas às linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 estão demonstrados na Figura 3.

Figura 3 - Efeitos da fração digerida de sementes e brotos de chia sobre a viabilidade celular da linhagem MCF-7

A



B



Legenda: As células foram cultivadas em meio DMEM enriquecido com 10% SFB e 1% de ATB até atingirem a confluência de 70%. Depois, foram expostas a diferentes concentrações das frações digeridas de semente e brotos de chia diluídos no meio de cultura por 24 h. A viabilidade celular foi mensurada por Alamar Blue® após 24 h de exposição (A) e as imagens do tratamento foram obtidas em microscópio óptico com aumento de 20 x (B). Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão, comparando os tratamentos em relação ao controle (n=3). Foram considerados estatisticamente diferentes (*) aqueles em que $p < 0,05$.

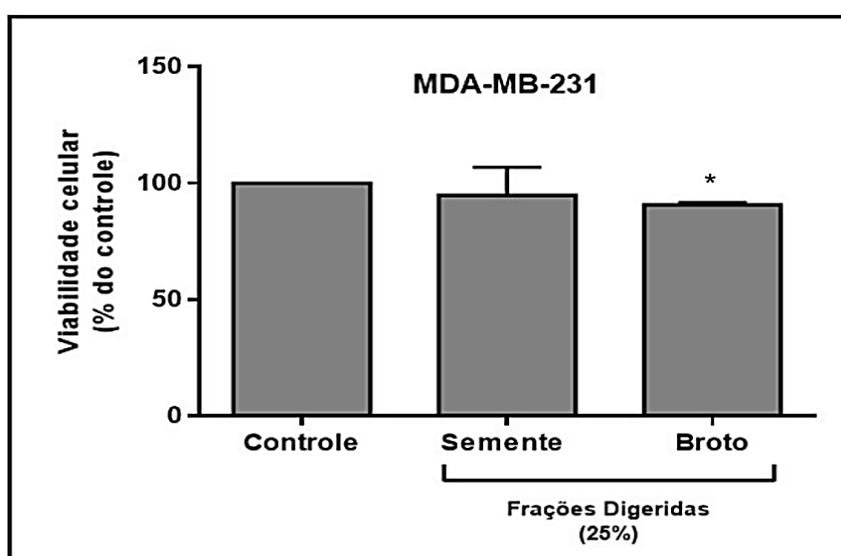
Nas células MCF-7, a exposição à concentração de 25% da fração digerida de brotos de chia resultou em redução significativa da viabilidade celular (aproximadamente 38%), quando comparadas ao controle (branco), enquanto a exposição à fração digerida das sementes não promoveu redução significativa (Figura 3). Percebe-se que, neste caso, o broto de chia foi mais tóxico às células do que a semente. Tal fato pode ser explicado, entre outros fatores, devido à semente possuir uma matriz alimentar mais rígida e,

portanto, mais difícil de ser hidrolisada durante a digestão, tornando seus compostos antioxidantes menos bioacessíveis [15].

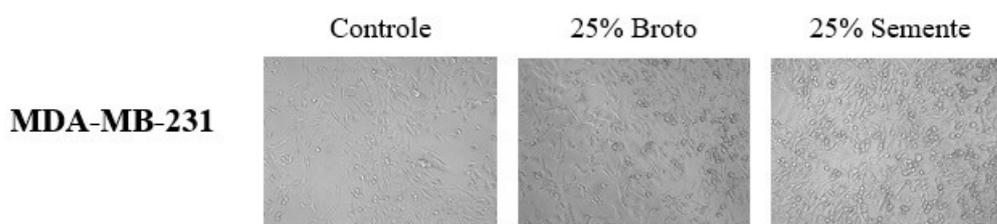
Resultado semelhante foi encontrado em células MDA-MB-231, nas quais apenas o broto digerido promoveu redução significativa da viabilidade celular, em cerca de 10% (Figura 4).

