

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO RICO EM DITERPENOS
OBTIDO A PARTIR DE *Mikania glomerata* Sprengel COMPLEXADO
À β -CICLODEXTRINA.**

ANGELA VALÉRIA FARIAS ALVES

Aracaju
Março – 2019

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO RICO EM DITERPENOS
OBTIDO A PARTIR DE *Mikania glomerata* Sprengel COMPLEXADO
À β -CICLODEXTRINA.**

Tese de doutorado submetida à banca
examinadora para obtenção de título de
Doutor em Saúde e Ambiente, na área de
concentração Saúde e Ambiente.

ANGELA VALÉRIA FARIAS ALVES

Orientadores:

**Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior
Profa. Dra. Juliana Cordeiro Cardoso**

Aracaju
Março – 2019

A474a Alves, Angela Valéria Farias
Atividade antitumoral do extrato rico em diterpeno obtido a partir de
Mikania glomerata Sprengel complexado à β -Ciclodextrina / Angela Valéria
Farias Alves; orientação [de] Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de
Albuquerque Júnior, Prof.^a Dr.^a Juliana Cordeiro Cardoso– Aracaju: UNIT,
2019.

85 f. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes,
2019
Inclui bibliografia.

1. Produtos naturais. 2. *Mikania glomerata*. 3. Diterpeno 4. Anticâncer. I.
Alves, Angela Valéria Farias. II. Albuquerque Júnior, Ricardo Luiz Cavalcanti
de. (orient.). III. Cardoso, Juliana Cordeiro. (orient.) IV. Universidade
Tiradentes. V. Título.

CDU: 606: 615. 277

SIB- Sistema Integrado de Bibliotecas

ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO RICO EM DITERPENOS OBTIDO A PARTIR DE *Mikania glomerata* Sprengel COMPLEXADO À β -CICLODEXTRINA.

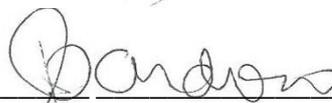
Angela Valéria Farias Alves

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:



Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc
Orientador



Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc
Orientadora



Adriana Karla de Lima, D.Sc
Universidade Tiradentes

Patrícia Severino, D.Sc
Universidade Tiradentes



Margarete Zanardo Gomes, D.Sc
Universidade Tiradentes



Francine Ferreira Padilha, D.Sc
Universidade Tiradentes

Klebson Silva Santos, D.Sc
Universidade Tiradentes (Suplente)

Edna Aragão Farias Cândido, D.Sc
Universidade Tiradentes (Suplente)

Aracaju
Março – 2019

DEDICATÓRIA

A Deus, meu bem maior;
À minha amada mãe Maria Alves, exemplo de
mulher e admirável ser humano.

*"A ciência será sempre uma busca, jamais uma descoberta.
É uma viagem, nunca uma chegada."*

(Karl Popper)

AGRADECIMENTOS

Uma etapa é concluída e com ela o coração chama ao reconhecimento! Grata àqueles que estenderam a mão, grata àqueles que com palavras ajudaram na caminhada.

Agradecida ao bondoso Deus e Pai por sempre me amparar, por renovar as minhas forças e me ajudar a superar os momentos mais difíceis e me permitir transcorrer essa jornada e chegar ao fim dela com louvor.

À minha família pelo apoio, e em especial a uma grande mulher, exemplo de força, doação, humildade; minha mãe! Obrigada pelo belo ser humano que é, e pelo amor no reconhecimento diário dos meus esforços, obrigada por transmitir valores para formar esta modesta filha. Amo-te!

Ao professor Ricardo Albuquerque, pela confiança ao longo desses 10 anos. Lembro-me como se fosse ontem a primeira vez que acreditou no potencial daquela garota tímida. E marcado pela característica de homem visionário, possibilitou a construção da minha carreira científica. Embora muitas vezes eu entrasse “muda e saísse calada” do laboratório, ou até mesmo “tremesse e congelasse” ao ressoar de um notório: “Angeliinha!”, conheci um admirável humorado homem, amante da música e da patologia e que perpassa pelo significado da palavra benevolência e faz questão de exercê-la. Hoje, encerro essa fase levando comigo a admiração pelos seus saberes. E como cantava Nina Simone: *“And this old world is new world and a bold world for me”!* Thank you, daddy!

À professora Juliana Cardoso, exemplo de mulher e de uma beleza inigualável de alma. Grata pela credibilidade, simpatia, bondade, ensinamentos e palavras. Poderia narrar uma variedade de belos adjetivos, mas a extensão de linhas talvez não descrevesse o atributo de ser humano que a senhora é, ou o quanto a admiro como pessoa, pesquisadora. A amabilidade no trato, a postura doce, gentil e preocupada, capaz de se comover e ajudar em pormenores, demonstram a grandeza do coração da senhora. Grata ontem, hoje e sempre!

À professora Margarete Gomes, pessoa meiga, gentil e profissional. Obrigada pela atenção com os pequenos detalhes, pela postura cortês, pela amabilidade, pelo porte reservado que consegue alcançar espaço e deixar marcas inteligentes e admiráveis. Saiba que reservo um carinho especial pela senhora.

À professora Patrícia Severino pela presença nos seminários de pesquisa, por cada palavra de correção e colaboração com este trabalho. Obrigada pelo olhar crítico, científico, educado, oportuno.

À Família LMPE, em especial àqueles do convívio diário, alguns que já compuseram essa virtuosa família, outros que ainda estão: Allan Resende, Amanda Borges, Ana Maria, Andréa Oliveira, Bernadeth Moda, Bruno Felipe, Camila Dantas, Camila, Cecília Mendonça,

Eliane Andrade, Fani Moraes, Felipe Andrade, Gabrielle Novaes, Joanny Motta, João Vitor, John Lennon, Lívia, Lorena Lopes, Marismar Fernandes, Rafael Valois, Reinaldo Neto, Rose Nely, Sheilla Barroso, Stefane Santos, Wilson pelo carinho, atenção e bonita convivência. A harmonia da presença de vocês e as risadas ajudaram a tornar os dias mais leves. “kkkkkkkk pra vocês”.

A mamãe do coração, Rose Nely, podemos contar mais de dez anos de uma bela adoção, com todo rigor de uma maternidade, obrigada pelo carinho, atenção, palavras, preocupação, pelo afeto e admiração, pelo suporte e humanidade. Grata a Deus por tê-la colocado em meu caminho. O que mais eu poderia dizer?! “Mamãe ama!” rrsrsrs...

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente por colaborarem na formação acadêmica.

Aqueles amigos, de longas e novas datas, solícitos e comprometidos com o próximo: o casal Nair Santana e Umeda, Família Matos de Araújo (Zuleide, Valfredo...), o casal Ancelmo Silva e Gal Silva, Alfeu Nascimento, Suely Carvalho, Jeová Oliveira, Anselmo Lima.

À velha e boa trupe da “Raça Ruim”: Afrânio Evangelista, Angela Maria, Diogo Andrade, Grazielle Ribeiro, Julyana Fontes, Marcela de Jesus, Marília Assis, Paloma Félix, Suely Carvalho, Tiago Aquino, Valdereis Fontes e Vivian Alves.

Ao professor Rodrigo Veneziani e toda sua equipe na Universidade de Franca – SP. Grata pela presteza e solicitude, pelos esclarecimentos, pela parceria e generosidade demonstrada com o trabalho.

Ao Laboratório de Ensaios Farmacêuticos e Toxicidade (LeFT) – UFS, em especial a Yasmim Gomes e ao professor Dr. Adriano Antunes pela receptividade e presteza nas análises.

À Andrea Santos pela delicadeza e graciosidade nas ilustrações a mão elaboradas para esse trabalho.

A Denisson pelo suporte para analisar as amostras a 400°C e pesar minúsculas porções em porta amostra microscópica. Rrsrsrs

Ao casal Luciana Nalone e Ricardo Amaral pelo apoio no experimento com os aminsais.

À Taissa Alice pelas conversas, pelas trocas diárias, pelo apoio.

À Alessandra Rabelo pela receptividade, suporte e apoio no estágio docência.

Ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa – ITP pela infraestrutura e suporte na pesquisa.

À coordenação do bloco G pela receptividade e paciência para me receber muitas vezes no laboratório de química.

À coordenação de laboratórios do bloco F, representada por Lilian, a equipe técnica, na pessoa da Érika. Obrigada pela atenção, apoio e receptividade.

A todos que fazem o Biotério: Júlio, Marcus...

Aos camundongos Swis pela vida a ciência!!!

À Universidade Tiradentes pela formação acadêmica.

À Agência de Fomento à pesquisa, CAPES, pela bolsa concedida.

No mais, àqueles não citados, mas não menos importantes, registro a minha prova de gratidão.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Geral	14
2.2 Específicos.....	14
3 Revisão da Literatura.....	15
3.1 Panorama geral sobre o câncer	15
3.2 Plantas medicinais e atividade antineoplásica dos seus compostos químicos.....	21
3.3 Ciclodextrina e aplicações em pesquisa.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Aquisição do material vegetal e Extrato de <i>Mikania glomerata</i> Sprengel Rico em Ácido ent-caurenóico (ERAC)	34
4.2 Preparo e obtenção dos Complexos de Inclusão ERAC:β-CD.....	34
4.2.1 Modelagem molecular.....	34
4.2.2 Malaxagem (MX).....	35
4.2.3 Co-Evaporação (CE).....	35
4.3 Caracterização dos Complexos de Inclusão.....	36
4.3.1 Análise Térmica	36
4.3.2 Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	36
4.3.3 Eficiência da formação dos complexos de Inclusão ERAC:β-CD	37
4.4 Ensaio de citotoxicidade.....	37
4.4.1 Cultivo das células de fibroblastos	37
4.4.2 Teste de redução do <i>Methylthiazoletetrazolium</i> (MTT).....	38
4.5 Análise da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	38
4.5.1 Aspectos Éticos	38
4.5.2 Estudo da atividade antitumoral.....	38
4.5.3 Formação de grupos experimentais.....	40
4.5.4 Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	41
4.5.5 Avaliação sorológica de Lactato desidrogenase (LDH)	41
4.5.6 Avaliação macroscópica dos órgãos excisionados.....	41
4.5.7 Avaliação histopatológica dos órgãos excisionados.....	42
4.5.8 Determinação do efeito da administração do ERAC:β-CD sobre a massa ponderal, volume e taxa de inibição do crescimento dos tumores.	42
4.5.9 Avaliação histopatológica dos tumores excisionados.....	42

4.5.10 Análise imunohistoquímica da expressão de antígenos	43
4.6 Análise Estatística	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Modelagem molecular	46
5.2 Análise Térmica dos Complexos de Inclusão	47
5.3 Análise por FTIR dos Complexos de Inclusão	50
5.4 Análise da Eficiência de Inclusão	52
5.5 Ensaio de viabilidade celular pelo teste MTT	52
5.6 Parâmetros hematológicos	53
5.7 Parâmetro sorológico	54
5.8 Parâmetros histopatológicos dos órgãos	55
5.9 Efeito da administração do ERAC:β-CD sobre a massa ponderal, volume e taxa de inibição do crescimento dos tumores.....	60
5.10 Parâmetros histopatológicos dos tumores	61
5.11 Expressão imuno-histoquímica de antígenos nos tumores	63
6 CONCLUSÕES.....	68
7 REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE A.....	79
APÊNDICE B.....	82
ANEXO.....	83

RESUMO

O câncer é uma doença que acomete grande parcela da população mundial e representa a segunda causa de morte no Brasil, tornando-se um problema de saúde pública. Estudos científicos buscam evidências de princípios ativos oriundos de produtos naturais com atividade antitumoral para desenvolvimento de novos produtos terapêuticos. Diterpenos, como o ácido *ent*-caurenóico, destacam-se devido às atividades antineoplásicas e antiproliferativas contra células de diversos tipos de tumores. Porém, diterpenos possuem baixa solubilidade em solventes aquosos, sendo necessário a busca de estratégias tecnológicas que facilitem a administração de compostos lipossolúveis. Assim, esta pesquisa teve como objetivo avaliar os efeitos antitumorais do extrato rico em ácido *ent*-caurenóico (ERAC) obtido das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel em complexos de inclusão com β -ciclodextrina (β -CD). O ERAC foi adquirido do Núcleo de Pesquisa em Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade de Franca – São Paulo. Foi realizada modelagem molecular das estruturas em estudo, a fim de determinar o modo de inclusão, bem como a razão molar a ser estabelecida. Posteriormente, foram desenvolvidos complexos de inclusão ERAC: β -CD pelas técnicas de malaxagem (MX) e co-evaporação (CE) e analisadas pelas técnicas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria/Termogravimetria derivada (TG/DTG) e Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e realizados ensaios de citotoxicidade em células L929. Grupos experimentais foram formados em 5 ($n=7$), dentre os quais: CTR (controle negativo), 5-FU (controle positivo – 5 Fluorouracil), ERAC: β -CD 30 (30 μ g/kg), ERAC: β -CD 100 (100 μ g/kg), e ERAC: β -CD 300 (300 μ g/kg). Foram avaliados os parâmetros: variação de massa ponderal, hematológicos e bioquímicos; alterações anatomopatológicas e histomorfológicas dos tumores excisionados, dos órgãos baço, rins e fígado, bem como a expressão imunohistoquímica dos antígenos NRF2, NFkB, VEGF e Ki-67 dos tumores de Sarcoma 180. Os dados foram submetidos a tratamento estatístico, considerando significativas diferenças onde p for menor que 0,05. Os resultados mostraram através da análise térmica que as curvas de DSC pelo método MX apresentou um perfil endotérmico mais significativo (331°C) que o de CE (340°C) e perda de massa gradual de 5,6 % para MX e 3,6 % para CE. A análise da eficiência de inclusão do ERAC em β -CD por MX foi de 65,37% e de 13,64% por CE. Os espectros de FTIR dos complexos ERAC: β -CD mostraram mudanças em bandas características, reforçando a proposição de complexação energeticamente favorável das ligações de hidrogênio entre as moléculas de β -CD e ERAC no estudo de modelagem molecular na razão molar 1:1. A análise citotóxica dos compostos ERAC, β -CD, MX e CE frente as células L929 mostrou viabilidade celular para mais de 70% das células. O parâmetro hematológico para maior dose (ERAC: β -CD300) foi o que apresentou melhor resultado, os níveis de LDH dos grupos tratados com ERAC: β -CD mantiveram-se normais, o efeito de ERAC: β -CD sobre os órgãos apresentou distúrbios leves, diferente do grupo controle 5FU. No que se refere aos achados da massa, volume e taxa de inibição tumoral, o grupo ERAC: β -CD300 foi o mais eficiente na redução tumoral, demonstrando inibição da atividade celular significativa para o crescimento dos tumores. Quanto à expressão imuno-histoquímica dos antígenos em células de tumores Sarcoma 180, o composto ERAC: β -CD foi capaz de regular a via de sinalização NRF2 positivamente através de resposta antioxidante na supressão tumoral, além da redução da taxa de proliferação tumoral demonstrada pelo Ki67.

PALAVRAS-CHAVE: Produtos naturais, *Mikania glomerata*, diterpeno, anticâncer.

ABSTRACT

Cancer is a disease that affects a large part of the world's population and represents the second cause of death in Brazil, becoming a public health problem. Scientific studies seek evidence of active principles from natural products with antitumor activity for the development of new therapeutic products. Diterpenes, such as ent-caurenoic acid, stand out due to antineoplastic and antiproliferative activities against cells of various types of tumors. However, diterpenes have low solubility in aqueous solvents, being necessary the search of technological strategies that facilitate the administration of liposoluble compounds. Thus, this study aims to evaluate the antitumor effects of the ent-caurenic acid rich extract (ERAC) obtained from the leaves of *Mikania glomerata* Sprengel in inclusion complexes with β -cyclodextrin (β -CD). ERAC was acquired from the Nucleus of Research in Exact and Technological Sciences of the University of Franca - São Paulo. Molecular docking of the studied structures was performed in order to determine the mode of inclusion as well as the molar ratio to be established. Subsequently, ERAC: β -CD inclusion complexes were developed by the techniques of kneading (KD) and co-evaporation (CE) and analyzed by Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetry / Derivative thermogravimetry (TG/DTG) and Vibrational Absorption Spectroscopy in the Infrared Region with Fourier Transform (FTIR) and cytotoxicity assays were performed on L929 cells. The animals were divided into 5 groups (n = 7): CTR (negative control), 5-FU (positive control - 5 Fluorouracil), ERAC: β -CD 30 (30 μ g/kg), ERAC: β -CD100 (100 μ g/kg), and ERAC: β -CD 300 (300 μ g/kg). We evaluated the parameters: weight variation, hematological and biochemical; histological and histomorphological alterations of excised tumors, spleen, kidneys and liver, as well as the immunohistochemical expression of the NRF2, NFkB, VEGF and Ki-67 antigen of Sarcoma tumor 180. The data were submitted to statistical treatment, considering significant differences where p is less than 0.05. The results showed that the DSC curves by the KD method presented a more significant endothermic profile (331°C) than that of EC (340°C) and a gradual mass loss of 5.6% for MX and 3.6% for CE. The analysis of ERAC inclusion efficiency in β -CD by KD was 65.37% and 13.64% by EC. The FracR spectra of the ERAC: β -CD complexes showed changes in characteristic bands, reinforcing the proposition of energetically favorable hydrogen bonding between the β -CD and ERAC molecules in the molecular docking study in the 1:1 molar ratio. Cytotoxic analysis of ERAC, β -CD, MX and CE compounds against L929 cells showed cell viability for more than 70% of the cells. The haematological parameter for the highest dose (ERAC: β -CD300) was the one that presented the best result, the LDH levels of the groups treated with ERAC: β -CD remained normal, the effect of ERAC: β -CD on the organs presented mild disorders, different from the 5FU control group. As regards the findings of mass, volume and rate of tumor inhibition, the ERAC: β -CD300 group was the most efficient in tumor reduction, demonstrating inhibition of significant cellular activity for tumor growth. As for the immunohistochemical expression of antigens in Sarcoma 180 tumor cells, the ERAC: β -CD compound was able to regulate the NRF2 signaling pathway positively through the antioxidant response in tumor suppression, in addition to reducing the rate of tumor proliferation demonstrated by Ki67.

KEY WORDS: Natural products, *Mikania glomerata*, diterpene, anticancer.

1 INTRODUÇÃO

Estimativas acerca do número de casos de câncer têm crescimento constante em todo mundo (SIEGEL *et al.*, 2019). De acordo com dados publicados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de novos casos para o ano de 2018 foi de 324.580 para homens e 310.300 para mulheres (INCA, 2018).

As abordagens terapêuticas tradicionais como quimioterapia podem não oferecer resultados satisfatórios, levando à resistência da droga no tratamento (SCHOTTENFELD *et al.*, 2013, MILLER *et al.*, 2016), visto que células tumorais se adaptam às vias de sinalização de sobrevivência refletindo na ineficácia da droga (VALENT *et al.*, 2012). O uso de plantas para descoberta de novas moléculas com potencial ação supressora do câncer é um recurso útil para descoberta de novos agentes antitumorais. Os derivados bioativos presentes nas espécies vegetais, a exemplo dos metabólitos secundários como terpenos, compostos fenólicos, alcaloides são considerados compostos preventivos quando inibem a iniciação do processo carcinogênico, ou terapêuticos, quando inibem a proliferação celular e progressão do câncer (MONDAL *et al.*, 2012; YAO *et al.*, 2016a).

O gênero *Mikania* dispõe de cerca de 300 espécies, dentre as quais um percentual de 10 foram estudadas quimicamente. Os metabólitos secundários mais comuns para o gênero *Mikania* são as cumarinas: cumarina 2, ácido cumárico, e diterpenos do tipo caurano: ácido *ent*-caurenóico 3, ácido cinamoilgrandiflórico 4 que apresentam atividade biológica (VILEGAS *et al.*, 1997; LIMBERGER *et al.*, 2001). Alguns estudos têm demonstrado que o ácido *ent*-caurenóico presente em espécies de plantas exibe atividade citotóxica e antiproliferativa em linhagens de células tumorais mamárias (SIMÃO *et al.*, 2016) e epiteliais (RUFATTO *et al.*, 2013), além de ter demonstrado o efeito apoptótico de linhagem celular de glioblastoma humano (LIZARTE *et al.*, 2013) e dano ao DNA de linhagens de células do câncer gástrico (CARDOSO *et al.*, 2017). Embora sejam evidentes as atividades citotóxicas e genotóxicas em linhagens de células tumorais, Moreira *et al.*, (2016) demonstraram segurança no uso de extrato com alto teor desse diterpeno quando utilizado em doses de até 1500 mg/kg em ratos.

A incorporação desses compostos bioativos a sistemas de liberação de fármacos propicia a inclusão de moléculas menos solúveis em solventes aquosos, tais como os diterpenos e permite que se supere as dificuldades farmacotécnicas existentes. Desta forma, espera-se uma maior concentração do princípio ativo disponível no local alvo e maior eficiência na resposta terapêutica. Para tanto, as ciclodextrinas compõem um grupo de oligossacarídeos encontradas nas formas

naturais α , β , γ , que possuem seis, sete e oito unidades de D-glicopirranose, respectivamente (LOFTSSON; BREWSTER, 1996). Estas estruturas são capazes de acomodar moléculas apolares formando complexos de inclusão e aumentando a possibilidade de administração de maiores concentrações de moléculas lipofílicas (REN *et al.*, 2002). Existem vários produtos farmacêuticos comercializados com ciclodextrinas sob a forma de comprimidos, soluções, pomadas (LOFTSSON; BREWSTER, 2010). Essa forma de aplicação terapêutica das ciclodextrinas permite que a substância ativa apresente maior solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade (PINHO *et al.*, 2014).

Estudos experimentais têm mostrado os benefícios do uso de extratos naturais em complexos de inclusão, todavia o interesse da indústria farmacêutica é raro no que se refere a alguns compostos como terpenos, devido à baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade. Assim, oferecer uma forma farmacêutica que possibilite minimizar essas barreiras, auxiliaria na melhor abordagem de administração de compostos bioativos, como o extrato rico em diterpeno que possa ser um aliado na terapia anticâncer (MANGOLIM *et al.*, 2014; ABURAHMA, 2015).

O presente estudo se propôs a investigar os efeitos antitumorais do extrato rico em ácido *ent*-caurenóico obtido das folhas da *Mikania glomerata* Sprengel em complexos de inclusão com β -ciclodextrina.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar o efeito antitumoral do extrato rico em ácido *ent*-caurenóico (ERAC) obtido das folhas da *Mikania glomerata* Sprengel em complexos de inclusão com β -ciclodextrina (β -CD).

2.2 Específicos

- Desenvolver formulação a base de β -CD contendo extrato rico em ácido *ent*-caurenóico e caracterizar os aspectos físico-químicos deste complexo;
- Avaliar a atividade citotóxica dos complexos ERAC: β -CD em células de fibroblastos (L929);
- Analisar os parâmetros hematológicos e bioquímicos em animais com tumores Sarcoma 180 após tratamento com complexos ERAC: β -CD ou veículo;
- Avaliar as características anatomopatológicas do tumor, do fígado, dos rins e do baço de animais com tumores Sarcoma 180 tratados com complexos ERAC: β -CD;
- Avaliar a expressão imunohistoquímica dos antígenos Ki-67 (marcador de proliferação celular), NFkB e NRF2 (resposta antioxidante) e VEGF (angiogênese) nos tumores Sarcoma 180 tratados com os complexos ERAC: β -CD.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Panorama geral sobre o câncer

O câncer é uma doença crônica não transmissível que acomete a população mundial ao longo dos anos. O envelhecimento da população, fatores de risco associados, melhoria dos diagnósticos são critérios relacionados ao aumento do número de casos de câncer, destacando a doença como a epidemia da modernidade (RUTHERFORD; DICKMAN; LAMBERT, 2012).

O elevado número de pessoas acometidas pelos diversos tipos de câncer abrange a esfera mundial, afetando tanto homens quanto mulheres, jovens e crianças. Relatos podem ser observados na Europa, a partir do levantamento feito para estimar os custos anuais para tratamento do câncer de bexiga e constatando um total de 2,6 milhões de diagnósticos de câncer (LEAL *et al.*, 2016). Na Ásia, quando Jain *et al.* (2014) ao revisarem registros epidemiológicos do câncer de próstata na Índia, observaram que este tipo de tumor se apresenta como o segundo mais incidente nas grandes cidades indianas, e com projeções de que o número de casos seja duplicado até 2020.

Ao observar a realidade nas Américas, na região Norte, os Estados Unidos estimaram 1.735.350 de novos números de tumores diagnosticados para o ano de 2018 e que mais de 600 mil norte-americanos morrerão de câncer no mesmo ano (NAACCR, 2018). Dentre os tipos de câncer que acometem os cidadãos americanos e são responsáveis por 46% das mortes por câncer da população americana estão o câncer de pulmão, dos brônquios, mama e colorretal (NCHS, 2017). Em destaque, o câncer de mama é apontado como a segunda principal causa de morte por câncer em mulheres, representando cerca de 30% do total de novos casos (SIEGEL *et al.*, 2017; BAN; GODELLAS, 2014).

Na região Sul da América, em destaque para o Brasil, a realidade do número de novos casos de câncer estimada para o ano de 2018 pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) foi de 324.580 para homens e 310.300 para mulheres. Desse total de casos novos reportados pelo INCA, destaca-se em percentual de distribuição, para homens, o câncer de próstata com 28,6% do total de casos e o câncer de mama nas mulheres, 28,1%. A figura 1 retrata a distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018.

A representatividade dos altos números de casos de câncer de próstata reflete no aumento das taxas de mortalidade para esse tipo de câncer, tal realidade pode ser observada no trabalho realizado por Braga *et al.* (2017) quando descreveram as

tendências da mortalidade por câncer de próstata no Brasil para as cinco regiões geográficas no período de 1980-2014, revelando que as regiões Norte e Nordeste apresentaram maior risco de morte e que o principal evento associado ao aumento das taxas de mortalidade em todas as regiões do país é o envelhecimento da população. Embora as desigualdades no acesso e serviços de saúde fossem evidentes nas cinco regiões brasileiras, a menor disponibilidade dos serviços oncológicos entre aquelas menos desenvolvidas, colaborou negativamente para a saúde da população de netas áreas de menor desenvolvimento.

De igual modo, Abrahão *et al.* (2015) ao mostrarem achados de descrições avançadas do câncer de mama, a fim de reduzir a morbidade e mortalidade por câncer, perceberam que dos 53,5% dos diagnósticos evidenciados, o percentual apresentava associação entre viver no Norte e Nordeste do país e ter um diagnóstico tardio da doença, refletido em uma população com baixo nível de educação e que vive em áreas rurais com difícil acesso aos serviços de saúde.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 em homens e mulheres. Fonte: INCA, 2018.

