

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade antitumoral do extrato
bruto obtido por fluido supercrítico da *Tithonia diversifolia*
(Hemsl.) A.Gray.**

Enrik Barbosa de Almeida, M.Sc.

Aracaju - SE

Junho 2018

**Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade antitumoral do extrato
bruto obtido por fluido supercrítico da *Tithonia diversifolia*
(Hemsl.) A.Gray.**

Tese de Doutorado submetido à
banca examinadora para a obtenção
do título de Doutor em Saúde e
Ambiente na área de concentração
em Saúde e Ambiente.

Enrik Barbosa de Almeida, M.Sc.

Orientadores:

Francine Ferreira Padilha, Dra.

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque-Júnior, Dr.

Aracaju - SE

Junho 2018

A447 Almeida, Enrik Barbosa de
Avaliação in vitro e in vivo da atividade antitumoral do extrato bruto obtido por fluido supercrítico da *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray / Enrik Barbosa de Almeida; orientação [de] Prof. M.Sc. Padilha, Francine Ferreira – Aracaju: UNIT, 2018.

64 f. il.: 30cm

Tese (Doutorado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, 2018
Inclui bibliografia.

1. Triagem de medicamento antitumoral. 2. Células tumorais cultivadas. 3. Produtos naturais. 4. Sarcoma 180. 5. Sesquiterpenos. 6. Extrato com fluido supercrítico. I. Almeida, Enrik Barbosa de. II. Albuquerque-Júnior, Ricardo Luiz Cavalcanti de. (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 616-006-092.4

**Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade antitumoral do extrato
bruto obtido por fluido supercrítico da *Tithonia diversifolia*
(Hemsl.) A.Gray.**

Enrik Barbosa de Almeida

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

Aprovada por:

Ricardo Luiz Cavalcanti Albuquerque Júnior, Dr.
Orientador

Francine Ferreira Padilha, Dra.
Orientadora

Juliana Cordeiro Cardoso, Dra.
Membro Interno

Maria Nogueira Marques, Dra.
Membro Interno

Luciana Maria de Hollanda, Dra.
Membro Externo

Luciana Nalone Andrade, Dra.
Membro Externo

Aracaju

Junho-2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai Noé Henrique de Almeida Filho, minha mãe Lêda Barbosa de Almeida (Professora de Educação Física) e meu irmão Erik Barbosa de Almeida pelo apoio, paciência, dedicação, confiança e respeito por minha pessoa durante todo este período.

Agradeço a minha esposa Adriana Karla de Lima por ser a responsável pelas duas maiores alegrias que tenho nesta vida que são meus filhos Arthur e Marina, amo vocês.

Agradeço aos meus orientadores Profs. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior e Dra. Francine Ferreira Padilha pelo inestimável auxílio no desenvolvimento desta tese.

Agradeço ao meu irmão de coração Ricardinho por mais uma vez segurar a barra de me orientar. Deixando de lado a amizade sincera que tenho por você, venho te falar da admiração que tenho por você quando o assunto é ciência. Não me refiro de sua capacidade intelectual, mas sim da forma como você repassa seus conhecimentos para seus alunos. Sorte daqueles que tiverem a honra de passarem pelas tuas mãos e serem agraciados pela tua orientação.

Agradeço aos meus amigos e irmãos Adriano Antunes, Alfredo Dias, Ana Paula Belizário, Cinthia Meireles, Divaldo Lyra.

Agradeço aos novos amigos, feitos durante o desenvolvimento deste trabalho, Cleberson Franclin Tavares Costa, Mayanna Machado Freitas, Maria Eliane de Andrade e Rose Nely Pereira Filho. Este trabalho tem muito de todos vocês.

Agradeço aos alunos do Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental em especial a Isadora e Rafa, que contribuíram de forma decisiva para a realização da tese.

Agradeço a Universidade Tiradentes e o Instituto de Tecnologia e Pesquisa por toda ajuda necessária para o desenvolvimento desta tese.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	2
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	5
2.1-Câncer	5
2.2- Tratamento convencional e alternativo	6
2.2.1- Quimioterapia Antiblástica	6
2.2.2- Radioterapia	6
2.2.3- Cirurgia	7
2.2.4- Quimioterapia Adjuvante	8
2.3- Caracterização farmacognóstica da <i>Tithonia diversifolia</i>	9
2.4- Atividades biológicas da tagitinina C, um sesquiterpeno comumente descrito como composto majoritário das folhas da <i>Tithonia diversifolia</i> .	12
2.5- Extrato bruto das folhas de <i>Tithonia diversifolia</i> por fluido supercrítico (EScTD).	13
2.6- Modelo biológico <i>in vivo</i> para ensaios de atividade antitumoral.	14
2.6.1- Modelo experimental <i>in vivo</i> de Sarcoma 180.	16
OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivos específicos.	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1- Preparação e caracterização química do extrato bruto das folhas de <i>Tithonia diversifolia</i>	21
4.1.1- Coleta e identificação botânica da <i>Tithonia diversifolia</i>	21
4.1.2- Extração das folhas de <i>T. diversifolia</i> através do fluido supercrítico.	21
4.1.3- Caracterização química do extrato obtido	23
4.2- Avaliação do Potencial Antioxidante do extrato obtido	24
4.3- Análise da Atividade Antitumoral <i>in vitro</i>	24
4.3.1- Ensaio de triagem de atividade citotóxica contra células tumorais com alta concentração do EScTD (50 µg/mL)	24
4.3.2- Ensaio de citotoxicidade em baixas concentrações do EScTD (2 a 8 µg/mL)	25
4.4- Análise da Atividade Antitumoral <i>in vivo</i>	27

4.4.1- Aspectos Éticos	27
4.4.2-Conservação das células do sarcoma 180 e implantação dos tumores.	27
4.4.3-Formação dos grupos experimentais e tratamento com o extrato bruto da <i>Tithonia diversifolia</i> (EScTD)	28
4.5-Avaliação dos parâmetros hematológicos	28
4.6-Avaliação dos parâmetros bioquímicos	29
4.7-Determinação do efeito da administração do Extrato bruto da <i>Tithonia Diversifolia</i> (EScTD) sobre a massa ponderal, volume e taxa de inibição do crescimento dos tumores	29
4.8-Avaliação macroscópica dos órgãos excisionados	30
4.9-Avaliação histopatológica dos tumores excisionados	30
4.10-Análise estatística	30
5. RESULTADOS	32
5.1 Extração, rendimento e caracterização do extrato das folhas de <i>Tithonia diversifolia</i> através do fluido supercrítico.	32
5.2 Avaliação do potencial antioxidante do extrato EScTD por meio de ensaio com DPPH.	32
5.3 Avaliação da atividade citotóxica do EScTD	33
5.4 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> .	35
5.4.1 Análise da massa ponderal média dos tumores excisionados.	35
5.4.2 Análise histopatológica dos tumores excisionados	35
5.5 Avaliação de parâmetros toxicológicos	36
5.5.1 Análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos	36
5.5.2 Percentual de massa corpórea dos animais e massa ponderal dos órgãos viscerais.	43
5.5.3 Análise da massa ponderal média dos órgãos viscerais excisionados.	43
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÕES	53
8. REFERÊNCIAS	55
ANEXO I	64

LISTA DE QUADRO E TABELAS

QUADRO 1 - Descrição dos parâmetros adaptados para a extração das folhas de <i>T. diversifolia</i> por fluido supercrítico.....	22
TABELA 1 - Distribuição dos grupos experimentais realizado nos animais transplantedos com Sarcoma 180.....	28
TABELA 2 - Resultados da atividade antioxidante do ESCTD por meio do ensaio DPPH.....	33
TABELA 3 - Análise de parâmetros hematológicos relacionados a série branca em ratos submetidos a implante dérmico de células de sarcoma 180 tratados com solução salina (CTR), extrato supercrítico de <i>Tithonia diversifolia</i> (EScTD) nas doses de 10 e 30 mg/Kg/dia e 5-fluorouracil (5-FU) ao final dos oito dias do período experimental.....	40
TABELA 4 - Análise de parâmetros bioquímicos relacionados a função hepática e renal em ratos submetidos a implante dérmico de células de sarcoma 180 tratados com solução salina (CTR), extrato supercrítico de <i>Tithonia diversifolia</i> (EScTD) nas doses de 10 e 30 mg/Kg/dia e 5-fluorouracil (5-FU) ao final dos oito dias do período experimental.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tagitinina C, em destaque o grupo α MyL.....	12
Figura 2 - Curvas de rendimento do ESCTD.....	22
Figura 3 - Perfil cromatográfico das amostras A, B, C, D e E do ESCTD obtido por CLAE ($\lambda = 254$ nm).....	33
Figura 4 - Avaliação da perda de viabilidade celular (%) das linhagens PC3 (adenocarcinoma prostático humano), HCT116 (carcinoma colorretal humano), SNB19 (glioblastoma humano), HL60 (leucemia promielocítica humana) e A549 (adenocarcinoma alveolar de células basais de pulmão humano). Dados expressos em percentual médio de células não viáveis em relação ao o controle (meio RPMI sem tratamento).	33
Figura 5 - Avaliação da viabilidade celular (%) das linhagens ATCC (A) A549 (adenocarcinoma alveolar de células basais de pulmão humano) e (B) L929 (fibroblastos murinos).....	34
Figura 6 - Determinação da massa ponderal média dos tumores excisionados dos animais submetidos a implante dérmico de células de sarcoma 180 tratados com solução salina (CTR), extrato supercrítico de <i>Titonia diversifolia</i> (EScTD) nas doses de 10 e 30 mg/Kg, e 5-fluorouracil (5-FU) ao final dos oito dias do período experimental (mg de massa tumoral/100 g massa corpórea).....	35
Figura 7 - Fotomicrografias de secções histológicas de sarcoma 180 coradas em HE. (A – C) Imagens representativas de tumor com alto potencial de invasão, promovendo intensa dissociação dos feixes de músculo estriado esquelético. (D – F) Imagens representativas de tumor com menor potencial infiltrativo invadindo o tecido muscular e separando os feixes em blocos mais compactos (HE, 40 $\times$, 100 $\times$ e 400 $\times$). Legenda: TME – tecido muscular estriado esquelético; CT – células tumorais viáveis do sarcoma 180.....	37
Figura 8 - Fotomicrografias de secções histológicas de sarcoma 180 coradas em HE. (A) Célula gigante bizarra (seta grossa), (B/D) mitose típica em anáfase (círculo) e (C/E) mitose tetrapolar atípica em metáfase. (F/G) Células tumorais em apoptose (setas delgadas) (HE, 400 $\times$ e 800 $\times$).....	38
Figura 9 - Fotomicrografias de secções histológicas de sarcoma 180 coradas em HE. (A) áreas de necrose coagulativa do parênquima tumoral. (B) Células tumorais invadindo o tecido adiposo periférico. (C) Presença de células tumorais formando êmbolo intravascular. (D) Infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário peritumoral (HE, 100 $\times$ e 400 $\times$).....	39
Figura 10 - Determinação da massa ponderal média dos tumores excisionados dos animais submetidos a implante dérmico de células de sarcoma 180 tratados com solução salina (CTR), extrato supercrítico de <i>Titonia diversifolia</i> (EScTD) nas doses de 10 e 30 mg/Kg, e 5-fluorouracil (5-FU) ao final dos oito dias do período experimental (mg de massa tumoral/100 g massa corpórea).....	43
Figura 11 - Determinação da massa ponderal média dos órgãos viscerais removidos dos animais submetidos a implante dérmico de células de sarcoma 180 tratados com solução salina (CTR), extrato supercrítico de <i>Titonia diversifolia</i> (EScTD) nas doses de 10 e 30 mg/Kg, e 5-fluorouracil (5-FU) ao final dos oito dias do período experimental (mg de massa tumoral/100 g massa corpórea).	44

RESUMO

O câncer é a segunda causa mais comum de morte no Brasil. Novas terapêuticas baseadas na utilização de produtos naturais ricos em lactonas sesquiterpênicas, como aquelas presentes na *Tithonia diversifolia* têm ganhado cada vez mais espaço devido as suas atividades citotóxicas e antiproliferativas contra células tumorais. Além disso, nos últimos anos, técnicas extrativas em alta pressão que fazem uso de gases em estado supercrítico como solventes extratores têm sido utilizadas por representarem tecnologias “verdes” altamente eficientes de extração. Assim, este trabalho tem como objetivo investigar os efeitos citotóxicos e antitumorais do extrato bruto obtido por fluido supercrítico das folhas *Tithonia diversifolia* (EScTD). O processo de extração por meio do método de fluido supercrítico, utilizando-se o CO₂ como solvente extrator (2 ml/min), a 40 °C e 200 bar, durante 180 min. A análise cromatográfica foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. Os solventes utilizados na fase móvel foram: (B) acetonitrila e (A) ácido acético à 1% em água milli-q (20 µL, a 1 mL/min, por 10 min), e os cromatogramas foram analisados no comprimento de onda de 254 nm. Para triagem de atividade citotóxica contra células tumorais 50 µg/mL do EScTD foram testados contra as linhagens A549 (adenocarcinoma alveolar de células basais de pulmão humano), PC3 (Carcinoma de próstata), HCT-116 (côlon - humano), HL60 (Leucêmica) e SNB19 (Glioblastoma) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), cultivadas em meio RPMI 1640. Posteriormente, a linhagem mais sensível (A549) foi selecionada para teste de citotoxicidade com baixas concentrações de EScTD (2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL), assim como a linhagem L929 (fibroblasto não maligno murino), e calculado o IC₅₀. No ensaio *in vivo* de atividade antitumoral, 24 camundongos Swiss foram inoculados com células de Sarcoma 180 e divididos em 4 grupos (n=6): tratado com salina (CTR), tratado com 5 Fluorouracil (5-FU), e tratados com 10 mg/Kg e 30 mg/Kg do extrato (EScTD) durante 7 dias. Posteriormente, os tumores foram removidos, assim como fígado, baço e rins, pesados e analisados microscopicamente. Foram avaliados, ainda, a massa ponderal dos animais, e parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os dados foram submetidos a tratamento estatístico, considerando significativas diferenças onde $p < 0,05$. O rendimento do extrato foi $1,02 \pm 0,2\%$ e o perfil cromatográfico exibiu um pico eluído em aproximadamente 5 min, compatível com tagitinina C. No teste de triagem citotóxica, o EScTD apresentou elevados percentuais citotóxico (>75% inibição) frente a todas as linhagens testadas com ênfase para A549, PC3 e HCT-116 (100%). No teste de citotoxicidade com baixas concentrações de EScTD a IC₅₀ foi de 2,2 µg/mL para as células A549 e de 8,0 µg/mL para L929. Foi observada redução significativa de massa ponderal dos tumores nos grupos tratados com 5-FU, EScTD 10 e 30mg/Kg em comparação com o grupo CTR ($p < 0,05$). Contudo, apenas os grupos tratados com EScTD a 30 mg/Kg e 5-FU, mas não o EScTD a 10 mg/Kg, exibiram perda significativa de massa corpórea ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente), além de sinais hematológicos e bioquímicos de imuno, hepato e citotoxicidade. Conclui-se que estes resultados sugerem que o EScTD apresenta elevada atividade citotóxica contra células tumorais malignas, e ação antitumoral em modelo experimental murino de sarcoma 180. Além disso, a dose de 10 mg/kg do extrato promoveu menor toxicidade, o que parece promissor para estudos futuros em terapias anticâncer.

Palavras-chave: Triagem de medicamento antitumoral, células tumorais cultivadas, produtos naturais, sarcoma 180, sesquiterpenos, extração com fluido supercrítico.

ABSTRACT

Cancer is the second most common cause of death in Brazil. New therapies based on the use of natural products rich in sesquiterpene lactones, such as those present in *Tithonia diversifolia*, have been increasingly gaining space in the scientific community due to their cytotoxic and antiproliferative activities against tumor cells. In recent years, high pressure extractive techniques using supercritical gases as solvent extractors have been used since they represent highly efficient "green" extraction technologies. Thus, this work aims to investigate the cytotoxic and antitumor effects of the crude extract of the leaves of *Tithonia diversifolia* (EScTD) obtained by supercritical fluid. The extraction process was carried out by means of the supercritical method, using the CO₂ as extractor solvent (2 ml / min), at 40 °C and 200 bar, during 180 min. A chromatographic analysis was performed using high performance liquid chromatography. The solvents in a mobile phase were: (B) acetonitrile and (A) 1% acetic acid in milli-q water (20 µl, at 1 mL / min, for 10 min), and the chromatograms were ionic at wavelengths of 254 nm. The cytotoxic activity of EScTD 50 µg / mL against tumor cells was tested against A549 (basal cell alveolar adenocarcinoma of human lung), PC3 (prostate carcinoma), HCT-116 (human-colon), HL60 (Leukemia and SNB19 (Glioblastoma) cell lines were donated by the National Cancer Institute (USA), grown in RPMI 1640 medium. Subsequently, the most sensitive cell line (A549) was selected for cytotoxicity testing with low concentrations of EScTD (2, 4, 6, 8 and 10 µg / mL), as well as the L929 (non-malignant murine fibroblast) cell line, and calculated the IC₅₀. In the in vivo antitumor activity assay, 24 Swiss mice were inoculated with Sarcoma 180 cells and assigned into 4 groups (n = 6): treated with saline (CTR), treated with 5 Fluorouracil (5-FU), and treated with 10 mg / kg and 30 mg / kg extract (EScTD) for 7 days. Then, the tumors were removed, as well as liver, spleen and kidneys, weighed and their gross and microscopic features were analyzed. Body weight of the animals, as well as haematological and biochemical parameters were also assessed. The data were subjected to statistical analysis, considering significant differences where $p < 0.05$. The extract yield was $1.02 \pm 0.2\%$ and the chromatographic profile exhibited an eluted peak in approximately 5 min, compatible with tagitinin C. In the cytotoxic screening test, the EScTD showed high cytotoxic percentages (> 75% inhibition) against all cell lines tested, particularly against A549, PC3 and HCT-116 (100%). In the cytotoxicity assay with low concentrations of EScTD the IC₅₀ was 2.2 µg / mL for A549 cell line and 8.0 µg / mL for L929 cell line. Significant reduction in tumor weight was observed in the groups treated with 5-FU, EScTD 10 and 30mg / kg compared to the CTR group ($p < 0.05$). However, only the groups treated with EScTD at 30 mg / kg and 5-FU, but not EScTD at 10 mg / kg, showed significant loss of body weight ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively), as well as hematological and biochemical signs of immuno, hepato and cytotoxicity. In conclusion, these results suggest that EScTD has high cytotoxic activity against malignant tumor cell lines, and antitumor properties in murine sarcoma 180 experimental model. In addition, the 10 mg / kg dose of EScTD promoted lower toxicity, which seems promising for further studies in anticancer therapies.