Figura 4 - Efeitos da fração digerida de sementes e brotos de chia sobre a viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231

A



B



Legenda: As células foram cultivadas em meio DMEM enriquecido com 10% SFB e 1% de ATB até atingirem a confluência de 70%. Depois, foram expostas a diferentes concentrações das frações digeridas de semente e brotos de chia diluídos no meio de cultura por 24 h. A viabilidade celular foi mensurada por Alamar Blue® após 24 h de exposição (A) e as imagens do tratamento foram obtidas em microscópio óptico com aumento de 20 x (B). Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão, comparando os tratamentos em relação ao controle (n=3). Foram considerados estatisticamente diferentes (*) aqueles em que $p < 0,05$.

Sabe-se que a germinação produz aumento de fitoquímicos como ácido rosmarínico e GABA, ambos com reconhecido potencial antitumoral. É possível que a ação de enzimas, pH e reações durante a digestão possam ter aumentado a concentração destes compostos tornando-os mais bioacessíveis [24, 33, 34].

Além disso, é importante lembrar que linhagens celulares tumorais positivas para receptores de estrogênio, como as células de mama MCF-7, podem sofrer efeito de fitoestrógenos presentes na chia, como a quercetina, kaempferol e daidzeína. Tais compostos podem ter seus teores aumentados com a germinação e se tornarem mais bioacessíveis após passarem pelo processo de digestão, o que explicaria o maior efeito citotóxico na linhagem MCF-7 após exposição aos brotos digeridos [10, 15, 35].

É importante ressaltar que não existem ainda estudos avaliando a fração digerida da chia e o efeito de seus compostos bioativos em células tumorais. Logo, a metodologia utilizada para a definição dos percentuais de frações digeridas e a forma de tratamento nas células precisam ser mais exploradas e aperfeiçoadas.

4. Conclusões

A germinação de sementes de chia pode resultar em mudanças significativas na composição nutricional dos brotos. Durante o processo de germinação, houve um aumento no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante em comparação às sementes. Além disso, a digestão mostrou ter influência na bioacessibilidade dos compostos, aumentando ainda mais o teor de compostos fenólicos de sementes e brotos de chia, e a atividade antioxidante em brotos. Os resultados também sugerem que os brotos de chia, após submetidos à digestão gastrointestinal *in vitro*, apresentam potencial citotóxico sobre células de câncer de mama. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar o potencial antitumoral de sementes e brotos de chia após a digestão. Portanto, os brotos de chia oferecem benefícios nutricionais, especialmente com relação aos compostos fenólicos e atividade antioxidante, o que os torna uma boa escolha para inclusão na dieta.