A frequência com que esses tumores específicos surgem e afetam diferentes classes sociais em diversas partes do mundo, variando em números crescentes ao longo do tempo, encontra correlação com aspectos químicos, físicos e biológicos associados à população atual. Yu *et al.* (2017) observaram que a exposição a agentes químicos como o tabaco foi responsável pelo aumento da incidência de câncer de pulmão em mulheres de 25 a 69 anos na Austrália no período de 1985 a 2009. Já Sodhi-Berry *et al.* (2017), ao compararem a incidência geral e específica de câncer em mineradores da Austrália no período de 1996 a 2013, perceberam que esse tipo de trabalho, associando ambiente e exposição a agentes carcinógenos foram responsáveis pelo aumento significativo de risco de câncer de pulmão.

A realidade descrita no comportamento desses fatores ambientais que desempenham papel na incidência do câncer está associada ao evento da

oncogênese, em que múltiplos efeitos carcinogênicos colaboram para a conversão de uma célula normal em uma célula maligna (SLATTERY *et al.*, 2017). De modo que tal processo expõe as células cancerosas a eventos proliferativos, originando um tumor. A figura 2 traz a representação do processo de carcinogênese, demonstrando as etapas envolvidas na formação da massa de tecido tumoral.

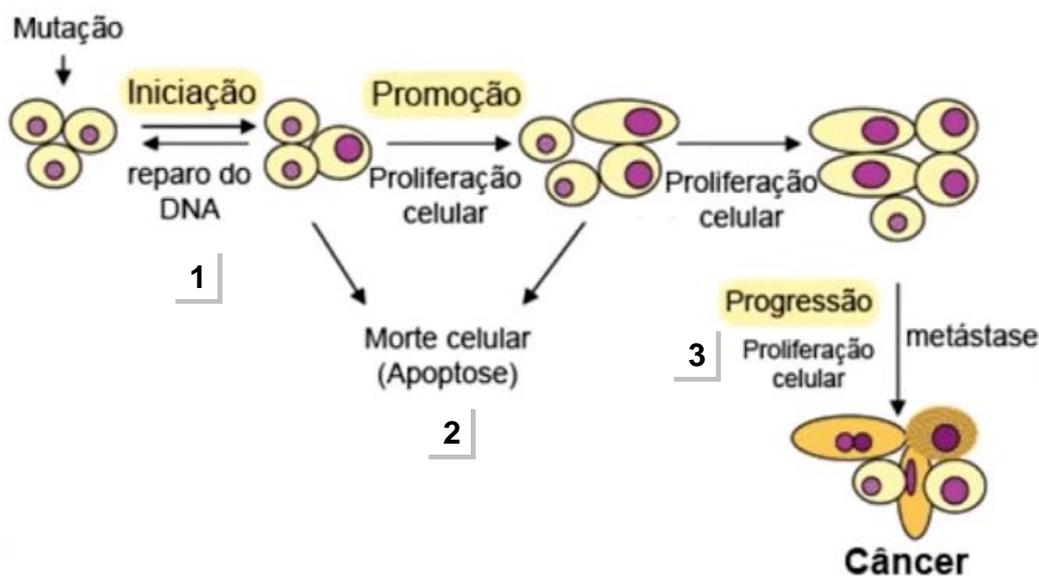


Figura 2. Processo de Carcinogênese. 1. Células sofrem mutação a partir da ação de agentes carcinogênicos. Todavia nesse estágio é possível reparar o dano. 2. A célula que foi geneticamente alterada encontra-se sob o efeito de oncopromotores, podendo proliferar ou sofrer apoptose. 3. Se as células se multiplicam desordenadamente, o acúmulo dessas origina o tumor maligno, podendo alcançar outros órgãos do corpo.

Fonte: Extraído e modificado de INCA, 2016.

O processo de carcinogênese que é induzido por alterações celulares, pode ser iniciado por agentes carcinógenos, bem como as células podem sofrer espontaneamente os processos de mutação, não afetando toda a população de células normais em desenvolvimento, mas incluindo possíveis danos oxidativos ou erros no processo de replicação do DNA que evidenciem alterações mutagênicas ou epigenéticas (DOLL, 1999).

O comportamento das modificações celulares na biologia tumoral está compreendido na sequência de eventos da cinética celular. De maneira normal, as células somáticas são geradas pela divisão celular em sequência ordenada, a partir de células existentes. Tais células ao se dividirem, passam por intervalos: (G1) – crescimento e preparo para a síntese de DNA (S), (G2) – término da fase S e início da Mitose (M). Existe ainda a fase (G0), destinada àquelas células que não são submetidas a síntese de DNA. O evento de divisão celular e os intervalos que a célula

está sujeita, é destinado a produção de células adicionais para crescimento do organismo ou para que ocorra regeneração celular, de modo que células mortas ou perdidas são substituídas por células específicas de cada tipo de tecido e assim, mantem-se a homeostase – Figura 3 (ALBRECHTSEN *et al.*, 1999).

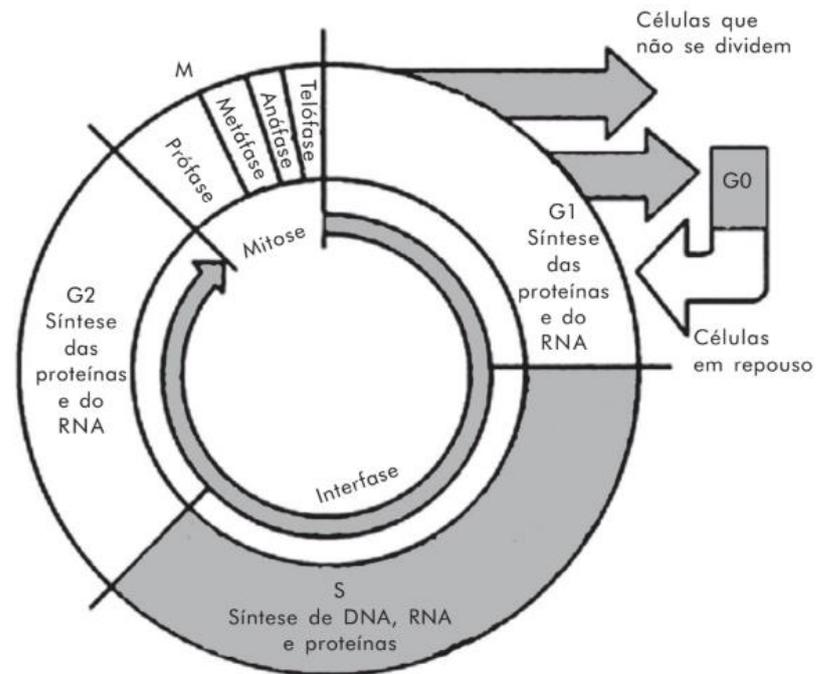


Figura 3. Etapas da divisão celular no controle de diferenciação e crescimento celular.
Fonte: BAQUIRAN; GALLAGHER, 1998.

Diante da falha de mecanismos celulares no processo de divisão celular, alguns reguladores são capazes de ajustar o crescimento e permitir que as células se desenvolvam normalmente. Os reguladores responsáveis pelo controle no ciclo celular são os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Estes são representados pela proteína do retinoblastoma (RB) e a proteína p53 (p53) (ALUNNI-FABRONI *et al.*, 2000). São ativos na fase G1 do ciclo celular, ponto de verificação que confere que a célula progrida no ciclo para síntese de DNA nuclear (Figura 4). Já os proto-oncogenes são genes cujos produtos proteicos estão envolvidos com diversos fatores funcionais de várias vias celulares (Figura 5). Caso ocorram mutações que alterem esses genes, passam de genes reguladores a genes causadores de câncer, oncogenes (DEY *et al.*, 2002).

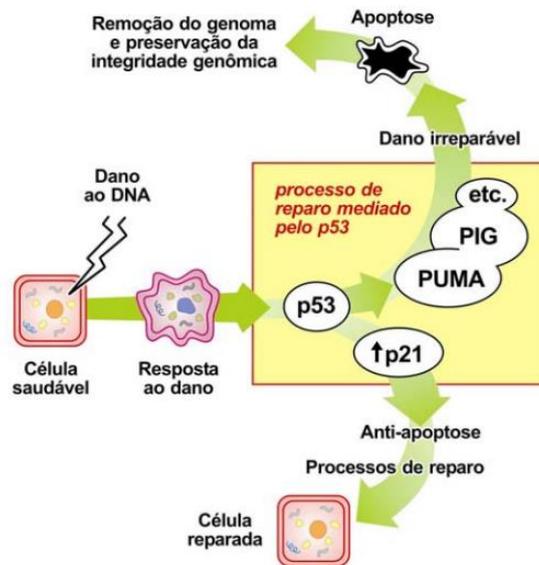


Figura 4. Representação do processo de resposta do gene p53 frente a lesão celular.
 Fonte: WEISS, 2003.

Diante de um dano ao DNA celular que não foi reparado, uma das funções da p53 é repará-lo, ligando-se ao promotor gênico da proteína apoptótica Bax e acionar a morte celular programada pelas vias intrínseca (mitocondrial) ou extrínseca (citoplasmática) (AL-KHARUSI *et al.*, 2013). Nesse envolvimento de mecanismos apoptóticos, estímulos conduzem a célula com dano no DNA a apoptose na tentativa de evitar a formação tumoral e manter o equilíbrio homeostático.

Caso a atividade das proteínas reguladoras da apoptose (pró-apoptóticas: Bax, Bak) seja alterada, as células tumorais serão favorecidas pela expressão de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1) e conduzirão o microambiente celular em estado de desregulação energética, sinal de proliferação contínuo, indução de angiogênese (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

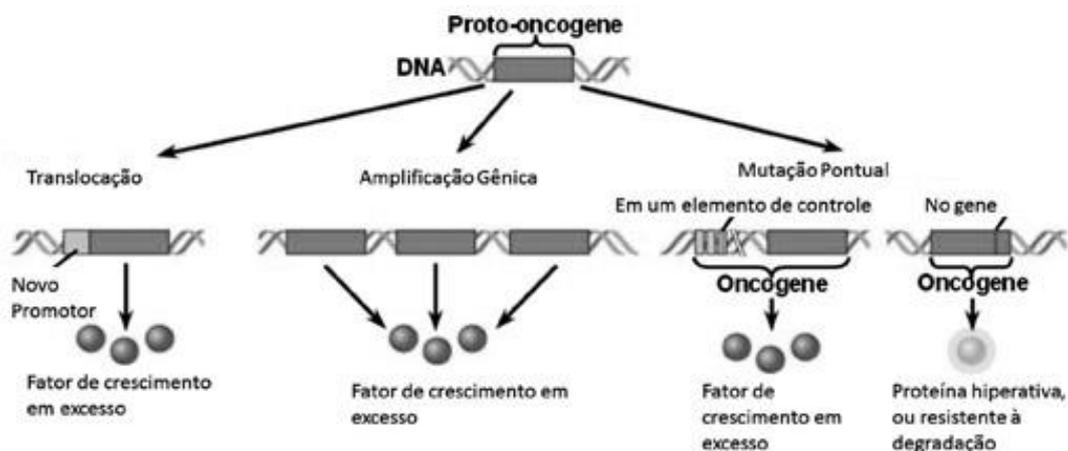


Figura 5. Ilustração das fases de mecanismo de geração de oncogenes.
 Fonte: SERRANO *et al.*, 2014.

O estado estabelecido no ambiente tumoral, onde as células já perderam o controle do ciclo celular, evadiram-se dos genes supressores tumorais e encontram-se no estágio capaz de induzir a angiogênese e ativação de invasão e metástase, é decorrente de um estado pró-inflamatório que é considerado um fator epigenético contribuinte para o surgimento e progressão de células tumorais.

Biologicamente, uma célula ao ser iniciada por um agente carcinogênico pode promover a mutação celular, gerando espécies reativas de oxigênio (EROS), estas espécies reativas são capazes de oxidar moléculas ou favorecer a ativação de fatores de transcrição. Todo este cenário é caracterizado por um estado inflamatório correlacionado ao desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes (estresse oxidativo) (KLAUNIG *et al.*, 2010).

Se na fase de iniciação a célula não é reparada e é promovida com danos ao DNA, a mutação celular pode evoluir para tumor em conjunto com a ação das EROS que estimularão vias de transdução de sinal e ativarão fatores de transcrição como o Fator nuclear eritróide-2 (NRF2) e o Fator nuclear kappa B (NFkB) e proteínas quinases ativadores de mitógenos (MAPK) no embate para progressão da carcinogênese (KLAUNIG *et al.*, 2010).

Enquanto o NRF2 ativará genes que codifiquem proteínas antioxidantes, a fim de reduzir fatores de transcrição pró-inflamatórios como o NFkB para permitir a adaptação e sobrevivência celular em condições de homeostase, o NFkB atuará na regulação de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, enzima cicloxigenase-2 (COX-2) na finalidade de promover uma condição inflamatória que está envolvida com a causa da carcinogênese, mecanismo anti-apoptótico e regulação da angiogênese (Figura 6) (DOU *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2012).

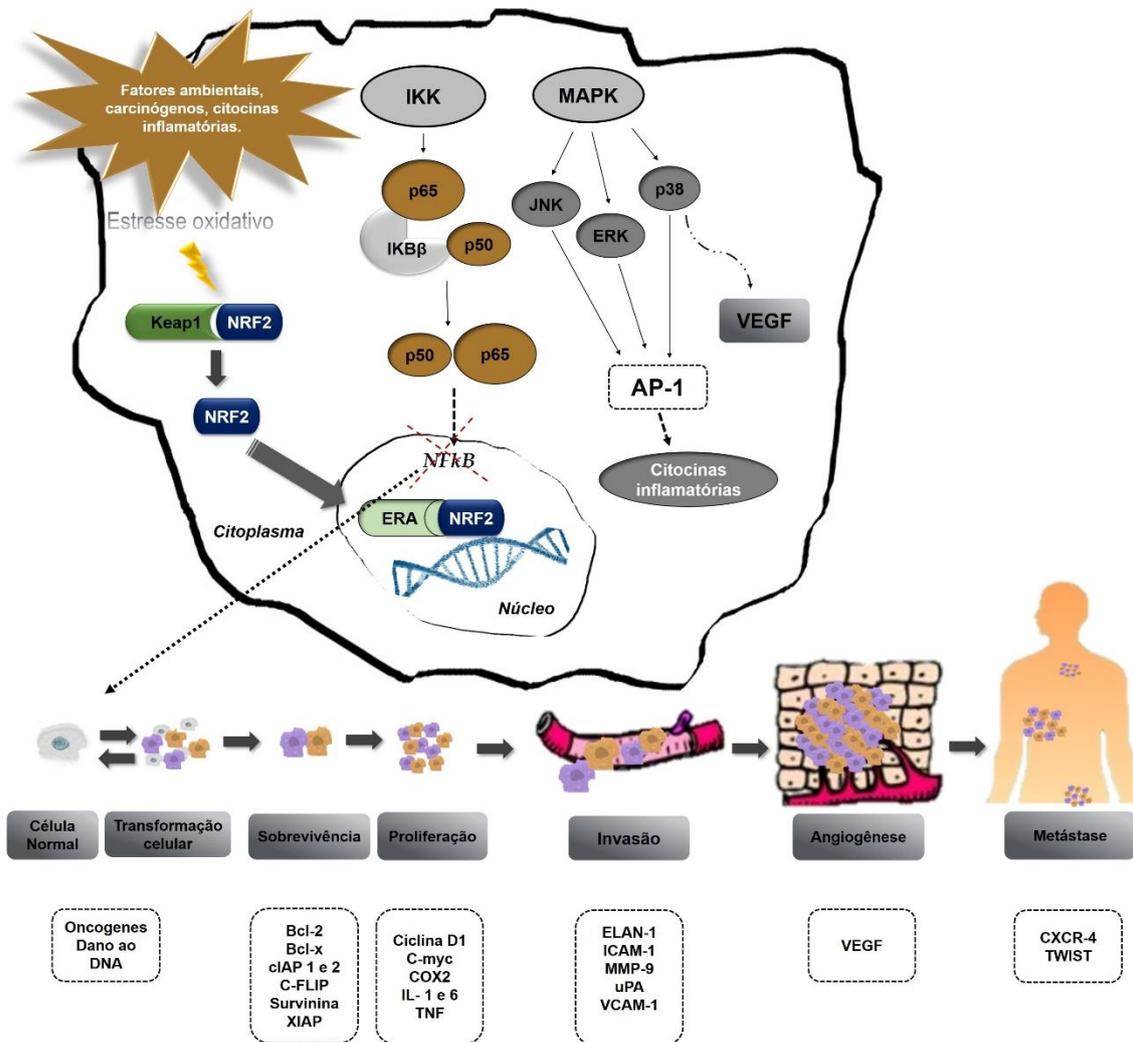


Figura 6. Representação esquemática da ativação da via do NRF2 em condições de estresse oxidativo e inibição das vias de inflamação dependentes do NFκB no processo de transformação celular de acordo com seus alvos moleculares.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2 Plantas medicinais e atividade antineoplásica dos seus compostos químicos

Diversos extratos vegetais são utilizados no tratamento de doenças e asseguram resultados promissores. Os metabólitos secundários da classe dos terpenos, compostos fenólicos, alcaloides mostraram efeitos na prevenção ou tratamento do câncer (MONDAL *et al.*, 2012; YAO *et al.*, 2016a) por serem encontrados em espécies vegetais que apresentam valor medicinal para o desenvolvimento de novos fitoterápicos (NEWMAN; CRAGG *et al.*, 2012). Estes achados na literatura induzem à nova pesquisas na área.

A *Catharanthus roseus* (L.) G. Don é uma planta herbácea, nativa de Madagascar e pertence à família Apocinaceae. É conhecida como vinca, maria-sem-vergonha ou boa-noite, apresenta ampla dispersão em áreas subtropicais e tropicais do mundo (ONG *et al.*, 2011). Após a realização de testes em modelos de estudo de linfoma e leucemia com o extrato de *C. roseus*, foi possível observar efeito supressor de medula óssea em animais, conduzindo trabalhos que levaram ao isolamento dos alcaloides vimblastina e vincristina e tornaram-se agentes úteis no tratamento de alguns tipos de câncer como a leucemia linfoblástica aguda, o sarcoma de Kaposi, o linfoma de Hodgkin (JACOBS *et al.*, 2004; SOTTOMAYOR; ROS, 2005).

Outro alcaloide isolado da árvore *Camptotheca acuminata* Decne, da família Cornaceae, nativa da China, é a camptotecina que originou as substâncias topotecan e irinotecan que inibem a enzima topoisomerase I e são utilizadas no tratamento de câncer de ovário, de pulmão e cólon (MANN, 2002; CHABNE; ROBERTS, 2005; POMMIER; 2006).

Outra planta com achado importante de atividade anticâncer é a *Taxus baccata* L. e *Taxus brevifolia* Nutt., originária da América do Norte e América Central, pertence a família Taxaceae e é conhecida como teixo do Pacífico ou teixo inglês. Ao desenvolver ensaios de triagem com 60 células de linhagens tumorais humanas, percebeu-se a eficiência do diterpeno paclitaxel, devido à ação antimetabólica em cânceres de mama e ovário (MANN, 2002; ROUX; GUÉRITTE, 2017).

As espécies de *Podophyllum peltatum*, *Podophyllum emodii*, *Podophyllum hexandrum* são outros vegetais que se enquadram no grupo de exemplares com agentes antineoplásicos (JARDINE, 1980). Estudos com a podofilotoxina, uma lignana extraída das raízes de *Podophyllum* demonstraram atividade antimetabólica, tal fato conduziu outras investigações para a síntese de drogas no tratamento do câncer, o etoposídeo e o teniposídeo que são capazes de interferir na síntese de DNA, e assim, indicados no tratamento de linfoma não-Hodgkin, câncer de pulmão, sarcoma de Kaposi (AYRES; LOIKE, 1990; CASTRO *et al.*, 2003).

As pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de novos fármacos com ação antitumoral baseadas em substâncias bioativas que atuem nos dois últimos estágios da carcinogênese são constantes. Estudos recentes com produtos naturais mostram que a busca por moléculas com indicação terapêutica para o câncer tem apresentado resultados promissores, a partir da observação de achados antitumorais. Yadav *et al.* (2018) ao investigarem o efeito do ácido 3-bromopiruvato perceberam que este foi capaz de alterar a expressão de moléculas reguladoras da captação de glicose e através da diminuição na produção de ATP afetou o mecanismo das células tumorais, desencadeando o processo de morte celular.

De igual modo, ao investigar a atividade do aminoácido poli-L-lisina na supressão da angiogênese tumoral e indução da apoptose em camundongos portadores de tumor de Ehrlich e sarcoma 180, Debnath *et al.* (2017) observaram que o tratamento com a substância foi capaz de regular negativamente as proteínas Bcl-2 e CD31 e positivamente as Bax e p53 envolvidas no processo de apoptose. Bem como a expressão do fator de crescimento endotelial (VEGF) foi notoriamente reduzido, atestando a diminuição de microvasos sanguíneos no evento da angiogênese tumoral e crescimento do tumor.

Dória *et al.* (2016) também demonstraram efeito apoptótico em tumores Sarcoma 180 de camundongos que foram tratados com extrato aquoso de *Remirea maritima* Aubl. Além da perceberem redução nas taxas de inibição tumoral, reforçando a atividade anticancerígena do extrato natural. Ferreira *et al.* (2016) ainda elucidaram o efeito anticancerígeno da fração hexânica de folhas da planta medicinal *Casearia sylvestris* e do seu diterpeno Casearin X. Por meio de ensaios em modelo murino Sarcoma 180, os autores demonstraram o evento apoptótico como a principal forma de morte celular nos tumores de camundongos tratados com as substâncias bioativas.

Nessa linha de investigação de constituintes químicos de plantas, outra substância que tem sido estudada, relevando resultados promissores na busca de novas moléculas que atuem em diferentes mecanismos biológicos na terapia anticâncer são os diterpenos do tipo caurano. Estes metabólitos secundários estão presentes em espécies de plantas do gênero *Mikania* e *Copaifera* (MOREIRA *et al.*, 2016; SIMÃO *et al.*, 2016).

A espécie *Mikania glomerata* foi estudada e demonstrou a presença de cumarinas, ácido *ent*-caurenóico, ácido cinamoilgrandiflórico (OLIVEIRA *et al.*, 1984). Estudos posteriores dispensaram esforços para desenvolver extratos vegetais (TALEB-CONTINI *et al.*, 2006) e frações hexânicas (VENEZIANI *et al.*, 1999; YATSUDA *et al.*, 2005) que concentrassem os constituintes químicos presentes na amostra vegetal para investigação de atividades biológicas como a anti-inflamatória e broncodilatadora (MAIORANO *et al.*, 2005; BETONI *et al.*, 2006).

Mediante estudos, De Moura *et al.* (2002) relataram evidências de atividade bronco dilatadora ao tratar cobais com extrato aquoso e fração diclorometano de *Mikania glomerata* Sprengel e Fierro *et al.* (1999) demonstrando a ação antialérgica a partir da redução significativa de neutrófilos em ratos tratados com fração diclorometano obtida de folhas de *Mikania glomerata* que foram submetidos à indução de pleurisia.

Demais estudos conduzidos com estas espécies do gênero *Mikania* que tenham encontrado evidências de natureza citotóxica e antitumoral estão relacionados

à presença de constituintes cauranos, em suma, o ácido caurenóico e outros derivados sintetizados por espécies de plantas que também pode ser encontrado no gênero *Copaifera*. Dessa maneira, os trabalhos estão dirigidos para concentrações analíticas desse ácido a fim de respaldar os achados científicos. Alguns estudos dos referidos gêneros estão representados na tabela 1, quanto aos achados de natureza citotóxica e antitumoral.

Tabela 1. Estudos com diterpenos de plantas dos gêneros *Annona sp.*, *Copaifera sp.*, *Mikania sp.* em linhagens de células tumorais.

Referência literária	Espécie vegetal	Farmacógeno	Substância testada	Concentração da substância	Tipo de ensaio biológico*	Linhagem celular	Evidências reportadas
Okoye <i>et al.</i> (2014)	<i>Annona senegalensis</i> (graviola silvestre)	Casca da raiz	ácido caurenóico	31.5 - 1000 µg/mL	MTT	PANC-1 (tumor pancreático) e HeLa (tumor cervical humano)	Ação antiproliferativa contra as linhagens tumorais testadas, apresentando valores de IC50 0,74 e 0,52 M, respectivamente.
Lizarte <i>et al.</i> (2013)	<i>Mikania hirsutissima</i>	Folhas	ácido caurenóico	30, 50, 70 µM	viabilidade celular, coloração por anexina V e iodeto de Propídeo, PCR	U87, ATCC (glioblastoma humano)	Atividade citotóxica e antiproliferativa em células de glioblastoma humano (50 e 70 µM), além de notável regulação de genes envolvidos na apoptose. Com a diminuição da expressão dos anti-apoptóticos (miR-21, c-FLIP) e aumento na expressão dos genes apoptóticos (caspase 8, caspase 3).

Ruffato <i>et al.</i> (2013)	<i>Mikania laevigata</i>	Folhas	extratos: clorofórmico, acetato de etila, hexânico e etanólico de <i>Mikania</i>	10 - 800 µg/mL	MTT	HEp-2 (carcinoma epidermóide humano), HeLa (tumor cervical humano)	Os extratos hexânico (75 µg/mL; 160 µg/mL) e etanólico (600 µg/mL; 800 µg/mL) apresentaram melhor capacidade antiproliferativa frente as células tumorais HEP-2 e HeLa, respectivamente. Já que os demais não mostraram diferença significativa entre as células não tumorais.
Simão <i>et al.</i> (2016)	<i>Copaifera sp.</i>	Resina de óleo	ácido caurenóico e 15 derivados sintéticos do ácido caurenóico	0,975 - 1000 µg/mL	XTT	MCF-7 (carcinoma de mama humano)	O estudo mostrou que um dos compostos derivado do ácido caurenóico (síntese de amida) foi o mais citotóxico. O composto foi capaz de inibir o crescimento de células tumorais de câncer de mama (IC ₅₀ = 7,84 µM).
Sarajini <i>et al.</i> (2016)	<i>Mikania glomerata</i> Sprengel	Folhas	extrato aquoso	10, 20, 30 e 40 µg/mL	Proliferação celular, MTT, sobrevivência clonogênica, anexina V e iodeto de Propídeo	H292 (câncer de pulmão humano)	Potencial ação antineoplásica do extrato aquoso da <i>Mikania glomerata</i> , mediante aos achados citotóxicos do extrato contra as células tumorais.
Cano <i>et al.</i> (2017)	<i>Copaifera sp.</i>	Resina de óleo	ácido caurenóico e dois derivados sintéticos do ácido caurenóico	25 - 400 µM	XTT, teste do micronúcleo, ensaio cometa	CHO-K1 (células ovarianas)	Efeito citotóxico mais elevado para o ácido caurenóico que os outros dois derivados sintéticos em células ovarianas. Embora o mesmo não tenha apresentado efeito genotóxico naquelas concentrações que não mostraram citotoxicidade.

