



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais

**EFEITO DO COMPOSTO “MAIS VIDA” ADSORVIDO A
MICROESFERA DE POLIETILENOGLICOL NA
SOBREVIVÊNCIA DE LINHAGENS DE CÉLULAS DE
CÂNCER DE MAMA (MCF-7).**

ALINY APARECIDA LOPES RIBEIRO

BARRA DO GARÇAS - MT

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais

**EFEITO DO COMPOSTO “MAIS VIDA” ADSORVIDO A
MICROESFERA DE POLIETILENOGLICOL NA
SOBREVIVÊNCIA DE LINHAGENS DE CÉLULAS DE
CÂNCER DE MAMA (MCF-7).**

ALINY APARECIDA LOPES RIBEIRO

Licenciada em Ciências Biológicas

ORIENTADORA: PROF.^a Dr. ^a ADENILDA CRISTINA HONÓRIO FRANÇA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Materiais.

BARRA DO GARÇAS - MT

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

R484e Ribeiro, Aliny Aparecida Lopes.
Efeito do composto "Mais Vida" adsorvido a microesfera de polietilenoglicol na sobrevivência de linhagens de células de câncer de mama (MCF-7) / Aliny Aparecida Lopes Ribeiro. – 2016
90 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Adenilda Cristina Honório França.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário do Araguaia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Barra do Garças, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Polietilenoglicol. 2. "Mais Vida". 3. MCF-7. 4. Células

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Efeito do composto "Mais Vida" adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol na sobrevivência de linhagens de células de câncer de mama (MCF-7).

Autora: Aliny Aparecida Lopes Ribeiro

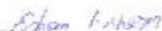
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adenilda Cristina Honório França

Aprovada em 13 de outubro de 2016.

Comissão Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Adenilda Cristina Honório França
Orientadora



Prof. Dr. Edson Fredulin Scherer
Examinador externo



Prof. Dr.^a Danny Laura Gomes Fagundes
Examinador interno

Barra do Garças – MT 2016

*“O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar de novo com
mais inteligência”.*

(Henry Ford)

DEDICATÓRIA

À Deus,

*dedico o meu agradecimento maior, porque têm
sido tudo em minha vida.*

*Aos meus amáveis e eternos pais Waldiney
Lourenço Ribeiro e Sônia Maria Lopes Ribeiro, que
no decorrer da minha vida, proporcionaram-me,
além de extenso carinho e amor, os conhecimentos
da integridade, da perseverança e de procurar
sempre em Deus à força maior para o meu
desenvolvimento como ser humano. Por essa razão,
gostaria de dedicar e reconhecer a vocês, minha
imensa gratidão e amor.*

*Ao meu eterno amor, Adalberto Júnior da Silva
Pereira, que além de me fazer feliz, ajudou-me
durante todo o percurso, dando-me atenção,
carinho e preciosos conselhos, contribuindo para
mais esta conquista em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço

A Deus por me iluminar, guiar, proteger e por todas as oportunidades que proporcionou em minha vida, por ter conhecido pessoas importantes que me ajudaram a superar os momentos difíceis e que contribuíram para meu aprendizado.

Aos doutores e amigos Prof^a Adenilda Cristina Honório França e Prof. Eduardo Luzia França, pela amizade, paciência, orientação, conhecimento e incentivo. Obrigada pelo amparo e pela atenção nas horas difíceis que foram vencidas graças ao apoio de vocês.

A Universidade Federal de Mato Grosso/Campus Araguaia em especial aos professores e alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, que contribuíram para meu crescimento profissional.

Ao Herbário da Reserva Ecocerrado Brasil/Araxá – MG, por nos auxiliar cedendo as plantas constituintes do composto “Mais Vida”.

Ao CAPES, CNPq e FAPEMAT pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

Aos companheiros e amigos de mestrado, Eliraldrin, Jesyca, Lidyane, e em especial ao Welerson Davi, “*nosso professor*”, que me ajudou a vencer a tão temida CM, dedicando seu tempo com toda a paciência do mundo nos ensinando a resolver cada exercício, a minha eterna gratidão.

A amiga Fabiana Helen que sempre esteve ao meu lado, me apoiando, ajudando, chorando, rindo nas horas boas e ruins, mas sempre juntas, dando força e ânimo uma a outra para não desanimar e alcançar o objetivo esperado. Obrigada amiga, “irmã gêmea”,

pela amizade, atenção, enfim por tudo que fez por mim. Ao Michel, pela amizade e preocupação de nos proporcionar momentos de distração, para aliviar o stress.