Referências

- [1] Hernández-Pérez T, Valverde M, Orona-Tamayo D, Paredes-Lopez O (2020) Chia (*Salvia hispanica*): Nutraceutical properties and therapeutic applications. *Proceedings* 53:17. doi:10.3390/proceedings2020053017
- [2] Peláez P, Orona-Tamayo D, Montes-Hernández S, Valverde ME, Paredes-López O, Cibrián-Jaramillo A (2019) Comparative transcriptome analysis of cultivated and wild seeds of *Salvia hispanica* (chia). *Sci Rep* 9(1):9761. doi: 10.1038/s41598-019- 45895-5
- [3] Gómez-Favela MA, Gutiérrez-Dorado R, Cuevas-Rodríguez EO, Canizalez-Román VA, Del Rosario León-Sicairos C, Milán-Carrillo J et al. (2017) Improvement of Chia Seeds with Antioxidant Activity, GABA, Essential Amino Acids, and Dietary Fiber by Controlled Germination Bioprocess. *Plant Foods Hum Nutr.* 2017;72: 345- 52. doi:10.1007/s11130-017-0631-4
- [4] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jema A et al. (2021) Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer Journal for Clinicians*, Hoboken, v. 71, n. 3, p. 209-249. doi: 10.3322/caac.21660
- [5] Inca. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA. (2022) O que é o câncer? Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Acessado em maio de 2022.
- [6] Saha SK, Lee SB, Won J, Choi HY, Kim K, Yang G et al. (2017). Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. *International Journal of Molecular Sciences*. 18, 1544. doi: 10.3390/ijms18071544
- [7] Gul K, Singh AK, Jabeen R. (2016) Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56:16, 2617-2627. doi: 10.1080/10408398.2014.903384
- [8] Koh YC, Ho C, Pan M. (2020) Recent advances in cancer chemoprevention with phytochemicals. *Journal of Food and Drug Analysis*, v.28, n. 1, p. 14-37. doi: 10.1016/j.jfda.2019.11.001
- [9] El Makawy AI, Mabrouk DM, Mohammed SE, Abdel-Aziem SH, EL-Kader HAA, · Sharaf HA et al. (2022) The suppressive role of nanoencapsulated chia oil against DMBA-induced breast cancer through oxidative stress repression and tumor genes expression modulation in rats. *Molecular Biology Reports*. 49:10217–10228. doi.org/10.1007/s11033-022-07885-1
- [10] Mutar HA, Alsadooni JFK. (2019) Antioxidant and anti-cancer activity of chia seed extract in breast cancer cell line. *Ann Trop & Public Health*; 22(8): S241. doi:10.36295/ASRO.2019.220818
- [11] Ortega AMM, Campos MRS. (2020) Effect of Chia Seed Oil (*Salvia hispanica* L.) on Cell Viability in Breast Cancer Cell MCF-7. *Proceedings*, 53, 18. doi:10.3390/proceedings2020053018

- [12] Beltrán-Orozco MC, Martínez-Olguín A, Robles-Ramírez MC. (2020) Changes in the nutritional composition and antioxidant capacity of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) during germination process. *Food Science and Biotechnology*, 29(6), 751–757. doi.org/10.1007/s10068-019-00726-1
- [13] Cabrera-Santos D, Ordoñez-Salanueva CA, Sampayo-Maldonado S, Campos JE, Orozco-Segovia A, Flores-Ortiz CM. (2021) Chia (*Salvia hispanica* L.) seed soaking, germination, and fatty acid behavior at different temperatures. *Agriculture* 11:1-16. doi:0.3390/agriculture11060498
- [14] Zhang Q, Xing B, Sun M, Zhou B, Ren G, Qin P. (2020) Changes in bio-accessibility, polyphenol profile and antioxidants of quinoa and djulis sprouts during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Sci Nutr* 8:4232–4241. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1718>
- [15] Calvo-Lerma J, Paz-Yépez C, Asensio-Grau A, Heredia A, Andrés A. (2020) Impact of Processing and Intestinal Conditions on in Vitro Digestion of Chia (*Salvia hispanica*) Seeds and Derivatives. *Foods*. 9, 290. doi.org/10.3390/foods9030290
- [16] Abdel-Aty AM, Elsayed AM, Salah HA, Bassuiny RI, Mohamed AS. (2021) Egyptian chia seeds (*Salvia hispanica* L.) during germination: Upgrading of phenolic profile, antioxidant, antibacterial properties and relevant enzymes activities. *Food Science and Biotechnology*, 30(5), 723–734. doi.org/10.1007/s10068-021-00902-2
- [17] Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Balance S et al. (2019) INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, vol 14, 991–1014. doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1
- [18] Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C. (2014) A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct*. 5, 1113. doi: 10.1039/c3fo60702j
- [19] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*. V.299, p.152 -178. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1
- [20] Müller L, Gnoyke S, Popken AM, Böhm V. (2010) Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 992–999. doi.org/10.1016/J.LWT.2010.02.004
- [21] Al-Duais M, Müller L, Böhm V, Jetschke, G. (2009) Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: Use of different assays. *European Food Research and Technology*, 228(5), 813–821. doi.org/10.1007/S00217-008-0994- 8/METRIC
- [22] Guzmán-Ortiz AF, Martín-Martínez ES, Valverde ME, Rodríguez-Aza Y, Berríos JDJ, Mora-Escobedo R. (2017) Profile analysis and correlation across phenolic