Cardoso <i>et al.</i> (2017)	<i>Copaifera langsdorffii</i>	Resina de óleo	ácido caurenóico	2,5; 5; 10; 30 e 60 µg/mL	Ensaio cometa, teste do micronúcleo, análise da transcrição de genes - RT-qPCR, análise do ciclo celular	ACP02, ACP03, AGP01 e PG100 (Células de câncer gástrico)	O ácido caurenóico é capaz de induzir dano ao DNA de células gástricas tumorais em concentrações acima de 5 µg/mL, além de induzir a apoptose, parada do ciclo celular (G1), com marcante aumento de genes (ATM, CHK2 e TP53) envolvidos nesse evento na dose de 60 µg/mL.
Da Costa <i>et al.</i> (2018)	<i>Copaifera ssp</i>	Resina de óleo	26 derivados sintéticos do ácido caurenóico	0,975 - 1000 µg/mL	XTT e métodos computacionais (programa Gaussian09) de análises multivariadas de moléculas	MCF-7 (carcinoma de mama humano)	Atividade citotóxica contra a linhagem celular de câncer de mama está relacionada às modificações energéticas que ocorre entre molécula do derivado diterpênico e o alvo celular, através do deslocamento e/ou transferência de carga energética.

*MTT (Teste de redução do *Methylthiazoletetrazolium*), PCR (Reação em cadeia polimerase), XTT (Ensaio de viabilidade celular do *Tetrazolium*).

3.3 Ciclodextrina e aplicações em pesquisa

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos resultantes da degradação enzimática do amido através da ação de bactérias produtoras da ciclodextrina-glicosiltransferase. Ao hidrolisarem as ligações glicosídicas do amido, dextrinas de diferentes tipos são geradas como produto da reação, formando estruturas cíclicas com unidades de D-glucopiranosose que se ligam em seis, sete e/ou oito unidades estabelecendo as formas naturais α -CD, β -CD, γ -CD, respectivamente (LOFTSSON; DUCHENE, 2007; VEIGA, PECORELLI *et al.*, 2006).

Ao se organizarem na forma estrutural de um cone truncado, grupamentos hidroxílicos são posicionados na região externa do cone, assumindo característica hidrofílica (LOFTSSON; BREWSTER, 1996) (Figura 7). A região interna é formada por grupos hidrocarbonetos e átomos de oxigênio unidos por ligações glicosídicas, conferindo uma cavidade hidrofóbica que permite a interação com compostos de natureza apolar.

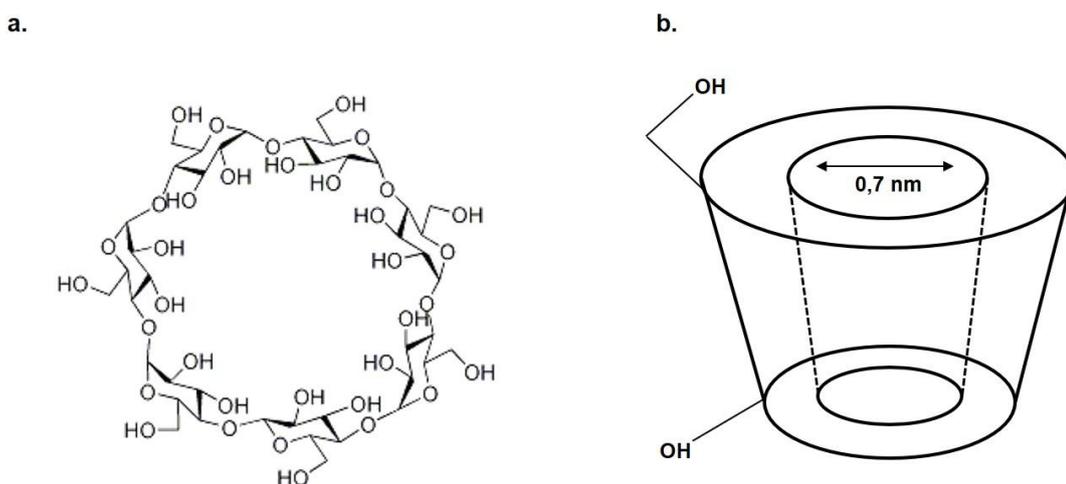


Figura 7. Estrutura química da β -ciclodextrina (β -CD) (a) e representação da forma estrutural (b).

Fonte: Montagem do autor.

Por possuir capacidade de formar complexos de inclusão com outras moléculas, as CDs são de interesse da indústria alimentar, farmacêutica e de cosméticos. Visto que suas propriedades conferem a inibição de odores, sabores desagradáveis, aumentam a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de fármacos lipofílicos. Dentre as CDs naturais, a β -CD é uma das mais utilizadas em preparações farmacêuticas encontradas no mercado. Tal fato se deve à disponibilidade elevada, ao baixo custo e a capacidade de

formar complexos de inclusão com diversos fármacos hidrofóbicos (VEIGA, PECORELLI, 2006).

A complexação de moléculas/fármacos na cavidade hidrofóbica das CDs é dependente de fatores como polaridade da molécula hóspede e do tamanho da cavidade de CD. De modo que, a ação de força de *van der Waals*, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas estabilizam os complexos e ocorre o equilíbrio dinâmico hóspede-hospedeiro a partir da razão molar estabelecida para formação dos complexos de inclusão (LIU; GUO, 2002) (Figura 8).

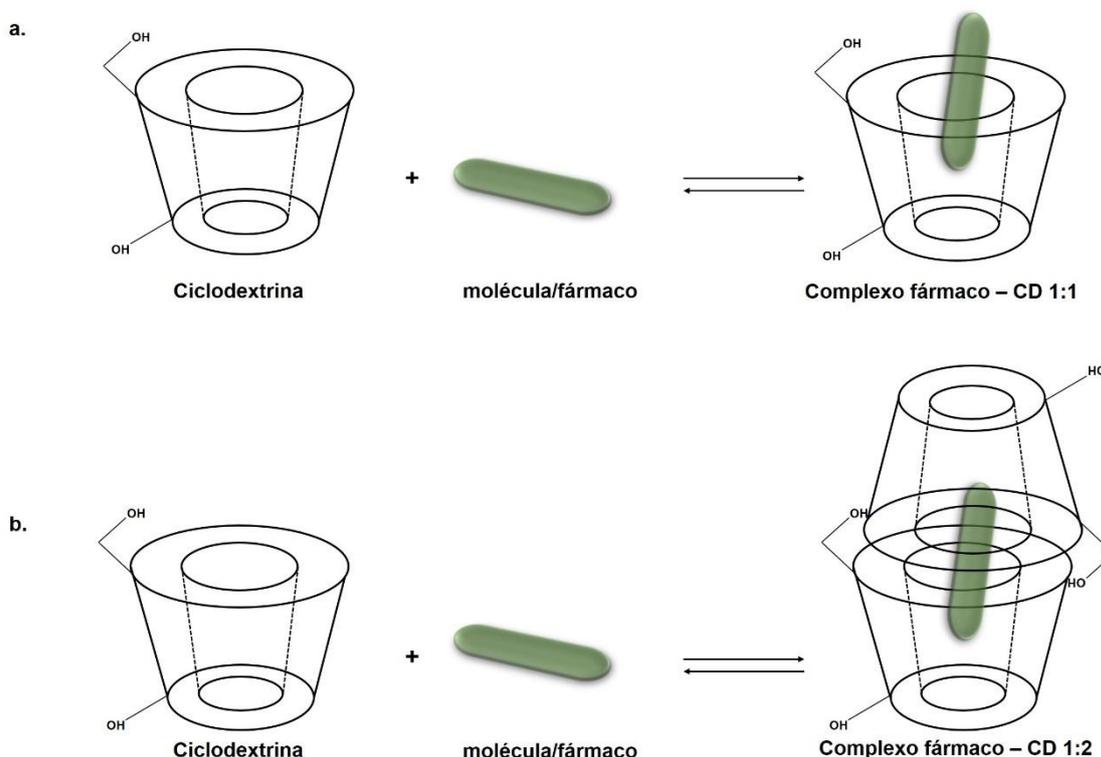


Figura 8. Representação esquemática da formação de complexos de inclusão fármaco – CD na razão molar 1:1 (a) e na razão molar 1:2 (b).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A utilização das CDs como excipientes associados a derivados vegetais de natureza lipofílica tem sido recurso útil em pesquisas, uma vez que as características desses produtos dificultam as investigações das atividades biológicas quando os pesquisadores encontram barreiras físico-químicas e/ou farmacocinéticas nas moléculas estudadas (PINHO *et al.*, 2014).

A tabela 2 reúne alguns trabalhos científicos de acordo com a natureza da pesquisa e o ramo de exploração biológica relacionado às ciclodextrinas.

Tabela 2. Estudos com ciclodextrinas que descrevem a formação de complexos de inclusão suas características e aplicações em diferentes áreas.

Referência literária	Substância Investigada	Tipo de CD	Razão molar	Método de preparação	Técnica de caracterização dos complexos de inclusão*	Evidências encontradas
Su <i>et al.</i> (2012)	Borneol	β -ciclodextrina	1:1	Ultrassom	Espectroscopia FTIR, DRX, DSC	Aumento da solubilidade e estabilidade do borneol quando comparado a molécula livre.
Hill <i>et al.</i> (2013)	Óleo essencial com extrato de casca de canela, trans-cinamaldeído, extrato de cravo-da-índia e eugenol	β -ciclodextrina	2:1	<i>Freeze-drying</i>	DSC, MET, eficiência de aprisionamento e solubilidade de fase	Foi observado atividade antimicrobiana do complexo de inclusão contra <i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium LT2 e <i>Listeria innocua</i> .
Menezes <i>et al.</i> (2013)	(-)-Linalool	β -ciclodextrina	1:1	Malaxagem e coevaporação	Espectroscopia FTIR, DRX, DSC, TG, MEV e Karl Fisher	Revelou evidências de formação de complexos de inclusão pelos métodos de malaxagem e pasta.
Gomes <i>et al.</i> (2014)	Pigmento de pimentão vermelho	β -ciclodextrina	1:4	Agitação magnética e ultrassom	Espectroscopia FTIR, DSC, RMN, distribuição de tamanho de partículas e potencial Zeta	Os dois métodos de preparo revelaram evidências de complexação. Todavia o método ultrassom apresentou maior rendimento e eficiência de inclusão.

Jiang <i>et al.</i> (2014)	artesanato (ATS)	β -ciclodextrina	1:1	não relatado	DRX, RMN, TG	Foi revelado aumento da solubilidade do artesunato complexado às moléculas de β -ciclodextrina quando comparado ao artesunato livre. Quando investigada a atividade citotóxica dos complexos de inclusão ATS- β -ciclodextrina (0.5 – 60 μ mol/L) contra linhagens celulares de câncer de cólon, percebeu-se atividade mais elevada que a substância livre.
Mangolim <i>et al.</i> (2014)	Curcumina	β -ciclodextrina	1:2	Co-precipitação, liofilização e evaporação de solvente	Espectroscopia FTIR e Raman, DRX	Foi possível observar a inclusão de curcumina em partículas de β -ciclodextrina com melhores resultados para o método de co-precipitação com garantia de solubilidade e estabilidade de cor em amostras de sorvetes.
Soica <i>et al.</i> (2014)	Ácido betulínico	octakis-[6-deoxi-6-(2-ácido etanosulfônico sulfanil)]- γ -CD (DGCD)	1:1	Malaxagem	DRX, DSC, MEV	Os complexos formados com o ácido betulínico e o derivado sintético de gama ciclodextrina exibiram aumento de solubilidade em água, possibilitando a demonstração de achados citotóxicos em células melanoma, bem como a redução do volume e peso tumoral em análise <i>in vivo</i> , usando modelo melanoma em camundongos.

Venuti <i>et al.</i> (2014)	Resveratrol (RSV)	Sulfobutileter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD)	1:1	<i>Freeze-drying</i>	Espectroscopia UV-vis e FTIR-ATR	A formação do complexo RSV-SBE- β -CD possibilitou a melhoria da solubilidade de RSV com resultados biológicos <i>in vitro</i> de atividade anticâncer em linhagem celular MCF-7.
Abarca <i>et al.</i> (2016)	2-nonanona (2-NN) - composto presente em óleo essencial de arruda)	β -ciclodextrina	1:0.5; 1:1; 1:2	Co-precipitação	Espectroscopia FTIR, DRX, DSC, TG, eficiência de aprisionamento	A formação de complexo de inclusão na razão 1:0,5 foi a que apresentou melhor resultado nas análises de caracterização. Com 34,8% de eficiência de inclusão do 2-NN, observou-se redução de crescimento de fungos da espécie <i>Botrytis cinerea</i> .
Quintans-Júnior <i>et al.</i> (2016)	β -cariofileno (sesquiterpeno presente em óleo essencial de cravo da índia)	β -ciclodextrina	1:1	Coevaporação	Espectroscopia FTIR, DRX, DSC, TG, MEV	Os ensaios realizados revelaram formação de complexos de inclusão e os tratamentos realizados com os complexos em camundongos com dores musculares promoveram efeito analgésico.
Sepúlveda <i>et al.</i> (2016)	Diterpeno mulinane	β -ciclodextrina	não relatado	não relatado	não relatado	Reportado efeito gastroprotetor em modelo experimental de úlcera em camundongos.
Ceborska (2017)	Terpenos de cânfora	β -ciclodextrina	2:3; 2:2	não relatado	DRX	A análise dos dados demonstrou formação de complexos com moléculas terpenóides de álcool borneol e (-)-isopinocampheol (2:3), de hidrocarbonetos (+)-fenchene e cetonas (+)-camphor/(-)-camphor (2:2).

Michalska <i>et al.</i> (2017)	ITH12674 (híbrido de melatonina e sulforafano)	2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD)	1:1	Liofilização	Espectroscopia FTIR, DRX, DSC, RMN, MEV, Docking	A formação do complexo de inclusão evidenciou o aumento da solubilidade de ITH12674 em água e a estabilidade contra os efeitos físico-químicos. O composto também foi capaz de induzir resposta antioxidante mediada pelo fator de transcrição NRF2 em células AREc32.
Leite <i>et al.</i> (2018)	Óleo essencial com (-)- α -bisabolol (BISA)	β -ciclodextrina	1:1	Malaxagem, coevaporação	Espectroscopia FTIR, DSC, TG	Os complexos de inclusão formados foram testados em ratos que sofreram injúria orofacial, sendo capazes de reduzir significativamente a dor.

*Calorimetria exploratória diferencial (DSC), Difractometria de raio-x (DRX), Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia eletrônica de transmitância (MET), Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Ressonância magnética nuclear (RMN), Termogravimetria (TG)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aquisição do material vegetal e Extrato de *Mikania glomerata* Sprengel Rico em Ácido ent-caurenóico (ERAC)

O extrato foi obtido das folhas da *Mikania glomerata* Sprengel através de processo extrativo utilizando inicialmente o diclorometano como solvente extrator seguido de partição e purificação com o objetivo de selecionar compostos terpênicos. O procedimento de obtenção do ERAC foi feito no Núcleo de Pesquisa em Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade de Franca, São Paulo, pelo professor Doutor Rodrigo Cassio Sola Veneziani. O método padronizado com o desenvolvimento da técnica analítica com precisão intra-dia das amostras conferiu um teor correspondente a 48,94% de AC nos extratos de *Mikania glomerata* Sprengel rico em AC (MOREIRA *et al.*, 2016).

Este extrato foi cedido em virtude de uma parceria firmada entre a Universidade Tiradentes e a Universidade de Franca como parte do projeto do Programa de estímulo a mobilidade e ao aumento da cooperação acadêmica da pós-graduação em instituições de ensino superior de Sergipe (PROMOB) - EDITAL CAPES/FAPITEC/SE N° 10/2016 – APÊNDICE A.

4.2 Preparo e obtenção dos Complexos de Inclusão ERAC:β-CD

4.2.1 Modelagem molecular

O estudo de modelagem molecular foi realizado para conhecer as possibilidades de interação entre as moléculas do ERAC e β-CD e definir a melhor razão molar para o complexo de inclusão. Para gerar a estrutura molecular do ERAC e da β-ciclodextrina, foi utilizado o programa Auto-dock vina 1.1.2 (TROTT; OLSON, 2010), por meio do DS Visualizer e utilizada no acoplamento molecular. O Auto DockTools (ADT) (MORRIS; HUEY, 2009) foi utilizado para preparar os arquivos de entrada pela fusão de átomos de hidrogênio não polares, adicionando cargas parciais e tipos de átomos. A raiz rígida do ligante e do receptor foi gerada usando ADT, definindo todas as possíveis ligações rotativas como ativas por torções. A grade no centro de massa (eixos x, y e z, respectivamente) para cobrir toda a superfície de interação da β-ciclodextrina foi de 40 × 40 × 40Å. O modelo de ligação que tem a menor energia livre de ligação foi pesquisado em 10 diferentes modelos.

4.2.2 Malaxagem (MX)

O complexo de Inclusão ERAC: β -CD por MX na razão molar de 1:1 foi realizado homogeneizando β -CD (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) em água e adicionando ERAC para formação de uma pasta. Posteriormente, o material foi homogeneizado e armazenado em dessecador de vidro até completa secagem para trituração manual - adaptado de Menezes *et al.* (2013). O material obtido foi armazenado em recipiente de vidro hermeticamente fechado para posterior análise (Figura 9).

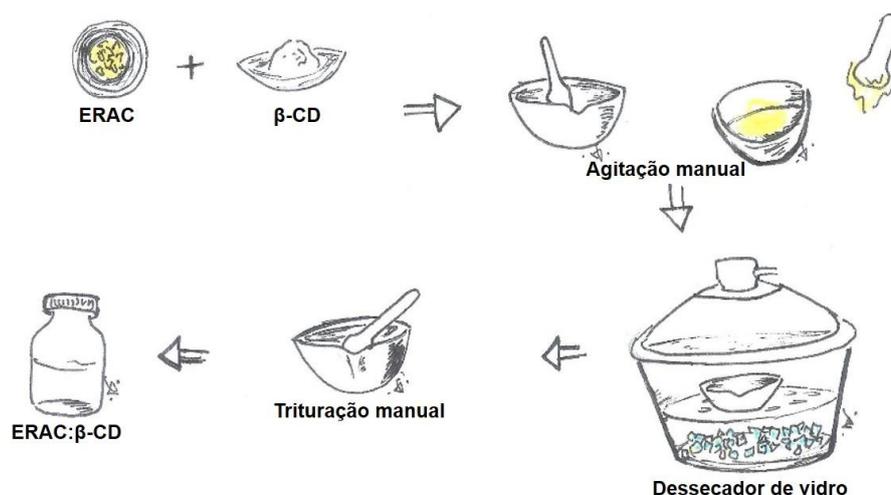


Figura 9. Esquema de preparo do complexo de inclusão ERAC: β -CD pelo método de Malaxagem.

Fonte: Ilustração de Andréa Santos, 2017.

4.2.3 Co-Evaporação (CE)

O complexo de Inclusão ERAC: β -CD por CE na razão molar de 1:1 foi realizado homogeneizando β -CD em água e adicionando ERAC. Posteriormente, o material foi submetido à agitação magnética, 45°C, por 5h e submetido a rotaevaporação - adaptado de Corrêa *et al.* (2005). O material obtido foi armazenado em recipiente de vidro hermeticamente fechado para posterior análise (Figura 10).

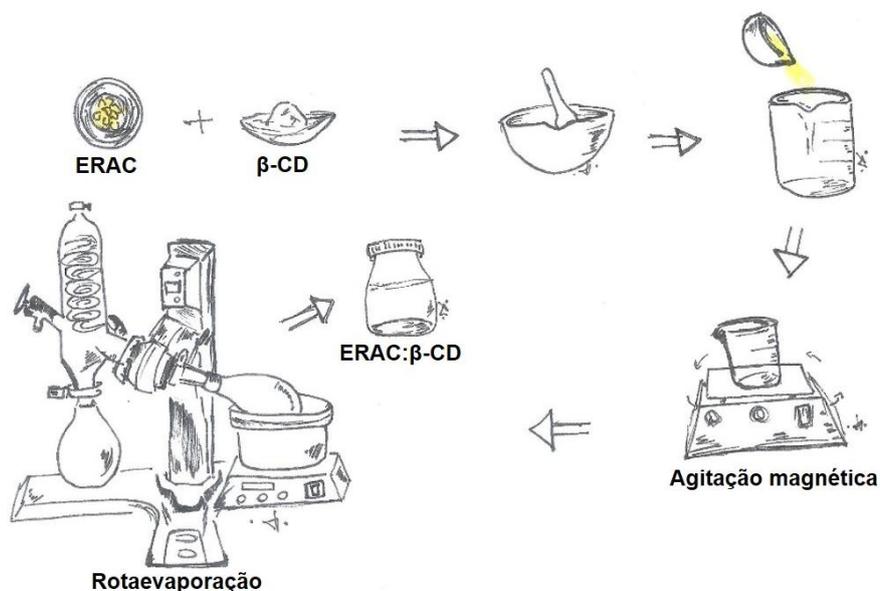


Figura 10. Esquema de preparo do complexo de inclusão ERAC:β-CD pelo método de Co-evaporação.

Fonte: Ilustração de Andréa Santos, 2017.

4.3 Caracterização dos Complexos de Inclusão

4.3.1 Análise Térmica

O ERAC, a β-CD, e os complexos obtidos (MX e CE) foram caracterizados por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) – DSC-60 (Shimadzu, USA) e Termogravimetria/Termogravimetria derivada (TG/DTG) – DTG-60H (Shimadzu, USA), sob razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, empregando massa de aproximadamente $1,0 \pm 0,5$ mg em porta-amostra de alumínio hermeticamente fechado. O equipamento foi previamente calibrado e/ou verificados no eixo da temperatura utilizando padrão índio metálico com pureza de 99,99% para o DSC e padrão oxalato de cálcio com pureza de 99,99% para o TG/DTG (MENEZES *et al.*, 2013; CORRÊA *et al.*, 2005).

4.3.2 Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de ERAC, da β-CD, e dos complexos de inclusão (MX e CE) foram obtidos utilizando espectroscópio equipado com diamante/cristal de Seleneto de Zinco (ZnSe) e dispositivo de Reflexão Total Atenuada (ATR) – AGILENT CARY 630 FTIR (Agilent

Technologies, USA). Foram utilizados $2,0 \pm 0,2$ mg de cada amostra, a qual foi depositada na superfície do cristal ATR em escala espectral $5100-600\text{ cm}^{-1}$ e resolução de 2 cm^{-1} e com processamento automático dos dados pelo *software* Agilent MicroLab PC - adaptado de Menezes *et al.* (2013).

4.3.3 Eficiência da formação dos complexos de Inclusão ERAC: β -CD

Para certificar-se da eficiência de inclusão (EI) das moléculas de ERAC nas cavidades de β -CD, a quantidade de ERAC aprisionada nos complexos de inclusão foi determinada por espectrofotometria a 216 nm (pico de varredura), UV-Vis (DR 5000, Hach Lange GmbH, Alemanha). Para cada tipo de complexo de inclusão (MX e CE), 5 mg de amostra foram solubilizados em 5 mL de álcool metílico P.A. e submetidos por 10 minutos em banho ultrassônico, a fim de que todo o composto ativo aderido à cavidade de β -CD fosse liberado na solução. Antes da aferição, as soluções foram centrifugadas a 3200 g durante 15 minutos para remover qualquer partícula de β -CD da solução e apenas o composto ativo estivesse presente - adaptado de Falcão *et al.* (2011). A EI foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$EI = \frac{\text{quantidade de ativo incorporado}}{\text{quantidade inicial de ativo}} \times 100$$

Na qual: a "quantidade de ativo incorporado" representa a quantidade de ativo presente nas partículas β -CD do complexo de inclusão, e a "quantidade inicial de ativo" indica a quantidade de ativo inicialmente utilizada para produzir o complexo de inclusão ERAC: β -CD. A quantidade de ativo foi calculada comparando-a a uma curva padrão ($1000 - 62,5\text{ }\mu\text{g/mL}$) obtida pela equação da reta: $y = 0,0044x + 0,0274$ $R^2 = 0,9995$.

4.4 Ensaio de citotoxicidade.

4.4.1 Cultivo das células de fibroblastos

As células de fibroblastos (L929) foram cultivadas em meio D-MEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). As culturas foram repicadas a cada 2 dias e mantidas em estufa (Forma Scientific Inc., modelo 3159) a 37°C , com 5% de CO_2 e umidade controlada. Posteriormente, as células L929 foram repicadas em microplacas de 96 poços, volume

de 100 µL/poço (1×10^6 cels/mL) e tratadas com ERAC, β-CD e os complexos ERAC:β-CD em seis concentrações, variando de 0 – 100 µg/mL para os testes de viabilidade celular com redução do *Methylthiazoletetrazolium* (MTT) - adaptado de Venuti *et al.* (2014); Enkhtaivan *et al.* (2017).

4.4.2 Teste de redução do *Methylthiazoletetrazolium* (MTT)

A viabilidade celular foi determinada através do microensaio colorimétrico utilizando MTT [3(4,5- *dimethylthiazol-2-yl*)-2,5- *diphenyltetrazolium bromide*] - Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA. As células foram incubadas por 72 horas com ERAC, β-CD e os complexos ERAC:β-CD. Após este intervalo, 10 µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados para cada 100 µL de cultivo. As microplacas foram mantidas na estufa por quatro horas. Após esse período foram retirados 100 µL do sobrenadante de cada poço e adicionados 100 µL de solução de HCl com isopropanol, homogeneizando bem até a completa dissolução dos cristais de sal. A microplaca contendo a reação foi submetida à leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 570nm e registrados valores de absorbância - adaptado de Venuti *et al.* (2014); Enkhtaivan *et al.* (2017).

4.5 Análise da atividade antitumoral *in vivo*

4.5.1 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Tiradentes – Aracaju/SE e aprovado, com protocolo nº: 030815RR (anexo).