Key-words: Antitumor drug screen, tumor cell lines, natural products, sarcoma 180, sesquiterpenes, supercritical fluid extraction.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o percentual de mortalidade por câncer no mundo vem aumentando consideravelmente. Este crescimento vem ocorrendo devido a elevação da taxa de crescimento populacional e o envelhecimento da população, associados a fatores de risco como obesidade, tabagismo e vida sedentária (SCHOTTENFELD *et al.*, 2013; NOLEN *et al.*, 2017). O tratamento do câncer visa inicialmente à cura do paciente. Quando esta cura não pode ser alcançada, os tratamentos buscam alternativas que prolonguem a sobrevida do paciente e com a melhor qualidade possível (SIEGEL *et al.*, 2012; HURTADO *et al.*, 2018). Os tratamentos convencionais como cirurgias, radioterapia e quimioterapia, são bastante efetivos contra a maioria dos cânceres, porém a toxicidade associada aos efeitos colaterais destes tratamentos promove impacto negativo na qualidade de vida destes pacientes (VENGOJI *et al.*, 2018).

A quimioterapia visa o tratamento do câncer por meio de princípios ativos que podem estar isolados ou conjugados atuando sobre a taxa de proliferação celular, interferindo diretamente no ciclo de divisão celular. Este tratamento impõe restrições consideráveis no seu uso, por não apresentar seletividade e especificidade exclusiva contra as células neoplásicas e limitações terapêuticas como, atividade toxicológica que produz efeitos colaterais em diversos tecidos (hematopoiético, germinativo e mucosa gastrointestinal) e tolerância aos seus princípios ativos (VANNEMAN; DRANOFF, 2012; YUAN, *et al.*, 2017).

A busca por novos tratamentos que promovam a cura ou o aumento da sobrevida do paciente oncológico vem se baseando na procura de compostos que possuam bioatividade e sejam obtidos de fontes naturais. Os produtos naturais que apresentam bioatividade ocupam hoje o principal caminho a ser seguido para o desenvolvimento de novas terapêuticas contra o câncer. As plantas medicinais geram a maior parte do arsenal de novos compostos que apresentam potencial antioncogênico. Estes novos compostos seriam utilizados como adjuvantes aos tratamentos convencionais de quimioterapia, radioterapia e cirurgia visando uma redução nas doses terapêuticas e diminuindo consideravelmente seus efeitos adversos (YUAN *et al.*, 2017).

Dentre os produtos naturais presente em plantas medicinais, destacam-se aqueles ricos em terpenos. Entre as subclasses dos terpenos, evidenciam-se as lactonas sesquiterpênicas, como a tagitinina C. Estes compostos apresentam-se como

um dos principais grupos de substâncias que aprestam bioatividade, evidenciando-se principalmente as atividades anti-inflamatórias e antitumorais (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2012; DESTANDAU *et al.*, 2015). Relatos científicos vêm se concentrando em estudar as atividades antitumorais das lactonas sesquiterpênicas, dando ênfase principalmente a atividade citotóxica da tagitinina C frente a diversas linhagens celulares tumorais. (WU *et al.*, 2001; GU *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2011; LIAO *et al.*, 2013).

Neste contexto a *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A.Gray (*T. divesifolia*) por sua grande concentração em lactonas sesquiterpênicas, e em especial, a tagitinina C, presente nos tricomas glandulares de suas folhas (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2012; JUANG *et al.*, 2014; DESTANDAU *et al.*, 2015; MABOU TAGNE *et al.*, 2018). Esta composição química da *T. divesifolia* possibilita a esta planta um potencial efetivo para ser utilizada como agente antitumoral. Os compostos que apresentam bioatividade podem ser obtidas através de diversos métodos extrativos seletivos que facilitam a separação de compostos específicos (MONDAL *et al.*, 2012).

Parte destas substâncias ativas presentes em plantas medicinais são extraídas por meio de solventes orgânicos que em sua maioria apresentam-se inadequados para a realização de ensaios biológicos devido a sua toxicidade. Técnicas extrativas limpas, como o fluido supercrítico, utilizam gases como solventes extratores. Estes gases quando submetidos à determinada pressão e temperatura crítica tornam-se fluidos. Sob a forma de fluido estes gases são capazes de extrair a maioria dos compostos orgânicos e são inertes com os compostos extraídos já que são separados dos compostos ao final do processo por retornarem ao estado gasoso (HERRERO, *et al.*; 2010). Ziemóns *et al.* (2005) desenvolveram um protocolo eficiente para a extração da tagitinina C por meio supercrítico utilizando o CO₂ como solvente. Desta forma, compostos extraídos por fluido supercrítico podem ser utilizados em ensaios biológicos por não apresentarem resquícios do solvente extrator.

Diante do exposto, este trabalho, tem por objetivo investigar os potenciais efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo* do extrato bruto obtido por fluido supercrítico das folhas de *T.diversifolia* (EScTD).

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1-Câncer

Nos últimos anos o aumento significativo da incidência do câncer na população mundial promove de forma direta um incremento em sua taxa de mortalidade. O desenvolvimento do câncer está sujeito a fatores intrínsecos e extrínsecos. Estes fatores agem concomitantemente, os intrínsecos estão relacionados a polimorfismos, herança genética e alterações (mutações) no DNA de células normais que abrangem genes que controlam os processos de diferenciação e divisão celular enquanto os extrínsecos alteram as taxas destas mutações (WU *et al.*, 2016). Segundo Hanahan e Wienberg (2011), a alteração de uma célula normal em uma célula oncogênica é um processo multifásico produzido por uma sequência de passos que inclui: produção de fatores proliferativos autônomos, redução dos fatores de supressão de crescimento celular, capacidade de invadir tecidos circunvizinhos e sofrer metástase, replicação de clones celulares imortais, indução de angiogênese e resistência aos processos de morte celular.

O câncer é a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e ocupa o segundo lugar nos países em desenvolvimento o que o torna um problema de saúde pública. A tendência para os próximos anos é que haja um crescimento no número de casos e de mortes relacionados ao câncer, principalmente nos países em desenvolvimento, provocado por uma mudança comportamental relacionada ao estilo de vida das pessoas que serão expostas com maior frequência aos fatores de risco que levam ao desenvolvimento do câncer (SIEGEL *et al.*; 2012; SCHOTTENFELD *et al.*; 2013; NOLEN *et al.*, 2017).

Segundo Torre *et al.* (2016), o número de novos casos de câncer ocorridos no ano de 2012, foi de 14,1 milhões e levaram a óbito cerca de 8,2 milhões de pessoas. Os cânceres de próstata e pulmão apresentaram a maior incidência em homens, principalmente na América do Norte, América do Sul e Europa. Nas mulheres a maior incidência foi dos cânceres de mama e cérvix uterina. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), levando em consideração dezoito tipos de câncer, a estimativa para o ano de 2018 no Estado de Sergipe será de 175,91 casos para cada 100 mil homens e de 162,69 para cada 100 mil mulheres. Entre estes novos casos de câncer, destacam-se o de pele não melanoma com 1.280 casos, 700 de próstata e 550 casos de mama feminina.

2.2- Tratamento convencional e alternativo

2.2.1- Quimioterapia Antiplásica

O tratamento por quimioterapia é baseado na utilização de fármacos que atuam interferindo no metabolismo celular e alterando os mecanismos de proliferação celular. Entre as principais classes de quimioterápicos aplicados nos tratamentos contra o câncer encontra-se os inibidores mitóticos, os alquilantes, os antibióticos antitumorais e os antimetabólitos. Estas intervenções geralmente ocorrem diretamente sobre o ciclo de divisão celular, mais precisamente interferindo na síntese ou replicação dos ácidos nucleicos e inibindo a migração cromossômica durante a metáfase (MILLER *et al.*, 2016).

Normalmente há necessidade de se utilizar classes combinadas de quimioterápicos para se obter um melhor resultado no tratamento. Isto ocorre porque existem medicamentos que atuam tanto em células que se encontram ou não em divisão celular (ciclo não-específico), os que atuam especificamente em uma fase do ciclo de divisão celular (fase-específico) e os que atuam apenas em células que se encontram em divisão celular (ciclo-específico). Estas associações de diferentes classes de quimioterápicos demonstram uma maior eficácia nas doses terapêuticas dos tratamentos e reduzem a resistência dos pacientes aos quimioterápicos (INCA, 2018).

Apesar de ser um tratamento eficaz, a quimioterapia não apresenta seletividade apenas para as células tumorais, atingindo também as células normais do paciente. A vantagem para as células normais é que elas apresentam uma taxa metabólica quantitativa de proliferação celular inferior às células tumorais. Porém tecidos que apresentam taxas proliferativas altas, como a medula óssea e epitélios do sistema digestivo, são muito atingidos pelos efeitos citotóxicos destes quimioterápicos. Por isso se faz necessário administração destes fármacos em intervalos cíclicos que permitam reversão destes efeitos citotóxicos nas células normais (YUAN *et al.*, 2017).

2.2.2- Radioterapia

A radioterapia consiste em um método através do qual se utiliza radiações ionizantes no tratamento contra as células tumorais. A emissão destas radiações gera feixes de elétrons que ao entrarem em contato com as células do tumor liberam uma grande quantidade de energia ionizante. Esta energia ionizante interfere na capacidade metabólica da célula e na sua taxa de proliferação celular através de mecanismos que promovem a desnaturação da cadeia de DNA e de diversas outras

moléculas essenciais para o metabolismo celular, levando à célula a morte (INCA, 2018).

O procedimento de radioterapia visa tratar uma área específica, podendo ser direcionada a um determinado local ou abranger uma região tecidual. Desta maneira alguns fatores devem ser levados em consideração durante a escolha do tipo de radiação e do tempo de duração de sua administração. Estes fatores são: a tolerância dos tecidos normais durante a aplicação da radiação, a sensibilidade das células tumorais a radiação, o local de sua ocorrência e a sua oxigenação. Por este motivo a utilização de doses diárias fracionadas busca atingir um equilíbrio entre a taxa de morte de células tumorais (regressão tumoral) e tolerância dos tecidos normais ao tratamento (ALLEN *et al.*, 2017).

As fontes de radiação ionizante podem ser originadas de duas formas, por meio de fonte elétrica ou por isótopos radioativos. As fontes elétricas geram elétrons e radiação X que são utilizados como tratamentos externos, sendo a radiação emitida a uma certa distância da área de aplicação. Já os radioisótopos, que geralmente tem como fonte elementos químicos (césio, cobalto, etc.) que geralmente produzem radiação gama. Estes elementos são introduzidos internamente (cavidades e interstício) por meio de diversas aplicações terapêuticas como fios, placas, tubos e agulhas. (INCA, 2018).

O tratamento por radioterapia é geralmente bem tolerado pelos pacientes gerando alguns efeitos adversos que normalmente são reversíveis. As limitações do tratamento estão relacionadas à sensibilidade das células tumorais ao tratamento, que influencia diretamente na taxa cura do câncer e a adequação da dose terapêutica a tolerância das células normais. Avanços tecnológicos nas áreas do diagnóstico associadas a terapia alvo buscam tornar a radioterapia um processo de tratamento individual que aumente as chances de cura dos pacientes oncológicos (ALLEN *et al.*, 2017).

2.2.3- Cirurgia

A cirurgia vem sendo utilizada há mais de um século como uma das formas primária de tratamento do câncer. O câncer é considerado uma doença sistêmica, mas quando diagnosticado no início ou limitado a uma área restrita de um tecido ou órgão (tumores sólidos) eu sua forma primária ou metastática, sua ressecção pode levar a cura do paciente ou prolongamento de sua vida (SAMER *et al.*, 2017).

A evolução das técnicas cirúrgicas nas últimas décadas promoveu uma melhora considerável no planejamento das cirurgias em geral, como também, um avanço na preparação dos pacientes quanto às modificações morfológicas e fisiológicas que ocorrerão decorrentes do tratamento. Desta maneira, a recomendação para o tratamento cirúrgico de um câncer deve considerar simultaneamente os aspectos gerais da saúde do paciente e o tipo de câncer a ser tratado. Paradoxalmente, estudos recentes têm demonstrado a possibilidade de que o trauma e a resposta inflamatória parecem gerar o aparecimento de focos metastáticos (INCA, 2018). Tal resposta adversa parece ter relação com a liberação em massa de fatores de crescimento inflamatórios, que estimulam a proliferação celular, bem como de citocinas pró-angiogênicas, necessárias para o transcorrer do processo de reparo (SAMER *et al.*, 2017).

A técnica cirúrgica pode ser utilizada de forma curativa redutora e paliativa. A técnica curativa deve ser empregada em estágios iniciais da doença, onde o tumor pode ser extirpado por completo. A técnica redutora deve ser utilizada como técnica adjuvante a outras formas de tratamento (quimioterapia e radioterapia) aumentando as perspectivas de resposta destes tratamentos contra a doença. A redução do volume do tumor deve respeitar as condições fisiológicas e funcionais do órgão e tecidos circunvizinhos. A técnica paliativa é empregada quando opção de cura é mínima ou inexistente e se baseia no controle dos sintomas de tumores em estágios avançados reduzindo os riscos de metástase (INCA, 2018).

2.2.4- Quimioterapia Adjuvante

A busca por novos tipos de tratamento é crescente e muitas inovações tecnológicas vem sendo introduzidas neste contexto. Estas novas terapias, baseadas em moléculas específicas contra as células tumorais, criam novas perspectivas e proporcionam uma revolução no tratamento do câncer. Entre elas pode-se destacar a terapia alvo associada à nanotecnologia. Apesar desta nova perspectiva de combate ao câncer apoiada por estes novos tratamentos adjuvantes, o investimento em novos medicamentos sintéticos, os quais são de elevado custo, vem sendo substituída pelo aproveitamento de medicamentos já existentes no mercado e que são submetidos a alterações estruturais em suas moléculas ou o aproveitamento de medicamentos com uso terapêutico diferente e que são testados contra o câncer. Por este motivo a busca por drogas que derivam de fontes naturais se tornam uma alternativa viável na investigação de novas terapêuticas no combate contra o câncer (VANNEMAN; DRANOFF, 2012; SIMÕES *et al.*, 2015).

A terapêutica adjuvante cada vez mais é utilizada pelos pacientes e entre estas os produtos derivados de elementos naturais se destacam. Independente do tipo de tratamento utilizado, os produtos naturais e seus derivados tornam-se subsídios essenciais na investigação de novas terapêuticas no combate contra o câncer. Entre as fontes naturais existentes as plantas medicinais se destacam por apresentarem o maior arsenal de princípios ativos que podem ser utilizados para a obtenção de fármacos em diferentes formas de apresentação. Os fitoterápicos e fitofármacos estão disponíveis para tratar cerca de 87% das enfermidades humanas, entre estas as bacterianas, distúrbios da coagulação, parasitárias, imunopatias e cânceres (NEWMAN *et al.*; 2003; MABOU TAGNE *et al.*, 2018).

Entre as plantas medicinais que apresentam substâncias com atividade antitumoral, destaca-se a *T. diversifolia*, que apresenta em suas folhas sesquiterpenos. Entre as lactonas sesquiterpênicas as tagitininas chamaram a nossa atenção pelos diversos estudos que demonstraram suas atividades antineoplásicas (WU *et al.*, 2001; GU *et al.*, 2002; MIRANDA *et al.*, 2015; MABOU TAGNE *et al.*, 2018). A tagitina C foi descrita como o principal componente sesquiterpenóide isolado das folhas da *T. diversifolia* e demonstrou atividade antitumoral sobre células do glioblastoma e efeito antiproliferativo contra o tumor hepático (LIAO *et al.*, 2011; LIAO *et al.*, 2012).

2.3- Caracterização farmacognóstica da *Tithonia diversifolia*

A *T. diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) é um arbusto perene que cresce até 2 ou 5 m. É conhecida como margaridão, cinco-pontas, mão-de-Deus ou girassol mexicano (GU *et al.*, 2002; OWOYELE *et al.*, 2004; FERRO, 2006; MABOU TAGNE *et al.*, 2018). Originária do México está distribuída nas Américas Central e do Sul, na Ásia e África. No Brasil, pode ser encontrada em todo o território e é usada pela medicina popular para o tratamento de diarreia, febre, hepatite, malária e ascaridíase. Devido ao seu histórico de uso na medicina popular no tratamento de diversas enfermidades, estudos demonstraram a presença de diversos metabólitos secundários que apresentam atividade biológica (PEREIRA *et al.*, 1997; COS *et al.*, 2002; GU *et al.*, 2002).

Dentre as classes químicas de metabólitos secundários presentes no gênero *Tithonia* (13 espécies), destacam-se os flavonoides e as lactonas sesquiterpênicas. (JUANG *et al.*, 2014; DESTANDAU *et al.*, 2015; SAMPAIO *et al.*, 2016). Estes compostos foram identificados também na *T. diversifolia*, (PEREIRA *et al.*, 1997; KUO;

CHEN, 1998). Tona *et al.* (1998) identificaram nas folhas desta planta a presença de flavonóides, taninos, esteroides, triterpenoides e saponinas.

Os sesquiterpenóides, e principalmente as lactonas sesquiterpênicas compõem o grupo de metabólitos secundários mais prevalentes na família Asteraceae sendo conhecidos atualmente cerca de 5.000 compostos. Eles representam uma fração proporcional significativa do peso seco da planta e são encontradas principalmente nas folhas que apresentam células contendo os tricomas glandulares, principalmente nos meses que apresentam menor índice pluviométrico. Quando a planta é submetida a estresse biótico, outras células podem passar a sintetizar os sesquiterpenóides. Estes compostos são uns dos principais componentes do látex produzido pelas plantas para defendê-las contra insetos e pássaros herbívoros. As lactonas sesquiterpênicas estão mais concentradas (SAMPAIO *et al.*, 2016).

Os sesquiterpenoides são compostos lipofílicos incolores formados por uma cadeia de 15 carbonos geralmente cíclica. A biossíntese destes compostos pode sofrer diversas alterações ocasionadas por reações químicas, como oxidação e glicosilação, podendo originar uma enorme diversidade de compostos sesquiterpênicos em quantidades variadas e que podem ser utilizadas para classificar espécies diferentes de plantas (CHADWICK *et al.*, 2013; MABOU TAGNE *et al.*, 2018). Entre as cadeias cíclicas básicas das lactonas sesquiterpênicas três se destacam: germacranolide, eudesmanolide e guaianolide.

Compostos sesquiterpênicos presentes nas partes aéreas da *T.diversifolia* mostraram-se com potencialidade para atuar contra certos tipos de cânceres. Dentre estes destaca-se o 3 β -aceto-8 β -isobutiriloxireinosina que, na dose de 10 $\mu\text{g/mL}$, foi capaz de inibir em 63% a proliferação de células cancerígenas de glândula mamária de ratas (GU *et al.*, 2002).