- compounds, isoflavones and antioxidant capacity during germination of soybeans (*Glycine max* L.). *CyTA-J. Food*. 15, 516–524. doi: 0.1080/19476337.2017.1302995
- [23] Pająk P, Socha R, Broniek J, Królikowska K, Fortuna T. (2019) Antioxidant properties, phenolic and mineral composition of germinated chia, golden flax, evening primrose, phacelia and fenugreek. *Food Chem* 275:69-76. doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.081
- [24] Salgado VSCN, Zago L, da Fonseca EN, Calderari MRCM, Citelli M, Miyahira RF. (2023) Chemical Composition, Fatty Acid Profile, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activity of Raw and Germinated Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*. doi: 10.1007/s11130-023-01115-0
- [25] Rychlik J, Olejnik A, Olkowicz M, Kowalska K, Juzwa W, Myszka K et al. (2015) Antioxidant capacity of broccoli sprouts subjected to gastrointestinal digestion. *J Sci Food Agric* 9:1892–1902. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6895>
- [26] Miyahira RF, de Lima Pena F, Fabiano GA, de Oliveira Lopes J, Ponte LGS, da Cunha DT. (2022) Changes in Phenolic Compound and Antioxidant Activity of Germinated Broccoli, Wheat, and Lentils during Simulated Gastrointestinal Digestion. *Plant Foods for Human Nutrition*, 77(2), 233–240. doi.org/10.1007/s11130-022-00970-7
- [27] Hidalgo M, Sánchez-Moreno C, De Pascual-Teresa, S. (2010) Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chem*. 2010, 121, 691–696. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.12.097
- [28] Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*. doi:10.1007/s00204-020-02689-3
- [29] Pena FL, Souza MC, Valle MCP, Bezerra R. (2020) Probiotic fermented milk with high content of polyphenols: study of viab and bioaccessibility after simulated digestion. *Int J Dairy Technol* 74:170–180. doi.org/10.1111/1471-0307.12735
- [30] Manni, A et al. (2015) Combination of Antiestrogens and Omega-3 Fatty Acids for Breast Cancer Prevention. *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2015/638645
- [31] Ortega AMM, Cocom LMC, Campos MRS. (2022) *Salvia hispanica* L. Seed Oil: Effect on Cell Viability in Colon Cancer Line Caco2 and Breast Cancer Line MCF7. *J Med Food*. 25(5):529-533. doi: 10.1089/jmf.2021.0114
- [32] González-Montoya M, Ramón-Gallegos E, Robles-Ramírez MC, Mora-Escobedo R. (2016) Evaluation of the Antioxidant and Antiproliferative Effects of Three Peptide Fractions of Germinated Soybeans on Breast and Cervical Cancer Cell Lines. *Plant Foods Hum Nutr*. 71(4):368-374. doi: 10.1007/s11130-016-0568-z
- [33] Motyka S, Kusznierevicz B, Ekiert H, Korona-Głowniak I, Szopa A. (2023) Comparative Analysis of Metabolic Variations, Antioxidant Profiles and Antimicrobial Activity of *Salvia hispanica* (Chia) Seed, Sprout, Leaf, Flower, Root and Herb Extracts. *Molecules*, 28(6), 2728. [doi: 10.3390/molecules28062728](https://doi.org/10.3390/molecules28062728)

- [34] Guan H, Luo W, Bao B, Cao, Y, Cheng, F, Yu S et al. (2022) A Comprehensive Review of Rosmarinic Acid: From Phytochemistry to Pharmacology and Its New Insight. *Molecules*, 27(10), 3292. doi: 10.3390/molecules27103292
- [35] Tanwar, A. K. et al. (2020). Engagement of phytoestrogens in breast cancer suppression: Structural classification and mechanistic approach. *European Journal of Medicinal Chemistry*. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.113037

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresenta um caráter original, ao avaliar o efeito citotóxico de frações digeridas de sementes e brotos de chia em células tumorais. No entanto, a fim de compreender melhor o possível potencial antitumoral destas frações digeridas, mais análises são necessárias.