4.5.2 Estudo da atividade antitumoral

Os camundongos Swis (*Mus musculus*) foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$) e umidade relativa (30% a 70%), com ciclo artificial claro/escuro de 12h, e receberam ração (Labina®, Purina, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram rigorosamente realizados dentro dos preceitos éticos determinados pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

O animal doador foi anestesiado com isoflurano (1,5%, via inalatória) e eutanasiado. A antisepsia da região abdominal foi feita com álcool iodado e foi

coletado 0,5 mL do líquido ascítico da cavidade abdominal e transferido para uma solução de contendo 5,0 mL de Ringer lactato e 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL). Posteriormente, foi realizada a análise da viabilidade celular através do método de exclusão do azul de Tripán a partir do lavado peritoneal utilizando solução de Ringer lactato para a contagem de células tumorais. Esta solução foi centrifugada para separar o precipitado contendo as células tumorais do sobrenadante o qual foi descartado. O precipitado foi tratado com solução corante de azul de Tripán a 0,025% para a separação das células viáveis (citoplasma translúcido) das não viáveis (citoplasma corado em azul), já que as células não viáveis perdem a integridade de membrana, sendo incapazes de regular o conteúdo intracitoplasmático de corante (azul de Tripán). O tratamento foi realizado utilizando a relação 1:1 (solução ringer de líquido ascítico: corante, 50 μ L).

A contagem das células tumorais viáveis é realizada em câmara de Neubauer utilizando magnificação de 400x. A contagem ocorre através da soma dos 4 quadrantes externos superiores e inferiores dividido por 4. O número de células a serem transplantadas por mL de solução é obtido utilizando a seguinte equação:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/mL} = (\text{n}^\circ \text{ células contadas} \times \text{diluição} \times 10^4) \div 4$$

Após o ajuste das células viáveis com solução de Ringer lactato na concentração de $2 \times 10^6/500 \mu\text{L}$, os animais receptores foram inoculados com 500 μL de células tumorais na região axilar, via subcutânea (ZHENG *et al.*, 2010). Após 24 horas, os animais foram submetidos ao tratamento via intraperitoneal com o ERAC: β -CD uma vez ao dia, por sete dias (Figura 11). Para este ensaio foram utilizados 35 camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, adultos, com massa corpórea de 30 ± 5 g. Os mesmos foram divididos randomicamente em gaiolas apropriadas com $n=7$. Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade Tiradentes, em caixas de polipropileno e grades metálicas apropriadas com cama de maravalha, trocadas diariamente.

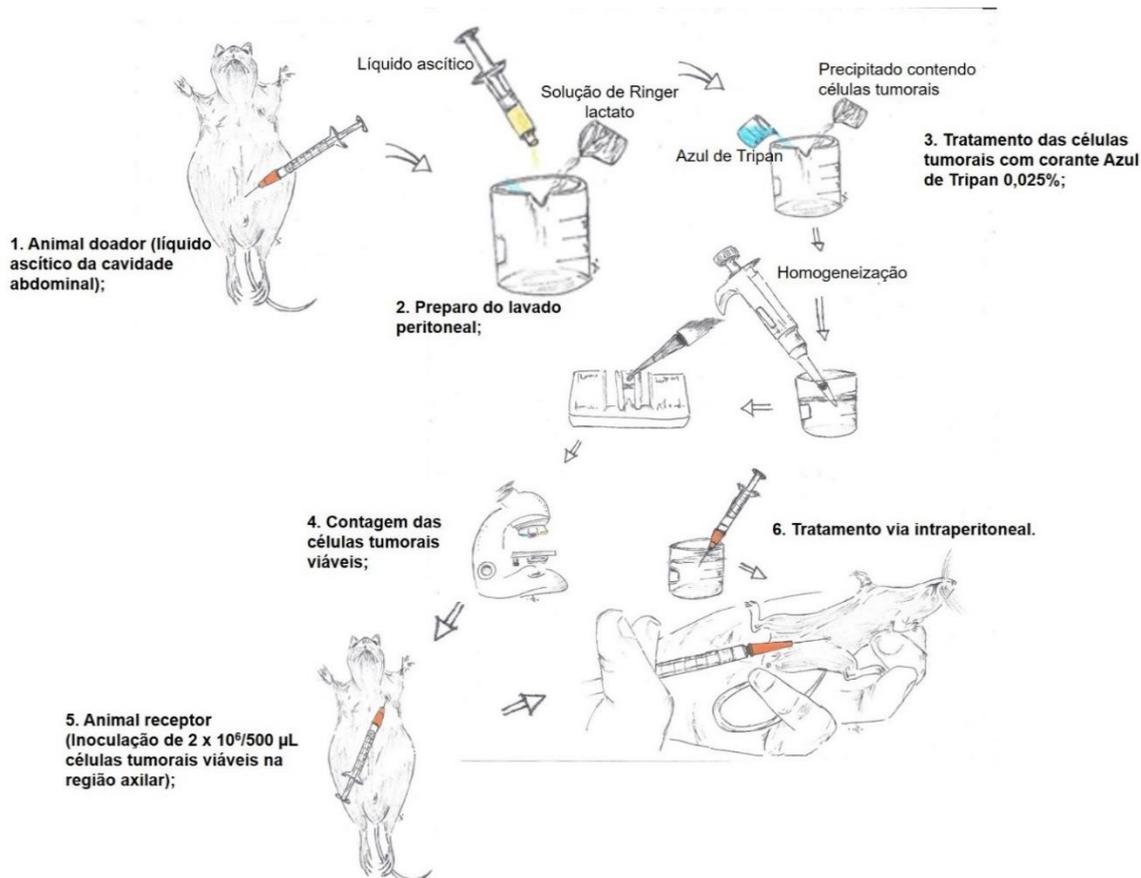


Figura 11. Esquema ilustrativo das etapas do estudo da atividade antitumoral *in vivo* em modelo Sarcoma 180.

Fonte: Ilustração de Andréa Santos, 2017.

4.5.3 Formação de grupos experimentais

Os animais foram separados em grupos de acordo com o tratamento realizado, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento realizado nos animais transplantados com Sarcoma 180.

Grupos	ERAC ($\mu\text{g/mL}$)	Formulação ERAC: $\beta\text{-CD}$ ($\mu\text{g/mL}$)	Tratamento ($\mu\text{g/kg/dia}$)*
CTR	-	-	Solução salina + $\beta\text{-CD}$
5-FU	-	-	25000 de 5 - Fluorouracil
ERAC: $\beta\text{-CD}$ 30	8	25	30**
ERAC: $\beta\text{-CD}$ 100	26,6	83,3	100**
ERAC: $\beta\text{-CD}$ 300	86	250	300**

*Todos os compostos foram diluídos em 0,2 mL de solução salina e injetados via intraperitoneal;

**As doses foram determinadas com base na concentração de ácido caurenóico identificada no extrato, Moreira *et al.*, (2016).

4.5.4 Avaliação dos parâmetros hematológicos

As amostras de sangue foram coletadas no nono dia por meio do plexo orbital sob efeito anestésico. Foram utilizados capilares revestidos internamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), evitando assim a coagulação da amostra até o tubo coletor, preservando a integridade das mesmas. Os parâmetros hematológicos avaliados foram: contagem de leucócitos totais e a diferencial, tais como os eosinófilos (%), linfócitos (%), neutrófilos (%) e monócitos (%). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada através de esfregaço sanguíneo elaborado com as amostras frescas, através de uma gota do sangue total pingada em lâmina limpa de vidro, com borda fosca e identificada. As lâminas foram coradas com corantes panóticos, e realizada a contagem diferencial em 100 células utilizando o microscópio de luz.

4.5.5 Avaliação sorológica de Lactato desidrogenase (LDH)

Amostras de sangue obtidas do plexo orbital foram armazenadas em tubos coletores não heparinizados e centrifugadas a 2000 g por 5 minutos para análise em aparelho automatizado Bioplus 200 - adaptado de Yao *et al.* (2016b).

Após a coleta das amostras sanguíneas, os camundongos foram eutanasiados em câmara de gás com fluxo contínuo de CO₂ para a excisão dos tumores, bem como dos órgãos de interesse: fígado, rins e baço. Estes foram devidamente pesados em balança de precisão e analisados macroscopicamente.

4.5.6 Avaliação macroscópica dos órgãos excisionados

Baço, fígado e rins foram removidos e a sua massa relativa foi calculada pela equação a seguir: $MR = (\text{massa do órgão} \times 100) / \text{massa do animal}$. Os órgãos também foram avaliados quanto as suas características macroscópicas, de acordo com as seguintes variáveis: variações na coloração, presença de áreas de necrose, hemorragia, supuração e/ou fibrose, bem como consistência do tecido. Os dados foram tabulados para análise posterior. Os espécimes foram acondicionados em frascos coletores, previamente identificados, contendo solução de formaldeído a 10% para o processo de fixação e em seguida submetidos ao processo de rotina histopatológica.

4.5.7 Avaliação histopatológica dos órgãos excisionados

As amostras de órgãos e dos tumores removidos foram armazenadas em solução de formaldeído 10% tamponado. Decorridas 24 horas da fixação dos espécimes, estes foram submetidos ao processamento histológico de rotina laboratorial para obtenção das secções histológicas e avaliadas em microscopia óptica das prováveis alterações teciduais (MASSON, 1956). A fim de possibilitar uma análise comparativa semiquantitativa da intensidade das alterações histopatológicas nos diferentes órgão e grupos experimentais, estas, quando presentes, foram classificadas em: leve (distúrbio atinge menos de 10% do parênquima do órgão), moderada (distúrbio atinge entre 10 e 50% do parênquima do órgão) e intensa (distúrbio atinge mais de 10% do parênquima do órgão).

4.5.8 Determinação do efeito da administração do ERAC:β-CD sobre a massa ponderal, volume e taxa de inibição do crescimento dos tumores.

A massa ponderal tumoral foi expressa como a massa aferida de cada tumor por 100 g de massa corpórea dos camundongos. O volume tumoral foi determinado pelo produto da altura, profundidade e largura dos tumores, multiplicado pelo fator de correção 0,52 e expressa em mm³ (LEE *et al.*, 2003). A taxa de inibição do crescimento tumoral (%) foi calculada pela seguinte equação:

$$PI \% = [(A - B) / A] \times 100$$

Na qual: PI – Percentual de inibição da massa tumoral;

A – Média da massa do tumor do controle negativo;

B – Média da massa do tumor dos grupos tratados com ERAC:β-CD.

Os tumores excisionados foram acondicionados em frascos coletores, previamente identificados, contendo solução de formaldeído a 10% para o processo de fixação e submetidos ao processo de rotina histopatológica.

4.5.9 Avaliação histopatológica dos tumores excisionados

Secções histológicas coradas em HE foram utilizadas para análise das características histopatológicas dos tumores excisionados dos diferentes grupos de animais experimentais. As variáveis microscópicas avaliadas foram: grau de atipia citológica, áreas de necrose coagulativa e número de figuras de mitose típicas e

atípicas (MASSON, 1956). Estas foram categorizadas em quatro escores de intensidade crescente, conforme descrito na Tabela 4, para posterior análise semiquantitativa. Além disso, ainda foram avaliadas a presença ou ausência de invasão muscular e adipocítica, invasão perineural e formação de êmbolos tumorais.

Tabela 4. Descrição dos parâmetros histopatológicos para análise semi-quantificativa de diferenças entre os tumores excisionados dos diferentes grupos experimentais.

Variáveis histopatológicas	0	1	2	3
Atipia (pleomorfismo e hiperchromatismo nuclear)	Ausente	Bem marcada em menos de 10% da população tumoral	Bem marcada em 10% e 50% da população tumoral	Bem marcada em mais de 50% da população tumoral
Área de necrose	Ausente	Presente em menos de 10% da área tumoral	Presente em 10% e 50% da área tumoral	Presente em mais de 50% da área tumoral
Número de figuras mitóticas (10 campos/400x)	Ausente	1 a 3 mitoses	4 a 6 mitoses	7 ou mais mitoses

Fonte: (MASSON *et al.*, 1956).

4.5.10 Análise imunohistoquímica da expressão de antígenos

Os cortes histológicos com 5 µm de espessura foram montados em lâminas de vidro silanizadas e submetidas à reação de imunohistoquímica por meio do método da estreptoavidina-biotina indireta. Essas secções histológicas foram desparafinizadas em xilol e lavadas em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 95%, 90%, 80%, e 70%) e duas lavagens em água destilada. A etapa seguinte consistiu na recuperação antigênica por meio da imersão das secções em solução de citrato (10 mM; pH 6.0), aquecida por 20 minutos em micro-ondas, potência máxima. Posteriormente, as secções histológicas foram lavadas com tampão fosfato e realizado o bloqueio da peroxidase endógena (H₂O₂ – 3%) e subsequente incubação em tampão fosfato-salina (PBS), 10 mM; pH 7,4. A marcação dos antígenos foi realizada com o anticorpo primário diluído em tampão PBS, contendo albumina bovina 1% por 3 horas, temperatura ambiente, de acordo com a Tabela 5. Após lavagem das secções histológicas com tampão PBS, foi realizada incubação com o anticorpo secundário biotilado (Kit LSAB System - HRP, Dako), lavagem com tampão

PBS e incubação com o complexo Estreptavidina conjugada com peroxidase (Kit LSAB System - HRP, Dako). Procedeu-se com lavagem em tampão Tris-Salina (TBS), 0,25 M, pH 7.4. A reação foi revelada com o uso de tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) e as secções foram lavadas com tampão TRIS, desidratadas, diafanizadas e contra coradas com Hematoxilina de Meyer para montagem e posterior análise. A positividade para imunomarcção, no que se refere ao padrão de cor, ocorre em tom acastanhado. Dessa forma, a graduação da expressão dos antígenos ocorreu de acordo com Escala Germânica de Imunorreatividade (SULLU *et al.*, 2010). A escala é baseada na multiplicação do coeficiente de intensidade da expressão do imunomarcador pelo coeficiente de porcentagem de células positivas. De maneira que, o coeficiente de intensidade da expressão do imunomarcador é graduado de 0-3, onde 0 representa a ausência de coloração, 1: fracamente corado, 2: moderadamente corado e 3 quando fortemente corado. Para obter o coeficiente de porcentagem de células positivas, observa-se a sequência do número de células positivas (coradas) e negativas (não coradas) contadas em um espaço amostral de no mínimo 500 células, com estratificação de: coeficiente 0, se ausência de coloração, coeficiente 1, se 1 - 10% de positividade, coeficiente 2 se 11 - 50% de positividade, coeficiente 3 se 51 - 80% de positividade e coeficiente 4 se 81 - 100% de positividade. O valor final da Escala Germânica de Imunorreatividade (coeficiente de intensidade da expressão do imunomarcador X coeficiente de porcentagem de células positivas) varia de 0-12, de modo que: 0 (negativa), 1 - 4 (fraca), 5 - 8 (moderada) e 9 - 12 (forte). A fim de dinamizar as análises dos casos, considerou-se dois grupos: grupo 1 (negativos/fracos) e grupo 2 (moderados/fortes).

Tabela 5. Relação de anticorpos utilizados nas análises imuno-histoquímicas dos tumores sarcoma 180.

Anticorpo primário	Clone	Fabricante	Titulação
Anti-NF-kB p65	Policlonal, (H-286)	Santa Cruz, SC-7151	1:50
Anti-NRF2	Policlonal (C-20)	Santa Cruz, SC-722	1:50
Anti-Ki67	Anti-camundongo, MIB-1	Dako, Glostrup, Denmark, M724029-2, M724029-2	1:50
VEGF	Policlonal (A 20)	Santa Cruz, SC-152	1:50

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Análise Estatística

Para o teste de normalidade, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk, enquanto que, para análise de homocedasticidade foram aplicados os testes de Bartlett (supõe que a variável tem distribuição normal) e Levene (supõe que os dados têm qualquer distribuição contínua). Dados com distribuição normal e com homocedasticidade foram comparados entre si utilizando o teste ANOVA seguido da extensão pós teste de Tukey. Dados que não obedecessem a estes pressuposto (distribuição normal e/ou homocedasticidade) seriam comparados pelo teste Kruskal-Wallis com extensão pós teste de Dunn. Diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de p foram menores que 0,05. As variáveis quantitativas foram expressas sob a forma de média \pm erro padrão da média.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Modelagem molecular

Os resultados mostraram que os locais de interação entre as moléculas de AC: β -CD (Figura 12 a e b) são representados por ligações de hidrogênio. De acordo com a figura 12 c, a modelagem do ERAC apresenta menor valor absoluto de afinidade (-6,4 kcal/mol). Uma melhor abordagem molecular do acoplamento do ERAC na estrutura da β -ciclodextrina, está representado no diagrama de interações moleculares da na Figura 12 d, demonstrando os átomos de hidrogênio interagindo entre si, com distância de geometria 2,04 Å do ERAC para a β -ciclodextrina.

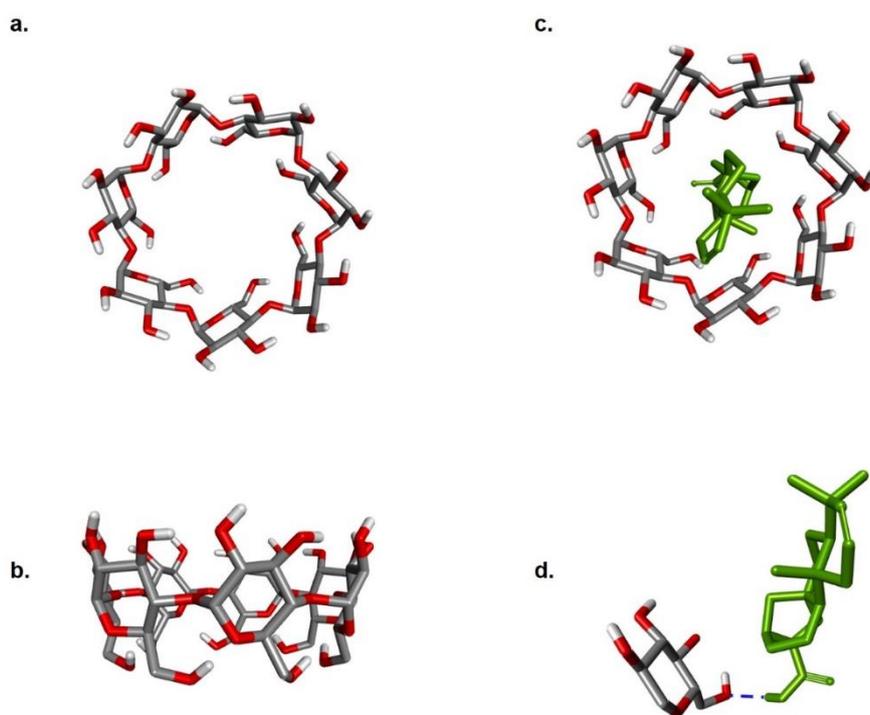


Figura 12. Representação da estrutura molecular da β - ciclodextrina (a e b), a modelagem molecular do AC na posição de menor valor absoluto de afinidade (kcal / mol) (c) e o diagrama de interações moleculares entre AC: β -CD (d), em verde, representação do AC.

Fonte: Imagem obtida pelo Software Auto-dock vina 1.1.2.

A demonstração da modelagem molecular reflete o comportamento das ligações de hidrogênio dos grupos OH presente no AC. Tais evidências denotam o esclarecimento dos grupos funcionais CH_2 e CH_3 presentes no AC que se mantém fora da cavidade de β -CD, enquanto a outra porção da estrutura interage com a porção interna da molécula de β -CD. Os referidos achados corroboram os dados nas análises

de Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), quando na faixa de $1454 - 866 \text{ cm}^{-1}$ é evidente o registro do sinal com bandas aparentes. Desse modo, a modelagem das moléculas nas dez diferentes abordagens de acoplamento, demonstrou que apenas uma estrutura de ERAC foi incorporada na estrutura de β -CD.

5.2 Análise Térmica dos Complexos de Inclusão

A presença de interações intermoleculares “hóspede-hospedeiro” é uma característica de conformação estrutural das ciclodextrinas. Essa particularidade possibilita que compostos (hóspede) com moléculas de natureza hidrofóbica sejam adaptados no interior da cavidade apolar das CDs (hospedeiro) e formados complexos de inclusão (MARTIN DELL VALLE, 2004). Os possíveis complexos formados são passíveis de análise térmica pela técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria/Termogravimetria derivada (TG/DTG), de modo que, a partir da determinação de entalpias, temperatura de fusão; são gerados termogramas que evidenciam a diminuição ou ausência de pontos de fusão dos compostos analisados por DSC e a perda de massa seguida de decomposição de carbono em diferentes faixas de temperatura por TG/DTG, indicando a formação dos complexos (TEJASHRI *et al.*, 2013).

A figura 13 apresenta os eventos térmicos do ERAC, da β -CD e dos complexos MX e CE avaliados pelo DSC. As curvas revelaram eventos endotérmicos entre $107 - 158^\circ\text{C}$ ($T_{\text{pico}} = 132^\circ\text{C}$) para o ERAC, correspondendo a temperatura de fusão dos constituintes cauranos do extrato (FERRARI *et al.*, 1971). Seguindo os eventos térmicos demonstrados na figura 13, a β -CD apresentou dois eventos endotérmicos, um em 104°C , característico da perda de água da molécula e outro em 339°C , referente ao ponto de fusão seguido de decomposição térmica.

As misturas MX e CE apresentaram eventos endotérmicos na faixa de $91 - 136^\circ\text{C}$ semelhantes ao da β -CD. Tais eventos térmicos correspondem a perda de moléculas de água e provável adsorção do ERAC na superfície da β -CD. O evento seguinte que ocorre a 331°C para MX e a 340°C para CE é atribuído a fusão do complexo.

Ao avaliar a possível formação do complexo ERAC: β -CD, quando observado os perfis térmicos, é notável o deslocamento da temperatura de fusão e a diminuição dos picos de fusão dos complexos quando comparados com a β -CD, além da marcante redução de entalpia no evento endotérmico, com representação gráfica menos evidente para o complexo de inclusão MX quando comparado ao CE, indicando

melhor inclusão do ERAC nas cavidades de ciclodextrina pelo método de malaxagem. Similarmente a este evento, Leite *et al.*, (2018) demonstraram redução da área do pico de fusão ao formar complexos de óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker (candeeiro), rico em terpeno, com β -CD.

Entres os eventos térmicos que geram mudanças em curvas de DCS, o alargamento ou diminuição da intensidade desses picos está relacionado a interações intermoleculares, assim existem evidências de que o ERAC esteja interagindo com as cavidades de CDs e formando os complexos de inclusão.

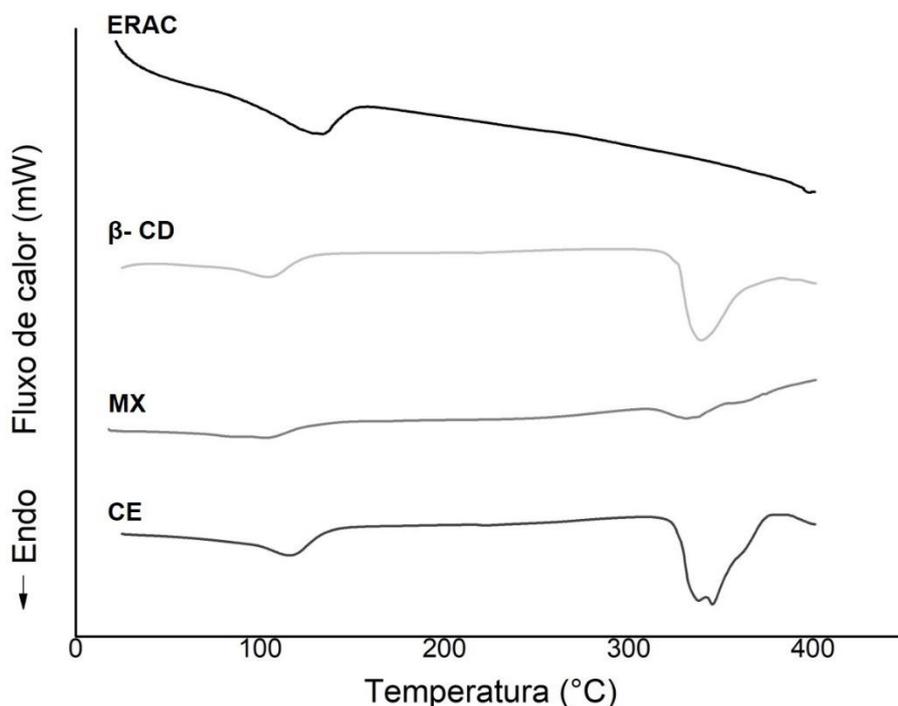


Figura 13. Termograma de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) do Extrato rico em ácido *ent*-caurenóico (ERAC), β -Ciclodextrina e dos compostos de inclusão MX (malaxagem) e CE (co-evaporação) em atmosfera dinâmica de Nitrogênio (50 mL.min⁻¹) e razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹.

As curvas de TG/DTG do ERAC, da β -CD e dos complexos MX e CE estão representadas na figura 14 e as porcentagens de perda de massa na tabela 6. Ao avaliar os dados, pode-se observar perda de massa do ERAC entre 32 – 300°C, compatíveis com a degradação de cumarinas e compostos cauranos que estão presentes no ERAC, confirmando os achados representados pelo DSC. A curva termoanalítica da β -CD ocorre em três etapas, na primeira, houve uma perda de massa de 14,1 % (25 – 150°C), correspondendo a liberação de água; na segunda, uma perda pouco notável de 0,4 % (150 – 300°C), característica da transição de fase

para o evento de decomposição térmica (71,5 %, 300 – 400°C) que ocorre na terceira etapa, seguida de carbonização (7,3 %, 400 – 600°C).

Os dados térmicos dos complexos MX e CE foram semelhantes ao da β -CD, todavia as perdas de massas na faixa de 150 – 300°C tiveram um aumento para o MX (5,6 %) e CE (3,6 %) quando comparadas à β -CD livre (0,4 %). Este achado sugere a perda de massa do ERAC incluído na cavidade de ciclodextrina, visto que nessa faixa de temperatura as moléculas de β -CD são estáveis e o ERAC precisa de uma temperatura mais elevada para ser decomposto (KAYACI *et al.*, 2013), já que foi incorporado às CDs.