Wu *et al.* (2001) isolaram das folhas de *T.diversifolia* três compostos: acetiltagitinina E, tagitinina F e hispidulina. Os autores observaram que as duas tagitininas isoladas mostraram citotoxicidade seletiva para células da linhagem HepG2 do carcinoma hepático.

Gu *et al.* (2002) mostraram que o fracionamento, guiado pela atividade, de um extrato de acetato de etila obtido das partes aéreas da *T.diversifolia*, e no qual se usou um antiproliferativo com células Col2 do câncer uterino humano, permitiu que fossem isolados três novos sesquiterpenóides (2 α -hidroxitirofundina, titofolinolideo e 3 α -acetoxidiversifolol) e oito lactonas sesquiterpênicas conhecidas (3 β -acetoxi-8 β -

isobutiriloxireinosina; tagitinina C; 1 β -2 α epoxitagitinina C; 4 α -10 α -dihidroxi-3-oxo-8 β -isobutiriloxiguaia-11(13)-en-12-6 α -olídeo; 3 α -acetoxi-4 α -hidroxi-11(13)-eudesmen-12-óico ácido metiléster; 17,20-dihidroxigeranilnerol; tagitinina A e tirotundina). Os compostos isolados foram avaliados para determinar o seu potencial como anticancerígeno, não só porque demonstraram atividade antiproliferativa em células Col2, mas também pelo seu potencial de induzir diferenciação celular em células HL - 60 da leucemia promielocítica. Os compostos foram investigados quanto as suas habilidades para inibir lesões pré-neoplásticas induzidas por 7,12-dimetilbenz[a]antraceno em cultura de glândula mamária. A tagitinina C e 1 β -2 α epoxitagitinina C apresentaram significativa atividade antiproliferativa. O titofolinolídeo 3 β -acetoxi-8 β -isobutiriloxireinosina e a 4 α -10 α -dihidroxi-3-oxo-8 β -isobutiriloxiguaia-11(13)-en-12-6 α -olídeo induziram diferenciação nas células HL-60. A 3 β -acetoxi-8 β -isobutiriloxireinosina inibiu fortemente a formação de lesão nos ensaios de glândula mamária.

Liao *et al.* (2011) investigaram a atividade antitumoral da *T.diversifolia* sobre células do glioblastoma. Reportaram que a tagitinina C foi o principal componente inibidor destas células e que esta substância se constitui no componente fitoquímico mais abundante na planta. Relataram que, tanto o extrato metanólico quanto a tagitinina C, produziram uma vigorosa inibição nos estudos de viabilidade *in vitro*. Além do mais, encontraram que estes derivados promoveram uma inibição da survivina, que é um fator de resistência na terapia contra o câncer e concluíram que os achados por eles obtidos sugeriam que tanto o extrato metanólico, quanto a tagitinina C eram eficazes para tratar o glioblastoma

Liao *et al.* (2013) relataram que a tagitinina C é o principal composto sesquiterpenóide isolado das folhas da *T.diversifolia*. Em Taiwan, ocorre elevada morbidade e mortalidade por hepatoma fato que motivou o interesse dos investigadores para descrever a ação anti-hepatoma produzida pelo extrato metanólico das folhas de *T.diversifolia*, comparando-a com pacientes tratados com tagitinina C. Os autores encontraram que tagitinina C isolada da *T.diversifolia* foi capaz de ativar as caspases 3 e 8, sugerindo que o efeito antiproliferativo de ambos os ensaios era dependente da apoptose induzida pela ativação das caspases.

Lee *et al.* (2011), demonstraram que o extrato metanólico da *T.diversifolia*, apresenta atividade antiproliferativa contra células U373 do glioblastoma humano. Os autores encontraram que o efeito anti-glioblastoma ocorreu por uma via independente

da apoptose. Os resultados por eles obtidos sugeriram que a tagitinina C destrói as células U373 usando uma via que é dependente da autofagia.

2.4-Atividades biológicas da tagitinina C, um sesquiterpeno comumente descrito como composto majoritário das folhas da *Tithonia diversifolia*

Entre as lactonas sesquiterpênicas as tagitininas (A-F) vêm sendo extensivamente estudadas por suas atividades biológicas. Segundo Chagas-Paula *et al.*(2012), as tagitininas apresentam em sua estrutura química um esqueleto germacrane e um anel α,β -insaturados γ -lactona com um grupo metileno e um grupo isobutailoxi no carbono 8. Os diferentes tipos de tagitinina variam de acordo com as reações de oxidação e instauração nos carbonos 1, 2, 3, 4, 5 e 10.

A tagitinina C é o composto majoritário encontrado nos tricomas glandulares nas folhas de espécies brasileiras de *T. diversifolia*. A tagitinina C contém duas duplas ligações conjugadas com um grupo cetona no carbono 3. A presença destes grupos cetonas insaturados, que não são frequentes nas outras moléculas de tagitinina e são utilizadas para identificar e diferenciar a molécula de tagitinina C (MABOU TAGNE *et al.*, 2018; SUT *et al.*, 2018).

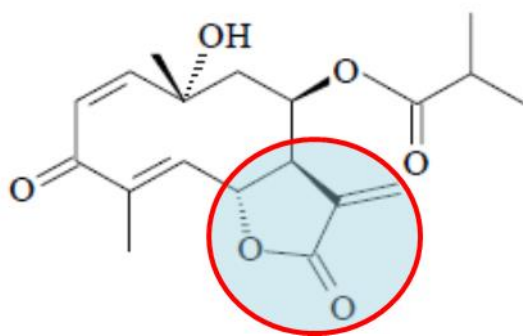


Figura 1. Tagitinina C, em destaque o grupo α MyL.

As atividades biológicas referentes tagitinina C são atribuídas ao grupo α -metileno- γ -lactona (α MyL), uma estrutura em anel contendo oxigênio com uma função carbonila (Figura 1). A atividade antimicrobiana está vinculada a reações de alquilação de grupos tiol de proteínas que promovem o rompimento da parede celular de diversos microorganismos. A atividade antitumoral do grupo α MyL está vinculada a diversos mecanismos entre os quais pode-se destacar: o bloqueio do ciclo celular por meio da regulação das proteínas quinases MAPK e JNK que bloqueiam o ciclo celular e principalmente por interferir na expressão gênica da proteína NF- κ B, responsável por

mediar à síntese de moléculas de adesão celular, angiogênese e apoptose. (KREUGER *et al.*, 2012; BUTTURINIA *et al.*, 2014; HAJDÚ *et al.*, 2014; MCKINNON *et al.*, 2014).

Os pesquisadores Sen e Baltimore, em 1986, descreveram um fator de transcrição nuclear, promotor e regulador, da expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos B, o fator de transcrição nuclear kappa beta (NF- κ B). O NF- κ B associa-se com um outro grupo de proteínas denominadas de Rel, esta interação forma dímeros compostos por subunidades que podem variar, possibilitando a formação de homodímeros e heterodímeros. As subunidades foram descritas de acordo com sua massa atômica e denominadas de p50, p52, p65(Rel A), c-Rel e Rel B (PIRES *et al.*, 2018).

Algumas destas subunidades que se ligam ao DNA apresentam sítios de ligação homólogos que permitem translocação nuclear, formação de dímeros e a associação com proteínas inibitórias (I- κ B), que sequestram o NF- κ B (heterodímeros com as subunidades p50 e p65(Rel A) inibindo sua ativação. Reações de fosforilação e ubiquitinação promovidas por vias inflamatórias promovem a degradação das I- κ B permitindo a interação do NF- κ B com seus sítios de ligação nucleares iniciando sua atividade transcricional. (HEHNER *et al.*, 1998)

Este fator desempenha papel fundamental na transcrição de vários genes envolvidos nos processos de morte celular programada (apoptose) e transformação neoplásica. A ativação do NF- κ B desempenha papel direto no balanço de sobrevivência e morte celular, já que promove redução dos sinais apoptóticos e elevação de sinais de sobrevivência celular, alterando drasticamente a resposta inflamatória. (KREUGER *et al.*, 2012; ABE *et al.*, 2015).

2.5-Extrato bruto das folhas de *Tithonia diversifolia* por fluido supercrítico (EScTD)

Os metabólitos secundários podem ser extraídos das folhas por diversos métodos, entre os quais se destacam os convencionais que utilizam solventes orgânicos para promover sua extração. Solventes orgânicos, apesar de serem bastante eficazes, apresentam diversas ressalvas na sua utilização. Entre elas podemos destacar o risco de contaminação do meio ambiente, a extração de componentes secundários que possam provocar a necessidade de separação dos mesmos do extrato bruto promovendo redução do seu rendimento e a possibilidade de resquícios do solvente permanecerem no extrato (MACHADO *et al.*, 2015).

A busca por metodologias inovadoras que utilizem tecnologia “verde” ou “limpa”, reduzindo o impacto ambiental e melhorando o percentual extrativo apresenta-se como o grande objetivo da atualidade. Baseados nesta perspectiva a extração por fluido supercrítico se enquadra nesta realidade, pois se baseia na utilização de gases como o solvente extrator. O termo fluido deriva de um estado intermediário (supercrítico) entre o estado líquido e o gasoso, que é obtido através de temperatura e pressão superiores ao ponto crítico do gás. Neste estado supercrítico um gás é capaz de incorporar e dissolver grande parte das moléculas de origem orgânica. Segundo Ziémons *et al.*(2005) realizando comparação entre estes métodos evidenciou que a extração por fluido supercrítico obteve o melhor rendimento extrativo.

Entre as diversas vantagens que o processo de extração por fluido supercrítico utilizando o CO₂ proporciona podemos destacar: em temperatura ambiente e pressão normal o solvente pode ser eliminado do produto extraído; o CO₂ é inerte, não inflamável e apresenta custo baixo; a separação dos materiais é realizada em baixas temperaturas evitando diversas reações químicas, como hidrólise e oxidação, o que afetaria a extração de produtos naturais; a propriedade de extração do solvente pode ser adaptada ao do produto a ser extraído alterando a força de compressão, a temperatura e adicionando outros materiais que podem alterar a polaridade do CO₂ facilitando a extração de produtos não polares e até de polaridade média; fluxos de extração mais rápidos podem ser obtidos utilizando o supercrítico. A extração utilizando um fluido supercrítico se baseia na utilização de gases como o solvente extrator. O termo fluido deriva de um estado intermediário (supercrítico) entre o estado líquido e o gasoso, que é obtido através de temperatura e pressão superiores ao ponto crítico do gás. Neste estado supercrítico um gás é capaz de incorporar e dissolver grande parte das moléculas de origem orgânica (ZIEMONS *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2015).

2.6-Modelo biológico *in vitro* e *in vivo* para ensaios de atividade antitumoral

A limitação na utilização de animais em ensaios experimentais intensificou a busca por metodologias de ensaios de citotoxicidade *in vitro*, que visam determinar a biocompatibilidade de diferentes produtos antes do seu uso em modelos biológicos *in vivo*. Estes ensaios procuram evitar ou minimizar os riscos de utilização em modelos biológicos mais complexos de compostos citotóxicos, e previsão de seus possíveis efeitos colaterais e/ou adversos, bem como e determinar doses seguras para a utilização em animais e seres humanos. Adicionalmente, ensaios de citotoxicidade têm sido utilizados como estratégia de screening quando se procura avaliar o potencial

efeito antitumoral *in vitro* de extratos e suas frações. Os ensaios de citotoxicidade para determinar o potencial antitumoral de um bioproduto, se baseiam na utilização de culturas celulares normais e tumorais para avaliar a viabilidade destas linhagens celulares após a aplicação do bioproduto (ROGERO *et al.*, 2003).

A viabilidade celular é determinada por ensaios colorimétricos como o vermelho neutro (2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina), o MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} e o azul de Tripán, que se baseiam na capacidade das células em manter a integridade de suas membranas celulares e metabolizarem estes compostos alterando a intensidade de cor das culturas celulares mensuradas por espectrofotometria. (ATES *et al.*, 2017 PATNAIK, PADHY, 2018).

A análise colorimétrica do Vermelho Neutro avalia as funções metabólicas celulares por meio da análise de permeabilidade da membrana e da atividade lisossômica de células vivas. Como o vermelho neutro é um corante catiônico fraco, ele penetra na membrana celular e se acumula intracelularmente nos lisossomos combinando-se com a parte aniônica da matriz desta organela. Portanto alterações na superfície celular ou na membrana lisossômica suscitam a fragilidade desta organela que se tornam gradativamente irreversíveis. Tais alterações resultam na diminuição da absorção e assimilação do vermelho possibilitando distinguir células viáveis, danificadas ou mortas. A quantidade de corante incorporado às células é medida por espectrometria, a 540 nm, e é diretamente proporcional ao número de células com membrana intacta (MOTHE-SATNEY *et al.*, 2012; ATES *et al.*, 2017).

O ensaio de redução de MTT é uma análise colorimétrica para a quantificação de metabolismo mitocondrial e atividade da cadeia respiratória de células em resposta a compostos farmacêuticos, químicos, ambientais e também nutricionais. Os sais de MTT foram utilizados para medir a atividade metabólica de células vivas. Estes sais são reduzidos a azul de formazan, cristais insolúveis em soluções aquosas, pela succinato desidrogenase mitocondrial, uma enzima que só é ativa em células com o metabolismo e cadeia respiratórios intactos. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (PATNAIK, PADHY, 2018).

Outro teste colorimétrico utilizado para analisar a viabilidade celular em ensaios de citotoxicidade é o azul de Tripán. Este método é fundamentado na manutenção da permeabilidade seletiva das membranas citoplasmáticas de células viáveis que não permitem a entrada deste corante. Enquanto as células inviáveis permitem a penetração do corante pela formação de poros em suas membranas decorrentes do

processo de morte celular, exibindo coloração azul após o ensaio (PATNAIK, PADHY, 2018).

Os avanços no tratamento do câncer dependem muito da parte experimental, que procura não só diagnosticar precocemente e com maior precisão os tumores, como também ampliar melhorias na terapia oncogênica. O desenvolvimento de modelos biológicos *in vivo* para ensaios de atividade antitumoral há mais de um século auxiliam no tratamento do câncer. Em meio aos diversos modelos existentes, aqueles que são transplantáveis para animais da mesma espécie são os mais empregados (FERREIRA, 2006). Entre estes, o sarcoma 180, é um modelo bastante utilizados devido à facilidade de reprodução (GRANDIZOLI *et al.*, 2014).

2.6.1-Modelo experimental *in vivo* de Sarcoma 180

Segundo Zuckerberg (1973), o sarcoma 180 (S-180) foi primeiramente nomeado como tumor de Crocker, em referência ao laboratório em que foi descoberto nos Estados Unidos pelo Doutor W. H. Woglom em 1914. Inicialmente foi descrito como um tumor de origem epitelial, devido as características estruturais e morfológicas a luz da microscopia. Posteriormente, o seu comportamento biológico foi reavaliado, principalmente pela não síntese de laminina, que caracterizaria a origem epitelial, alterando sua classificação para sarcoma (GRANDIZOLI *et al.*, 2014).

As células tumorais do S-180 podem ser cultivadas e mantidas *in vitro* (cultura celular) e *in vivo* (inoculação em camundongos). A inoculação em camundongos das células tumorais do S-180 pode ser realizada em diferentes regiões suscitando duas formas, uma sólida (músculo) e outra ascítica (cavidade intraperitoneal). Estas características permitem que este tipo de tumor possa ser transferido de um animal para outro, o que o qualifica para ser utilizado como modelo para ensaios de atividade antitumoral (FLORÊNCIO *et al.*, 2007).

O uso do modelo biológico de tumorigênese utilizando a transplantação de células de S-180 para estudos de atividade antitumoral *in vivo* apresenta algumas vantagens: i) facilidade de execução do protocolo de transplantação tumoral; ii) crescimento tumoral em 90% a 100% dos animais experimentais; e iii) evolução tumoral rápida, reduzindo o tempo de experimento (SUZUKI, YAMADA 1994; FERREIRA *et al.*, 2013).

Segundo Grandizoli *et al.* (2014), o S-180 cresce rapidamente na maioria dos animais nos quais é inoculado, mas existem relatos de regressão espontânea em aproximadamente 8-10% dos casos. Além disso, as células tumorais se desenvolvem em quase todos os tecidos nos quais são implantadas. De especial interesse é o fato de que são observadas poucas alterações hematológicas e bioquímicas em camundongos inoculados com células tumorais S-180, o que o torna um modelo interessante para avaliação de toxicidade de quimioterápicos e adjuvantes.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo* do extrato bruto obtido por extração supercrítica das folhas de *T.diversifolia*.

3.2 Objetivos específicos

- Obter e caracterizar quimicamente o extrato foliar da *T.diversifolia* obtido por fluido supercrítico e caracterizar;
- Avaliar o potencial antioxidante do extrato foliar da *T. diversifolia* obtido por fluido supercrítico (EScTD);
- Avaliar o potencial citotóxico do EScTD em modelo experimental *in vitro*;
- Avaliar o potencial antitumoral do EScTD em modelo experimental *in vivo* (Sarcoma 180);
- Avaliar parâmetros bioquímicos, hematológicos e de toxicidade nos animais tratados com EScTD.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1-Preparação e caracterização química do extrato bruto das folhas de *Tithonia diversifolia*

4.1.1-Coleta e identificação botânica da *Tithonia diversifolia*

Foram coletados alguns exemplares das partes da *T.diversifolia* no Parque Municipal Albano Franco, Aracaju-SE. A coleta ocorreu entre os meses de janeiro e abril, onde o índice pluviométrico é reduzido, possibilitando uma maior concentração de metabólitos secundários nas folhas da *T.diversifolia*. Este material foi processado, através da técnica de herborização, para a confecção de uma exsicata que foi enviada para identificação e depósito no Herbário Dárdano de Andrade Lima, localizado no Instituto Agrônomo de Pernambuco, Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária do Estado de Pernambuco, Recife, Brasil.

4.1.2-Extração da folhas de *T. diversifolia* através do fluido supercrítico

As folhas da *T.diversifolia* foram lavadas em água corrente e, em seguida, banhadas rapidamente em água destilada. Depois, foram secadas em estufa com circulação de ar quente ($50 \pm 3^{\circ}\text{C}$) e posteriormente moídas utilizando peneira granulométrica de 16 mesh. O processo extrativo foi realizado através do método de fluido supercrítico. As folhas da *T.diversifolia* secas e moídas foram introduzidas no cilindro extrator e acoplada à câmara de extração. As condições extrativas de temperatura, volume do gás solvente e pressão foram ajustadas e mantidas durante todo o tempo de extração. O CO_2 no estado supercrítico foi circulado através do material que se encontra na câmara de extração para que ocorra a dissolução dos metabólitos secundários desejados. Ao término do período de extração o material foi transferido para o separador, onde a temperatura foi mantida abaixo do ponto crítico. A esta temperatura o CO_2 retornou ao estado gasoso interrompendo suas propriedades de solvatação, o que ocasionou a precipitação do produto, que foi coletado e mantido a uma temperatura de armazenamento (0°C) em frasco âmbar com o objetivo de evitar a perda dos produtos voláteis. O CO_2 no estado gasoso foi enviado a uma câmara resfriadora onde posteriormente foi comprimido e liquefeito para que possa novamente ser recirculado, para que ocorra um novo ciclo de extração (ZIÉMONS *et al*, 2005).