Ao amigo José Nivaldo pelo incentivo, atenção, carinho e paciência que teve comigo, sempre disposto a ouvir meus desabafos, obrigada pela amizade sincera e pelo apoio nesta caminhada, sou muito grata por tudo.

Aos amigos e amigas dos Laboratórios de Cronoimunomodulação e Imunologia da Relação Materno Infantil, em especial a Alessandra Deluque, Aron Cotrim, Claudia, Fabiana Custódio, Patrícia e todos que de modo geral contribuíram para meu crescimento, obrigada por tudo.

A Dr Danny Laura, pela amizade, atenção, paciência e pelo conhecimento que me proporcionou durante todo o percurso. Sou grata por tudo que fez por mim.

Aos colegas de serviço Aline Vitorino, Danilo, Gilson, Paula, Rodrigo, Rogério, Suelene e em especial a minha chefia Prof. José Marques Pessoa e Dalva Nunes Sabino que sempre me apoiaram e me incentivaram nos momentos difíceis, me dando forças para continuar minha caminhada e alcançar meu objetivo.

A toda minha família em especial aos meus pais, sogro e sogra que sempre acreditaram e investiram em meus sonhos.

E por fim, ao amor da minha vida por estar sempre ao meu lado nas horas que chorei, sorri e me lamentei, sempre me apoiando, me incentivando durante todo o percurso. Agradeço pela paciência, dedicação e carinho. Obrigada por fazer parte da minha vida...

EFEITO DO COMPOSTO “MAIS VIDA” ADSORVIDO A MICROESFERA DE POLIETILENOGLICOL NA SOBREVIVÊNCIA DE LINHAGENS DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA (MCF-7).

RESUMO

O câncer de mama é uma das doenças mais frequentes entre as mulheres, porém a busca de tratamentos mais efetivos ainda é um desafio. Nos últimos anos o desenvolvimento de fármacos e/ou compostos fitoterápicos associados a sistemas de liberação modificada vem sendo utilizados para potencializar ou estimular respostas imunológicas. As plantas medicinais sempre foram objetos de estudos na tentativa de descobrir novas fontes de princípios ativos, entre elas destaca-se o composto “Mais Vida” que apresenta atividade moduladora sobre o sistema imunológico. Este composto adsorvido a microesfera de polietilenoglicol aumenta a atividade funcional de fagócitos humanos sendo importante em infecções bacterianas, porém seus efeitos sobre células tumorais ainda não foram elucidados. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do composto “Mais Vida” adsorvida a microesfera de polietilenoglicol em linhagens de células tumorais de mama (MCF-7), e em cocultura com células mononucleares do sangue humano. Foram analisadas na presença do composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de polietilenoglicol a viscosidade sanguínea, a viabilidade celular, a inibição de proliferação, apoptose e liberação de cálcio intracelular de células em cocultura com células de adenocarcinoma mamário (MCF-7). Verificou-se que o composto “Mais Vida” não alterou a viscosidade sanguínea. Quando se avaliou a viabilidade celular na presença do composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de PEG observou-se que o índice de viabilidade após 24 horas foi de 95,55% para células mononucleares e de 40,19% para células MCF-7. Houve aumento da apoptose e cálcio intracelular em células MCF-7 na presença do composto “Mais Vida”. A cocultura de células mononucleares e MCF-7 em presença do

composto “Mais Vida” adsorvido ao polietilenoglicol reduziu a viabilidade celular, aumentou os índices de apoptose e a liberação de cálcio intracelular. Esses dados sugerem que o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de polietilenoglicol pode atuar como material funcional com atividade antitumor sobre as células MCF-7.

PALAVRAS-CHAVE: Polietilenoglicol, “Mais Vida”, MCF-7, Células mononucleares, Cocultura.

EFFECT OF COMPOUND HERBAL MIXTURE ADSORBED TO THE MICROSPHERE POLYETHYLENE GLYCOL ON SURVIVAL OF BREAST CANCER CELL LINES (MCF-7).