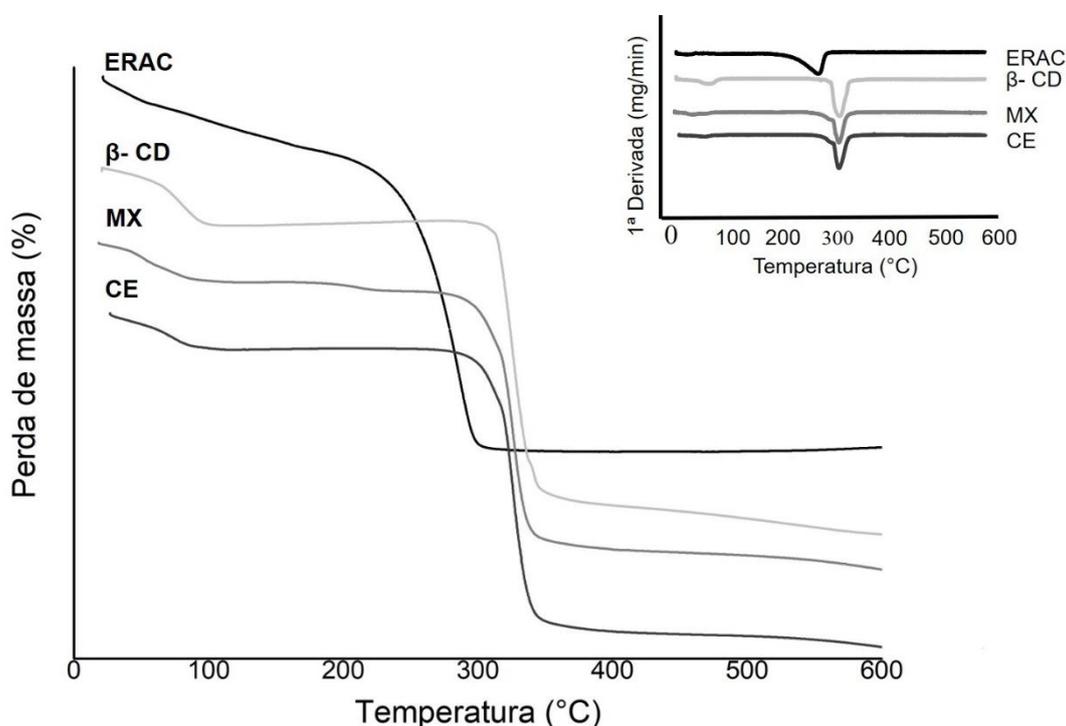


Figura 14. Termograma de Termogravimetria/Termogravimetria derivada (TG/DTG) do Extrato rico em ácido *ent*-caurenóico (ERAC), β -Ciclodextrina e dos compostos de inclusão MX (malaxagem) e CE (co-evaporação) em atmosfera dinâmica de Nitrogênio (50 mL.min⁻¹) e razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹.

Tabela 6. Porcentagem de perda de massa obtido por Termogravimetria/Termogravimetria derivada (TG/DTG) de amostras de Extrato rico em ácido *ent*-caurenóico (ERAC), β -Ciclodextrina e dos compostos de inclusão MX (malaxagem) e CE (co-evaporação).

Amostra	Temperatura de desidratação 25 - 150 (°C)	Temperatura de degradação 150 - 600 (°C)	Δm_1 (%) 25 - 150 (°C)	Δm_2 (%) 150 - 300 (°C)	Δm_3 (%) 300 - 400 (°C)	Δm_4 (%) 400 - 600 (°C)
ERAC	43,0	287,8	14,4	76,9	2,0	1,0
β - CD	80,0	327,8	14,1	0,4	71,5	7,3
MX	51,6	325,8	9,4	5,6	62,0	6,3
CE	75,9	325,8	9,1	3,6	67,9	3,9

A mudança da estabilidade térmica de hidrocarbonetos na presença de β -Ciclodextrina também foi evidenciada em outros estudos que analisaram termicamente complexos de inclusão, reforçando a aplicabilidade das técnicas de DSC e TG/DTG para demonstrar forma de inclusão de elementos apolares em cavidades de ciclodextrinas (PERIASAMY *et al.*, 2014; SHRESTHA; HO; BHANDARI, 2017).

5.3 Análise por FTIR dos Complexos de Inclusão

A escolha da técnica FTIR para analisar a formação dos complexos de inclusão ERAC: β -CD, permite que as vibrações que ocorrem nos átomos ligados aos grupos funcionais das moléculas emitam um sinal específico para cada banda no espectro de absorção do infravermelho, possibilitando a interpretação da composição das amostras em estudo (FERNANDES *et al.*, 2009). Desse modo, as CDs ao se complexarem com compostos, promovem uma interação intermolecular através de ligações não covalentes, permitindo que a parte da molécula do composto incluída na cavidade das ciclodextrinas gere um deslocamento característico nas bandas de absorção (PERIASAMY *et al.*, 2014).

A Figura 15 mostra os espectros FTIR obtidos do ERAC, da β -CD e dos complexos de inclusão MX e CE. No espectro que corresponde ao ERAC, observam-se duas bandas em 2918 cm^{-1} e 2856 cm^{-1} características dos estiramentos dos carbonos primários e secundários e outra em 1685 cm^{-1} , referente ao estiramento do grupo carboxila (-COOH). Na faixa de 1454 – 866 cm^{-1} , bandas aparentes são características da deformação angular de $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ na cadeia da molécula do composto de ERAC. O espectro da β -CD mostra uma banda larga em 3271 cm^{-1} relacionada ao estiramento dos grupos hidroxílicos associados à molécula de β -CD. A

banda que segue a 2917 cm^{-1} é representativa do estiramento de carbonos primários durante as vibrações ocorridas na região de absorção do infravermelho. A ocorrência de outras bandas na faixa de $1152 - 1019\text{ cm}^{-1}$ são evidências da deformação do grupo éter (C-O) em interação com as hidroxilas (-OH) presentes na estrutura molecular durante as vibrações ocorridas na região de absorção. Já o evento entre $938 - 700\text{ cm}^{-1}$ marca as vibrações cíclicas do anel piranosídico de glucose da β -CD mediante a absorção da radiação infravermelha.

No que se refere as bandas correspondentes aos complexos de inclusão, evidenciou-se que os métodos MX e CE apresentaram espectros semelhantes ao da β -CD, todavia as bandas nas faixas $1805 - 1507\text{ cm}^{-1}$ e $1180 - 940\text{ cm}^{-1}$ evidenciaram intensidade alterada, refletindo bandas deslocadas e mais largas que a β -CD, o que sugere uma conformação estrutural das moléculas e adaptação do ERAC na cavidade de β -CD. A referida interação entre hóspede-hospedeiro nas regiões de absorção citada é indicativo do estiramento de hidroxilas (O-H) e carbonos primários (C-H) das CDs, promovido pelas modificações nas ligações de hidrogênio após a formação dos complexos de inclusão (KFOURY *et al.*, 2014; CRUPI *et al.*, 2011). Essas modificações estruturais que possibilitam a saída de água da cavidade de β -CD e a interação com o ERAC podem ser observadas em outros estudos com terpenos (CORRÊA *et al.*, 2005; SU *et al.*, 2012; REN *et al.*, 2014).

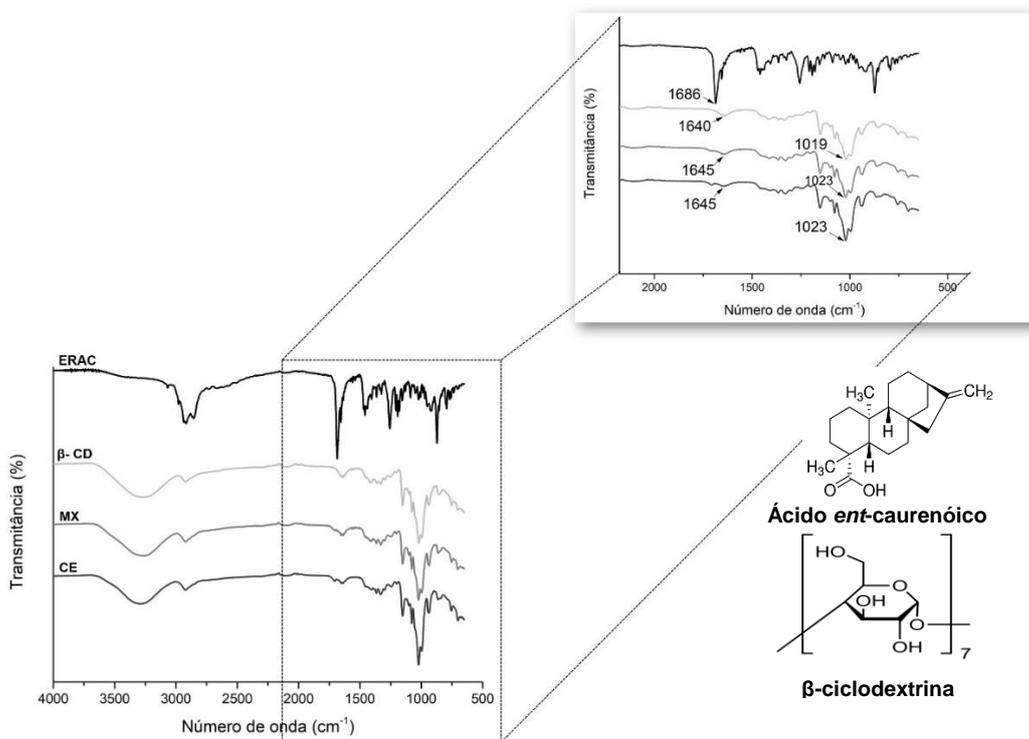


Figura 15. Espectros Vibracionais de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier do Extrato rico em ácido *ent*-caurenóico (ERAC), β -Ciclodextrina e dos compostos de inclusão MX (malaxagem) e CE (co-evaporação).

5.4 Análise da Eficiência de Inclusão

A capacidade de moléculas apolares como os terpenos interagirem com a cavidade hidrofóbica das CDs permite que sejam formados complexos de inclusão (MARQUES, 2010). Os valores avaliados neste estudo mostraram que o método MX foi capaz de incluir 65,37% de ERAC em ciclodextrina e 13,64% pelo CE. O mesmo achado de inclusão de eficiência pela técnica de malaxagem superior à CE foi observado por Murthy; Sowjanya (2011) ao incluírem carvedilol em ciclodextrinas. Ao observar outros dados da literatura que analisaram a eficiência de inclusão de compostos terpenos em moléculas de ciclodextrina, pode-se demonstrar que o resultado deste estudo foi superior aos já relatados. Menezes et. al (2013) obtiveram 42,57% de eficiência de complexação do linalol em β -ciclodextrina. Abarca et. al (2016) mostrou que 34,8% de composto de óleo essencial pode ser incluído em β -ciclodextrina. As diferenças de valores referentes a eficiência de inclusão deste estudo quando comparadas aos dados da literatura podem estar relacionadas ao tipo de interação da estrutura química do ERAC com a ciclodextrina (LAWTRAKUL *et al.*, 2014), bem como a razão molar do ERAC: β -CD que confere melhor eficiência de inclusão dos complexos, a partir da conformação molecular destas substâncias, dispondo o complexo ERAC: β -CD para futuras abordagens em aplicações clínicas.

5.5 Ensaio de viabilidade celular pelo teste MTT

O resultado do tratamento das células L929 com os compostos ERAC, β -CD, MX e CE representado na Figura 16 mostrou que a viabilidade celular não foi afetada, preservando a integridade de mais de 70% de células submetidas ao meio suplementado com estes compostos em concentrações que variaram de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$, sem diferença significativa entre as amostras testadas ($p > 0.05$).

Similarmente a estes achados, evidência anterior com testes de citotoxicidade de diterpenos em fibroblastos não reportaram a ocorrência de danos significativos a tais células, quando foram combinados a moléculas de β -CD (CÔRREA *et al.*, 2005). Contrariando estes achados, Cavalcanti *et al.* (2006) demonstraram que o uso da substância isolada foi capaz de produzir danos ao DNA de células V79 (fibroblastos) nas concentrações de 2,5 – 60 $\mu\text{g/mL}$. Dessa forma, os resultados do presente estudo mostraram que tanto o ERAC isolado quando incorporado a molécula de β -CD não demonstrou níveis significativos de citotoxicidade em células de fibroblastos, enfatizando a sinergia com outras moléculas presente no ERAC.

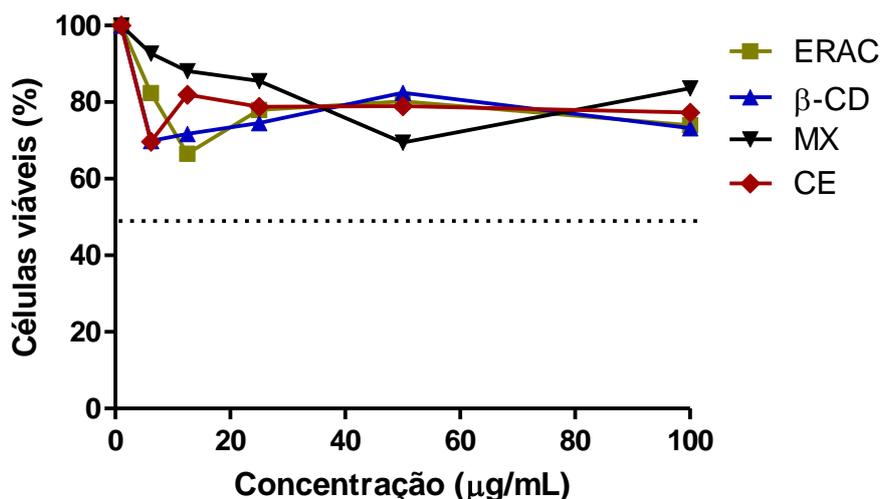


Figura 16. Efeito do tratamento com ERAC, β -CD e complexos de inclusão ERAC: β -CD elaborados pelo método de malaxagem (MX) e co-evaporação (CE) na viabilidade celular de células L929. Os dados estão representados como média \pm erro padrão. $p > 0.05$. $F = 0.6399$. ANOVA seguida pelo pós teste de Tukey.

5.6 Parâmetros hematológicos

A análise hematológica dos grupos experimentais revelou leucopenia com linfocitose nos animais tratados com o quimioterápico 5-FU, presença de neutrófilos tóxicos com núcleo em forma de anel nos grupos CTR e naqueles tratados com os complexos de inclusão ERAC: β -CD. Ainda pode ser observado neutrofilia nos animais que receberam as doses de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O grupo tratado com a dose de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ERAC: β -CD apresentou diferença significativa entre o grupo controle que não foi tratado com a formulação (tabela 7).

Todos os grupos que receberam a formulação contendo ERAC mostraram um perfil hematológico diferente daquele tratado com 5-FU. Enquanto este exibiu um quadro representativo de amostras tratadas com quimioterápico padrão, refletido pela diminuição de células sanguíneas, aqueles tratados com ERAC: β -CD exibiram células jovens, que são liberadas pela medula óssea na fase incompleta da maturação, a fim de compensar o estado carencial de defesa do organismo (WALKER, 2009).

Tabela 7. Dados hematológicos dos grupos experimentais de animais transplantados com Sarcoma 180.

Tratamento	Leucócitos Totais ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Contagem diferencial de Leucócitos (%)			
		Neutrófilos segmentados	Neutrófilos Bastonetes	Monócitos	Linfócitos
CTR	3,1 \pm 0,5	24,4 \pm 5,9	1,0 \pm 0,8	5,2 \pm 3,1	69,4 \pm 6,1
5-FU	0,4 \pm 0,3***	1,5 \pm 1,4***	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0***	20,5 \pm 14,1***
ERAC: β -CD30	3,5 \pm 0,6 [#]	58,2 \pm 2,7*** [#]	1,5 \pm 0,7	3,8 \pm 1,1	37,2 \pm 40***
ERAC: β -CD100	3,0 \pm 0,7 [#]	51 \pm 4,7*** [#]	0,3 \pm 0,8	2,3 \pm 0,5*	46,3 \pm 5,4 [#]
ERAC: β -CD300	3,3 \pm 0,5 [#]	34,3 \pm 5,7*** [#]	1,2 \pm 1,6	1,2 \pm 0,5***	56,5 \pm 14,2 [#]
Valores de Referência*	1,9 - 7,0 2,5 \pm 1,4	10 - 23 13,7 \pm 4,5	0 - 3	0 - 5 0,7 \pm 0,1	55 - 90 85 \pm 4,5

Valores expressos como Média \pm erro padrão da média. Diferenças estatísticas estão representadas com **($p < 0.01$) e ***($p < 0.001$), em comparação ao grupo (CTR), e #($p < 0.001$) comparado ao grupo 5-FU. ANOVA seguida pelo pós teste de Tukey.

*SANTOS *et al.* (2016).

5.7 Parâmetro sorológico

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima intracelular e indicativa de dano tissular agudo ou crônico quando apresenta níveis elevados mediante análise bioquímica. É um marcador de acompanhamento de lesões hepáticas, renais, tumores, visto que o dano celular implica na elevação da atividade enzimática na circulação periférica (NESTOR, 2004).

Os valores sorológicos da enzima lactato desidrogenase (LDH) nos grupos tratados com 5-FU e as formulações ERAC: β -CD estão representados na figura 17. A elevação dos níveis de LDH pode ser observado nos grupos controles, todavia os animais que receberam tratamento com o quimioterápico padrão apresentaram diferença significativa em relação àquele que não recebeu tratamento com alguma substância teste. Ao avaliar os níveis de LDH dos grupos que receberam terapêutica com os complexos de inclusão, percebeu-se que estes valores se mantiveram dentro da normalidade com diferenças significativas comparada com o grupo controle 5-FU. Achado semelhante pode ser observado no estudo de Yao *et al.*, (2016) quando relatou o aumento dos níveis de LDH de camundongos tratados com doxorrubicina, agente antineoplásico, e a diminuição desses níveis quando tratados com o composto epigallocatequina-3-galato, uma catequina encontrada na *Camellia sinensis* (chá verde).

Alguns autores afirmam que esta condição esteja relacionada ao aumento de espécies reativas de oxigênio que promovem estresse oxidativo do meio celular por

desregulação da via óxido nítrico, resultando no estado patogênico (WEINSTEIN *et al.*, 2000; DEAVALL *et al.*, 2012).

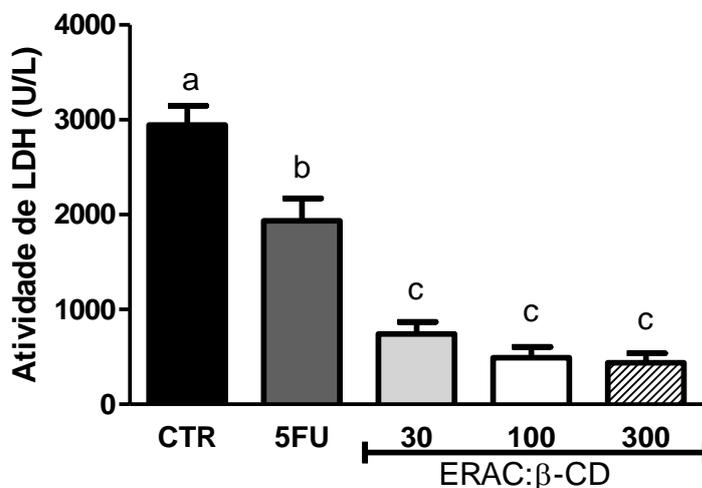


Figura 17. Valores representativos da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em animais com tumor sarcoma 180 tratados com 5-FU e composto ERAC:β-CD. Dados representados em média ± erro padrão da média. Segundo pós teste de Tukey, letras iguais indicam que não existe diferença significativa, letras diferentes, diferença significativa ($p < 0.001$), $F = 43.94$. ANOVA seguida de pós teste de Tukey.

5.8 Parâmetros histopatológicos dos órgãos

A avaliação dos parâmetros histológicos dos órgãos de camundongos com tumor submetidos ao tratamento com 5FU e formulação com ERAC:β-CD apresentou pequenas alterações quando comparada ao grupo controle (CTR). Os fígados dos grupos CTR (Figura 18 A) e daqueles tratados com ERAC:β-CD apresentaram distúrbios leves com evidências de congestão da veia porta e da centrolobular (Figura 18 C, D, E). Já o grupo 5FU que recebeu quimioterápico padrão, apresentou distúrbios intensos, esteatose, tumefação turva celular; quadro característico de sobrecarga hepática no processo de metabolização química, além de congestão da veia porta e da centrolobular.

Na análise dos rins dos grupos controles (CTR – Figura 19A e 5FU – Figura 19B) foram observados distúrbios intensos compatíveis com áreas de tumefação turva, hemorragia glomerular e tubular, cilindro hialino. Diferente do observado nos grupos tratados com o composto ERAC:β-CD (Figura 19 C, D, E) que mostraram glomérulos preservados e distúrbios leves marcados por hemorragia tubular.

Os respectivos achados relacionados aos órgãos de metabolização e excreção, são compatíveis com o trabalho de Debnath *et al.* (2017), que ao avaliar os efeitos

antitumorais do aminoácido Poli-L-Lisina em modelo sarcoma 180, observaram alterações similares nos referidos órgãos. Tais modificações arquiteturais na histopatologia desses órgãos são tidas como sinais reversíveis, passíveis de regeneração quando a estrutura tecidual se mantém preservada (KUMAR *et al.*, 2005).

No que se refere ao órgão responsável pelo acompanhamento das células viáveis do sangue, os baços dos grupos CTR (Figura 20A) e dos tratados com ERAC: β -CD (Figura 20 C, D, E) mostraram-se preservados. Quanto às estruturas esplênicas, a polpa vermelha apresentou cápsulas e trabéculas íntegras; e a polpa branca, folículos linfoides, centro germinativo e arteríola folicular sem alterações visíveis. Já os órgãos esplênicos do grupo 5FU (Figura 20B), foi notável a diminuição do tamanho e a presença de pigmentos férricos de hemossiderina circundando as áreas de sinusóides vasculares e trabéculas. Tais evidências fazem referência às condições de distúrbios pigmentares envolvidos no metabolismo da hemoglobina. Diante de imunossupressão e depressão medular promovida pelo fármaco 5FU (DOGRA *et al.*, 2004), o baço é condicionado a captação do grupo heme (composto da hemoglobina) que se unem as moléculas de ferro no interior dos macrófagos, levando a maior produção de pigmentos férricos de hemossiderina que resulta no acúmulo deste pigmento nas células esplênicas (GARTNER; HIATT, 2007).

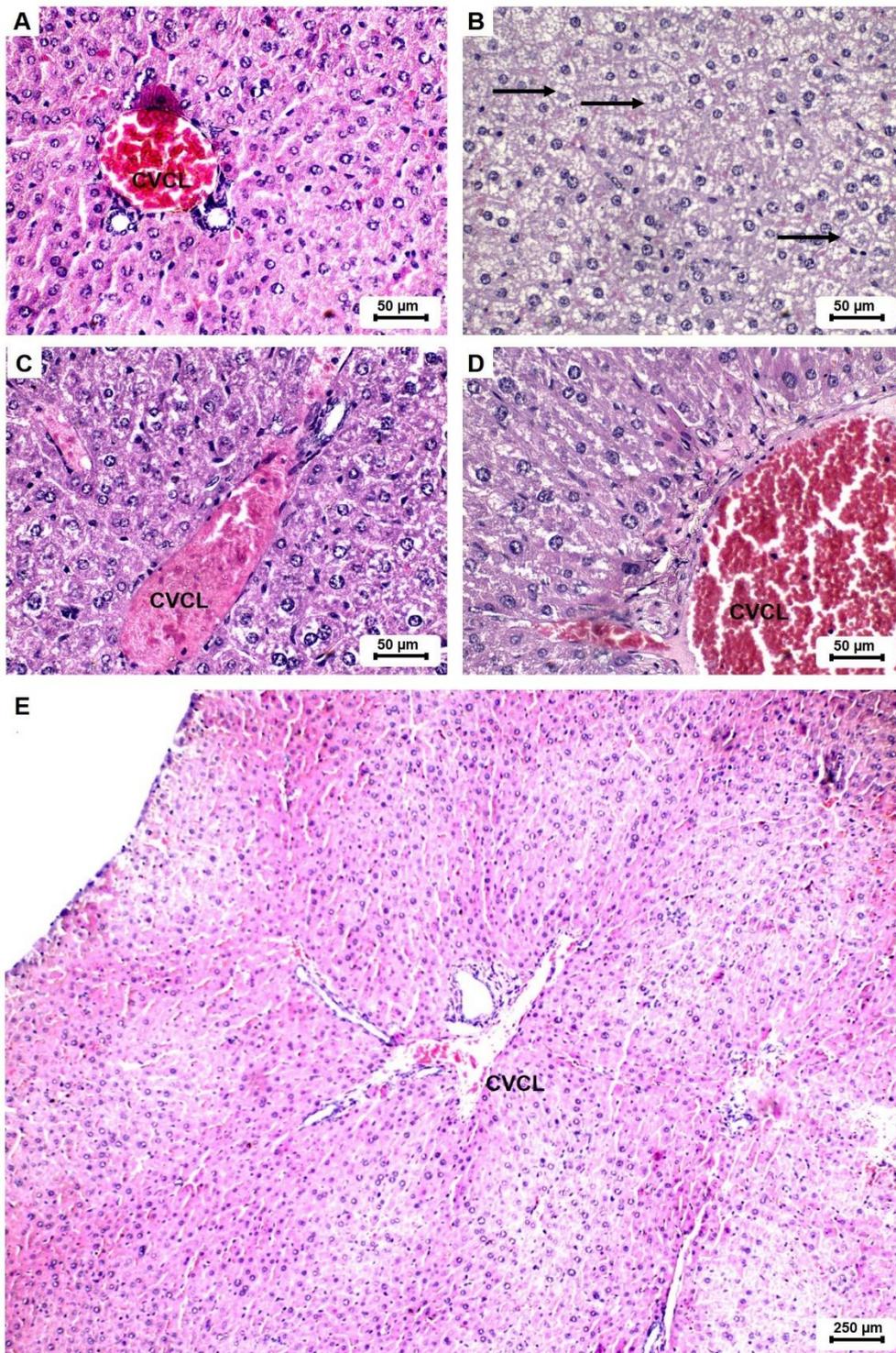


Figura 18. Análise histopatológica dos fígados de camundongos transplantados com Sarcoma 180 corados em Hematoxilina/Eosina (HE). A. Controle negativo – CTR, evidenciando congestão da veia centrolobular (CVCL); B. Controle positivo – 5FU (25mg/kg/dia), setas destacam esteatose; C. ERAC:β-CD 30 μg/kg/dia, congestão da veia centrolobular (CVCL); D. ERAC:β-CD 100 μg/kg/dia, congestão da veia centrolobular (CVCL); E. ERAC:β-CD 300 μg/kg/dia, congestão da veia centrolobular (CVCL). Barras horizontais de escala nas figuras: 250 μm e 50 μm.