A realização do processo extrativo das folhas da *T. diversifolia* utilizando o fluido supercrítico foi adaptado da metodologia utilizada por Ziémons *et al*. (2005). O aparelho de extração por fluido supercrítico utilizado durante o processo extrativo possui um cilindro extrator de aço inox com capacidade de 100 cm^3 , 2,5 cm de

diâmetro e 20,5 cm de altura, encamisado para controle de temperatura, que possibilitou a utilização de partículas com uma maior granulometria. As condições otimizadas de extração foram adaptadas à realidade do aparelho e podem ser observadas no quadro 1. O extrato das folhas de *T.diversifolia* obtido por fluido supercrítico foi denominado de ESCTD.

Quadro 1. Descrição dos parâmetros adaptados para a extração das folhas de *T.diversifolia* por fluido supercrítico.

GRANULOMETRIA	16 Mesh
QUANTIDADE DE AMOSTRA	10 gramas
FLUXO DE CO ₂	2 mL/min
TEMPERATURA	40°C
PRESSÃO	200 Bar

Para a determinação destas condições foram realizadas duas curvas extrativas (figura 2), adequadas às condições reais do extrator, levando em consideração os seguintes parâmetros: temperatura, pressão, fluxo de CO₂ e quantidade de amostra (volume do cilindro extrator). Dois destes parâmetros, fluxo de CO₂ e pressão, sofreriam dependência direta do operador do aparelho de extração, já que somente um destes parâmetros poderia ser fixado. Esta influência ocorreria por conta da utilização de uma válvula manual durante a realização da extração. Foram coletadas amostras em tempos diferentes, até atingir o tempo total de 360 minutos.

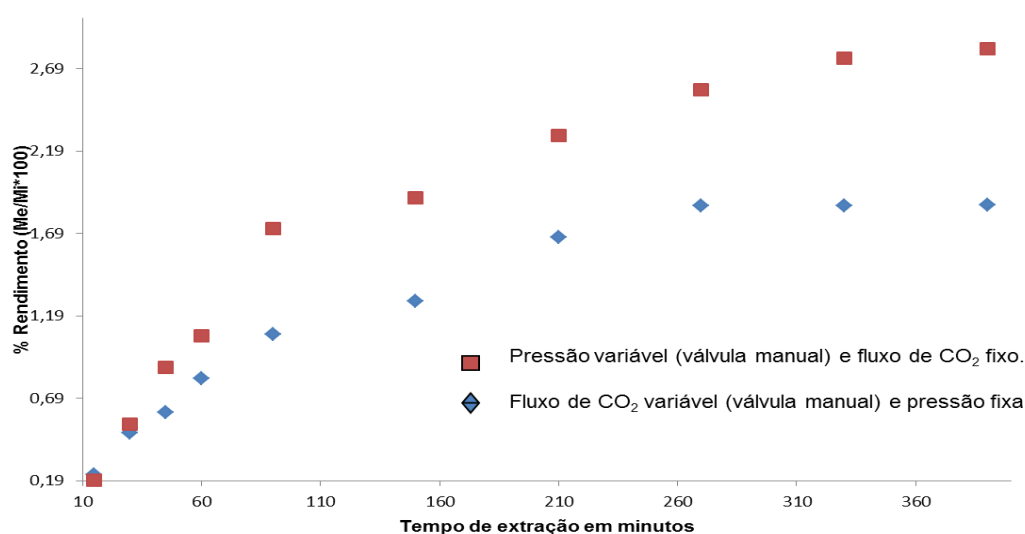


Figura 2. Curvas de rendimento do ESCTD. Me: massa de extrato, Mi: massa de ESCTD.

Por meio das curvas de extração o melhor rendimento extrativo foi obtido quando o fluxo de CO₂ era constante e a pressão realizada por via manual. Em ambos os casos o platô de rendimento ocorreu por volta dos 200 min. A massa inicial de folhas inseridas no cilindro extrator foi de 7,0 g. Após os resultados iniciais obtidos, os parâmetros extrativos foram determinados e adaptados para as melhores condições de extração. O tempo de extração foi de 180 min, baseados no rendimento extrativo das curvas piloto. Para se adequar a este tempo total de extração e não alterar o rendimento extrativo a massa inicial de folhas foi aumentada 10 g de folhas secas e trituradas. O rendimento da extração foi determinado em quintuplicata, segundo a equação abaixo.

$$Re = \frac{MEScTD}{Mf} \times 100$$

Onde, **Re**: rendimento extrativo, **Mf**: massa das folhas em gramas, **MEScTD**: massa do extrato supercrítico da *T diversifolia*.

4.1.3- Caracterização química do extrato obtido

O extrato foi avaliado quanto a sua composição química por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando como sistema de detecção, o espectrofotômetro de massas (MS), método descrito por Goffin *et al.* (2003).

Para as análises cromatográficas, as amostras em quintuplicata (A, B, C, D e E) do extrato foram diluídas em acetonitrila (grau HPLC) até a concentração de 1 mg/mL, e em seguida submetidas à banho de ultrassom por 30 minutos e filtradas em filtros de membrana (PTFE) de 0,45 µm. As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu®, equipado com um degaseificador DGU-20A3, duas bombas LC-20AD, um injetor automático SIL-20A HT, um forno CTO-20A, um detector de arranjo de diodos SPD-M20Avp, acoplados a um sistema controlador CBM-20A. As análises foram determinadas em uma coluna analítica *Shim Pack* C18 de fase reversa de 250 x 4,6 mm (5 µm tamanho de partícula). O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min e o volume de injeção da amostra foi de 20 µL. Os solventes utilizados na fase móvel foram: (B) acetonitrila e (A) ácido acético à 1% em água milli-q. O método foi constituído de um sistema isocrático de eluição na proporção de 45/55 (B/A) da fase móvel em um tempo de análise de 10 minutos. Os cromatogramas foram analisados no comprimento de onda de 254 nm.

4.2-Avaliação do Potencial Antioxidante do extrato obtido

O extrato foi validado quanto a seu potencial antioxidante *in vitro* por meio do ensaio do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). O potencial antioxidante do extrato EScTD foi avaliado quanto à capacidade de sequestrar o radical DPPH, segundo metodologia descrita por Brand-Williams *et al.*(1995), com modificações.

Uma solução controle DPPH foi obtida com etanol e a calibração do espectrofotômetro (comprimento de onda de 515nm), uma solução de etanol foi utilizada. Alíquotas do extrato diluídas em etanol foram acrescidas da solução controle de DPPH e diferentes diluições em triplicata sendo monitoradas para avaliar a capacidade de sequestro do radical DPPH, por meio da redução das medidas de absorbância das alíquotas.

A avaliação da atividade sequestrante do extrato de ESCTD foi determinada em porcentagem (%), por meio da capacidade de reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%, esta redução é denominada de concentração inibitória (CI₅₀). Os resultados foram expressos por meio do valor da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), segundo a equação abaixo.

$$\%S = \frac{Ac - Aa}{Ac} \times 100$$

Onde, %S: atividade sequestrante (redução da coloração), Ac: absorbância controle e Aa: absorbância amostra.

4.3-Análise da Atividade Antitumoral *in vitro*

4.3.1 Ensaio de triagem de atividade citotóxica contra células tumorais com alta concentração do ESCTD (50 µg/mL)

As linhagens tumorais utilizadas, PC3 (Carcinoma de próstata), HCT-116 (côlon - humano), HL60 (Leucêmica) e SNB19 (Glioblastoma) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. A amostra de *T. diversifolia* teve massa de 19 mg e foi solubilizada em DMSO puro estéril para concentrações estoque de 10 mg/mL.

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT é comumente utilizada nos ensaios de citotocidade (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato e foi descrita primeiramente por Mosman (1983) e permite analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão

do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996). As células foram plaqueadas nas concentrações de $0,7 \times 10^5$ e $0,3 \times 10^6$ céls/mL para as linhagens HCT-116 e HL60, respectivamente e $0,1 \times 10^6$ céls/mL para as linhagens de PC3 e SNB19. As placas foram incubadas com a substância por 72 horas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C . Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 μL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 h. Após a incubação as placas foram novamente centrifugadas para retirada da solução de MTT. A absorbância foi lida, após dissolução do precipitado de formazan em DMSO puro, em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

4.3.2- Ensaio de citotoxicidade em baixas concentrações do EScTD (2 a 8 $\mu\text{g/mL}$)

Para a realização do ensaio de atividade antitumoral foram utilizadas as linhagens celulares L929 (ATCC CCL1) (fibroblasto murino) e A549 (ATCC CCL185) (câncer de pulmão). As células foram cultivadas em meio D-MEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 20 $\mu\text{g/mL}$ 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.

A partir da solução mãe (extrato em DMSO 4%) foram feitas 8 diluições seriadas em tubos tipo Falcon, previamente identificados contendo EScTD conforme a tabela. Para a realização das diluições, foi adicionado 4mL de meio RPMI (Falcon de maior concentração) e 2 mL (demais falcons). Sequencialmente, foi adicionado ao tubo de maior concentração 15,6 μL da solução mãe. Após homogeneizar, 2mL desse tubo foi retirado e passado para o tubo 2 (3,91 μg de extrato/mL de RPMI). Esse procedimento foi repetido para os demais tubos (sempre retirando 2 mL e passando ao tubo seguinte), no último tubo foi retirado 2 mL e descartado, para que o volume final de todos fosse 2 mL. A diluição do DMSO foi realizada seguindo a mesma lógica da diluição do extrato (seriada), a partir do DMSO 100%. A maior concentração foi 7,81 μL de DMSO/mL de RPMI.

Para realização do ensaio de citotoxicidade foi inoculado 1×10^5 células/mL em cada poço da placa. Para alcançar esta concentração celular final em cada poço da placa, uma suspensão celular inicial de 20 mL em RPMI foi previamente produzida.

Uma câmara de Neubauer foi utilizada para a realização da contagem celular e posterior transferência, utilizando pipeta multicanal, da concentração final de 1×10^5 células/mL necessária para os 96 poços da placa. A placa foi incubada em estufa de atmosfera umidificada a 37°C, 5% de CO₂ por 24 hrs para a fixação das células na placa.

Após 24 hrs o meio RPMI foi retirado dos poços, utilizando a pipeta multicanal, para que fosse realizado o ensaio in vitro. Para a realização do ensaio em triplicata, as amostras do EScTD foram transferidas para os poços em uma sequência pré-determinada:

- 3 primeiras fileiras de poços: apenas meio RPMI (esse será o controle de crescimento das células sem nenhum interferente, que servirá de comparativo para os demais posteriormente)

- 4^a-6^a fileiras: DMSO em suas diversas concentrações em RPMI (na ordem de menor concentração, para maior concentração)

- 7^a-9^a fileiras: Solução mãe do EScTD em suas diversas concentrações em RPMI (seguindo a ordem da menor concentração, para a maior).

As placas foram incubadas em estufa com atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO₂, por pelo menos 24 h. Após o período de incubação de 24 h, o meio presente na placa foi removido com ajuda de uma pipeta multicanal e 0,2 mL da solução de MTT (50 µg/mL de RPMI) foi adicionada a cada poço da placa, que retornam para a estufa onde permanecem incubadas por 3 hrs. Após esse período, o MTT foi descartado e adicionou-se em cada poço 0,2 mL de etanol absoluto. As placas foram agitadas por 5 minutos e a absorbância medida a 570 nm e analisado com o Software Magellan 7.1 SP1 (TECAN Group Ltd., USA). A porcentagem de células viáveis foi realizada em comparação ao controle sem extrato. A viabilidade foi mensurada através do MTT, uma análise colorimétrica para a quantificação de metabolismo mitocondrial e atividade da cadeia respiratória de células em resposta a fármacos, químicos, ambientais e também nutricionais. Os sais de MTT foram utilizados para medir a atividade metabólica de células vivas. Estes sais foram reduzidos a formazano pela succinato desidrogenase mitocondrial, uma enzima que só é ativa em células com o metabolismo e cadeia respiratórios intactos. Desta forma, o formazano foi quantificado fotometricamente e está intimamente relacionado com o número de células viáveis.

4.4-Análise da Atividade Antitumoral *in vivo*

4.4.1-Aspectos Éticos

Todos os procedimentos experimentais foram rigorosamente realizados dentro dos preceitos éticos determinados pela Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Este projeto de pesquisa foi submetido à apreciação técnica pela Comissão de ética no uso de Animais da Universidade Tiradentes e foi aprovado sob parecer consubstanciado nº 040315.

4.4.2-Conservação das células do sarcoma 180 e implantação dos tumores

O tumor foi mantido na forma ascítica por meio da replicação das células tumorais de animais doadores pra animais receptores da mesma espécie. Esta conservação foi realizada semanalmente através da transferência de líquido ascítico contendo aproximadamente de 10^7 células tumorais de animais portadores para animais sadios através de acesso intraperitoneal.

A contagem das células tumorais viáveis foi realizada em câmara de Neubauer utilizando magnificação de 400 x. A contagem ocorreu através da soma dos 4 quadrantes externos superior e inferior dividido por 4. O número de células transplantadas por mL de solução foi obtido conforme descrito por Ferreira (2006), utilizando a seguinte equação:

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

A análise da viabilidade celular foi realizada através do método de exclusão do azul de Trypan. Inicialmente foi obtido um 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, que foi descartado. O precipitado foi tratado com solução corante de azul de Trypan 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 sua integridade de membrana sendo incapazes de regular o conteúdo intracitoplasmático do corante (azul de Trypan). O tratamento foi realizado utilizando a relação 1:1 (solução ringer de líquido ascítico:corante, 50 µL). Os tumores foram induzidos na forma sólida através de inoculações subcutâneas nos animais experimentais para a transferência de $2,5 \times 10^7$ células tumorais.

4.4.3-Formação dos grupos experimentais e tratamento com o extrato bruto da *Tithonia diversifolia* (EScTD)

Um total de 24 camundongos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas, adultas, com massa corpórea de 30 ± 5 g, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes, foram divididos em 4 grupos, conforme expresso na Tabela 1. Os animais foram pesados e separados em gaiolas apropriadas com $n=6$, mantidos no Biotério da Universidade Tiradentes em caixas de polipropileno e grades metálicas apropriadas com cama de maravalha, trocadas diariamente (Tabela 1). Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa (30-70 %), com ciclo artificial claro/escuro de 12h, e receberão ração (Labina®, Purina, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*. Os animais foram tratados durante 7 dias por via intraperitoneal e eutanasiados no oitavo dia.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais realizado nos animais transplantados com Sarcoma 180. O fármaco 5 – Fluorouracil foi utilizado como quimioterápico padrão.

Grupos (n=6)	Tratamento **
CTR	Solução salina
5-FU	25 mg/Kg/dia de 5 – Fluorouracil
EScTD 10	10 mg/Kg/dia EScTD
EScTD 30	30 mg/Kg/dia EScTD

** Todos os compostos foram diluídos em de solução salina, de acordo com o peso do animal e nunca ultrapassando 0,3 mL, e injetados via intraperitoneal.

4.5-Avaliação dos parâmetros hematológicos

No oitavo dia foram coletadas amostras sanguíneas, por meio do plexo orbital sob efeito anestésico, e serão utilizados capilares internamente revestidos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), evitando assim a coagulação da amostra até o tubo coletor, preservando a integridade da mesma. Foram coletadas amostras de 0,5µl que serão transferidas para tubos coletores contendo EDTA de recém-nascidos, uma vez que a quantidade sanguínea se apresenta limitada por se tratar de camundongos. Os parâmetros hematológicos avaliados foram contagem de leucócitos totais e a diferencial, tais como os eosinófilos (%), linfócitos (%), neutrófilos (%) e monócitos (%). O exame hematológico foi realizado no Laboratório Central da Universidade Tiradentes, através de automação, com o aparelho Pentra 80 (HORIBA, Japan). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada através de esfregaço sanguíneo previamente elaborado com as amostras frescas, através de uma gota do sangue total pingada em lâmina limpa de vidro, com borda fosca e identificada para a preparação

do esfregaço. Após esfregaço pronto, as lâminas estendidas foram coradas com corantes panóticos, e será realizada a contagem diferencial em 100 células utilizando o microscópio de luz.

4.6-Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos foram realizados por meio da amostra obtida pelo plexo orbital, destinadas a investigar as funções renais e hepáticas. As amostras de 0,5µL foram transferidas para tubos coletores não heparinizados de recém-nascidos. Os parâmetros bioquímicos mensurados foram aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), para avaliação de função hepática, bem como a ureia e creatinina, para avaliar as funções renais, utilizando-se kits comerciais Labtest respectivos para cada análise. A determinação das dosagens foi realizada por aparelho semi-automatizado Bioplus 200 e automatizado Labmax 240 sendo realizados no Laboratório Central da Universidade Tiradentes.

4.7-Determinação do efeito da administração do Extrato Bruto da *Tithonia Diversifolia* (EScTD) sobre a massa ponderal, volume e taxa de inibição do crescimento dos tumores

Em seguida, 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. Posteriormente 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.

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 (%) será calculada pela seguinte equação:

$$PI\% = \frac{[(A - B)]}{A - 1}$$

Na qual: **PI%** – Percentual de inibição da massa tumoral; **A** – Média da massa do tumor do controle negativo (CTR); **B** – Média da massa do tumor do grupo tratado com 5-FU ou EScTD (10 e 30 mg/mL).

4.8-Avaliação macroscópica dos órgãos excisionados

Baço, fígado e rins foram removidos e a sua massa relativa será 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.

4.9-Avaliação histopatológica dos tumores excisionados

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

4.10-Análise estatística

As variáveis quantitativas expressas sob a forma de média $\pm$ erro padrão da média foram submetidas a testes de homoeostaticidade e normalidade de distribuição de valores. Para teste de normalidade, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk, enquanto para análise de homoeostaticidade 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 homoeostaticidade foram comparados entre si utilizando o teste ANOVA seguido teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Bonferroni. Dados que não obedeceram a estes pressupostos (distribuição normal e/ou homoeostaticidade) foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis seguido teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Dunn. Diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de p forem menores que 0,05 ($\alpha = 5\%$).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Extração, rendimento e caracterização do extrato das folhas de *Tithonia diversifolia* através do fluido supercrítico

O rendimento do processo extativo da *T. diversifolia* foi de $1,02 \pm 0,2\%$. O perfil cromatográfico das amostras em quintuplicata (amostras A, B, C, D e E) está expresso na Fig. 3. Os cromatogramas das amostras A, B, C, D e E do ESCTD, analisados no comprimento de onda de 254 nm, apresentaram apenas um pico com boa resolução cromatográfica e alta intensidade, eluído no tempo de retenção de aproximadamente 5 min, consistente com a tagitinina C (Figura 3) (GOFFIN *et al.*, 2003).