Ensaio de proliferação, migração e morte celular nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 podem apresentar um novo ponto de vista sobre o possível potencial tumoral da fração digerida de sementes e brotos de chia, e novas concentrações dos extratos e frações digeridas podem ser testadas. Além disso, a investigação dos efeitos citotóxicos das frações digeridas às células não tumorais de mama, e em outras linhagens celulares tumorais, como as intestinais ou hepáticas, também parece útil.

Com relação ao conteúdo fenólico e atividade antioxidante, a identificação e quantificação dos compostos bioativos presentes nos extratos e frações digeridas de sementes e brotos, principalmente os com reconhecido potencial antitumoral, darão uma visão mais ampla sobre quais compostos são responsáveis pelas atividades biológicas em cada matriz vegetal.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-ATY, A. M. et al. Egyptian chia seeds (*Salvia hispanica* L.) during germination: Upgrading of phenolic profile, antioxidant, antibacterial properties and relevant enzymes activities. *Food Science and Biotechnology*, 30(5), 723–734, 2021.
- ALOO S, O. et al. Edible plant sprouts: health benefits, trends, and opportunities for novel exploration. *Nutrients* 13:1–24, 2021.
- ARNOSO, B. J. D.; DA COSTA, G. F.; SCHMIDT, B. Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. *Nutrição Brasil*, v. 18, n. 1, p. 39-48, 2019.
- BELTRÁN-OROZCO, M. C.; MARTÍNEZ-OLGUÍN, A.; ROBLES-RAMÍREZ, M. C. Changes in the nutritional composition and antioxidant capacity of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) during germination process. *Food Sci Biotechnol*. 29(6):751–757, 2020.
- BOSS, A. et al. Evidence to support the anti-cancer effect of olive leaf extract and future directions. *Nutrients*, v. 8, n. 8, p. 513, 2016.
- CABRERA-SANTOS, D. et al. Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed Soaking, Germination, and Fatty Acid Behavior at Different Temperatures. *Agriculture*, 11, 498, 2021.
- CALVO-LERMA, J. et al. Impact of Processing and Intestinal Conditions on in Vitro Digestion of Chia (*Salvia hispanica*) Seeds and Derivatives. *Foods*. 9, 290, 2020.
- CAMPOY, E. M. et al. Intratumor heterogeneity index of breast carcinomas based on DNA methylation profiles. *BMC Cancer*. 19: 238, 2019.
- CROWE, K. M. & FRANCIS, C. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*: 113.8: 1096-1103, 2013.
- DA SILVA, B. P., et al. Chia Seed Shows Good Protein Quality, Hypoglycemic Effect and Improves the Lipid Profile and Liver and Intestinal Morphology of Wistar Rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, v.71, n.3, p. 225–230, 2016.
- EBERT, A, W. Sprouts and microgreens-novel food sources for healthy diets. *Plants* 11:1–35, 2022.
- EL MAKAWY, A. et al. The suppressive role of nanoencapsulated chia oil against DMBA-induced breast cancer through oxidative stress repression and tumor genes expression modulation in rats. *Molecular Biology Reports*. 49:10217–10228, 2022.
- EUROPEAN COMMISSION (2013) Commission Implementing Regulation (EU) No 208/2013. OJEU. https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2013/208/oj. Accessed 11 April 2022.
- FABIAN, C. J. Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast Cancer Research*. 17:62, 2015.

FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview. *International Journal of Cancer*, New York, Apr. 2021.

FERLAY, J. et al. *Global cancer observatory: cancer today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020.

GENG, J. et al. Plant sprout foods: Biological activities, health benefits, and bioavailability. In *Journal of Food Biochemistry*, vol. 46, Issue 3, 2022.