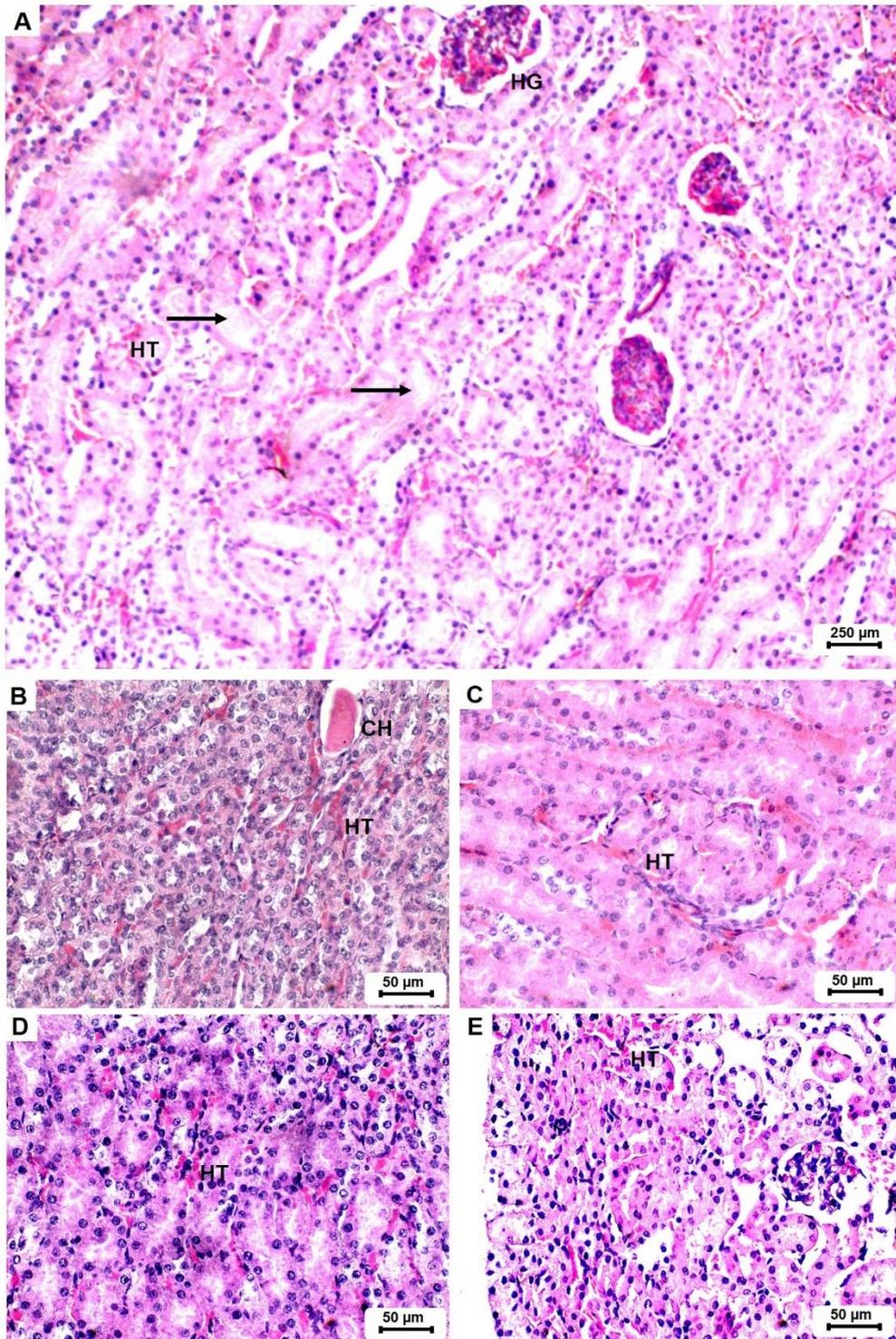


Figura 19. Análise histopatológica dos rins de camundongos transplantados com Sarcoma 180 corados em Hematoxilina/Eosina (HE). A. Controle negativo – CTR, evidenciando hemorragia glomerular (HG) e tubular (HT), setas indicam tumefação turva; B. Controle positivo – 5FU (25mg/kg/dia), destaque para hemorragia tubular (HT) e cilindro hialino (CH); C. ERAC:β-CD 30 µg/kg/dia; D. ERAC:β-CD 100 µg/kg/dia; E. ERAC:β-CD 300 µg/kg/dia apresentam hemorragia tubular (HT). Barras horizontais de escala nas figuras: 250 µm e 50 µm.

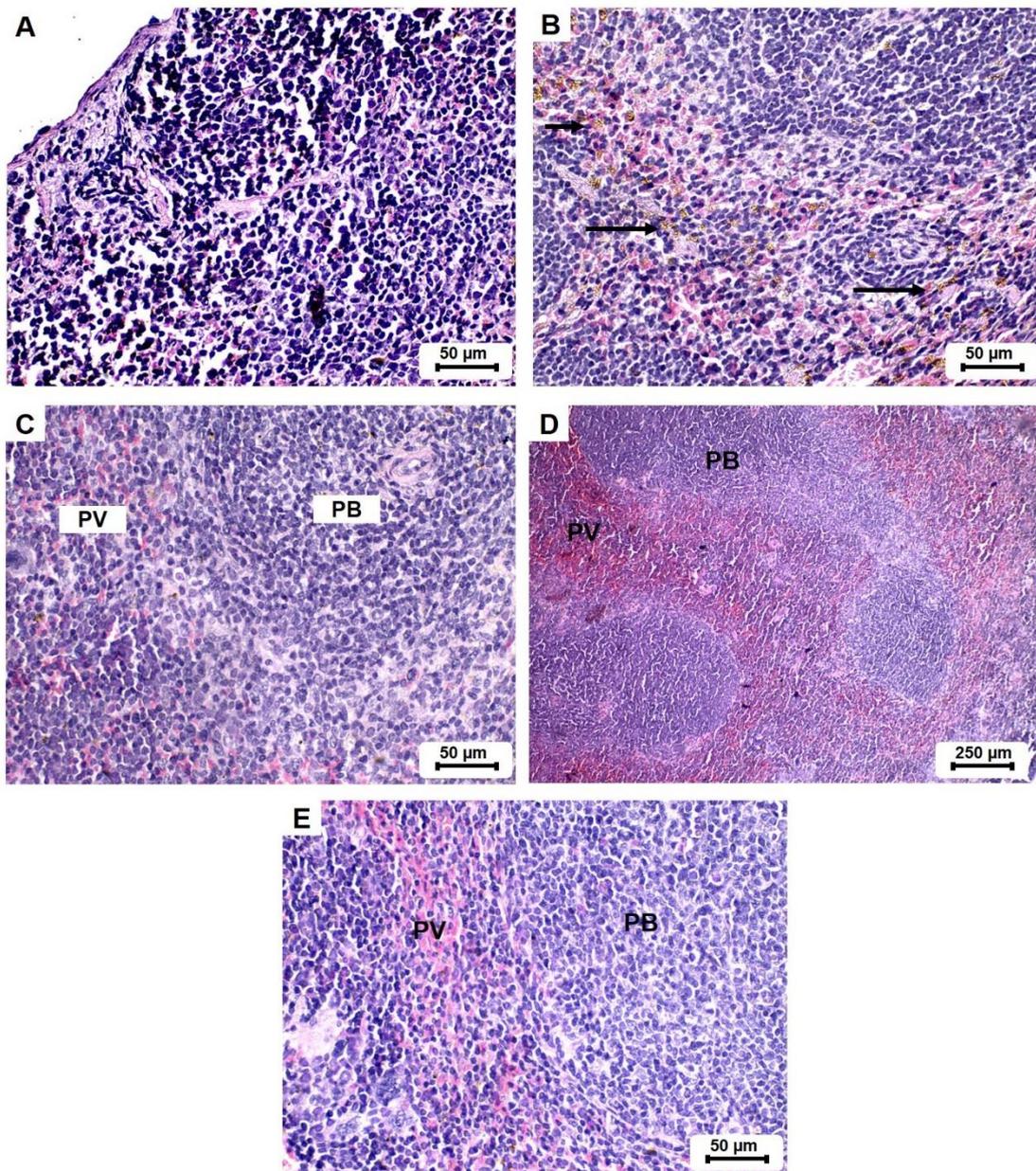


Figura 20. Análise histopatológica dos baços de camundongos transplantados com Sarcoma 180 corados em Hematoxilina/Eosina (HE). A. Controle negativo – CTR; B. Controle positivo – 5FU (25mg/kg/dia), destaque para deposição de pigmentos férrico (setas); C. ERAC:β-CD 30 μg/kg/dia; D. ERAC:β-CD 100 μg/kg/dia; E. ERAC:β-CD 300 μg/kg/dia destacam a polpa branca (PB) e polpa vermelha (PV). Barras horizontais de escala nas figuras: 250 μm e 50 μm.

5.9 Efeito da administração do ERAC:β-CD sobre a massa ponderal, volume e taxa de inibição do crescimento dos tumores

O grupo tratado com a formulação contendo ERAC:β-CD300 apresentou redução significativa da massa tumoral comparado ao grupo controle CTR e comportamento semelhante ao grupo 5-FU (Figura 21a). Ao avaliar o volume tumoral (Figura 21b) e a inibição do crescimento tumoral (Figura 21c), percebeu-se que os animais dos grupos tratados com 5-FU e o composto ERAC:β-CD300 apresentaram diferença significativa quanto à inibição da atividade celular de crescimento dos tumores comparados ao grupo CTR, revelando a eficácia do tratamento com ERAC:β-CD300 em modelo experimental Sarcoma 180. Trabalhos anteriores reportaram a eficiência de compostos naturais na redução tumoral em animais quando avaliaram o efeito do aminoácido poli-L-lisina na supressão da angiogênese tumoral e indução da apoptose em camundongos portadores de tumor de Ehrlich e sarcoma 180 e perceberam a diminuição de microvasos sanguíneos no evento da angiogênese tumoral e crescimento do tumor (DEBNATH *et al.*, 2017); ao analisar a atividade do extrato aquoso de *Remirea maritima* Aubl. com constituintes químicos da classe dos alcaloides, cumarinas, triterpenóides em tumores Sarcoma 180 de camundongos e observaram redução nas taxas de inibição tumoral (DÓRIA *et al.*, 2016).

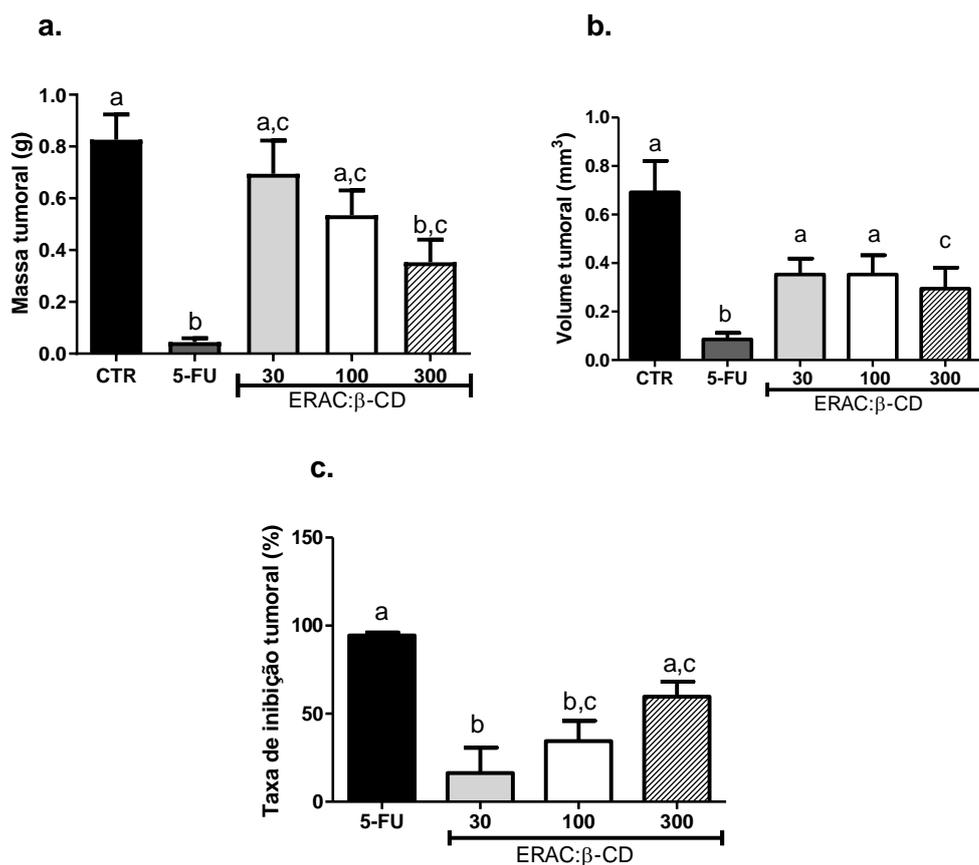


Figura 21. Efeito das formulações contendo ERAC:β-CD na massa tumoral (a), no volume tumoral (b) e na taxa de inibição do crescimento tumoral (c) em tumores Sarcoma 180 de camundongos. Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico 5-FU e como controle negativo, salina + β-CD. Dados expressos em média ± erro padrão da média. De acordo com pós teste de Tukey, letras iguais indicam que não existe diferença significativa, letras diferentes. ($p < 0.05$). (a) $F = 11.29$, (b) $F = 6.308$, (c) $F = 11.57$ ANOVA seguida de pós teste de Tukey.

5.10 Parâmetros histopatológicos dos tumores

Os animais que não receberam tratamento com algum princípio teste (CTR) – Figura 22A apresentaram tumores com características de neoplasia maligna na análise histopatológica. Os cortes histológicos mostravam atipia celular, marcada por células com tamanho e formas variadas, células binucleadas, refletindo o perfil de proliferação celular descontrolada com perda de diferenciação. Era evidente as intensas figuras de mitose típicas e atípicas, invasão muscular e áreas de necrose coagulativa denotando o padrão de malignidade tumoral. Diferentemente os grupos que receberam o tratamento com 5FU (Figura 22B) e o composto ERAC:β-CD (Figura 22C, D, E) apresentaram extensas áreas de necrose de coagulação, raras figuras de

mitose, evidenciando o padrão de morte celular. Ainda pode ser observado macrófagos com corpos apoptóticos no grupo que recebeu a maior dose do composto ERAC: β -CD300. Tais achados reforçam a sugestiva ação antineoplásica das referidas substâncias que mediante a injúria tecidual são acionados mecanismos de reparo para morte celular (apoptose/necrose), pela ativação de receptores de morte e danos ao DNA da célula alterada. Este estímulo culmina em eventos como lesão da membrana plasmática (necrose) e/ou preservação da membrana com a possibilidade de se observar formação de vesículas – corpos apoptóticos (apoptose) (BRINK *et al.*, 2006).

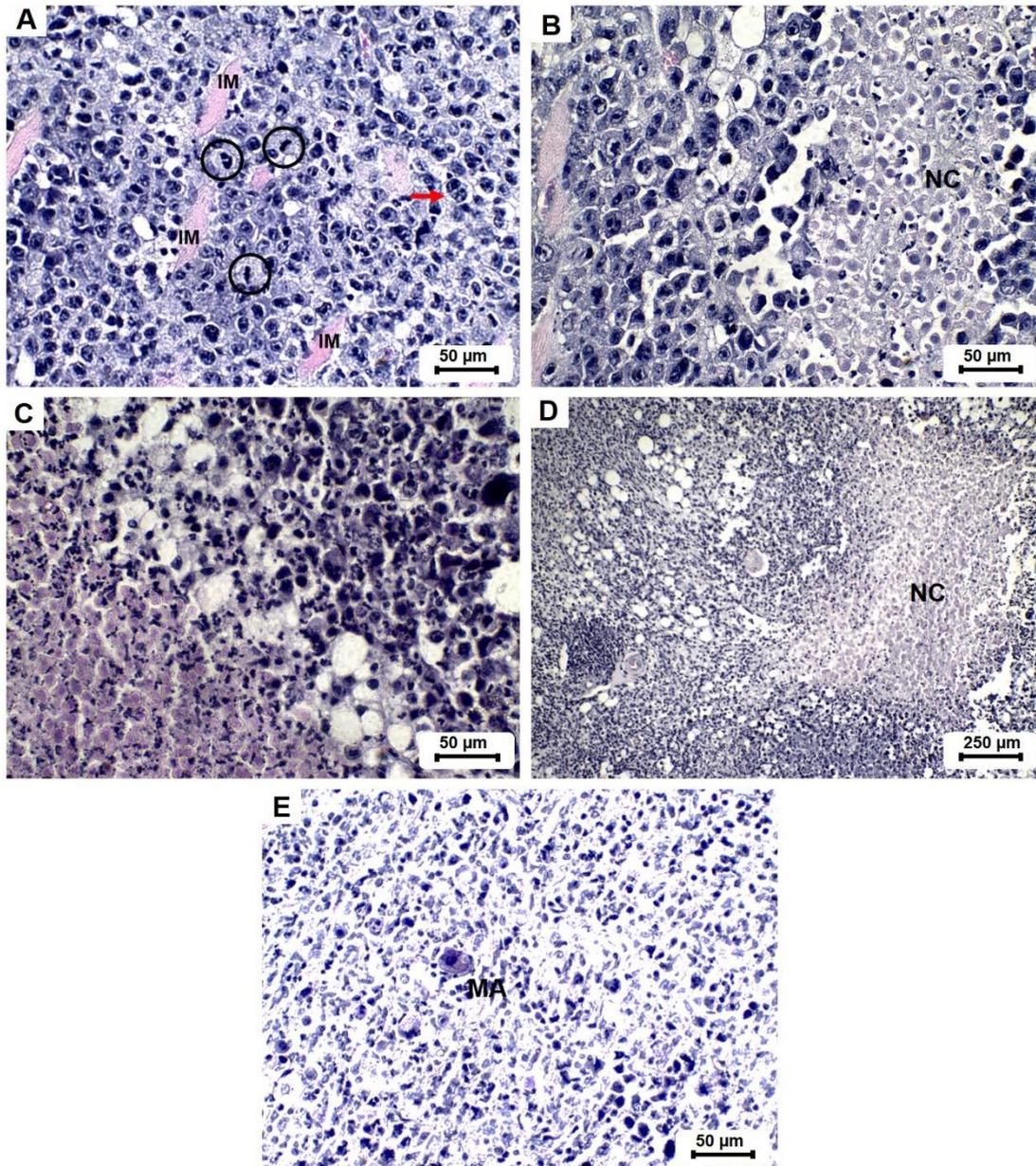


Figura 22. Análise histopatológica dos tumores Sarcoma 180 corados em Hematoxilina/Eosina (HE) de camundongos. A. Controle negativo – CTR, em destaque figuras de mitose (círculos), célula binucleada (seta vermelha), invasão muscular (IM); B. Controle positivo – 5FU (25mg/kg/dia), necrose coagulativa (NC); C. ERAC: β -CD 30

µg/kg/dia, D. ERAC:β-CD 100 µg/kg/dia, necrose coagulativa (NC); E. ERAC:β-CD 300 µg/kg/dia, macrófago (MA). Barras horizontais de escala nas figuras: 250 µm e 50 µm.

5.11 Expressão imuno-histoquímica de antígenos nos tumores

A análise imuno-histoquímica dos antígenos expressos em cortes histológicos de tumores de animais em modelo experimental Sarcoma 180 demonstrou um padrão citoplasmático (NFκB), nuclear (NRF2 e Ki67). As amostras de tumores avaliadas por VEGF não apresentaram padrão de marcação relevante.

Os grupos controles (CTR – Figura 23A e 5FU – Figura 23B) apresentaram marcação citoplasmática de NFκB moderada quando comparada aos grupos tratados com a formulação ERAC:β-CD (Figura 23C, D, E) nas três diferentes doses. Embora fosse esperado que o grupo 5FU mostra-se um perfil diferenciado na expressão desse antígeno comparado ao grupo CTR, tal fato pode estar relacionado à quimiorresistência da droga pela via NFκB (YAO *et al.*, 2007). É sabido que o microambiente tumoral pode contribuir para que a droga não tenha a ação esperada, em virtude de as células tumorais se adaptarem ao tratamento e inativar vias de morte celular ou ativar vias de sobrevivência (DEBATIN; KRAMMER, 2004). Ademais, já foi demonstrado que o 5FU levou células tumorais mamárias à quimiorresistência pela ativação da via NFκB, principal função para sobrevivência e proliferação celular (VINOD *et al.*, 2013).

Uma ação inversa a do NFκB foi o achado da expressão do NRF2 sobre os tumores. Enquanto este apresentou uma marcação moderada nos grupos tratados com ERAC:β-CD (Figura 24C, D, E), aquele demonstrou marcação leve nos grupos controles (Figura 24A, B). O que justifica a modulação negativa da via de sinalização NRF2 frente a via NFκB (PARK *et al.*, 2012), resultando em um dado favorável do composto ERAC:β-CD. Uma vez que a regulação da via NRF2 comporta-se como mecanismo de defesa endógena, a partir da promoção de uma resposta anti-inflamatória e redução do estresse oxidativo, colaborando para a supressão tumoral (RUIZ *et al.*, 2013; SATOH *et al.*, 2013).

O benefício dos constituintes antioxidantes presente no ERAC como cumarinas, terpenos é fator chave para a resposta antineoplásica observada nesse trabalho, sendo tais compostos químicos capazes de prevenir ou retardar danos oxidativos colaborar na efetividade da via de sinalização NRF2. Similarmente a este dado, Matzinger *et al.* (2018) observaram que produtos naturais foram capazes de ativar a sinalização de NRF2, Wei *et al.* (2016) perceberam que a curcumina regulou

negativamente o NFkB e elevou NRF2, reduzindo edema cerebral de ratos. Além de a suplementação com vitamina C reduzir a ativação de NFkB, a atividade de mieloperoxidase e peroxidação lipídica em ratos tratados com 5FU (AL-ASMARI *et al.*, 2015). Desse modo, o composto ERAC:β-CD destaca-se como um promissor composto adjunto na terapia do câncer, no que se refere à diminuição da quimiorresistência e toxicidade de medicamentos habituais.

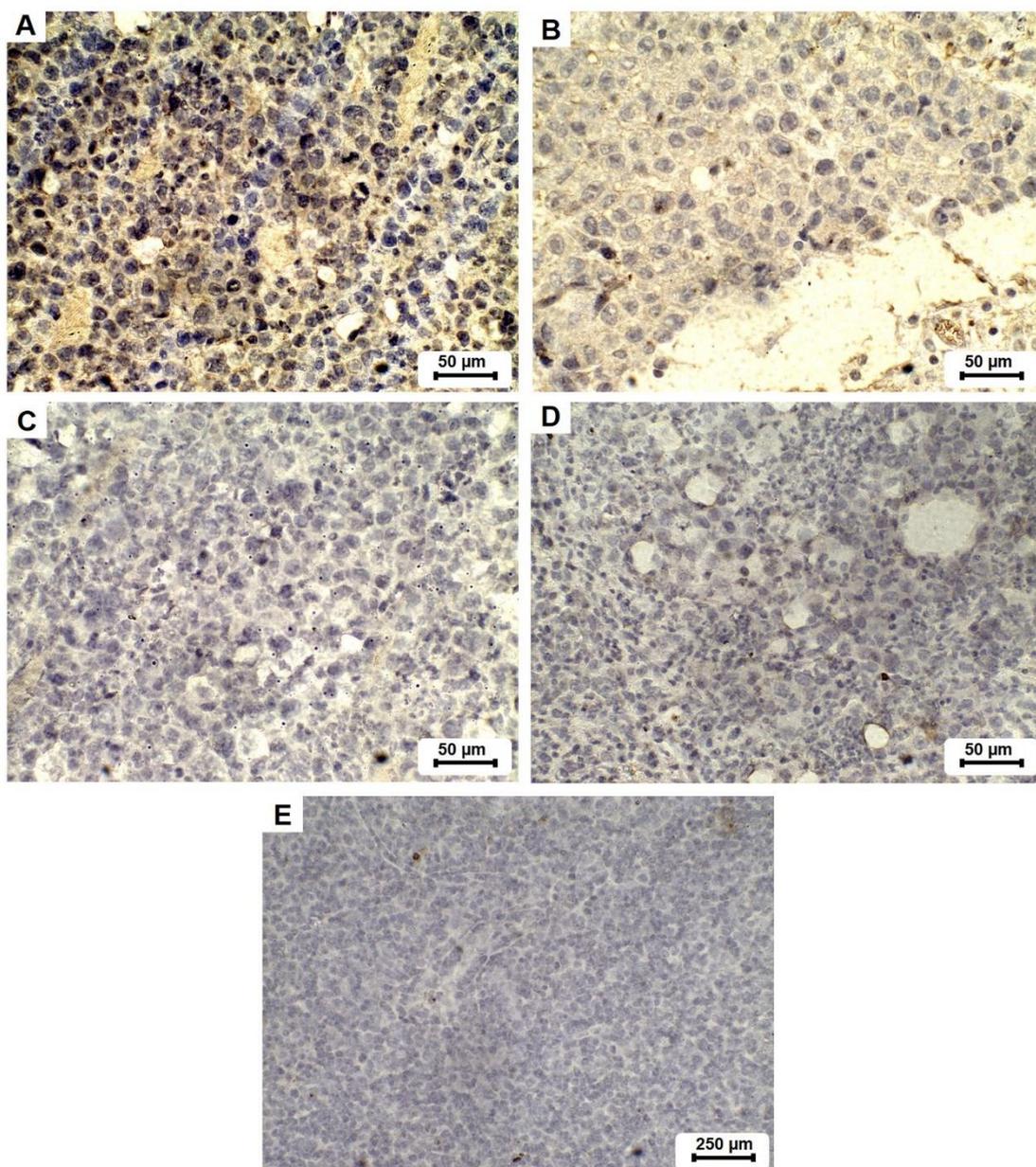


Figura 23. Análise imuno-histoquímica do antígeno NFkB em tumores Sarcoma 180 de camundongos. A. Controle negativo – CTR; B. Controle positivo – 5FU (25mg/kg/dia); C. ERAC:β-CD 30 μg/kg/dia; D. ERAC:β-CD 100 μg/kg/dia; E. ERAC:β-CD 300 μg/kg/dia. Barras horizontais de escala nas figuras: 250 μm e 50 μm.