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most frequent diseases among women, and now the search for more effective treatments is still a challenge. In this sense the development of drugs and / or herbal compounds has increased in recent years and the combination of active ingredients modified release systems have been used to enhance or stimulate immune responses. Medicinal plants have always been objects of study in an attempt to find new sources of active ingredients. Among them stands out the Herbal Mixture compound having modulatory activity can activate the immune system. This compound adsorbed to the microsphere polyethylene glycol was able to increase the functional activity of human phagocytes is important in bacterial infections, but its effects on tumor cells has not yet been elucidated. This work aimed to evaluate the effects of the compound Herbal Mixture adsorbed polyethylene glycol microsphere in tumor breast cell lines (MCF-7) in co-culture with mononuclear cells blood. Were analyzed in the presence of compound Herbal Mixture adsorbed microsphere polyethylene glycol blood viscosity, as well as the inhibition of proliferation, apoptosis, cell viability, release of intracellular calcium mononuclear cells in coculture with mammary adenocarcinoma cells (MCF-7). It was found that compound Herbal Mixture does not change the viscosity of normal blood. When we assessed cell viability in the presence of compound Herbal Mixture polyethylene glycol adsorbed microsphere was observed that the viability rate after 24 hours was 95.55% for mononuclear cells and 40.19% for MCF-7 cells. An increase of apoptosis and intracellular calcium in MCF-7 cells in the presence of compound Herbal Mixture. The co cell culture mononuclear and MCF-7 in presence of compound Herbal Mixture polyethylene glycol adsorbed to

reduced cell viability, increased apoptosis rates and release of intracellular calcium. These data suggest that compound Herbal Mixture absorbed microsphere polyethylene glycol can act as functional material with antitumor activity against MCF-7 cells.

KEYWORDS: polyethylene glycol, Herbal Mixture, MCF-7, mononuclear cells, co-culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Plantas que compõem o composto “Mais Vida”	23
Figura 02. Características gerais dos sistemas newtonianos. O gráfico A relaciona a velocidade de cisalhamento (D) e a tensão de cisalhamento, enquanto o gráfico B relaciona a viscosidade e a taxa de cisalhamento (D)..	29
Figura 03. Reogramas representando comportamento pseudoplástico	29
Figura 04. Caracterização dos fluidos plásticos	30
Figura 05. Comportamento característico de fluxo dilatante	30
Figura 06. Reograma produzido por um material tixotrópico pseudoplástico, onde (a) representa a curva ascendente, (c) representa a curva descendente e (b) a área de histerese	31
Figura 07. Sistema de focagem hidrodinâmica	33
Figura 08. Diagrama esquemático do citrômetro de fluxo	34
Figura 09. Curva de fluxo do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o composto “Mais Vida” (SN+MV)	44
Figura 10. Curva de fluxo do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue de indivíduo normal tratado com o estímulo do Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG).....	45
Figura 11. Curva de fluxo do sangue de indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com composto “Mais Vida” adsorvido à microesfera de Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG+MV).....	46
Figura 12. Rampa de temperatura do sangue de indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com composto “Mais Vida”- (SN+MV). 47	
Figura 13. Rampa de temperatura do sangue de indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o estímulo do Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG).....	48
Figura 14. Rampa de temperatura do sangue de indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com composto “Mais Vida” adsorvido à microesfera de Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG+MV).....	49
Figura 15. Curva de viscosidade em relação à taxa de cisalhamento do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o estímulo do composto “Mais Vida”- (SN+MV).....	50

Figura 16. Curva de viscosidade em relação à taxa de cisalhamento do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com microesfera de Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG).....	51
Figura 17. Curva de viscosidade em relação à taxa de cisalhamento do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG+MV).	52
Figura 18. Índice de viabilidade celular das células MN incubadas ou não com Polietilenoglicol (PEG), com composto “Mais Vida” (MV) e com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV), no tempo 0.....	53
Figura 19. Índice de viabilidade no tempo de 24 horas de células MN e de células MN incubadas com Polietilenoglicol (PEG), com composto “Mais Vida” (MV) e com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV).....	54
Figura 20. Índice de viabilidade celular no tempo 0 de células MCF-7 tratadas ou não com microesfera de Polietilenoglicol (PEG), com composto “Mais Vida” (MV) e com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV).....	55
Figura 21. Índice de viabilidade celular das células MCF-7 incubadas com os estímulos do Polietilenoglicol (PEG), com composto “Mais Vida” (MV) e com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV), realizada em 24h	56
Figura 22. Índice de viabilidade da cocultura de células MN e MCF-7 incubadas com microesferas de PEG (Polietilenoglicol), com o composto “Mais Vida” (MV) e com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV), realizada em 0h	57
Figura 23. Índice de viabilidade celular no tempo 24 horas da cocultura de células MN e células MCF-7 tratadas com microesferas de PEG (Polietilenoglicol), com composto “mais Vida” (MV) e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV)	58
Figura 24. Índice de apoptose das células MN incubadas com microesferas de Polietilenoglicol, com composto “Mais Vida” e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG)	59
Figura 25. Índice de apoptose das células MCF-7 incubadas com microesfera de Polietilenoglicol, com composto “Mais Vida e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG)	60
Figura 26. Índice de apoptose da cocultura de células (MN e MCF-7) incubadas com microesfera de PEG (Polietilenoglicol), com composto “Mais Vida” e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG)	61