GEORGE, B. P.; CHANDRAN, R.; ABRAHAMSE, H. Role of phytochemicals in cancer chemoprevention: Insights. *Antioxidants*, v. 10, n. 9, 2021.

GÓMEZ-FAVELA, M.A. et al. Improvement of Chia Seeds with Antioxidant Activity, GABA, Essential Amino Acids, and Dietary Fiber by Controlled Germination Bioprocess *Plant Foods Hum Nutr.* Dec;72(4):345-352, 2017.

GUL, K.; SINGH, A. K.; JABEEN, R. Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56:16, 2617-2627, 2016.

GUPTA, P. et al. Reference genome of the nutrition-rich orphan crop chia (*Salvia hispanica*) and its implications for future breeding. *Frontiers in Plant Science*, 10, 3389, 2023.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31– 46, 2022.

HERCHI, W. et al. Effects of germination on chemical composition and antioxidant activity of flaxseed (*Linum usitatissimum* L) oil. *Grasas Aceites* 66:e057, 2015.

HERNANDÉZ-PÉREZ, T. et al. Chia (*Salvia hispanica*): Nutraceutical Properties and Therapeutic Applications. *Proceedings*. 53, 17, 2020.

IKRAM, A. et al. Nutritional and end-use perspectives of sprouted grains: a comprehensive review. *Food Sci Nutr* 9:4617–4628, 2021.

INCA, Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. *ABC do Câncer: abordagens básicas para o controle do câncer*. 4. ed. rev. atual, 2019.

INCA. *Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil*. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA, Rio de Janeiro, 2022.

INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA. O que é o câncer? Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Acessado em maio de 2022.

KOH, Y. C.; HO, C.; PAN, M. Recent advances in cancer chemoprevention with phytochemicals. *Journal of Food and Drug Analysis*, v.28, n. 1, p. 14-37, 2020.

- KOTECHA, R.; TAKAMI, A; ESPINOZA, J. L. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: A review of the clinical evidence. *Oncotarget*, v. 7, n. 32, 2016.
- MAGKOS, F; TETENS, I; GJEDSTED BÜGE, S. A perspective on the transition to plant-based diets: a diet change may attenuate climate change, but can it also attenuate obesity and chronic disease risk? *Adv Nutr* 11:1–9, 2020.
- MAIA, Y. L. M et al. Saúde e sustentabilidade em grãos: Germinados, brotos e microgreens. 03(2), 147–157, 2020.
- MANNI, A. et al. Combination of Antiestrogens and Omega-3 Fatty Acids for Breast Cancer Prevention. *BioMed Research International*, 2015.
- MARCINEK, K.; KREJPCIO, Z. Chia seeds (*salvia hispanica*): health promoting properties and therapeutic applications-a review. *Rocz Panstw Zakl Hig*; v. 68, n.2, p.123-129, 2017.
- MARTÍNEZ-CRUZ, O., & PAREDES-LÓPEZ, O. Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1346, 43–48, 2014.
- MINATEL, I. O. et al. Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of processing and bioavailability. In: *Phenolic Compounds – Biological Activity*, v. 8, p. 1-24, 2017.
- MOTYKA, S. et al. Comparative Analysis of Metabolic Variations, Antioxidant Profiles and Antimicrobial Activity of *Salvia hispanica* (Chia) Seed, Sprout, Leaf, Flower, Root and Herb Extracts. *Molecules*, 28(6), 2728, 2023.
- MUÑOZ, L. et al. Chia seeds: microstructure, mucilage extraction and hydration. *J Food Eng* 108:216–224, 2012.
- MUTAR, H. A. & ALSADOONI, J. F. K. Antioxidant and anti-cancer activity of chia seed extract in breast cancer cell line. *Ann Trop & Public Health*; 22(8): S241, 2019.
- NIKMARAM, N. et al. Recent advances in γ -aminobutyric acid (GABA) properties in pulses: an overview. *J Sci Food Agric* 97:2681-9, 2017.
- OLIVEIRA-ALVES, S. C. et al. Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, fiber flour and oil. *Food Chemistry*, 232, 295–305, 2017.
- ORTEGA, A. M. M. & CAMPOS, M. R. S. Effect of Chia Seed Oil (*Salvia hispanica* L.) on Cell Viability in Breast Cancer Cell MCF-7. *Proceedings*, 53, 18, 2020.
- PAJAŁ, P. et al. Antioxidant properties, phenolic and mineral composition of germinated chia, golden flax, evening primrose, phacelia and fenugreek. *Food Chemistry*, 275, 69–76, 2019.