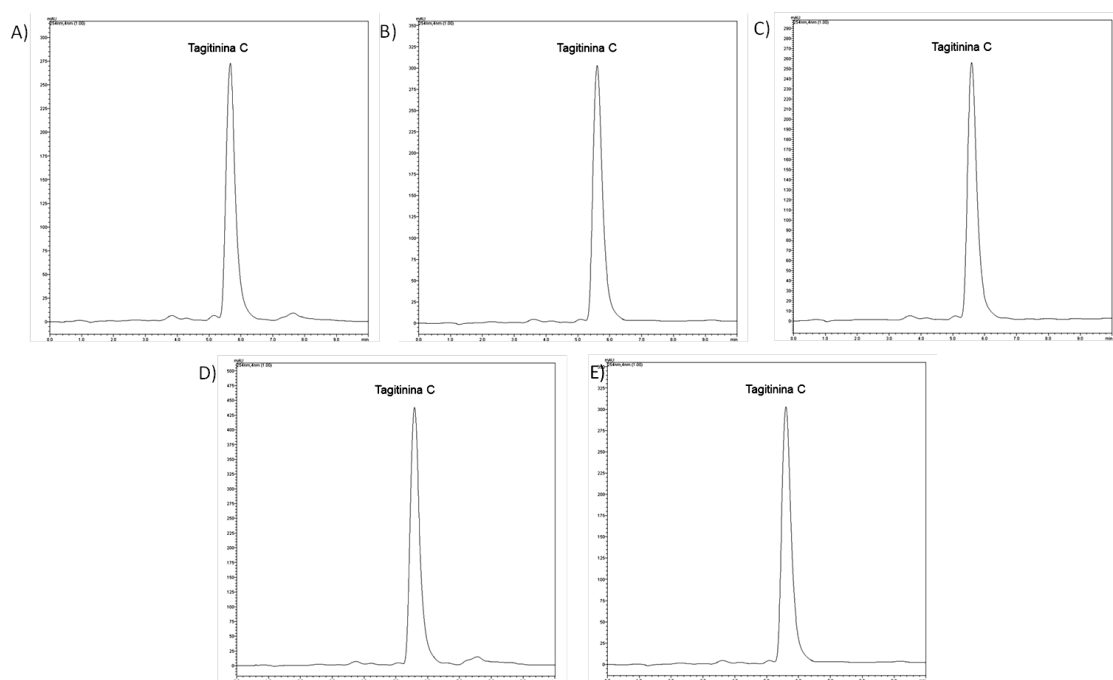


Figura 3. Perfil cromatográfico das amostras A, B, C, D e E do ESCTD obtido por CLAE ($\lambda = 254$ nm)

5.2 Avaliação do potencial antioxidante do extrato ESCTD por meio de ensaio com DPPH

Com base nos dados da tabela 2, a atividade antioxidante do ESCTD foi expressa em % de inibição do DPPH, utilizando o Trolox como referência comparativa. Foi observado que a CI50 do ESCTD foi de 3,23 mg/mL, o que sugere uma capacidade sequestrante de radicais livres reduzida do ESCTD.

Tabela 2. Resultados da atividade antioxidante do ESCTD por meio do ensaio DPPH.

Concentração mg/mL	Absorbância 517nm			% de Atividade antioxidante			Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação
0,5 ESCTD	0,267	0,272	0,251	14,42	12,82	19,55	15,60	3,52	22,54
1,0 ESCTD	0,228	0,237	0,234	26,92	24,04	25,00	25,32	1,47	5,80
2,0 ESCTD	0,188	0,201	0,194	39,74	35,58	37,82	37,71	2,09	5,53
3,0 ESCTD	0,175	0,167	0,168	43,91	46,47	46,15	45,51	1,40	3,07
Trolox 0,1	0,05	0,055	0,051	83,97	82,37	83,65	83,33	0,85	1,02

5.3 Avaliação da atividade citotóxica do ESCTD

A amostra apresentou-se solúveis no diluente utilizado. A amostra testada apresentou elevados percentuais citotóxico (>75% inibição) frente a todas as linhagens testadas com ênfase para A549, PC3, e HCT-116 (Figura 4).

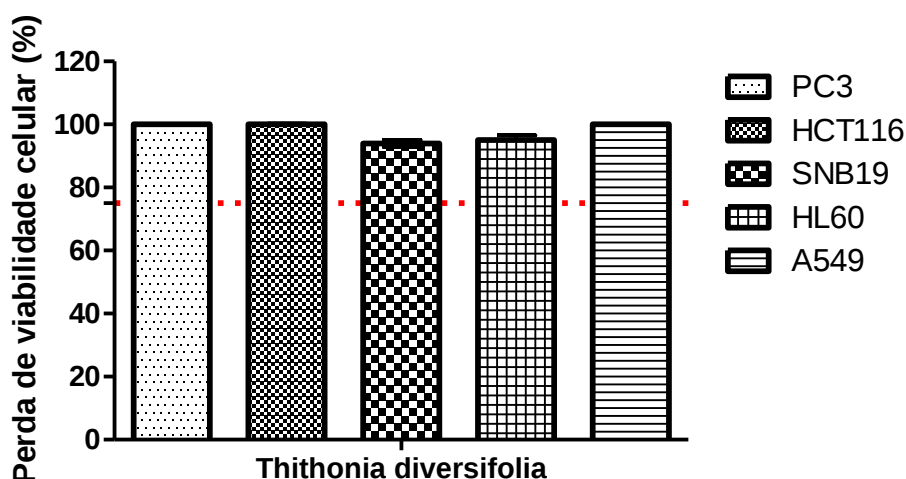


Figura 4. Avaliação da perda de viabilidade celular (%) das linhagens PC3 (adenocarcinoma prostático humano), HCT116 (carcinoma colorretal humano), SNB19 (glioblastoma humano), HL60 (leucemia promielocítica humana) e A549 (adenocarcinoma alveolar de células basais de pulmão humano). Dados expressos em percentual médio de células não viáveis em relação ao controle (meio RPMI sem tratamento).

Tendo em vista o elevado percentual de morte celular Conforme demonstrado na figura 5, a linhagem A549 foi selecionada para teste de viabilidade com concentrações mais baixas (2 a 8 µg/mL). Adicionalmente, as mesmas concentrações foram utilizadas para análise de citotoxicidade em fibroblastos (linhagem celular L929). Como pode ser observado na Figura 5, o tratamento apenas com o solvente (DMSO a 4%) propiciou alto percentual de viabilidade da linhagem ATCC A549

(adenocarcinoma alveolar de células basais de pulmão humano), acima de 95%. O ESCTD promoveu elevada e progressiva taxa de morte celular, com viabilidade percentual em torno de apenas 10% na concentração final de 8,0 $\mu\text{g/mL}$. A IC₅₀ foi de 2,2 $\mu\text{g/mL}$, considerada altamente citotóxica para célula tumoral testada. Por outro lado, a viabilidade da linhagem celular ATCC L929 (fibroblasto murino) tratada com DMSO foi de aproximadamente 50% na concentração mais alta testada (8 $\mu\text{g/mL}$), enquanto que esta mesma concentração representou a IC₅₀ do ESCTD. Para ambos os ensaios, o crescimento celular com apenas o meio RPMI constituiu o controle negativo e funcionou como 100%.

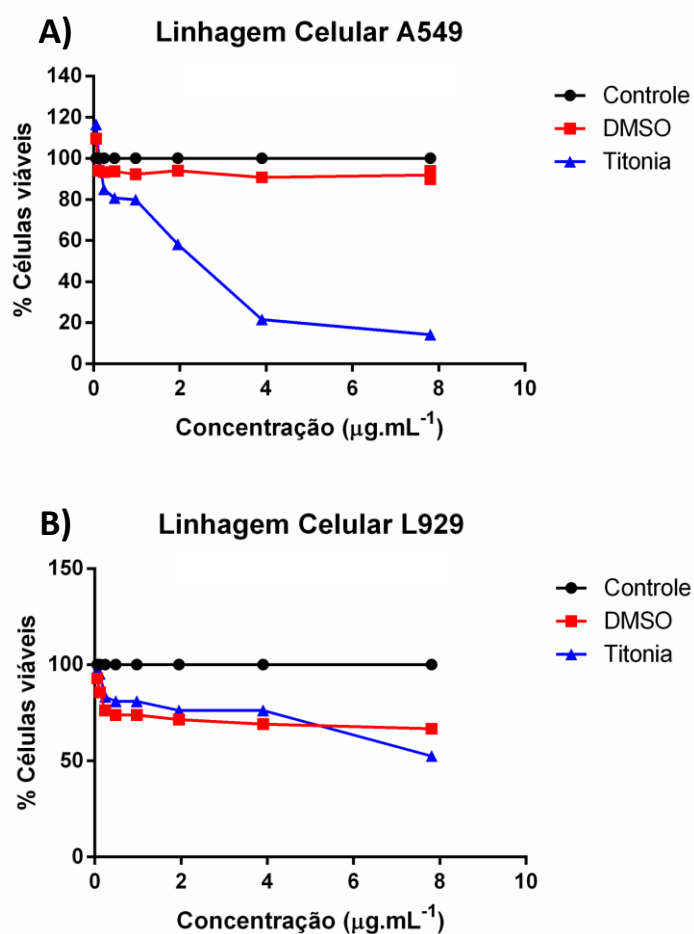


Figura 5. Avaliação da viabilidade celular (%) das linhagens ATCC (A) A549 (adenocarcinoma alveolar de células basais de pulmão humano) e (B) L929 (fibroblastos murinos). Dados expressos em percentual médio de viabilidade do controle (meio RPMI sem tratamento). DMSO: dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo a 4%, usado como solvente do extrato; ESCTD: extrato supercrítico de *T. diversifolia*.

5.4 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo*

5.4.1 Análise da massa ponderal média dos tumores excisionados

A análise da massa ponderal média dos tumores excisionados demonstrou perda significativa de massa ponderal dos tumores dos grupos tratados com EScTD 10 mg/Kg, 30mg/Kg e 5-FU quando comparados com o grupo controle. Quando comparamos a massa tumoral entre o grupo 5-FU e EScTD 10mg/Kg observamos perda significativa de massa ponderal dos tumores entre os grupos. Também foi observada diferença significativa de massa ponderal tumoral do grupo EScTD 30mg/Kg quando comparamos com o grupo EScTD 10mg/Kg (Figura 6).

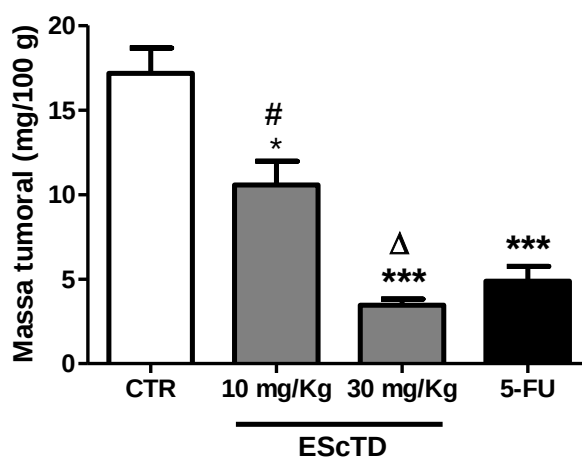


Figura 6. Determinação da massa ponderal média dos tumores excisionados dos animais submetidos a implante dérmico de células de sarcoma 180 tratados com solução salina (CTR), extrato supercrítico de *Titonia diversifolia* (EScTD) nas doses de 10 e 30 mg/Kg, e 5-fluorouracil (5-FU) ao final dos oito dias do período experimental (mg de massa tumoral/100 g massa corpórea). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças significativas em comparação com o grupo CTR foram expressas como * $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; diferenças significativas em relação ao grupo 5-FU foram expressas como # $p < 0,05$; diferenças significativas em comparação com EScTD 10 mg/Kg estão expressas como $\Delta p < 0,05$ (Teste ANOVA e teste de comparações múltiplas de Bonferrogni).

5.4.2 Análise histopatológica dos tumores excisionados

As secções histológicas coradas em HE dos espécimes de sarcoma 180 revelaram densa proliferação de células predominantemente poliédricas organizadas em lençóis compactos, sustentada por delgados trabiques de tecido conjuntivo fibroso estromal associado a uma delicada rede de capilares hiperemiados (Figura 7). As células tumorais exibiam citoplasma fortemente eosinofílico abundante e núcleos volumosos moderadamente pleomórficos, com cromatina ora frouxa ora bastante condensada. Eventualmente eram observadas células gigantes tumorais de aspecto

bizarro. Estruturas morfológicamente compatíveis com corpos apoptóticos, assim como figuras mitóticas típicas e atípicas eram achados relativamente frequentes (Figura 8). Extensas áreas de necrose coagulativa dispostas em padrão ora trabecular ora formando massas sólidas mais compactas no interior dos lençóis tumorais eram comumente observados. As margens tumorais se mostraram ora irregulares e mal definidas ora bastante regulares e bem delimitadas. O padrão de comprometimento das camadas musculares e adiposas nas adjacências do tumor se mostrou bastante variado, as células neoplásicas por vezes dissociando o tecido muscular em feixes espessos mais compactos e, em outras, o destruindo marcadamente, deixando apenas células remanescentes isoladas. Discreto infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário também foi observado, embora nas áreas circunjacentes as zonas de necrose fosse possível identificar marcante infiltração de polimorfonucleares neutrófilos. A formação de êmbolos tumorais se mostrou um achado extremamente incomum e não foi observada invasão perineural (Figura 9).

5.5 Avaliação de parâmetros toxicológicos

5.5.1 Análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Como demonstrado na Tabela 3, foi observada redução significativa do número absoluto de leucócitos totais nos animais tratados com 5-FU ($2,09 \pm 0,31 \times 10^3$ cells/ μ L) em relação ao grupo CTR ($5,07 \pm 0,88 \times 10^3$ cells/ μ L) ($p < 0,05$). Contudo, não houve diferença entre este último e os grupos tratados com EScTD nas doses de 10 mg/Kg ($3,87 \pm 0,41 \times 10^3$ cells/ μ L) e 30 mg/Kg ($2,97 \pm 0,69 \times 10^3$ cells/ μ L) ($p > 0,05$). Ao analisar a contagem diferencial de leucócitos foi possível observar a redução percentual significativa de linfócitos nos grupos 5-FU, levando ao aumento percentual relativo de neutrófilos. Como não houve alteração importante dos demais leucócitos, sugere-se que a leucopenia ocorreu especialmente às expensas de um quadro de linfocitopenia. Destaca-se que o grupo tratado com EScTD 30 mg/Kg também apresentou certa leucopenia que, embora não tenha sido estatisticamente diferente do grupo CTR, mostrou-se semelhante ao grupo 5-FU e abaixo do limite mínimo observados nos valores de referência. Além disso, este grupo também apresentou quadro linfocitopênico importante. Não foi observada diferença significativa no percentual de monócitos e eosinófilos entre os grupos analisados ($p > 0,05$).

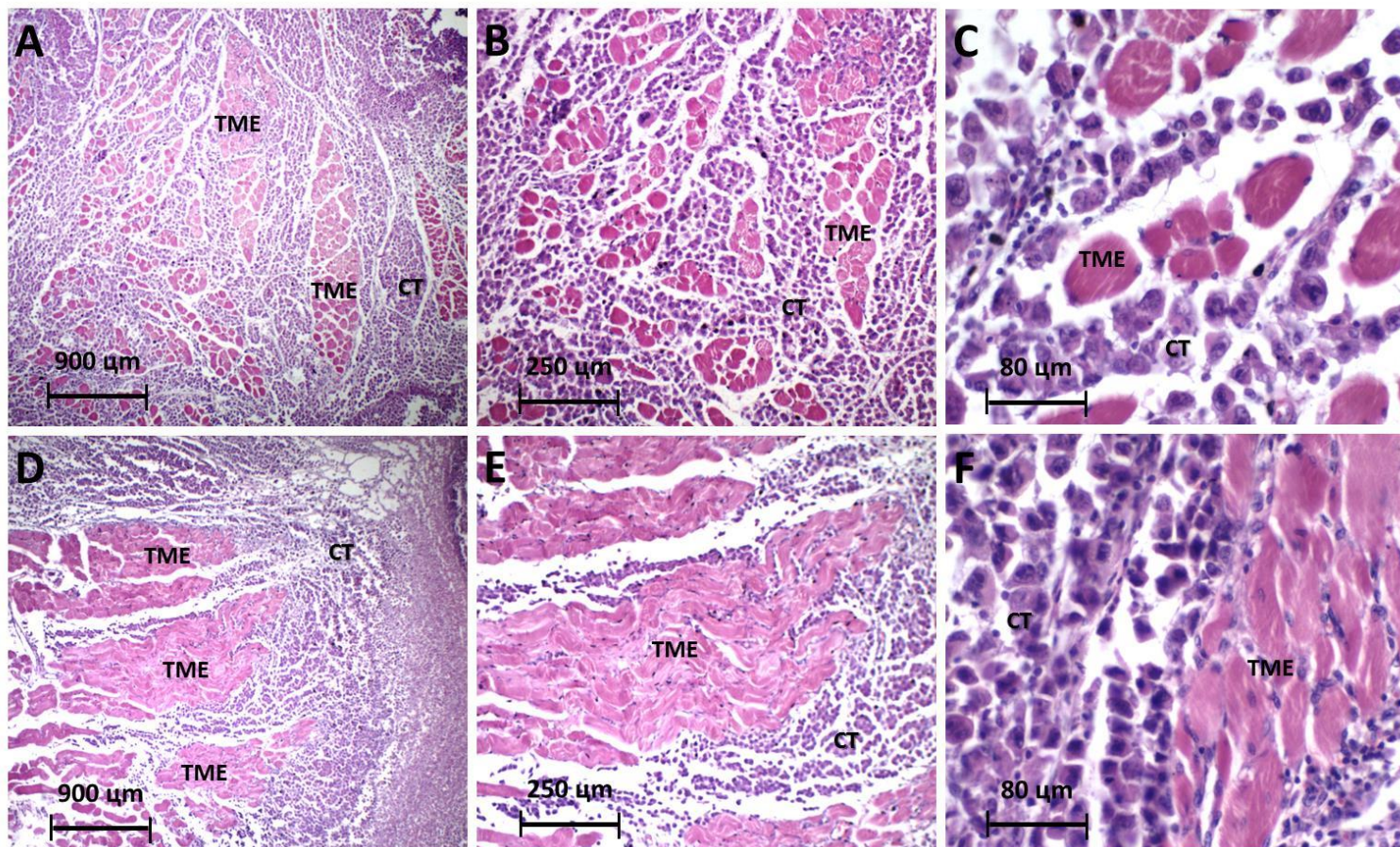


Figura 7. Fotomicrografias de secções histológicas de sarcoma 180 coradas em HE. (A – C) Imagens representativas de tumor com alto potencial de invasão, promovendo intensa dissociação dos feixes de músculo estriado esquelético. (D – F) Imagens representativas de tumor com menor potencial infiltrativo invadindo o tecido muscular e separando os feixes em blocos mais compactos (HE, 40 ×, 100 × e 400 ×). Legenda: **TME** – tecido muscular estriado esquelético; **CT** – células tumorais viáveis do sarcoma 180.