Figura 27. Índice de liberação de cálcio intracelular das células MN incubadas ou não com microesfera de Polietilenoglicol (PEG), com composto “Mais Vida” (MV) e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV)..... 62

Figura 28. Índice de liberação de cálcio intracelular das células MCF-7 incubadas com microesfera de Polietilenoglicol (PEG), com composto “Mais Vida” (MV) e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV)..... 63

Figura 29. Índice de liberação de cálcio intracelular em cocultura de células (MN+MCF-7) incubadas com microesfera de PEG (Polietilenoglicol), com composto “Mais Vida” (MV) e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV) 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Triagem fitoquímica do composto “Mais Vida” 24

Tabela 02. Índice de inibição de proliferação celular das células MCF-7 e cocultura celular (células MN + MCF-7) na presença dos estímulos. 58

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – Albumina de Soro Bovino

Ca²⁺ - Cálcio

CO₂ – Dióxido de Carbono

°C – Graus Celsius

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

Fluo-3 – Fluo 3 Acetoxymethyl

g - Grama

HEPES – Ácido 4-(2-hidroxiethyl) -1-piperazina etanosulfônico

IgA – Imunoglobulina A

MCF-7 – Células de adenocarcinoma mamário

mL – Mililitro

MN – Mononucleares

nm - Nanômetros

Na₂SO₄ – Sulfato de Sódio

PEG – Polietilenoglicol

Pa – Pascal

Pa.s – Pascal por segundo

PI – Iodeto de Propídeo

PBS – Tampão Fosfato Salino

Rpm – Rotações por minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SFB – Soro Fetal Bovino

µL - Microlitros

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Polímeros.....	19
2.2. Plantas Medicinais.....	20
2.3. Células tumorais.....	25
2.4. Análise Reológica.....	27
2.5. Ensaio Biológicos por Citometria de Fluxo.....	31
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo geral.	36
3.2. Objetivos específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Sujeitos.	37
4.2. Preparação da microesfera de Polietilenoglicol (PEG).....	37
4.3. Preparação do composto “Mais Vida”	37
4.3.1 Processo de alcoolatura.....	38
4.3.2 Processo de Rotaevaporação.....	38
4.4. Adsorção do composto “Mais Vida” à microesfera de Polietilenoglicol (PEG).	39
4.5. Caracterização Reológica.....	39
4.6. Separação das células do sangue.....	40
4.7 Linhagens de células tumorais e cultura.....	40
4.8. Viabilidade Celular.....	421
4.9 Ensaio de Apoptose.....	42
4.10. Liberação de Cálcio Intracelular pelos fagócitos do sangue periférico humano.	42
4.11 Análise Estatística.....	43
5. RESULTADOS	44
5.1. Características reológicas.	44
5.2. Viabilidade Celular.....	52
5.3. Ensaio de Apoptose.	59
5.4. Liberação de Cálcio Intracelular.	61
6. DISCUSSÃO	655
7. CONCLUSÕES.....	733
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	744
9. Apêndice	88
10. Anexo	89

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais sempre foram objetos de estudos na tentativa de descobrir novas fontes de princípios ativos. Trabalhos utilizando princípios ativos em sistemas de liberação modificada tem mostrado resultados promissores capazes de potencializar ou estimular respostas imunológicas. Estes sistemas têm se mostrado promissores no tratamento de doenças humanas (CORRÊA et al., 2006; FRANÇA et al., 2010; REINAQUE et al., 2012; PESSOA et al., 2015; LANES et al., 2016).

Dentre estes sistemas de liberação modificada destaca-se o Polietilenoglicol (PEG). Um polímero que apresenta propriedades farmacológicas importantes para modulação e prolongamento de ação de fármacos. As microesferas de Polietilenoglicol possuem propriedades de adsorção em compostos orgânicos e podem modificar e melhorar as funções biológicas (HARRIS; CHESS, 2003), e a adsorção de fitoterápicos ao PEG tem sido uma alternativa no tratamento de várias doenças.

O conhecimento sobre as plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos no Brasil e no mundo. O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação do potencial terapêutico dos vegetais, utilizados com frequência, devidos aos efeitos medicinais que produzem, apesar de a maioria não terem seus constituintes químicos estudados (MACIEL, PINTO; VEIGA JÚNIOR, 2002).