- PAL, D.; RAJ, K. Chia seed in health and disease prevention: present usage and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(9), 4123, 2020.
- PELÁEZ, P. et al. Comparative transcriptome analysis of cultivated and wild seeds of *Salvia hispanica* (chia). *Scientific Reports*. 9:9761, 2019.
- PIOTROWSKI, I.; KULCENTY, K. SUCHORSKA, W. Interplay between inflammation and cancer. *Reports of practical Oncology and Radiotherapy*, v. 25, n.3, p 422-427, 2020.
- PORRAS-LOAIZA, P. et al. Physical properties, chemical characterization and fatty acid composition of Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 571–577, 2014.
- REYES-CAUDILLO, E., TECANTE, A., VALDIVIA-LÓPEZ, M. A. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107(2), 656–663, 2008.
- RIGGIO, G. M. et al. Microgreens—A review of food safety considerations along the farm to fork continuum. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 76–85, 2019.
- SAHA, S. K. et al. Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. *International Journal of Molecular Sciences*. 18, 1544, 2017.
- SALGADO, V. S. C. N. et al. Chemical Composition, Fatty Acid Profile, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activity of Raw and Germinated Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2023.
- SALGADO-CRUZ, M. P. et al. Chia (*Salvia hispanica* L.) seed mucilage release characterisation. A microstructural and image analysis study. *Industrial Crops and Products*, 51, 453–462, 2013.
- SHIRAHIGUE, L. D.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Agro-industrial wastes as sources of bioactive compounds for food and fermentation industries. *Ciencia Rural*, v.50, n.4, 2020.
- SORANA, C. K. P. D. M. et al. Effects of temperature, substrate and luminosity conditions on chia seed germinations. *Revista Caatinga*, 32(2), 411–418, 2019.
- STEFANELLO, R. et al. Germinação e vigor de sementes de chia (*Salvia hispanica* L.-Lamiaceae) sob diferentes temperaturas e condições de luz. In *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v. 17, n. 4, 1182– 1186, 2015.
- SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer Journal for Clinicians*, Hoboken, v. 71, n. 3, p. 209-249, Feb. 2021.

TANWAR, A. K. et al. Engagement of phytoestrogens in breast cancer suppression: Structural classification and mechanistic approach. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020.

TOMÉ-SÁNCHEZ, I.; MARTÍN-DIANA, A. B.; Peñas E. Soluble phenolic composition tailored by germination conditions accompany antioxidant and anti-inflammatory properties of wheat. *Antioxidants* 9:1–20, 2020.

TOMÉ-SÁNCHEZ, I. et al. Bioprocessed wheat ingredients: characterization, bioaccessibility of phenolic compounds, and bioactivity during in vitro digestion. *Front Plant Sci* 12:790898, 2021.

WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. (ed.) *World cancer report: cancer research for cancer prevention*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020.

YAHFOUFI, N. et al. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*, v. 10, n. 11, p. 1–23, 2018.

YUAN, M. et al. The Role of Bioactive Compounds in Natural Products Extracted from Plants in Cancer Treatment and Their Mechanisms Related to Anticancer Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2022, p. 1429869, 2022.

ZHANG, Q. et al. Changes in bio-accessibility, polyphenol profile and antioxidants of quinoa and djuilis sprouts during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Sci Nutr* 8:4232–4241, 2020.