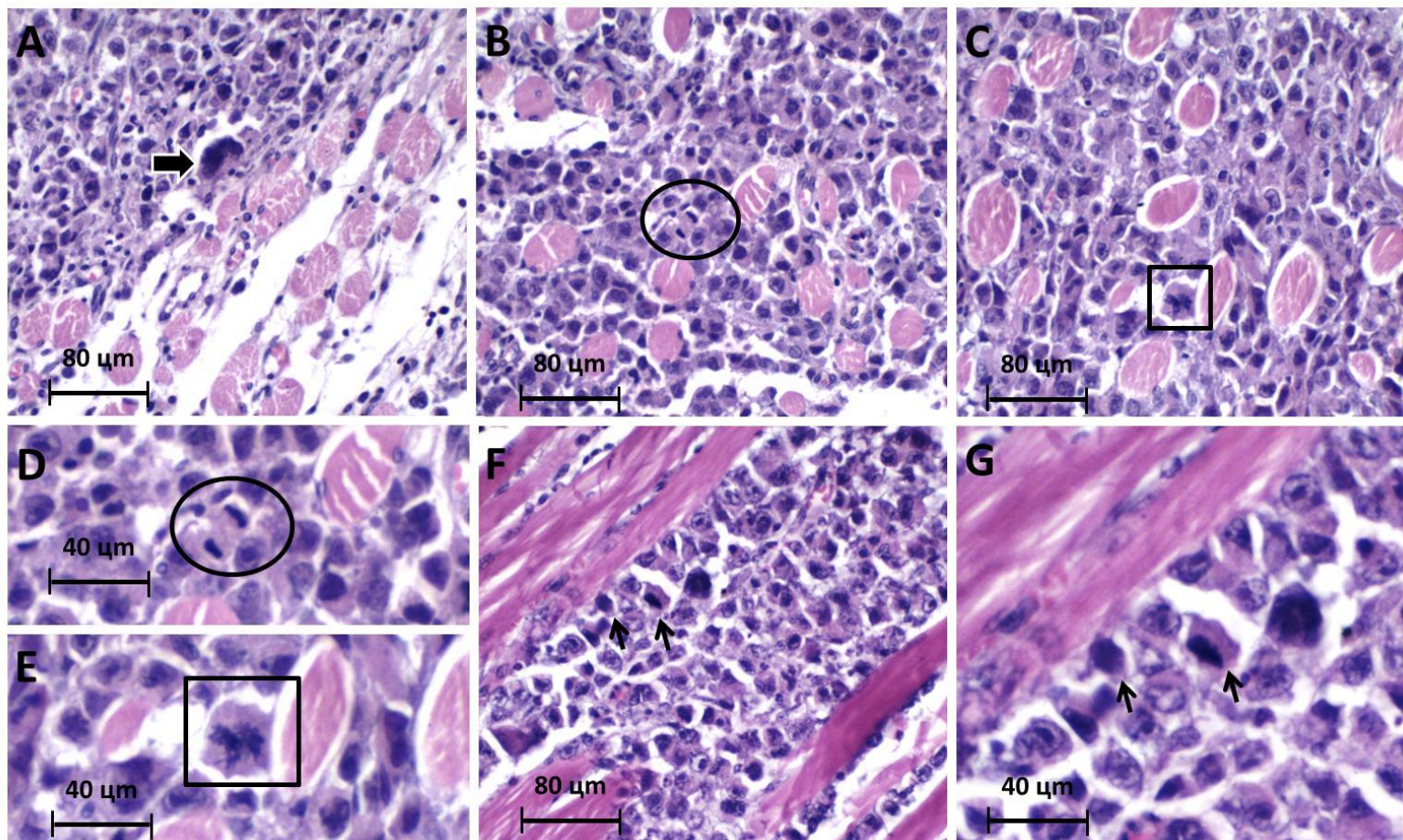


Figura 8. Fotomicrografias de secções histológicas de sarcoma 180 coradas em HE. (A) Célula gigante bizarra (seta grossa), (B/D) mitose típica em anáfase (círculo) e (C/E) mitose tetrapolar atípica em metáfase. (F/G) Células tumorais em apoptose (setas delgadas) (HE, 400 × e 800 ×).

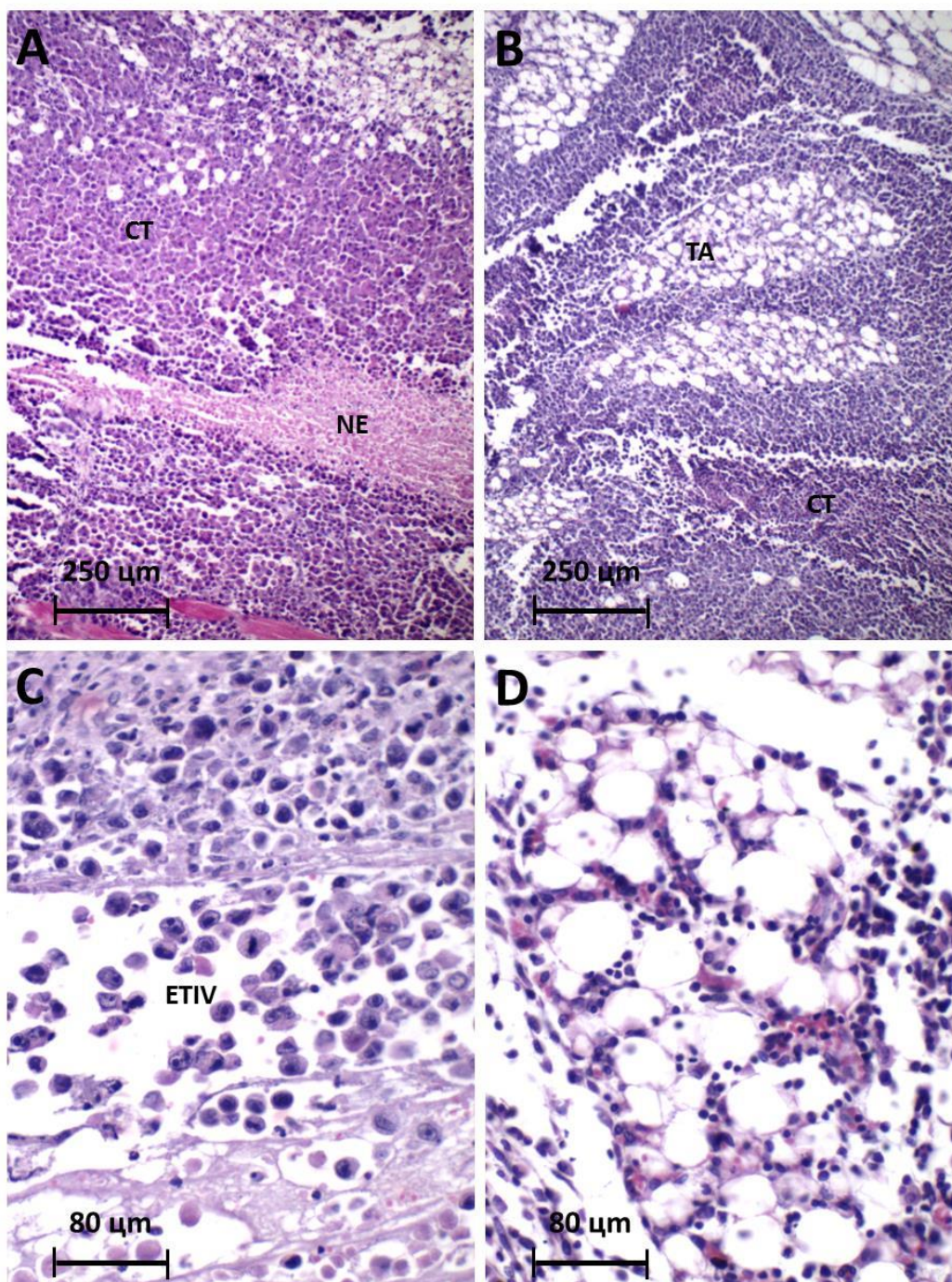


Figura 9. Fotomicrografias de secções histológicas de sarcoma 180 coradas em HE. (A) áreas de necrose coagulativa do parênquima tumoral. (B) Células tumorais invadindo o tecido adiposo periférico. (C) Presença de células tumorais formando êmbolo intravascular. (D) Infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário peritumoral (HE, 100 × e 400 ×).

Tabela 3. Análise de parâmetros hematológicos relacionados a série branca em ratos submetidos a implante dérmico de células de sarcoma 180 tratados com solução salina (CTR), extrato supercrítico de *Tithonia diversifolia* (EScTD) nas doses de 10 e 30 mg/Kg/dia, e 5-fluorouracil (5-FU) ao final dos oito dias do período experimental.

Grupo	Dose (mg/kg)	Leucócitos totais 10 ³ cells/ μ L	Contagem diferencial (%)			
			Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos
CTR	-	5,07 $\pm$ 0,88 ^a	36,50 $\pm$ 2,36 ^a	59,25 $\pm$ 2,28 ^a	3,50 $\pm$ 0,50 ^a	0,25 $\pm$ 0,25 ^a
EScTD	10	3,87 $\pm$ 0,41 ^{a,b}	46,6 $\pm$ 3,58 ^a	49,50 $\pm$ 3,99 ^{a,b}	3,00 $\pm$ 0,89 ^a	0,66 $\pm$ 0,49 ^a
	30	2,97 $\pm$ 0,69 ^{b,c}	63,00 $\pm$ 9,82 ^b	33,25 $\pm$ 9,25 ^b	3,50 $\pm$ 0,86 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^a
5-FU	25	2,09 $\pm$ 0,31 ^c	61,48 $\pm$ 5,16 ^b	18,78 $\pm$ 1,37 ^c	3,42 $\pm$ 0,47 ^a	0,29 $\pm$ 0,60 ^a
Valores de referencia [†]		6,0 $\pm$ 1,8	7,8 $\pm$ 4,6	91,7 $\pm$ 4,7	0,1 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,7
(min – max)		(3,4 – 9,8)	(2,0 – 20,0)	(80,0 – 98,0)	(0,0 – 1,0)	(0,0 – 2,0)

Os dados são apresentados como média $\pm$ Erro Padrão da Média de 12 animais. Letras diferentes na mesma coluna representam valores médios significativamente diferentes ($p < 0,05$ – teste ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Bonferrogni). [†] Valores de referencia para camundongos Swiss (Araújo *et al.*, 2015).

Quanto aos parâmetros bioquímicos hepáticos foi observado que houve aumento significativo dos níveis de ALT quando comparamos os grupos tratados (tanto com EScTD quanto com 5-FU) e o grupo controle ($p<0,05$). Além disso, o aumento observado nos grupos EScTD 30mg/Kg e 5-FU foi significativamente maior que aquele evidenciado no grupo EScTD 10mg/Kg ($p<0,05$). Adicionalmente, houve aumento significativo dos níveis séricos de AST nos grupos 30mg/Kg EScTD e 5-FU quando comparados aos grupos controle e 10mg/Kg do EScTD ($p<0,05$). No entanto, é preciso ressaltar que, a despeito das diferenças apresentadas no presente estudo, todos os valores médios de AST e ALT estiveram dentro dos limites normais de referência (Tabela 4).

Quanto a análise dos parâmetros bioquímicos renais, foi observado aumento significativo dos níveis séricos de ureia nos animais do grupo EScTD 30mg/Kg quando comparado com os demais grupos ($p<0,05$). Em relação aos níveis de creatinina não houve diferença significativa entre o grupo 5-FU e o grupo controle. Todavia foi observado aumento significativo no grupo tratado com o EScTD 30 mg/Kg em relação ao grupo CTR ($p<0,05$), aumento este acima dos valores de referência (Tabela 5).

Tabela 4. Análise de parâmetros bioquímicos relacionados a função hepática e renal em ratos submetidos a implante dérmico de células de sarcoma 180 tratados com solução salina (CTR), extrato supercrítico de *Tithonia diversifolia* (EScTD) nas doses de 10 e 30 mg/Kg/dia, e 5-fluorouracil (5-FU) ao final dos oito dias do período experimental.

Grupo	Dose (mg/kg/dia)	ALT (U/L)	AST (U/L)	UREA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)
CTR	-	71,3 ± 9,58 ^a	96,1 ± 4,18 ^a	46,50 ± 2,97 ^a	0,41 ± 0,03 ^a
EScTD	10	110,7 ± 21,7 ^b	110,0 ± 9,12 ^a	48,75 ± 2,52 ^a	0,62 ± 0,11 ^{a,b}
	30	150,5 ± 19,3 ^c	200,7 ± 26,2 ^b	57,42 ± 2,96 ^b	0,94 ± 0,12 ^b
5-FU	25	108,2 ± 14,8 ^c	203,4 ± 14,80 ^b	43,52 ± 3,20 ^a	0,32 ± 0,01 ^a
Valores de referencia [†] (min – max)	-	95,4 ± 25,1 (64,0 – 167,0)	112,9 ± 31,5 (57,0 – 199,0)	44,9 ± 7,8 (33,0 – 59,0)	0,3 ± 0,1 (0,2 – 0,4)

Os dados são apresentados como média ± Erro Padrão da Média de 12 animais. Letras diferentes na mesma coluna representam valores médios significativamente diferentes (p<0,05 – teste ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Bonferrogni). [†] Valores de referencia para camundongos Swiss (Araújo *et al.*, 2015).

5.5.2 Percentual de massa corpórea dos animais e massa ponderal dos órgãos viscerais

Foi observado perda significativa de massa corpórea nos grupos EScTD 30mg/Kg ($p < 0,05$) e 5-FU ($p < 0,001$) quando comparados com grupo controle. Além disso, a perda percentual de massa corpórea no grupo EScTD 30mg/Kg foi estatisticamente comparável àquela evidenciada no grupo tratado com o quimioterápico padrão ($p > 0,05$). Por outro lado o grupo EScTD obteve ganho percentual de massa corpórea ao final do período experimental estatisticamente semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 10).

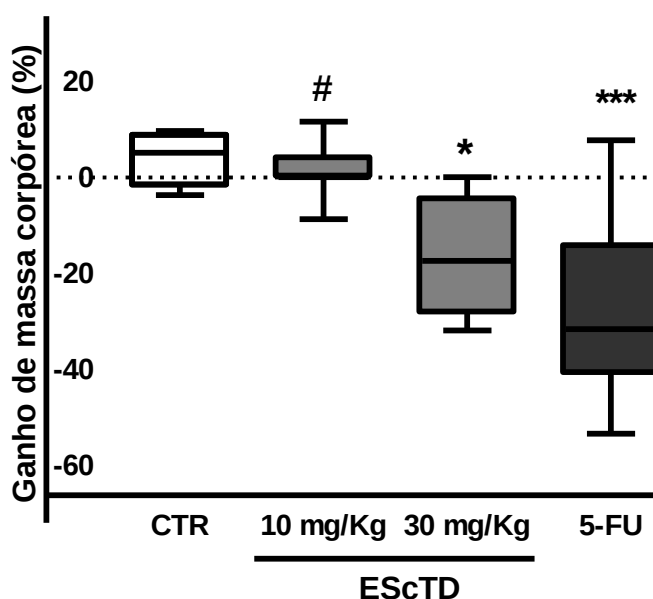


Figura 10. Determinação do ganho/perda percentual de massa corpórea dos animais submetidos a implante dérmico de células de sarcoma 180 tratados com solução salina (CTR), extrato supercrítico de *Titonia diversifolia* (EScTD) nas doses de 10 e 30 mg/Kg, e 5-fluorouracil (5-FU) ao longo dos oito dias de período experimental. Dados expressos como mediana e amplitude interquartil. Diferenças significativas em comparação com o grupo CTR foram expressas como * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$; diferenças significativas em relação ao grupo 5-FU foram expressas como # $p < 0,05$ (Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn).

5.5.3 Análise da massa ponderal média dos órgãos viscerais excisionados

Foi observado redução significativa de massa ponderal hepática e renal dos grupos EScTD 30mg/Kg e 5-FU quando comparados com grupo controle ($p < 0,001$). Contudo, o grupo tratado com EScTD 10 mg/Kg apresentou perda significativamente menor que aquele tratado com 30 mg/Kg ($p < 0,05$). Além disso, é preciso destacar que a perda de massa hepática e renal observada no grupo 5-FU foi significativamente maior que nos grupos tratados com ambas as doses de EScTD. Com relação a massa

esplênica, apenas o grupo 5-FU apresentou perda significativa em relação ao grupo CTR ($p>0,01$) (Figura 11).