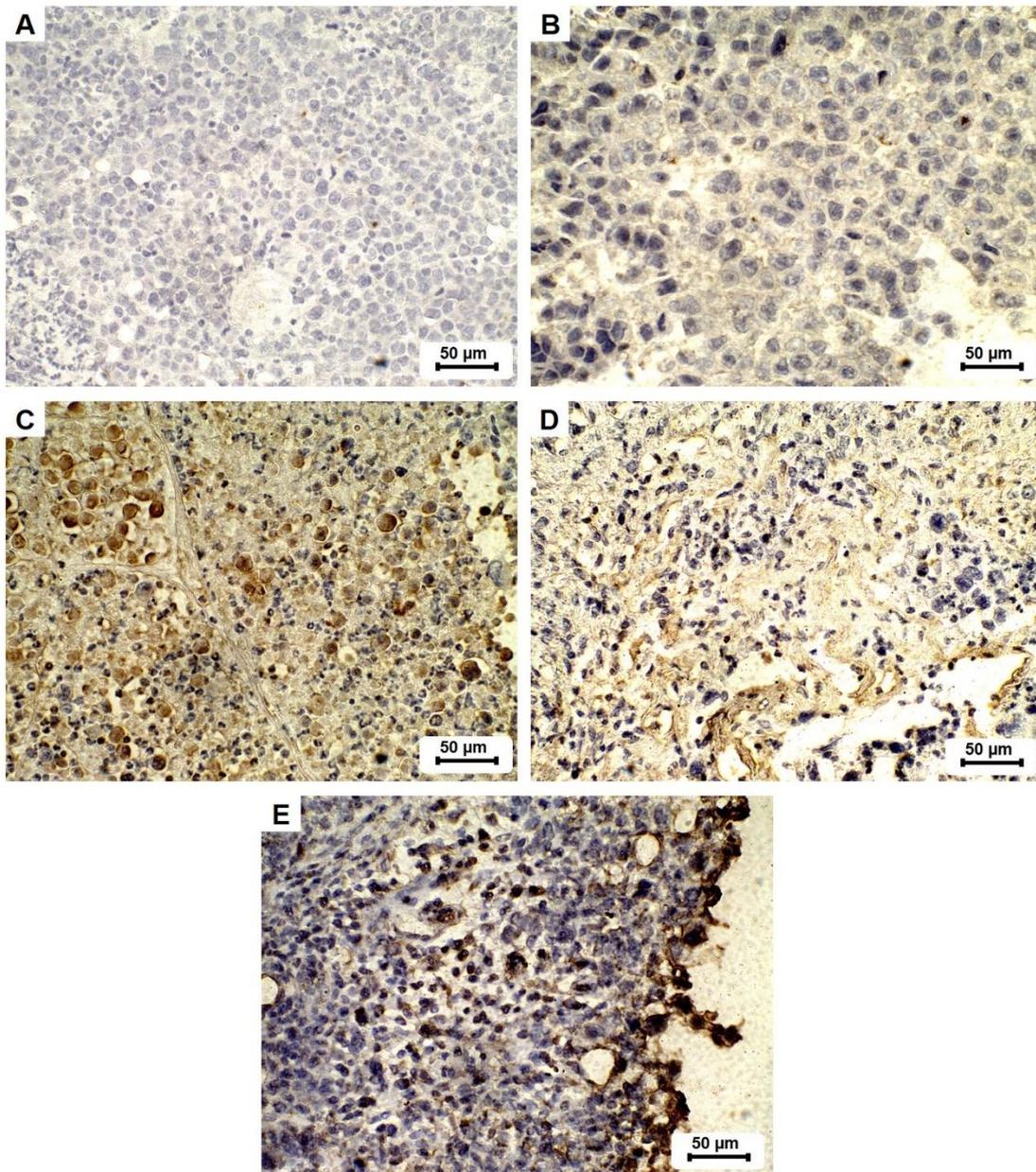


Figura 24. Expressão imuno-histoquímica de NRF2 em tumores Sarcoma 180 de camundongos. A. Controle negativo – CTR; B. Controle positivo – 5FU (25mg/kg/dia); C. ERAC:β-CD 30 μg/kg/dia; D. ERAC:β-CD 100 μg/kg/dia; E. ERAC:β-CD 300 μg/kg/dia. Barras horizontais de escala nas figuras: 50 μm.

No que se refere ao padrão de proliferação das células tumorais, as figuras 25 e 26 retratam o comportamento dos grupos tratados com 5FU e formulações com ERAC:β-CD. É possível perceber a redução na expressão de células tumorais Ki67 positivas dos grupos que receberam tratamento com o quimioterápico e as ERAC:β-CD em relação aqueles que não foram tratados (CTR). A redução da taxa de proliferação celular está relacionada à inibição do processo de síntese de proteínas, transcrição do

DNA pelos potenciais compostos antineoplásicos, impedindo que a célula progrida no ciclo celular e assim seja eliminada pelo mecanismo de apoptose (LI *et al.*, 2015).

O anticorpo monoclonal Ki67 é capaz de identificar o antígeno nuclear expresso nas fases do ciclo celular (G1, S, G2, M), exceto no início da fase de G1 e na G0 (GERDES *et al.*, 1984). Assim, a célula ao receber sinais de morte celular não avança no ciclo para formação de novas células, e o perfil proliferativo não é marcado por Ki67, revelando evidências antitumorais para os compostos testes.

Bezerra *et al.* (2006) pode perceber a ação antitumoral com redução da proliferação de células tumorais ao investigar o efeito de duas amidas oriundas da planta *Piper* ssp (pimenteira) em camundongos fêmea transplantadas com Sarcoma 180. De igual modo, Sousa *et al.* (2007) observaram a diminuição da taxa de proliferação tumoral de camundongos tratados com dois alginatos extraídos de alga *Sargassum vulgare*.

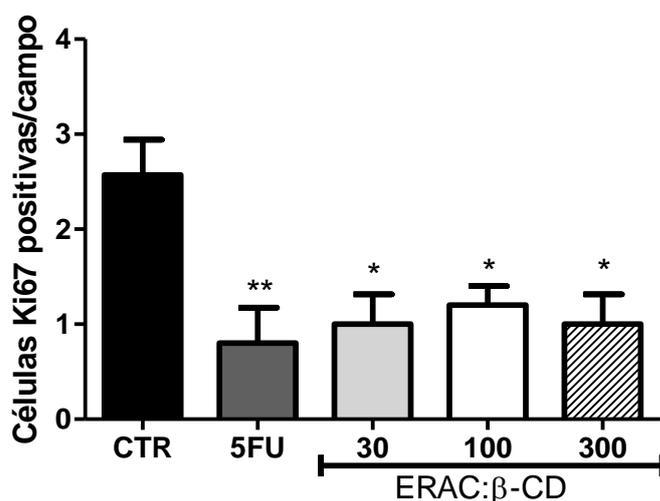


Figura 25. Efeito do 5-Fluorouracil (5FU) e das formulações contendo ERAC:β-CD na proliferação celular de tumores Sarcoma 180 em camundongos. Dados expressos em média ± erro padrão da média, diferença significativa **($p < 0.01$), * ($p < 0.05$) comparado ao grupo controle (CTR). $F = 5.455$. ANOVA seguida de pós teste de Tukey.

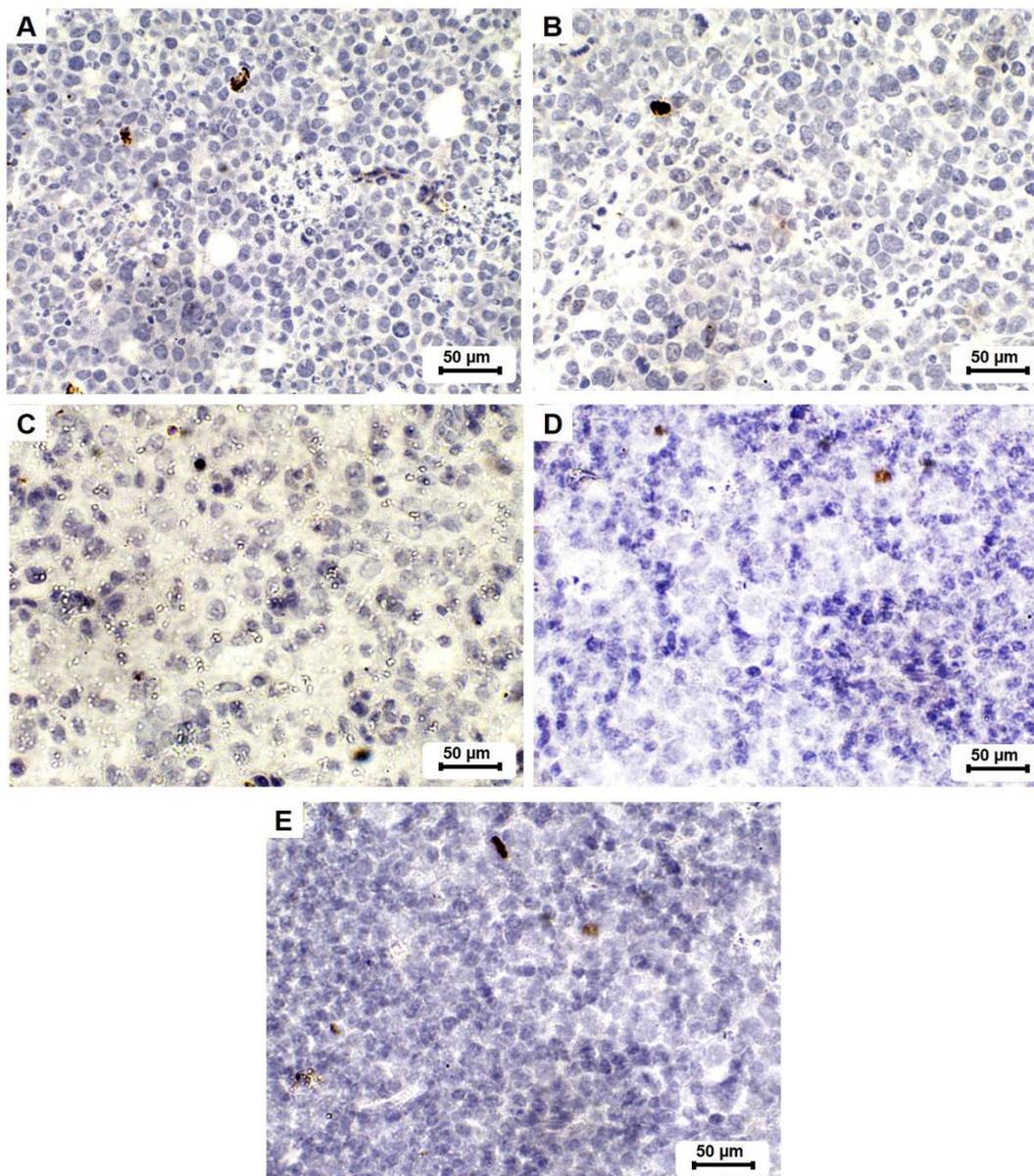


Figura 26. Expressão imuno-histoquímica forte e difusa do marcador de proliferação celular Ki67 em tumores Sarcoma 180 de camundongos. A. Controle negativo – CTR; B. Controle positivo – 5FU (25mg/kg/dia); C. ERAC:β-CD 30 μg/kg/dia; D. ERAC:β-CD 100 μg/kg/dia; E. ERAC:β-CD 300 μg/kg/dia. Barras horizontais de escala nas figuras: 50 μm.

Torna-se necessário reforçar que, a utilização do composto ERAC:β-CD apresenta constituintes químicos de natureza antioxidante capazes de fornecer benefícios nutricionais e/ou adjuvantes na terapia anticâncer. Tendo em vista a possibilidade de modular vias moleculares que induzem a oxidação de moléculas e estado inflamatório, constituindo-se dessa forma, um recurso promissor para manutenção da homeostase celular e evitando a ação tóxica e quimiorresistente de alguns fármacos como o 5-Fluorouracil.

6 CONCLUSÕES

- As diferenças físico-químicas dos complexos de inclusão ERAC:β-CD indicam que a técnica de Malaxagem (MX) foi a melhor;
- A análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria/Termogravimetria derivada (TG/DTG) revelou melhor interação ERAC:β-CD para o método MX;
- A análise por Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho – FTIR dos complexos ERAC:β-CD mostrou mudanças em bandas características, reforçando a proposição de complexação energeticamente favorável das moléculas no estudo de modelagem molecular na razão molar 1:1;
- A análise da eficiência de inclusão mostrou maior relação da quantidade de ERAC:β-CD pelo método de MX;
- A análise citotóxica dos compostos ERAC, β-CD, MX e CE frente as células L929 mostrou viabilidade celular para mais de 70% das células, indicando que o composto isolado, bem como incorporado à molécula de β-CD foi capaz de preservar significativamente a integridade de células de fibroblastos;
- O parâmetro hematológico para maior dose (ERAC:β-CD300) foi o que apresentou melhor resultado e os níveis de LDH dos grupos tratados com ERAC:β-CD mantiveram-se normais, significando que o tratamento não foi capaz de produzir danos tissulares significativos;
- A ação do composto ERAC:β-CD sobre os órgãos revelou distúrbios leves, diferente do grupo controle 5FU;
- A dose de ERAC:β-CD300 foi a mais eficiente na redução da massa tumoral;
- A análise imuno-histoquímica dos antígenos em células de tumores Sarcoma 180 mostrou que o composto ERAC:β-CD foi capaz de regular a via de sinalização NRF2 positivamente através de resposta antioxidante na supressão tumoral, além da redução da taxa de proliferação tumoral demonstrada pelo Ki67.

7 REFERÊNCIAS

ABARCA, R.L.; RODRÍGUEZ, F.J.; GUARDA, A.; GALOTTO, M.J.; BRUNA, J.E. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil componente. *Food Chem* 2016; 196:968-975.

ABRAHÃO, K.S.; BERGMANN, A.; AGUIAR, S.S.; THULER, L.C. Determinants of advanced stage presentation of breast cancer in 87,969 Brazilian women. *Maturitas*. 2015; 82(4):365-370.

ABURAHMA, M. H. Insights on novel particulate self-assembled drug delivery beads based on partial inclusion complexes between triglycerides and cyclodextrins. *Drug Deliv* 2015; 1-15.

AL-ASMAR, A.K.; KHAN, A.Q.; AL-QASIM, A.M.; AL-YOUSEF, Y. Ascorbic acid attenuates antineoplastic drug 5-fluorouracil induced gastrointestinal toxicity in rats by modulating the expression of inflammatory mediators. *Tox Rep.* 2015; 2:908–916.

ALBRECHTSEN, N.; DORNREITER, I.; GROSSE, F.; KIM, E.; WIESMULLER, L.; DEPPERT, W. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene* 1999; 18:7706-7717.

AL-KHARUSI, M.R.A.; SMARTT, H.J.M.; GREENHOUGH, A.; COLLARD, T.J.; EMERY, ED.; WILLIAMS, A.C.; *et al.* LGR5 promotes survival in human colorectal adenoma cells and is upregulated by PGE2: implications for targeting adenoma stem cells with NSAIDs. *Carcinogenesis*. 2013; 34(5):1150-1157.

ALUNNI-FABRONI, M.; LITTLEWOOD, T.; DELEU, L.; CALDEIRA, S.; GIARRÈ, M.; DELLÓRCO, M.; *et al.* Induction of S phase and apoptosis by the human papillomavirus type 16 E7 protein are separable events in immortalized rodent fibroblasts. *Oncogene* 2000; 19:2277-2285.

ALVES, A.V.F.; RIBEIRO, D.R.; LIMA, S.O.; REIS, F.P.; SOARES, A.F.; GOMES, M.Z.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R.L.C. Expression of Ki-67 and P16 INK4a in chemically-induced perioral squamous cell carcinomas in mice. *Rev Col Bras Cir* 2016; 43:72-79.

AYRES, D.C.; LOIKE, J.D. Lignans: chemical, biological and clinical properties. In: *Chemistry and Pharmacology of Natural Products [M]*. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.

BAN, K.A.; GODELLAS, C.V. Epidemiology of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2014; 23(3):409-22.

BAQUIRAN, C.; GALLAGHER, J. *Cancer chemotherapy handbook*. 1st ed. Philadelphia: Lippincott, 1998.

BETONI, J.E.; MANTOVANI, R.P.; BARBOSA, L.N.; DI STASI, L.C.; FERNANDES JUNIOR, A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101:387–390.

BEZERRA, D.P.; CASTRO, F.O.; ALVES, A.P.N.N.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; COSTA-LOTUFO, L.V. *In*

vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39(6):801-807.

BOECK, P.; SÁI, M.M.; SOUZA, B.S.; CERCENÁ, R.; ESCALANTE, A.M.; ZACHINO, S.A.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A. A simple synthesis of kaurenoic esters and other derivatives and evaluation of their antifungal activity. *J. Braz. Chem. Soc* 2005; 16(6b):1360-1366.

BRAGA, S.F.M.; DE SOUZA, M.C.; CHERCHIGLIA, M.L. Time trends for prostate cancer mortality in Brazil and its geographic regions: An age-period-cohort analysis. *Cancer Epidemiol*. 2017; 50(Pt A):53-59.

BRINK, A.; SCHULZ, B.; KOBRAS, K.; LUTZ, W.K.; STOPPER, H. Time dependent effects of sodium arsenit on DNA breakage and apoptosis observed in the comet assay. *Mut Res*. 2006; 603:121-128.

CARDOSO, P.C.S.; ROCHA, C.A.M.D.; LEAL, M.F.; BAHIA, M.O.; ALCÂNTARA, D.D.F.Á.; SANTOS, R.A.D.; GONÇALVES, N.D.S.; AMBRÓSIO, S.R.; CAVALCANTI, B.C.; MOREIRA-NUNES, C.A.; PESSOA, C.D.Ó.; BURBANO, R.M.R. Effect of diterpenoid kaurenoic acid on genotoxicity and cell cycle progression in gastric cancer cell lines. *Biomed Pharmacother* 2017; 89:772-780.

CASTRO, M.; MIGUEL DEL CORRAL, J.M; *et al.* Chemoinduction of cytotoxic selectivity in podophyllotoxin-related lignans [J]. *Phyt Ver*. 2003: 2:219-233.

CAVALCANTI, B.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BURBANO, R.R.; SILVEIRA, E.R.; CUNHA, K.M.; *et al.* Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44(3):388-392.

CEBORSKA, M. Structural investigation of the β -cyclodextrin complexes with chiral bicyclic monoterpenes e Influence of the functionality group on the host-guest stoichiometry. *J Mol Struc*. 2017; 1145:204-210.

CELEGHINI, R.M.S.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng ("guaco") leaves. *J Braz Chem Soc* 2001; 12: 706–709.

CHABNE, B.A.; ROBERTS, J.R.T.G. *Nat. Rev. Cancer*. 2005; 5:65.

CORRÊA, D.H.; MELO, P.S.; DE CARVALHO, C.A.; DE AZEVEDO, M.B.; DURÁN, N.; HAUN, M. Dehydrocrotonin and its β -cyclodextrin complex: Cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 2005; 510(1-2):17-24.

CRUPI, V.; GUELLA, G.; MAJOLINO, D.; MANCINI, I.; PACIARONI, A.; ROSSI, B.; VENUTI, V.; VERROCCHIO, P.; VILIANI, G. Effect of the chiral discrimination on the vibrational properties of (*R*)-, (*S*)- and (*R, S*)-ibuprofen/methyl- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Phil Mag* 2011; 91(13-15):1776-1785.

DA COSTA, R.M.; BASTOS, J.K.; COSTA, M.C.A.; FERREIRA, M.M.C.; MIZUNO, C.S.; CARAMORI, G.F.; NAGURNIAK, G.R.; SIMÃO, M.R.; DOS SANTOS, R.A.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R.; PARREIRA, R.L.T. *In vitro* cytotoxicity and structure-activity relationship approaches of *ent*-kaurenoic acid derivatives against human breast carcinoma cell line. *Phytochemistry*. 2018; 156:214-223.

DE MOURA, R.S.; COSTA, S.S.; JANSEN, J.M.; SILVA, C.A.; LOPES, C.S.; BERNARDO-FILHO, M.; DA SILVA, V.N.; CRIDDLE, D.N.; PORTELA, B.N.; RUBENICH, L.M.S.; ARAUJO, R.G.; CARVALHO, L.C. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guineapig trachea. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54(2):249–256.

DEAVALL, D.G.; MARTIN, E.A.; HORNER, J.M.; ROBERTS, R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol.* 2012; 2012:645460.

DEBATIN, K-M.; KRAMMER, P.H. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene.* 2004; 23(16):2950–2966.

DEBNATH, S.; KARAN, S.; DEBNATH, M.; DASH, J.; CHATTERJEE, T.K. Poly-L-Lysine Inhibits Tumor Angiogenesis and Induces Apoptosis in Ehrlich Ascites Carcinoma and in Sarcoma S-180 Tumor. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017; 18(8):2255-2268.

DEY, D.; DAHL, J.; CHO, S.; BENJAMIN, T.L. Induction and bypass of p53 during productive infection by polyomavirus. *J Virol* 2002; 76:9526-9532.

DOGRA, R.K.S.; KHANNA, S.; SHANKER, R. Immunotoxicological effects of piperine in mice. *Toxicology.* 2004; 196:229-236.

DOLL, R. The Pierre Denoix Memorial Lecture: nature and nurture in the control of cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35:16-23.

DÓRIA, G.A.; MENEZES, P.P.; LIMA, B.S.; VASCONCELOS, B.S.; SILVA, F.A.; HENRIQUES, R.M.; MELO, M.G.; ALVES, Â.V.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.Ó.; CARVALHO, A.A.; PRATA, A.P.; JUNIOR, R.L.; LIMA-VERDE, I.B.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; BEZERRA, D.P.; NOGUEIRA, P.C.; ARAUJO, A.A. *In vivo* antitumor effect, induction of apoptosis and safety of *Remirea maritima* Aubl. (Cyperaceae) extracts. *Phytomedicine.* 2016; 23(9):914-922.

DOU, W.; ZHANG, J.; SUN, A.; ZHANG, E.; DING, L.; MUKHERJEE, S.; *et al.* Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF-kappaB signaling. *Br J Nutr.* 2013; 110:599–608.

ENKHTAIVAN, G. KIM, D.H.; PANDURANGAN, M. Cytotoxic effect of TDZ on human cervical cancer cells. *J Photochem Photobiol B* 2017; 173:493-498.

FALCÃO, D. Q., SANTOS, A. R., ORTIZ-SILVA, B., LOURO, R. P., SEICEIRA, R., FINOTELLI, P. V., ET FERREIRA, J.L.P.; DE SIMONE, S.G.; AMARAL, A.C.F. Development of nanoencapsulation forms from *Cymbopogon citrates* essential oil. *Latin American Journal of Pharmacy* 2011; 30:765-772.

FERNANDES, L.P.; OLIVEIRA, W.P.; SZTATISZ, J.; SZILÁGYI, I. M.; NOVÁK, C. Solid state studies on molecular inclusions of *Lippia Sidoides* essential oil obtained by spray drying. *J Therm Anal Calorim* 2009; 95:855–863.

FERRARI, M.; PAGNONI, U.M.; PELIZZONI, F.; LUKES, V.; FERRARI, G. Terpenoids from *Copaifera langsdorffi*. *Phytochemistry*, 1971; 10:905-907.

FIERRO, I.M.; DA SILVA, A.C.; LOPES, C.S, DE MOURA, R.S.; BARJA-FIDALGO, C. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. *J Ethnopharmacol.* 1999; 66:19–24.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Tratado de histologia. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabra Koogan, p.228-233; 2007.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H.H.; SCHWAB, U.; STEIN, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984; 133:1710-1715.

GOMES, L.M.; PETITO, N.; COSTA, V.G.; FALCÃO, D.; DE LIMA ARAÚJO, K.G. Inclusion complexes of red bell pepper pigments with β -cyclodextrin: Preparation, characterisation and application as natural colorant in yogurt. *Food Chem.* 2014; 148:428-436.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-674.

HILL, L.E.; GOMES, C.; TAYLOR, T.M. Characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Sc Tech.* 2013; 51:86-93.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. [online]. 2018 [acessado em 10 maio 2018]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>

JACOBS, D.I.; SNOEIJER, W.; HALLARD, D.; VERPOORTE, R. The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr. Med. Chem.* 2004; 11:607-628.

JAIN, S.; SAXENA, S.; KUMAR, A. Epidemiology of prostate cancer in India. *Meta Gene.* 2014; 2:596–605.

JARDINE, I. Anticancer Agents Based on Natural Product Models (Cassady, J. M and Douros, J. D., eds) p.319. Academic Press, New York; 1980.

JIANG, R.J.; ZHAO, Y.L.; CHEN, Y.J.; XIAO, D.; WANG, F.; HAN, B.; YANG, J.; LIAO, X.L.; YANG, L.J.; GAO, C.Z.; YANG, B. Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of artesunate- β -cyclodextrin conjugates as novel anti-cancer prodrugs. *Carbohydr Res.* 2014; 400:19-25.

KAYACI, F.; AYTAC, Z.; UYAR, T. Surface modification of electrospun polyester nanofibers with cyclodextrin polymer for the removal of phenanthrene from aqueous solution. *J Haz Materials.* 2013; 261:286– 294.

KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; RUELLAN, S.; FOURMENTIN, S. Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies. *Food Chem* 2014; 164:454-461.

KLAUNIG, J.; KAMENDULIS, L; HOCEVAR, B. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology* 2010; 38:96-109.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. Pathology basis of disease. 7th ed. [S.l]: WB Saunders, 2005.

LAWTRAKUL, L., INTHAJAK, K., TOOCHINDA, P. Molecular calculations on β -cyclodextrin inclusion complexes with five essential oil compounds from *Ocimum basilicum* (sweet basil). *Sci Asia* 2014; 40:145-151.

LEAL, J.; LUENGO-FERNANDEZ, R.; SULLIVAN, R.; WITJES, J.A. Economic Burden of Bladder Cancer Across the European Union. *Eur Urol*. 2016; 69(3):438-447.

LEE, Y. S.; YANG, H. O.; SHIN, K. H.; CHOI, H. S.; JUNG, S. H.; KIM, Y. M.; OH, D.K.; LINHARDT, R. J.; KIM, Y. S. Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achatina fulica*. *Eur J Pharmacol* 2003; 465(1-2):191-198.

LEITE, L.H.I.; LEITE, G.O. SILVA, B.A.F.; SANTOS, S.A.A.R.; MAGALHÃES, F.E.A.; MENEZES, P.P.; SERAFINI, M.R.; TEIXEIRA, C.S.; BRITO, R.G.; SANTOS, P.L.; COSTA, J.G.M.; ARAÚJO, A.A.S.; QUINTANS JÚNIOR, L.J.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M.; CAMPOS A.R. Molecular mechanism underlying orofacial antinociceptive activity of *Vanillosmopsis arborea* Baker (Asteraceae) essential oil complexed with β -cyclodextrin. *Phytomedicine* 2018; *In Press*:1-45.

LI, W.; SUWANWELA, N.C.; PATUMRAJ, S. Curcumin by down-regulating NF- κ B and elevating Nrf2, reduces brain edema and neurological dysfunction after cerebral I/R. *Microvasc Res*. 2016; 106:117-127.

LI, W.; TANUMIHARDJAC, J.; MASUYAMAD, T.; KORSHIN, G. Examination of the kinetics of degradation of the antineoplastic drug 5-fluorouracil by chlorine and bromine. *J Haz Mat*. 2015; 282:125–132.

LIMBERGER, R.P.; ABOY, A.L.; BASSANI, V.L.; MORENO, P.R.H.; RITTER, M.R.; HENRIQUES, A.T. Essential oils from four *Mikania* species (Asteraceae). *J Essent Oil Res* 2001; 13:225–228.

LIU, L.; GUO, Q.X. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. In: *J Incl Phenom Macroc Chem*. 2002; 42:1-14.

LIZARTE NETO, F.S.; TIRAPELLI, D.P.; AMBROSIO, S.R.; TIRAPELLI, C.R.; OLIVEIRA, F.M.; NOVAIS, P.C.; PERIA, F.M.; OLIVEIRA, H.F.; CARLOTTI JUNIOR, C.G.; TIRAPELLI, L.F. Kaurene diterpene induces apoptosis in U87 human malignant glioblastoma cells by suppression of anti-apoptotic signals and activation of cysteine proteases. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46(1):71-78.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J Pharm Pharmacol* 2010; 62(11):1607-1621.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins .1. Drug solubilization and stabilization. In: *J Pharm Sci*. 1996; 85(10):1017-1025.

LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. In: *Int J Pharm*. 2007; 329(1-2):1-11.

MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M.A.; OLIVEIRA, C.Z.; COUTO, L.B.; GOMES, O.A.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; PEREIRA, P.S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *J Ethnopharmacol* ,2005; 102: 364–370.

MANGOLIM, C.S.; MORIWAKI, C.; NOGUEIRA, A.C.; SATO, F.; BAESSO, M.L.; NETO, A.M.; MATIOLI, G. Curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. *Food Chem* 2014; 153:361–370.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Cancer*. 2002; 2:143.

MARQUES, H.M.C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour Frag J* 2010; 25:313-325.

MARTIN DELL VALLE, E.M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem* 2004; 39:1033-1046.

MASSON, P. Tumeurs humaines: histologic diagnostics et techniques. 2ed. Paris: Libraire maloine. 1956.

MATZINGER, M.; FISCHHUBER, K.; HEISS, E.H. Activation of Nrf2 signaling by natural products-can it alleviate diabetes? *Biotechnol Adv*. 2018; 36(6):1738-1767.

MENEZES, P.P.; SERAFINI, M.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; SILVA G.F.; OLIVEIRA, J.F.; CARVALHO, F.M.S.; SOUZA, J.C.C.; MATOS, J.R.; ALVES, P.B.; MATOS, I.L.; HĂDĂRUGĂ, D.I.; ARAÚJO, A.A.S. Inclusion complex of (2)-linalool and β -cyclodextrin. *J Therm Anal Calorim* 2013; 115(3):2429–2437.

MICHALSKA, P.; WOJNICZ, A.; RUIZ-NUÑO, A.; ABRIL, S.; BUENDIA, I.; LEÓN, R. Inclusion complex of ITH12674 with 2-hydroxypropyl--cyclodextrin: Preparation, physical characterization and pharmacological effect. *Carbohydr Polym*. 2017; 157:94-104.

MILLER, K.D.; SIEGEL, R.L.; LIN, C.C.; MARIOTTO, A.B.; KRAMER, J.L.; ROWLAND, J.H.; STEIN, K.D.; ALTERI, R.; JEMAL, A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(4):271-289.

MONDAL, S.; BANDYOPADHYAY, S.; GHOSH, M.K.; MUKHOPADHYAY, S.; ROY, S.; MANDAL, C. Natural products: promising resourcers for cancer drug Discovery. *Anticancer Agents Med Chem* 2012; 12:49-75.

MOREIRA, M.R.; SOUZA, A.B.; SOARES, S.; BIANCHI, T.C.; DE SOUZA EUGÊNIO, D.; LEMES, D.C.; MARTINS, C.H.; DA SILVA MORAES, T.; TAVARES, D.C.; FERREIRA, N.H.; AMBRÓSIO, S.R.; VENEZIANI, R.C. ent-Kaurenoic acid-rich extract from *Mikania glomerata*: In vitro activity against bacteria responsible for dental caries. *Fitoterapia* 2016; 112:211-216.

MORRIS, G.; HUEY, R. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009; 30:2785.

MURTHY, T.E.G.K.; SOWJANYA, G. Evaluation of Some Methods For Preparing Carvedilol-Hydroxy Propyl-B-Cyclodextrin Inclusion Complexes. *AJBPR* 2011; 2(1):676-683.

NAACCR, North American Association of Central Cancer Registries. [online]. 2018 [acessado em 12 de dezembro de 2018]. Disponível em: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/results_single/sect_01_table.01.pdf
NCHS, National Center for Health Statistics. [online]. 2018. [acessado em 8 de maio de 2018]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/cancer/dcpc/data/index.htm>

NESTOR, D.D. Biochemical analysis of neoplastic versus nonneoplastic abdominal effusions in dogs. *J Am Animal Hosp Assoc*. 2004; 40:372-375.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 2003; 66(7):1022-1037.

OKOYE, T.C.; AKAH, P.A.; NWORU, C.S.; EZIKE, A.C. Kaurenoic Acid Isolated from the Root Bark of *Annona senegalensis* Induces Cytotoxic and Antiproliferative Effects against PANC-1 and HeLa cells. *Eur J Med Plants*. 2014; 4(5):579-589.

OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M.A.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. *Rev Farm Bioq USP*. 1984; 2:169-183.

ONG, H.C.; AHMAD, N.; MILOW, P. Traditional medicinal plants used by the temuan villagers in Kampung Tering, Negeri Sembilan, Malaysia. *Ethnop Med*. 2011; 5:169–173.

PARK, H.Y.; KIM, G.Y.; CHOI, Y.H. Naringenin attenuates the release of pro-inflammatory mediators from lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia by inactivating nuclear factor kappa B and inhibiting mitogen-activated protein kinases Int. *J. Mol. Med*. 2012; 30: 204–210.

PARK, H.Y.; KIM, G.Y.; CHOI, Y.H. Naringenin attenuates the release of pro-inflammatory mediators from lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia by inactivating nuclear factor kappa B and inhibiting mitogen-activated protein kinases Int. *J. Mol. Med*. 2012; 30:204–210.

PERIASAMY, R.; KOTHAINAYAKI, S.; RAJAMOCHAN, R.; SIVAKUMAR, K. Spectral investigation and characterization of host-guest inclusion complex of 4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline) with beta-cyclodextrin. *Carb Polym* 2014; 114:558-566. *Pharmacol* 2003; 465(1-2):191-8.

PINHO, E.; GROOTVELD, M.; SOARES, G.; HENRIQUES, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr Polym* 2014; 101:121-135.

POMMIER, Y. *Nat. Rev. Cancer*. 2006; 6:789.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ARAÚJO, A.A.; BRITO, R.G.; SANTOS, P.L.; QUINTANS, J.S.; MENEZES, P.P.; SERAFINI, M.R.; SILVA, G.F.; CARVALHO, F.M.; BROGDEN, N.K.; SLUKA, K.A. β -caryophyllene, a dietary cannabinoid, complexed with β -cyclodextrin produced anti-hyperalgesic effect involving the inhibition of Fos expression in superficial dorsal horn. *Life Sci*. 2016; 149:34-41.

REN, L.; JING, J.; CHEN, G.; MIAO, Y.; WEI, P. Preparation, characteristic and pharmacological study on inclusion complex of sulfobutylether- β -cyclodextrin with glaucocalyxin A. *J Pharm Pharmacol* 2014; 66:927–934.

REN, X.; XUE, Y.; LIU, J.; ZHANG, K.; ZHENG, J.; LUO, G.; GUO, C.; MU, Y.; SHEN, J. A novel cyclodextrin-derived tellurium compound with glutathione peroxidase. *Chem Bio Chem* 2002; 3:363–365.

ROUX, M.L.; GUÉRITTE, F. From the Pacific Yew (*Taxus brevifolia*) to the English Yew (*Taxus baccata*): Steps Towards the Discovery of Docetaxel (Taxotere®). Navelbine® and Taxotere®, Histories of Sciences; 2017.

RUFATTO, L.C.; FINIMUNDY, T.C.; ROESCH-ELY, M; MOURA, S. *Mikania laevigata*: chemical characterization and selective cytotoxic activity of extracts on tumor cell lines. *Phytomedicine* 2013; 20(10):883-889.

RUIZ, S.; PERGOLA, P.E.; ZAGER, R.A.; VAZIRI, N.D. Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2013; 83(6):1029-1041.

RUTHERFORD, M.J.; DICKMAN, P.W.; LAMBERT, P.C. Comparison of methods for calculating relative survival in population-based studies. *Cancer Epidemiol.* 2012; 36(1):16–21.

SANTOS, E.W.; OLIVEIRA, D.C.; HASTREITER, A.; SILVA, G.B.; BELTRAN, J.S.O.; TSUJITA, M.; CRISMA, A.R.; MEIRY, S.; NEVES, P.; FOCK, R.A.; BORELLI, P. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2016; 53(2):138-145.

SAROJINI, S.; RAMESH, V.; SENTHILKUMAAR, P. Anticancer potential of aqueous extract of *Mikania glomerata* against H292 human lung cancer cell line. *IJBAR* 2016; 7(3):135-140.

SATOH, H.; MORIGUCHI, T.; TAKAI, J.; EBINA, M.; YAMAMOTO, M. Nrf2 prevents initiation but accelerates progression through the Kras signaling pathway during lung carcinogenesis, *Cancer Res.* 2013; 73:4158–4168.

SCHOTTENFELD, D.; BEEBE-DIMMER, J.L.; BUFFLER, P.M.; OMENN, G.S. Current perspective on the global and United State cancer burden attributable to lifestyle and environmental risk factors. *Annu Rev Public Health* 2013; 34:97-117.

SEPÚLVEDA, B.; QUISPE, C.; SIMIRGIOTIS, M.; GARCÍA-BELTRÁN, O.; ARECHE, C. Gastroprotective effects of new diterpenoid derivatives from *Azorella cuatrecasasii* Mathias & Constance obtained using a β -cyclodextrin complex with microbial and chemical transformations. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016; 26(14):3220-3222.

SERRANO, R.; THEODORO, T.R.; PINHAL, M.A.S. Oncogenes, tumor suppressor genes, microRNA and tumor development. *RBM.* 2014; 71(a2):4-10.
SHRESTHA, M.; HO, T.M.; BHANDARI, B.R. Encapsulation of tea tree oil by amorphous β -cyclodextrin powder. *Food chem* 2017; 221:1474-1483.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer Statistics. *Cancer J Clin.* 2017; 67(1):7-30.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019; 69(1):7-34.

SIMÃO, M.R.; CARNEIRO, L.J.; SANTOS, R.A.; BASTOS, J.K.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R.; MIZUNO, C.S. In vitro cytotoxicity study of ent-kaurenoic acid derivatives against human breast carcinoma cell line. *Med Chem Res* 2016; 25(2):303–309.

SLATTERY, M.L.; HERRICK, J.S.; MULLANY, L.E.; SAMOWITZ, W.S.; SEVENS, J.R.; SAKODA, L.; WOLFF, R.K. The co-regulatory networks of tumor suppressor genes, oncogenes, and miRNAs in colorectal cancer. *Genes Chrom Cancer.* 2017; 56(11):769-787.

SODHI-BERRY, N.; REID, A.; FRITSCHI, L.; MUSK, A.B.; VERMEULEN, R.; DE KLERK, N.; PETERS, S. Cancer incidence in the Western Australian mining industry (1996-2013). *Cancer Epidemiol.* 2017; 49:8-18.

SOICA, C.; DANCIU, C.; SAVOIU-BALINT, G.; BORCAN, F.; AMBRUS, R.; ZUPKO, I.; BOJIN, F.; CORICOVAC, D.; CIURLEA, S.; AVRAM, S.; DEHELEAN, C.A.; OLARIU, T.; MATUSZ, P. Betulinic Acid in Complex with a Gamma-Cyclodextrin Derivative Decreases Proliferation and in Vivo Tumor Development of Non-Metastatic and Metastatic B164A5 Cells. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(5):8235-8255.

SOTTOMAYOR, M.; ROS, BARCELO, A. The vinca alkaloids: from biosynthesis and accumulation in plant cells, to uptake, activity and metabolism in animal cells. In: Attaur R, editor. *Studies in natural products chemistry (Bioactive natural products)*. Amsterdam: *Elsevier Sci Pub.* 2005; 813–857.

SOUSA, A.P.A.; TORRES, M.R.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; ROCHA FILHO, F.D.; ALVES, A.P.N.N.; COSTA-LOTUFO, L.V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Carbohydr Pol.* 2007; 69(1):7-13.

SU, J.; CHEN, J.; LI, L.; LI, B.; SHI, L.; CHEN, L.; XU, Z. Formation of β -Cyclodextrin Inclusion Enhances the Stability and Aqueous Solubility of Natural Borneol. *J Food Sci.* 2012; 77(6):C658-664.

SULLU, Y.; GUN, S.; ATMACA, S.; KARAGOZ, F.; KANDEMIR, B. Poor prognostic clinicopathologic features correlate with VEGF expression but not with PTEN expression in squamous cell carcinoma of the larynx. *Diagn Pathol.* 2010; 5:35.

TALEB-CONTINI, S.H.; SANTOS, VENEZIANI, P.A.; R.C.S.; PEREIRA, A.M.S.; FRANÇA, S.C.; LOPES, N.P.; OLIVEIRA, D.C.R. Differences in secondary metabolites from leaf extracts of *Mikania glomerata* Sprengel obtained by micropropagation and cuttings. *Rev. bras. farmacogn.* 2006; 16:596-598.

TEJASHRI, G.; AMRITA, B.; DARSHANA, J. "Cyclodextrin based nanosponges for pharmaceutical use: A review". *Acta Pharmac* 2013; 63:335–358.

TROTT, O.; OLSON, A. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem.* 2010; 31:455.

VALENT, P.; BONNET, D.; DE MARIA, R.; LAPIDOT, T.; COPLAND, M.; MELO, J.V. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer.* 2012; 12(11):767-775.

VEIGA, F., PECORELLI, C. *As ciclodextrinas em Tecnologia Farmaceutica*. Coimbra, Minerva Coimbra; 2006.

VENEZIANI, R.; CAMILO, D.; DE OLIVEIRA, R. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel, *Biochem. Syst. Ecol.* 27 (1999) 99–102.

VENUTI, V. CANNAVÀ, C.; CRISTIANO, M.C.; FRESTA, M.; MAJOLINO, D.; PAOLINO, D.; STANCANELLI, R.; TOMMASINI, S.; VENTURA, C.A. A characterization study of resveratrol/sulfobutyl ether- β -cyclodextrin inclusion complex and in vitro anticancer activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014; 115:22-28.

VILEGAS, J.H.Y.; DE MARCHI, E.; LANCAS, F.M. Extraction of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* (Guaco) leaves. *Phytochem Anal* 1997; 8: 266–270.

VINOD, B.S.; ANTONY, J.; NAIR, H.H.; PULIYAPPADAMBA, V.T.; SAIKIA, M.; NARAYANAN, S.S.; BENVIN, A.; ANTO, R.J. Mechanistic evaluation of the signaling events regulating curcumin-mediated chemosensitization of breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Cell Death Dis.* 2013; 26:1-13.

WALKER, D. Esfregaços de sangue periférico. *In: COWEL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DeNICOLA, D.B. Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos.* Editora MedVet: São Paulo. 3ª Edição, 2009; 390-422.

WEINSTEIN, D.M.; MIHM, M.J.; BAUER, J.A. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 294(1):396-401.

WEISS, R.H. P21waf1/cip1 as a therapeutic target in breast and other cancers. *Cancer Cell.* 2003; 4(6):425-429.

YADAV, S.; KUJUR, P.K.; PANDEY, S.K.; GOEL, Y.; MAURYA, B.N.; VERMA, A.; KUMAR, A.; SINGH, R.P.; SINGH, S.M. Antitumor action of 3-bromopyruvate implicates reorganized tumor growth regulatory components of tumor milieu, cell cycle arrest and induction of mitochondria-dependent tumor cell death. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018; 339:52-64.

YAO, J.L.; FANG, S.M.; LIU, R.; OPPONG, M.B.; LIU, E.W.; FAN, G.W.; ZHANG, H. A Review on the Terpenes from Genus *Vitex*. *Molecules* 2016a; 21(9):1179.

YAO, Y.F.; LIU, X.; LI, W.J.; SHI, Z.W.; YAN, S.Y.X.; WANG, L.F.; CHEN, M.; XIE, M.Y. (-)-Epigallocatechin-3-gallate alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity in sarcoma 180 tumor-bearing mice. *Life Sci* 2016b; 180:151-159.

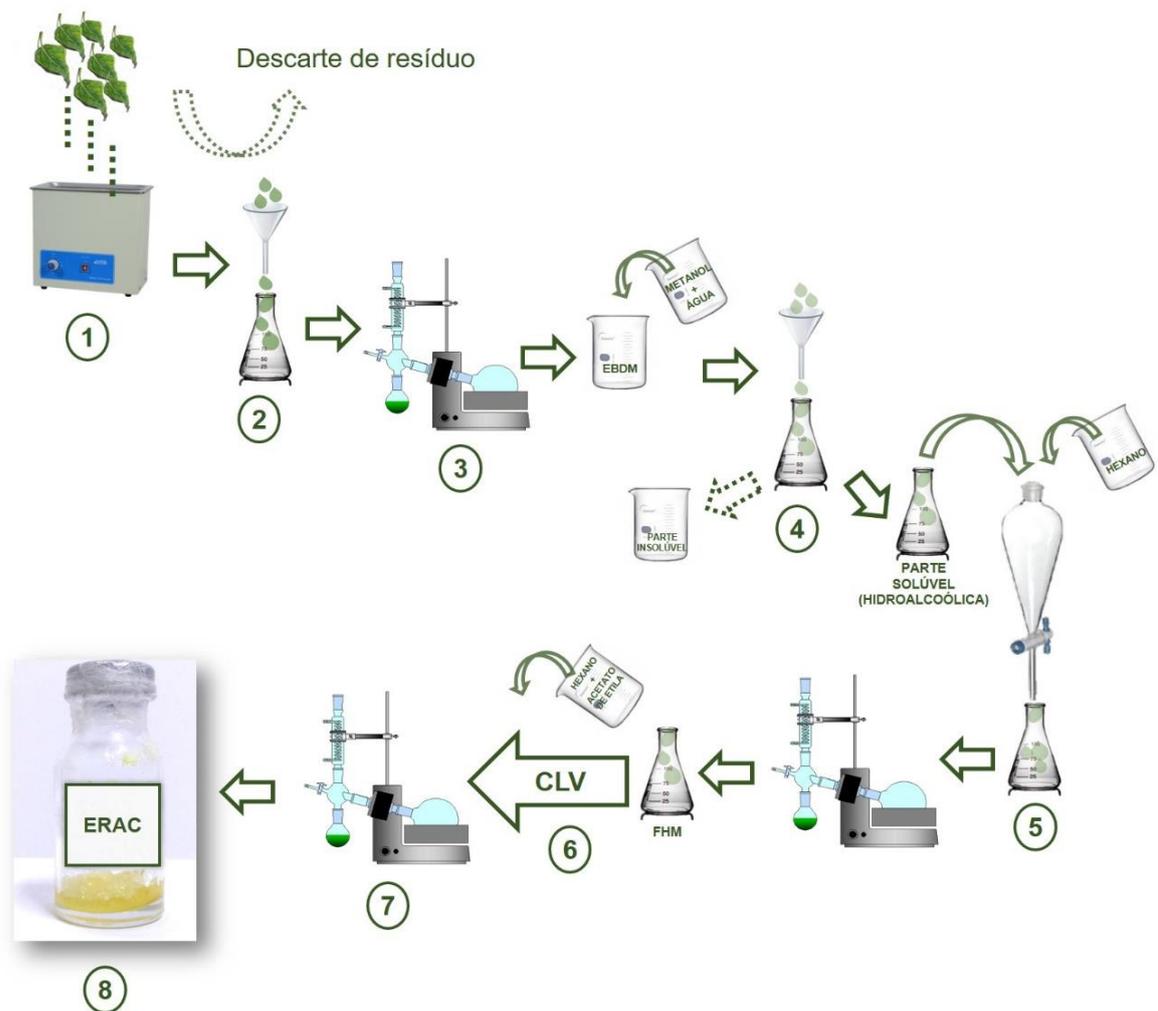
ZHENG, Y.; ZHOU, F.; WU, X.; WEN, X.; LI, Y.; YAN, B.; ZHANG, J.; HAO, G.; YE, W.; WANG, G. 23-hydroxybetulinic acid from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel synergizes the antitumor activities of doxorubicin *in vitro* and *in vivo*. *J Ethnopharmacol* 2010; 128:615-622.

APÊNDICES/ANEXOS

APÊNDICE A - Obtenção do material vegetal e Extrato de *Mikania glomerata* Sprengel Rico em Ácido ent-caurenóico (ERAC)

As folhas secas da *Mikania glomerata* foram adquiridas do fornecedor “Nutriervas” (localizado em São Paulo, na Rua do Bucolismo nº 144 – Brás, CEP: 03008-040), lote GUA07-07. O preparo do ERAC foi realizado no laboratório da Universidade de Franca, São Paulo, a partir de método padronizado (MOREIRA *et al.*, 2016), sob supervisão do professor Doutor Rodrigo Cassio Sola Veneziani. Assim, o material vegetal foi pulverizado em moinho de facas e tamisado em telas *Mesh* 10 para padronização do tamanho das partículas. A Figura 9 representa o esquema do processo de extração do ERAC a partir do material vegetal obtido a 10 *Mesh*. Inicialmente, 1000 g de *M. glomerata* seca e pulverizada foram adicionadas a 3500 mL de diclorometano e submetidos ao ultrassom durante três ciclos de 15 minutos. Em seguida, o material foi filtrado e concentrado em rotaevaporador, gerando o extrato bruto em diclorometano de *M. glomerata* (EBDM). O EBDM foi solubilizado em 300 mL de Metanol/ H₂O 9:1(v/v) e filtrado em papel de filtro.

A fração hidroalcolóica originada deste procedimento foi submetida à partição em hexano (300 mL) por quatro vezes com auxílio de funil de separação e concentrada em rotaevaporador, obtendo-se a Fração Hexânica de *Mikania* (FHM). A FHM foi submetida à cromatografia líquida a vácuo (CLV) utilizando uma mistura 1:1 de sílica gel 60 e sílica gel 60H como fase estacionária. Inicialmente, a coluna foi eluída com 2000 mL de hexano. Sucessivamente, o produto dessa etapa foi eluído em 1500 mL da mistura de hexano com acetato de etila (8:2) e concentrado em rotaevaporador, obtendo-se o ERAC com teor correspondente a 48,94% de AC nos extratos de *Mikania glomerata* Sprengel rico em AC.



Representação esquemática das etapas do preparo do Extrato de *Mikania glomerata* Sprengel rico em ácido *ent*-caurenóico (ERAC). 1. Folhas de *M. glomerata* em banho ultrassônico. 2. Filtração do material contendo folhas e solvente. 3. Concentração da substância em rotaevaporador. 4. Processo de filtração. 5. Partição líquido-líquido da fração hidroalcolólica. 6. Procedimento de cromatografia líquida a vácuo (CLV) da fração hexânica. 7. Concentração da substância em rotaevaporador. 8. Produto obtido do processo de extração fracionada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE B – Artigo oriundo da tese submetido à revista.

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry
Complexation of diterpene-rich extract in β -cyclodextrin.
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Complexation of diterpene-rich extract in β -cyclodextrin.
Article Type:	Research Paper
Corresponding Author:	Angela Alves, M.D. Science and Technology Institute ARACAJU, BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Science and Technology Institute
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Angela Alves, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Angela Alves, M.D. Rodrigo Veneziani Yasmim Carvalho Paulo Silva Pedro Rolim Neto Matheus Pereira Adriano Araújo Ricardo Albuquerque Júnior Juliana Cardoso
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Ent-caurenoic acid is a diterpene that stands out for having antineoplastic and antiproliferative activities against cells of different types of tumors. However, diterpenes have low solubility in aqueous solvents, being necessary the search of technological strategies for the administration of the same. The aim of this research was to produce complexes of inclusion of extract rich in ent-caurenoic acid (ERAC) obtained from the leaves of <i>Mikania glomerata</i> Sprengel with β -cyclodextrin (CD). Molecular docking of the studied structures was performed in order to determine the mode of inclusion as well as the molar ratio to be established. The ERAC: β -CD inclusion complexes were developed by the techniques of kneading (KD) and co-evaporation (CE) and analyzed by Vibrational Absorption Spectroscopy Infrared Region with Fourier Transform (FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetry/Thermogravimetry (TG/DTG) and inclusion efficiency. FTIR spectra of the ERAC: β -CD complexes showed changes in characteristic bands reinforcing the proposition of energetically favorable hydrogen bonding between the β -CD and ERAC molecules in the 1: 1 molar ratio molecular docking study. Thermal analysis through the DSC curves, the KD method presented a more significant endothermic profile (331 °C) than CE (340 °C) and gradual mass loss of 5.6% for KD and 3.6% for CE. ERAC inclusion efficiency in β -CD by KD was 65.37% and 13.64% by CE.
Suggested Reviewers:	

ANEXO



UNIVERSIDADE TIRADENTES
DIRETORIA DE PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

DECISÃO DA CEUA-UNIT

O protocolo do projeto, “Avaliação da atividade antitumoral do ácido ent-caurenóico obtido a partir de *Mikania glomerata* Sprengel em modelo *in vitro* e *in vivo*”, processo nº 030815RR, foi submetido à avaliação na CEUA-UNIT, pelo pesquisador **Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior**, onde recebeu o parecer de **Aprovado** dos membros dessa comissão, na reunião realizada no dia 10 de dezembro de 2015.


Coordenador(a) da CEUA-UNIT