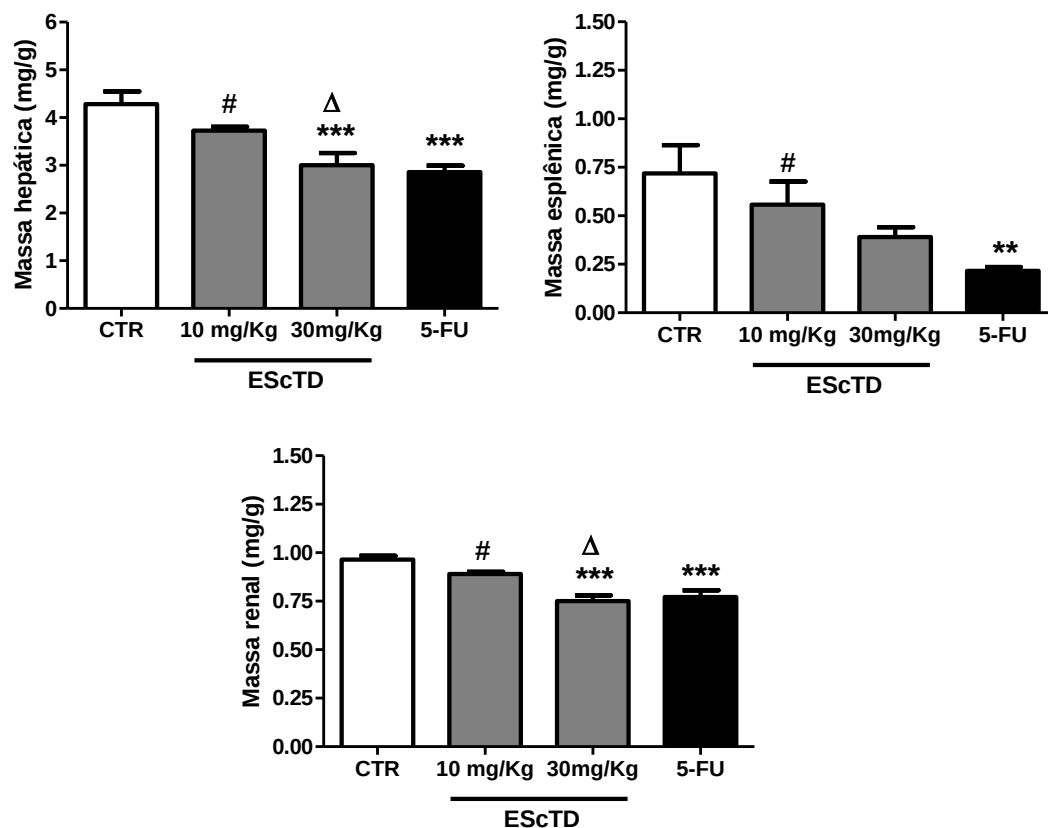


Figura 11. Determinação da massa ponderal média dos órgãos viscerais removidos dos animais submetidos a implante dérmico de células de sarcoma 180 tratados com solução salina (CTR), extrato supercrítico de *Titonia diversifolia* (ESCTD) nas doses de 10 e 30 mg/Kg, e 5-fluorouracil (5-FU) ao final dos oito dias do período experimental (mg de massa tumoral/100 g massa corpórea). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças significativas em comparação com o grupo CTR foram expressas como *** $p<0,001$; diferenças significativas em relação ao grupo 5-FU foram expressas como # $p<0,05$; diferenças significativas em comparação com ESCTD 10 mg/Kg estão expressas como Δ $p<0,05$ (Teste ANOVA e teste de comparações múltiplas de Bonferrogni).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O rendimento extrativo percentual médio obtido pela extração por fluido supercrítico foi de 1,02 (%). Contudo, Ziemons *et al.* 2005, realizaram um experimento para determinar as melhores condições extrativas por fluido supercrítico para as folhas da *T. diversifolia* e obtiveram rendimento extrativo médio de 2,9 (%). Esta diferença pode ser explicada pelas distinções entre as condições extrativas e equipamentos (fluxo de CO₂, pressão, temperatura, volume do cilindro extrator, massa de folhas, e local e época da coleta) realizadas entre os dois experimentos.

O perfil cromatográfico do ESCTD mostrou um pico majoritário no tempo de retenção de 5 min., identificado possivelmente como tagitinina C. Este resultado é corroborado por Goffin *et al.* (2003), que obteve dados semelhantes, uma vez que o pico foi eluído no mesmo tempo de retenção, analisado na mesma faixa de absorção (254 nm) e os cromatogramas descritos são semelhantes àquele obtido no presente estudo. Como a tagitinina C purificada não pode ser obtida comercialmente a fim de ser usada como padrão, estudos posteriores utilizando técnicas como espectroscopia de massa são necessários a fim de confirmar a natureza do pico cromatográfico aqui discutido.

A atividade antioxidante de produtos naturais vêm sendo bem documentada na literatura científica. Este interesse é baseado na capacidade destas substâncias de neutralizar a formação de radicais livres, envolvidos em doenças como o câncer, processo inflamatórios crônicos, além de envelhecimento (ROSS *et al.* 2017). A avaliação do potencial antioxidante dos polifenóis nas folhas da *T. diversifolia* foi demonstrado por Di Giacomo *et al.* (2017), que mostraram alta atividade antioxidante em extratos aquosos. A escolha do método do DPPH em detrimento do teste colorimétrico ABTS, foi baseado em condições menos extremas de níveis de oxigênio e temperatura para realização do método, o menor tempo para que ocorra a reação e a estabilidade do radical DPPH. (LIMA, 2008)

No presente estudo, o percentual de inibição de DPPH do ESCTD (3,23 mg/mL) foi considerado baixo. Outros estudos mostraram resultados divergentes, como Juang *et al.* (2014), em que o percentual de inibição de DPPH para a *T. diversifolia* foi de $0,92 \pm 0,2$ mg/mL e Gama *et al.* (2014) que foi de 0,2 mg/mL. Esta divergência parece ocorrer devido a metodologias extrativas diferentes e das partes da planta que foram utilizadas. Estes autores obtiveram em seus extratos uma riqueza em polifenóis, que apresentam alta capacidade de sequestrar radicais livres. Todavia, a composição do ESCTD pobre em polifenóis, mas rico em lactonas sesquiterpênicas que têm

demonstrado maior atividade antitumoral e antiproliferativa sendo mais relevante no presente estudo (DESTANDAU *et al.*, 2015; MABOU TAGNE *et al.*, 2018).

Alguns aspectos importantes levam a especular se a baixa capacidade antioxidante do EScTD não poderia ser um dado positivo. De fato, o estresse oxidativo é capaz de gerar radicais livres que podem atuar no DNA de células de diferentes órgãos e tecidos e promover mutações carcinogênicas (SINGH *et al.*, 2016); assim, a minimização do estresse oxidativo poderia ser extremamente relevante para prevenir a formação de células tumorais malignas em condições mutagênicas dependentes da geração de radicais livres, como a carcinogênese química e física (radiações ionizantes). Contudo, em situações nas quais o tumor já esteja instalado, como no modelo de transplantação de sarcoma 180 utilizado no presente estudo, a atividade antioxidante elevada poderia atuar como um fator prejudicial à contensão do tumor (HERRAIZ *et al.*, 2016). Nesse sentido, estudos já demonstram que o uso de antioxidantes pode acelerar a progressão do câncer (SAYIN *et al.*, 2014) e a indução de metástases em modelo murino (LE GAL *et al.*, 2015). Apesar das razões para esses resultados aparentemente paradoxais ainda não estarem devidamente elucidadas, é possível que exista uma relação com a função fisiológica de imunovigilância. O estresse oxidativo é um dos principais mecanismos de eliminação de clones tumorais malignos por células *Natural Killer* (NK) (CHAN *et al.*, 2014; SORIANI *et al.*, 2014). Assim, uma forte atividade antioxidante poderia atenuar a atividade imunovigilante das células NK e, portanto, facilitar a progressão tumoral.

O EScTD mostrou forte atividade citotóxica frente a linhagem ATCC A549, apresentando a IC₅₀ de 2,2 µg/mL. Estudos anteriores realizados com extratos obtidos a partir das folhas de *T. diversifolia* e utilizando linhagens celulares diferentes corroboram este resultado (LEE *et al.*, 2011; LIAO *et al.*, 2011; LIAO *et al.*, 2013). Vale salientar que em tais estudos os processos extrativos das folhas de *T. diversifolia* foram realizados utilizando solventes orgânicos que demonstraram atividade citotóxica contra as células tumorais testadas. Todavia, o efeito citotóxico mais expressivo foi observado quando a tagitinina C foi isolada. Liao *et al.* (2013) obtiveram a IC₅₀ de 2,0 ± 0,1 µg/mL frente a linhagem celular Hep-G2 (hepatoma humano) enquanto Liao *et al.* (2011) encontraram a IC₅₀ de 6,0 ± 0,1 µg/mL contra U373 (glioblastoma humano). Apesar do processo extrativo utilizado no presente estudo não contemplar etapas específicas de isolamento da tagitinina C, foi possível obter um extrato altamente concentrado desta substância; esses dados poderiam justificar a elevada atividade citotóxica aqui observada, comprável com aquela relatada quando do uso isolado deste sesquiterpeno.

A IC₅₀ da atividade citotóxica em células não malignas da linhagem L929 foi quatro vezes maior quando comparada com a linhagem tumoral A549. Neste sentido, parece que a tagitinina C apresenta seletividade e especificidade em relação a células tumorais o que a torna uma promissora substância a ser um adjuvante no tratamento contra o câncer.

No presente estudo, a solução salina, um veículo inerte, foi usada como controle negativo para o experimento *in vivo* de pesquisa de atividade antitumoral, e o 5-Fluoruracil (5-FU), um quimioterápico com reconhecida ação antitumoral, foi empregado como controle positivo (ANDRADE *et al.*, 2016). Como esperado, o tratamento com 5-FU reduziu significativamente a massa ponderal média dos tumores em relação àqueles tratados apenas com solução salina. O mecanismo de ação deste composto químico parece estar relacionado à inibição da Timidilato Sintase (TS), uma enzima fundamental para síntese das pirimidinas, por ação do 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP); este promove a incorporação de 5-fluoro-5-trifosfato (FUTP) ao RNA e de 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP) ao DNA celular, fenômenos potencialmente capazes de induzir a redução da síntese e reparo do DNA, e consequentemente promover morte da célula-alvo (LONGLEY, *et al.*, 2003).

Ambas as doses de EScTD promoveram redução na massa ponderal dos tumores, especialmente a dose 30mg/Kg que mostrou comportamento semelhante ao 5-FU. Estes dados parecem reforçar o efeito citotóxico obtido neste estudo e sugerem um elevado potencial de atividade antitumoral para o EScTD. O mecanismo pelo qual o EScTD apresentou a atividade antitumoral ainda não foi elucidado. Porém, sabe-se, que extratos obtidos a partir da *T. diversifolia* apresenta principalmente a lactona sesquiterpênica tagitinina C (MABOU TAGNE *et al.*, 2018;), o que, de fato, foi comprovado nesta pesquisa. Uma vez que o potencial citotóxico contra células tumorais da tagitinina C tem sido documentado (LIAO *et al.*, 2013), é provável que essa substância seja responsável pela ação antitumoral *in vivo*.

A atividade antitumoral das lactonas sesquiterpênicas, incluindo a tagitinina C, parece estar vinculada ao grupo α -metileno- γ -lactona (α MyL). Estudos anteriores mostraram que o principal mecanismo de ação parece ser a regulação da expressão do NF- κ B (KREUGER *et al.*, 2012; PIRES *et al.*, 2018). A resposta imunológica contra as células tumorais promove a liberação de mediadores inflamatórios, como TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e IL-6 (interleucina 6). Estas citocinas agem sobre os fatores de inibição (I- κ B) que regulam a expressão do NF- κ B. Após sua ativação, esta citocina parece contribuir para o crescimento e progressão tumoral uma vez que induz bloqueio dos mecanismos apoptóticos ao mesmo tempo em que estimula a angiogênese. Desta forma a taxa de proliferação tumoral aumenta, assim como o risco

de metástase. Os grupos α -metileno- γ -lactona (α MyL), presentes nos sesquiterpenos, como a tagitinina C, parecem prevenir a degradação dos heterodímeros inibitórios, reduzindo a expressão do fator NF- κ B (HEHNER *et al.*, 1998).

Outro mecanismo estudado por Kreuger *et al.* (2012), e independente do NF- κ B, está ligado ao bloqueio do ciclo celular na fase G2 e posterior ativação da proteína p53, envolvida no processo de morte celular programada. Diversos tumores agem suprimindo a expressão da p53 e consequentemente avançam no ciclo celular, fixando mutações oncogênicas em células-prole e, por consequência, criando clones celulares tumorais. Por outra ótica, Lu *et al.* (2017) e Liao *et al.* (2013) demonstraram que a tagitinina C está envolvida também na ativação da caspase 3, uma proteína que está associada a iniciação da cascata enzimática que leva a regulação e execução do processo de morte celular programada.

A despeito dos relatos de prováveis mecanismos envolvidos na potencial atividade antitumoral do EScTD e seu composto majoritário, a tagitinina C, o cabedal metodológico proposto no presente estudo não permite a elucidação dos eventos bioquímicos e moleculares que determinam a atividade biológica deste extrato. Assim, estudos posteriores utilizando técnicas moleculares que permitam a análise da transcrição e tradução proteica dos genes responsáveis pela codificação das citocinas e enzimas anteriormente descritas ainda são necessários a fim de esclarecer este tópico.

Trabalhos clássicos publicados na literatura durante a década de 80 atestam que algumas características histopatológicas de tumores malignos podem ser relacionadas a seu comportamento biológico, destacando-se, entre elas, a atividade mitótica, a formação de áreas de necrose, reação desmoplásica (fibrose) e infiltrado inflamatório peri e intratumoral (TROJAN *et al.*, 1984). De forma geral, não houve diferença substancial na apresentação morfológica dos tumores analisados. Estes dados sugerem que a potencial atividade antitumoral do EScTD observada no presente estudo não parece interferir na arquitetura citomorfológica do tumor.

Estudos prévios têm demonstrado a toxicidade das lactonas sesquiterpênicas. (SCHMIDT *et al.*, 1999). Desta forma os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram estudados para avaliar os efeitos toxicológicos e garantir a segurança do uso EScTD.

No presente estudo, apenas o uso do EScTD na dose de 30 mg/Kg promoveu redução significativa do número total de leucócitos do sangue periférico, comparável ao 5-FU. Uma vez que esses valores hematológicos se mostraram abaixo dos valores de referência, é possível inferir que o extrato, assim como o quimioterápico, determinou um quadro de leucopenia nos animais experimentais. Tem sido relatado

que toxicidade hematológica pode ser causada por quimioterapia citotóxica, que pode levar a retardo, descontinuidade ou abandono do tratamento, e até mesmo mortes relacionadas à quimioterapia (HUANG *et al.*, 2016). Os dados obtidos no presente estudo parecem apontar para um provável efeito imunossupressor do EScTD. A análise da contagem diferencial de leucócitos parece indicar que esta depressão imunológica parece estar associada à um quadro de linfocitopenia, similarmente ao ocorrido com 5-FU, uma vez que houve significativa redução relativa (percentual) do número de linfócitos circulantes. De fato, a depleção linfocítica induzida por quimioterapia está bem documentada na literatura (VERMA *et al.*, 2016), e parece indicar que este efeito colateral tipicamente evidenciado durante o uso de quimioterápicos convencionais também ocorre com a administração do EScTD.

Nesse sentido, a análise da massa ponderal esplênica vem sendo correntemente utilizada como indicador de potenciais efeitos imunossupressivos em modelos murinos de atividade antitumoral (ANDRADE *et al.*, 2016). No presente estudo, não houve diferença entre a massa média ponderal esplênica dos animais tratados com EScTD e o grupo CTR, o que parece corroborar os resultados evidenciados na análise hematológica de contagem de leucócitos. De especial interesse foi a observação de que a dose de 10 mg/Kg do EScTD, assim como o grupo CTR, demonstraram massa ponderal esplênica significativamente maior que o grupo tratado com 5-FU. Tais dados parecem suportar a teoria de que o EScTD, especialmente na menor dose testada no presente estudo, apresentaria menor imunotoxicidade que o quimioterápico 5-FU.

A análise bioquímica revelou aumento significativo de enzimas séricas sugestivas de disfunção hepática tanto nos animais tratados com EScTD 30 mg/Kg quanto com 5-FU. Corroborando estes dados, a avaliação da massa ponderal hepática também apresentou redução significativa frente ao tratamento com estes dois compostos. Por outro lado, apenas a administração do EScTD 30 mg/Kg promoveu alteração significativa dos indicadores bioquímicos de função renal, embora o mesmo efeito não tenha sido observado com o uso do 5-FU. Contudo, estes valores se mantiveram dentro dos limites de referência indicados por Araújo *et al* (2016) para animais do mesmo biotério. Em adição a esses achados, a mesma dose de EScTD e 5-FU promoveu redução significativa da massa ponderal renal. Uma provável explicação para esses dados aparentemente paradoxais reside no fato de que o tempo de tratamento foi muito curto, o que pode ter influenciado na magnitude da alteração dos dados bioquímicos aqui analisados (OLIVEIRA *et al.* 2011; PASSONI *et al.* 2013). Assim, a análise global destes resultados parece conduzir à especulação de que um

tratamento em longo prazo ou mesmo crônico com esses compostos poderia levar a disfunção hepato-renal importante.

De especial interesse foi o fato de que o tratamento com EScTD na dose de 10 mg/Kg promoveu atividade antitumoral significativa e comparável ao quimioterápico convencional (5-FU), mas não apresentou efeito toxicológico expressivo, nem sobre os indicadores hematológicos e bioquímicos, nem sobre a massa ponderal dos órgãos viscerais analisados. Estes dados parecem sugerir que a dose de 10 mg/kg do EScTD pode ser tão efetiva quanto o quimioterápico convencional, utilizado como controle positivo no presente estudo, no combate à progressão tumoral do sarcoma 180, mas substancialmente menos agressivo às células e tecidos normais do organismo. Diante destes dados, é possível inferir que esta dose poderia funcionar como ponto de partida para estudos posteriores visando o desenvolvimento de formulações passíveis de serem testadas em ensaios de atividade antitumoral e/ou quimiopreventiva em outros sistemas biológicos mais complexos e, quiçá, em humanos.

Diante desta questão, é preciso enfatizar a necessidade de realização de estudos toxicológicos específicos, considerando os protocolos determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a fim de determinar com mais precisão e clareza a segurança ou toxicidade deste extrato, nos limites da dose mais segura observada no presente estudo (10 mg/Kg), com vistas ao desenvolvimento futuro de um potencial produto natural quimioterápico ou adjuvante na quimioterapia antitumoral.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o extrato foliar de *T. diversifolia* obtido por processo de extração com CO₂ em condições supercríticas apresenta elevada atividade citotóxica, com aparente seletividade por células tumorais malignas em detrimento de não malignas, bem como forte ação antitumoral em modelo experimental murino de sarcoma 180. Além disso, a dose de 10 mg/kg do extrato promoveu atividade antitumoral com menos efeitos toxicológicos, o que parece indicar um considerável potencial para futuro desenvolvimento de formulações quimioterápicas/quimiopreventivas ou terapias adjuvantes para o tratamento de neoplasias malignas.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Diante dos dados obtidos no presente estudo, e sob as condições experimentais aqui utilizadas, é possível concluir que:

- O processo de extração em fluido supercrítico com CO₂ produziu um extrato altamente concentrado em uma molécula química compatível com tagitinina C.
- O potencial antioxidante do EScTD foi considerado baixo.
- O EScTD apresenta elevado potencial citotóxico contra células tumorais A549, com IC50 próximo àquele obtido para compostos químicos puros.
- O IC50 do EScTD em fibroblastos não malignos L929 foi quatro vezes maior que para as células malignas A549, o que sugere certa seletividade na citotoxicidade do extrato.
- Ambas as doses testadas (10 e 30 mg/Kg) do EScTD promoveram inibição significativa do crescimento tumoral *in vivo*, comparável ao quimioterápico padrão (5-FU).
- A administração da dose de 30 mg/Kg promoveu alterações bioquímicas, hematológicas e anatomomacrosscópicas (massa dos órgãos) consistentes com esplenomegalia, hepatomegalia e nefrotoxicidade, mas estes distúrbios não foram evidenciados com o uso da dose de 10 mg/Kg.
- O EScTD na dose de 10 mg/Kg mostrou-se promissor para o estudo futuro de formulações antineoplásicas.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ABE, A.E.; DE OLIVEIRA, C.E.; DALBONI, T.M.; CHAGAS-PAULA, D.A.; ROCHA, B.A.; DE OLIVEIRA, R.B.; GASPAROTO, T.H.; DA COSTA, F.B.; CAMPANELLI, A.P. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* trigger different effects on human neutrophils. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2015; 25: 11-116.

ALLEN, C.; HER, S.; JAFFRAY, D.A. Radiotherapy for Cancer: Present and Future. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2017; 109: 1-2.

ARAÚJO, F.T.M.; TEIXEIRA, A.C.P.; ARAÚJO, M.S.S.; SILVA, C.H.; NEGRÃO-CORRÊA, D.A.; MARTINS-FILHO, O.A.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. Establishment of reference values for hematological and biochemical parameters of mice strains produced in the animal facility at centro de pesquisas rené rachou/fiocruz - Minas Gerais. *Resbcal.* 2015; 3(2): 95-102.

ATES, G.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, V.; RODRIGUES, R.M. Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. *Methods Mol Biol.* 2017; 1601: 19-26.

ANDRADE, L.N.; AMARAL, R.G.; DÓRIA, G.A.; FONSECA, C.S.; DA SILVA, T.K.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R.L.; THOMAZZI, S.M.; DO NASCIMENTO, L.G.; CARVALHO, A.A.; DE SOUSA, D.P. *In Vivo* Anti-Tumor Activity and Toxicological Evaluations of Perillaldehyde 8,9-Epoxyde, a Derivative of Perillyl Alcohol. *Int J Mol Sci.* 2016; 4;17(1).

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 1995; 28: 25-30,.

BUTTURINIA, E.; DI PAOLA, R.; HISANORI SUZUKIA, H.; IRENE PATERNITI, I.; AHMAD, A.; MARIOTTO, S.; CUZZOCREA, S. Costunolide and Dehydrocostuslactone, two natural sesquiterpene lactones, ameliorate the inflammatory process associated to experimental pleurisy in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2014; 730: 107-115.

CHADWICK, M.; TREWIN, H.; GAWTHROP, F.; WAGSTAFF, C. Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. *Int. J. Mol. Sci* 2013; 14: 12.780-12.805.

CHAGAS-PAULA, D.A.; OLIVEIRA, R.B.; BRUNO A. ROCHA, B.A.; DA COSTA, F.B. Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). *Chem. Biodiversity* 2012; 9: 210-235.

CHAN, C.J.; SMYTH, M.J.; MARTINET, L. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ.* 2014; 21(1): 5-14..

COS, P.; HERMANS, N.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; SINDAMBIWE, J. B.; WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E.; VANDEN BERGHE, D.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Antiviral activity of Rwandan medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Phytomedicine* 2002; 9: 62–68, 2002.

DI GIACOMO, C.; VANELLA, L.; SORRENTI, V.; SANTANGELO, R.; BARBAGALLO, I.; CALABRESE, G.; GENOVESE, C.; MASTROJENI, S.; RAGUSA, S.; ACQUAVIVA, R. Effects of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray Extract on Adipocyte Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cell. *Plos One* 2017; 10(4): 1-15.

DESTANDAU, E.; BOUKHRIS, M.A.; ZUBRZYCKI, S.; AKSSIRA, M.; EL RHAFARI, L.; ELFAKIR, C. Centrifugal partition chromatography elution gradient for isolation of sesquiterpene lactones and flavonoids from *Anvillea radiata*. *J. Chromatogr. B* 2015; 985: 29-37.

FERREIRA, M.A.N.D. *Avaliação da angiogênese, inflamação e crescimento tumoral em camundongos com deleção gênica dos receptores para o PAF (PARF-KO)*. [Tese]. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.

FERRO, D. *Fitoterapia: conceitos clínicos*. Atheneu, 2006.

FLORÊNCIO, A. P. S.; MELO, J. H. L. ; MOTA C. R. F. C.; MELO-JÚNIOR, M. R.; ARAÚJO, R. V. S. Estudo da atividade antitumoral do polissacarídeo (PJU) extraído de *Anacardium Occidentale* frente a um modelo experimental do sarcoma 180. *Rev. Eletronica Farm.* 2007; 4(1): 61-65.

GAMA, R.M.; GUIMARÃES, M.; ABREU, L.C.; ARMANDO-JUNIOR, J. Phytochemical screening and antioxidant activity of ethanol extract of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray dry flowers. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2014; 4(9): 740-742.

GRANDIZOLI, C.W.P.S.; CARRENHO, L.Z.B.; DE FRANCISCO, T.M.G.; SANTANA-FILHO, A.P.; SASSAKI, G.L.; SIMONELLI, F.; NAGATA, N.; MARIA R. O. KREUGER, M.R.O.; FRANCINETE R. CAMPOS, F.R.; BARISON, A. Ehrlich and Sarcoma 180 tumour characterisation and early detection by 1 h NMR-based metabonomics of mice sérum. *J. Braz. Chem. Soc.* 2014; 25(5): 841-852.

GOFFIN, E.; PROENÇA DA CUNHA, A.; ZIEMONS,E.; TITS, M.; ANGENOT, L.; FREDERICH, M. Quantification of Tagitinin C in *Tithonia diversifolia* by Reversed-phase Highperformance Liquid Chromatography. *Phytochem. Anal.* 2003; 14: 378-380.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; KUMAR, S. R.; SIVAKUMAR, T.; VAMSI, M. L. M. Antitumor activity and antioxidante status of *Caesalpina bonducella* against Ehrlich Ascites carcinoma in swiss albino mice. *J. Pharmacol. Sci.* 2004; 94: 177-184.

GU, J. Q.; GILLS, J. J.; PARK, E. J.; MATA-GREENWOOD, E.; HAWTHORNE, M. E.; AXELROD, F.; CHAVEZ, P. I.; FONG, H. H. S.; MEHTA, R. G.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity. *J. Nat. Prod.* 2002; 65: 532-536.

HAJDÚ, Z.; HOHMANN, J.; FORGO, P.; MÁTHÉ, I.; MOLNÁR, J.; ZUPKÓ, I. Antiproliferative Activity of *Artemisia asiatica* Extract and Its Constituents on HumanTumor Cell Lines. *Planta Med.* 2014; 80: 1692-1697.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-674.

HEHNER, S.P.; HEINRICH, M.; BORK, P.M.; VOGT, M.; RATTER, F.; LEHMANN, V.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; DROGE, W.; SCHMITZ, M.L. Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NFκ B by preventing the degradation of I κ Ba and I κ Bb. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(3): 1288-1297.

HERRAIZ, C.; CROSAS-MOLIST, E.; SANZ-MORENO, V. Reactive oxygen species and tumor dissemination: Allies no longer. *Mol Cell Oncol.* 2016 19;3(2).

HERRERO, M.; MENDIOLA, J.A.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ. E. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *J. Chromatogr. A.* 2010; 1217: 2495–2511.

HUANG, A.; MA, M.; JIN, B.; HAN, B. Chemotherapy-induced leukopenia as a prognostic factor in patients with metastatic non-small cell lung cancer treated with platinum-based chemotherapy. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2016; 9(2): 5241-5242.

HURTADO, M.; SANKPAL, U.T.; RANJAN, A.; MARAM, R.; VISHWANATHA, J.K.; NAGARAJU, G.P.; EL-RAYES, B.F.; BASHA, R. Investigational agents to enhance the efficacy of chemotherapy or radiation in pancreatic cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018; 126: 201-207.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. 2018 [acessado em 01 mai 2018]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sergipe-aracaju.asp>.

JUANG, C.L.; YANG, F.S.; HSIEH, M.S.; TSENG, H.Y.; CHEN, S.C.; WEN, H.C. Investigation of anti-oxidative stress *in vitro* and water apparent diffusion coefficient in MRI on rat after spinal cord injury *in vivo* with *Tithonia diversifolia* ethanolic extracts treatment. *BMC Complementary Altern. Med.* 2014; 14: 447.

KREUGER, M.R.O.; GROOTJANS, S.; BIAVATTI, M.W.; VANDENABEELE, P.; D'HERDE, K. Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. *Anti-Cancer Drugs* 2012; 23(9): 883-896.

KUO, Y. H.; CHEN, C. H. Sesquiterpenes from the leaves of *Tithonia diversifolia*. *J. Nat. Prod* 1998; 61: 827-828.

LE GAL, K.; IBRAHIM, M.X.; WIEL, C.; SAYIN, V.I.; AKULA, M.K.; KARLSSON, C.; DALIN, M.G.; AKYÜREK, L.M.; LINDAHL, P.; NILSSON, J.; BERGO, M.O. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Sci Transl Med.* 2015; 7;7(308).

LEE, M. Y.; LIAO, M. H.; TSAI, Y. N.; CHIU, K. H.; WEN, H. C. Identification and anti-human glioblastoma activity of tagitinin C from *Tithonia diversifolia* methanolic extract. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59: 2347-2355.

LIAO, M. H.; LIN, W. C.; WEN, H. C.; PU, H. F. *Tithonia diversifolia* and its main active component tagitinin C induce survivin inhibition and G2/M arrest in human malignant glioblastoma cells. *Fitoterapia* 2011; 82: 331-341.

LIAO, M. H.; TSAI, Y. N.; YANG, C. Y.; JUANG, C. L.; LEE, M. Y.; CHANG, L. H.; WEN, H. C. Anti-human hepatoma Hep-G2 proliferative, apoptotic, and antimutagenic activity of tagitinin C from *Tithonia diversifolia* leaves. *J. Nat. Med.* 2013; 67(1): 98-106.

LIMA, A. *Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (Caryocar brasiliense, Camb.)* [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.

LONGLEY, D.B.; HARKIN, D.P.; JOHNSTON, P.G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(5): 330-338.

LU, M.R.; HUANG, H.L.; CHIOU, W.F.; HUANG, R.L. Induction of Apoptosis by *Tithonia diversifolia* in Human Hepatoma Cells. *Pharmacogn Mag.* 2017; 13(52):702-706.

MABOU TAGNE, A.; MARINO, F.; COSENTINO, M. *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray as a medicinal plant: A comprehensive review of its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacotoxicology and clinical relevance. *J Ethnopharmacol.* 2018; 26(220): 94-116.

MACHADO, B.A.S.; BARRETO, G.A.; COSTA, A.S.; COSTA, S.S.; SILVA, R.P.D.; SILVA, D.F.; BRANDÃO, H.N.; ROCHA, J.L.C.; NUNES, S.B.; UMSZA-GUEZ, M.A.; PADILHA, F.F. Determination of Parameters for the Supercritical Extraction of Antioxidant Compounds from Green Propolis Using Carbon Dioxide and Ethanol as Co-Solvent. *Plos One.* 2015; 10(8): 1-26.

MCKINNON, R.; BINDER, M.; ZUPKÓ, I.; AFONYUSHKIN, T.; LAJTER, I.; VASAS, A.; DE MARTIN, R.; UNGER, C.; DOLZNIG, H.; DIAZ, R.; FRISCH, R.; PASSREITER, C.M.; KRUPITZA, G.; HOHMANN, J.; KOPP, B.; BOCHKOV, V.N. Pharmacological insight into the anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cass. *Phytomedicine* 2014; 21: 1695-1701.

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

MIRANDA, M.A.F.M.; VARELA, R.M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J.M.G.; SONIA C. J. GUALTIERI, S.C.J.; FRANCISCO A. MACÍAS, F.A. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia* J. Nat. Prod. 2015; 78: 1083-1092.

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

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.

NOLEN, S.C.; EVANS, M.A.; FISCHER, A.; CORRADA, M.M.; KAWAS, C.H.; BOTA, D.A. Cancer—Incidence, prevalence and mortality in the oldest-old. A comprehensive review. *Mech. Ageing Dev.* 2017; 164: 113-126.

OLIVEIRA, R.B.; CHAGAS DE PAULA, D.P.; BRUNO ALVES ROCHA, B. A.; JOÃO JOSÉ FRANCO, J.J.; GOBBO-NETO, L.; UYEMURA, S.A.; SANTOS, W.F.; COSTA, F.B. Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: The yacon example. *J Ethnopharmacol.* 2011; 133: 434-441.

OWOYELE, V. B.; WURAOLA, C. O.; SOLADOYE, A. O.; OLALEYE, S. B. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extract. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 90: 317-321.

PARISOTTO, E. B. *Avaliação da atividade antitumoral do extrato bruto e supercrítico de Cordia verbenácea* [Tese]. Santa Catarina: Universidade de Santa Catarina; 2011.

PATNAIK, R.; PADHY, R.N. Comparative study on toxicity of methylmercury chloride and methylmercury hydroxide to the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2018. [Epub ahead of print]

PIRES, B.R.B.; SILVA, R.C.M.C.; FERREIRA, G.M.; ABDELHAY, E. NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. *Genes* 2018; 9(1): 1-24.

PEREIRA, P. S.; DIAS, D. A.; VICHNEWSKI, W.; NASI, A. M. T. T.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones from Brazilian *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray. *Phytochemistry* 1997; 45(7): 1445-1448.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; ÁUREA SILVEIRA CRUZ, A.S. *Teste in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Mater. Res.* (São Carlos, Braz.). 2003; 6(3): 317-320.

ROSS, G.L.; TEDESCO, I.; SPAGNUOLO, C.; RUSSU, M. Antioxidant polyphenols in cancer treatment: Friend, foe or foil? *Semin. Cancer Biol.* 2017; 46: 1-13.

SAMPAIO, B.L.; EDRADA-EBEL, R.; DA COSTA, F.B. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Sci. Rep.* 2016; 6: 29265.

SAYIN, V.I.; IBRAHIM, M.X.; LARSSON, E.; NILSSON, J.A.; LINDAHL, P.; BERGO, M.O. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci Transl Med.* 2014; 29;6(221).

SCHMIDT, T.J. Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects. *Curr. Org. Chem.* 1999; 3: 577–608.

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.

SIEGEL, R.; DESANTIS, C.; VIRGO, K.; STEIN, K.; MARIOTTO, A.; SMITH, T.; COOPER, D.; GANSLER, T.; LERRO, C.; FEDEWA, S.; LIN, C.; LEACH, C.; CANNADY, R. S.; KIRCH, R.; JEMAL, A.; WARD, E. Cancer treatment and survivorship statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2012; 62: 220-241.

SIMÕES, M.C.F.; SOUSA, J.J.S.; PAIS, A.A.C.C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Lett.* 2015; v. 357, p.8-42.

SINGH A.K.; PANDEY P, TEWARI, M.; PANDEY, H.P.; GAMBHIR, I.S.; SHUKLA, H.S. Free radicals hasten head and neck cancer risk: A study of total oxidant, total antioxidant, DNA damage, and histological grade. *J Postgrad Med.* 2016; 62(2): 96-101.

SORIANI, A.; IANNITTO M.L.; RICCI B.; FIONDA, C.; MALGARINI, G.; MORRONE, S.; PERUZZI, G.; RICCIARDI, M.R.; PETRUCCI, M.T.; CIPPITELLI, M.; SANTONI, A.

Reactive oxygen species- and DNA damage response-dependent NK cell activating ligand upregulation occurs at transcriptional levels and requires the transcriptional factor E2F1. *J Immunol.* 2014; 193(2): 950-960.

SUT, S.; DALL'ACQUA, S.; BALDAN, V.; KAMTE, S.L.N.; RANJBARIAN, F.; NYA, P.C.B. VITTORI, S.; BENELLIE, G.; MAGGI, F.; CAPPELLACCI, L.; HOFER, A.; PETRELLI, R. Identification of tagitinin C from *Tithonia diversifolia* as antitrypanosomal compound using bioactivity-guided fractionation. *Fitoterapia.* 2018; 124: 145-151.

TOHME, S.; SIMMONS, R.L TSUNG, A. Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases. *Cancer Res.* 2017; 77(7): 1548-1552.

TONA, L.; KAMBU, K.; NGIMBI, N.; CIMANGA, K.; VLIETINCK, A. J. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 1998; 61: 57-65.

TORRE, L.A.; SIEGEL, R.L.; ELIZABETH M. WARD, E.M.; JEMAL, A. Global cancer incidence and mortality rates and trends-an update. *Cancer Epidemiol.,Biomarkers Prev.* 2016; 25(1): 16-27.

TROJAN, M.; CONTESSO, G.; COINDRE, J.M.; ROUESSE, J. SOFT-TISSUE Sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Int. J. Cancer.* 1984; 33: 37-42.

VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in câncer treatment. *Nat. Rev. Cancer.* 2012; 12(4): 237-251.

VENGOJI, R.; MACHA, M.A.; BATRA, S.K.; SHONKA, N.A. Natural products: a hope for glioblastoma patients. *Oncotarget.* 2018 ;9(31): 22194-22219.

VERMA, R.; FOSTER, R.E.; HORGAN, K.; MOUNSEY, K.; NIXON, H.; SMALLE, N.; HUGHES, T.A.; CARTER, C.R.D. Lymphocyte depletion and repopulation after chemotherapy for primary breast câncer. *Breast Cancer Res.* 2016; 18: 10.

WU, S.; POWERS, S.; ZHU, W.; HANNUN, Y.A. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature.* 2016; 529: 43-57.

WU, T. S.; SHI, L. S.; KUO, P. C.; LEU, Y. L.; MEEI, J.; WU, P. N.; WU, Y. C.; IOU, S. C.; CHEN, Y. P.; HSIEN, C. Cytotoxic principles from leaves of *Tithonia diversifolia*. *Chin. Pharm. J.* 2001; 53: 217–223.

YUAN, R.; HOU, Y.; SUN, W.; LIU, J.Y.X.; NIU, Y.; LU, J.J.; CHEN, X. Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2017; 1401: 19-27.

ZIÉMONS, E.; GOFFIN, E.; LEJEUNE, R.; ANGENOT, L.; THUNUS, L. FT–IR measurement of tagitinin C after solvent extraction from *Tithonia diversifolia*. *Talanta* 2003; 62: 383-387.

ZIÉMONS, E.; GOFFIN, E.; LEJEUNE, R.; PROENÇA DA CUNHA, A.; ANGENOT, L.; THUNUS, L. Supercritical carbon dioxide extraction of tagitinin C from *Tithonia diversifolia*. *J. Supercrit. Fluids* 2005; 33: 53–59.

ZUCKERBERG, C. Ultrastructure of sarcoma 180. *Cancer Res.* 1973; 33 2278-2282.

ANEXO I



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

DECISÃO DA CEUA-UNIT

O protocolo da pesquisa, "Atividade antitumoral da tagitinina c, composto isolado da *Tithonia diversifolia* A. Gray (Hemsl.)", processo nº 040315R, 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 20 de maio de 2015.


Coordenador(a) da CEUA-UNIT

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT

Prof.ª Maria Lívia Bordelli
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso Animal