Dentre as plantas medicinais utilizadas como recurso terapêutico por muitas comunidades, destaca-se uma mistura de sete plantas denominada composto “Mais Vida”.

O composto “Mais Vida” inclui a preparação do extrato das plantas Babaçu (*Orbignia martiana* Rodr.), Ipê Roxo (*Tabebuia avellanedae* L. G.), Bardana (*Arctium lappa* L.), Rosa (*Rosa centifolia* L.), Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.), Boldo Baiano (*Vernonia condensata* Baker), Tuia (*Thuja occidentalis* L.). O composto “Mais Vida” tem sido utilizado como potente imunoestimulador, capaz de ativar a produção do ânion superóxido pelos fagócitos do sangue humano (CORRÊA et al., 2006; FRANÇA et al., 2010) e tem se mostrado útil para a melhoria das respostas imunológicas,

aumento da atividade celular e redução de infecções (REINAQUE et al., 2012), bem como tem sido utilizado popularmente como adjuvante no tratamento de pacientes com câncer.

Entre os diferentes tipos de câncer, o de mama é um dos mais frequentes entre as mulheres e apresenta distribuição mundial. Estudos revelam que tanto o câncer de mama bem como outros tipos de cânceres, possuem alta heterogeneidade no que se refere aos tipos celulares e suas origens no interior dos tecidos. Essa diversidade se estende à desregulação de muitas vias como processos de proliferação e diferenciação (KREEGER et al., 2010).

A linhagem de células MCF-7 de adenocarcinoma mamário são amplamente utilizadas como modelo de estudo de câncer de mama, e são resistentes a uma variedade de drogas (SIMSTEIN et al., 2003; JÄNICKE, 2009). Estudos utilizando o hormônio melatonina e anticorpo IgA do tipo secretória extraída do leite humano adsorvidas a microesferas de PEG tem mostrado que a liberação modificada deste composto foi capaz de reduzir a viabilidade e induzir apoptose em linhagens de células MCF-7 (FRANÇA et al., 2015; FRANÇA et al., 2016), porém não se conhece os efeitos do composto “Mais Vida” sobre as células MCF-7. Considerando que este composto é utilizado popularmente para o tratamento de tumores, e que a liberação modificada de drogas e fitoterápicos é capaz de prolongar o tempo de exposição dos mesmos no organismo, é possível que o composto “Mais Vida” associado a microesfera de PEG exerça efeitos na sobrevivência de células tumorais.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos imunomoduladores do composto “Mais Vida” adsorvida a microesferas de PEG sobre linhagens de células de adenocarcinoma de mama (MCF-7).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Polímeros

O termo “polímero” é de origem grega, onde poli significa muitos e meros partes, ou seja, muitas partes. São macromoléculas caracterizadas pela repetição de um ou mais átomos ou grupos de átomos, fornecendo um conjunto de propriedades através das ligações entre si, não variando com adição ou remoção de uma ou mais unidades constituintes (ANDRADE et al., 2002). São empregados em preparações de medicamentos e em diversas áreas, por serem versáteis (VILLANOVA; ORÉFICE, 2010).

São considerados veículos de transporte de nanopartículas, podendo ser naturais ou sintéticos (YAM et al., 2011). Os polímeros naturais são encontrados na natureza, e os polímeros sintéticos são compostos orgânicos obtidos através da reação de polimerização de moléculas simples (SALVADOR, 2000). Dentre os polímeros sintéticos se destaca o polietilenoglicol (PEG).

O polietilenoglicol é um polímero caracterizado como um líquido viscoso, límpido, incolor, hidrofílico e higroscópico, sendo solúvel em água, etanol e acetona, muito utilizado na área farmacêutica, pois são importantes para modulação, prolongamento da ação da droga e não apresenta efeitos tóxicos (HARRIS; CHESS, 2003). Além disso, possui propriedades que podem melhorar a biocompatibilidade dos materiais de sangue e fluidos biológicos (HUANG, Y.Y.; CHUNG, T.W.; TZENG T.W. 1999; PARK, S.J.; KIM, S.H. 2004).

Para a aplicação na terapia humana de produtos biofarmacêuticos é utilizado a técnica de "PEGylation", onde ocorre o acoplamento covalente de polietilenoglicol às cadeias dos fármacos (DAVIS, 2002; ABUCHOWSKI et al., 1977). Este processo protege a formulação farmacêutica da sua superfície para a periferia. Assim, a estabilidade destes conjugados contra proteases aumenta, reduz a imunogenicidade e diminuiu a excreção renal. Com isso, a técnica “PEGylation” assegura uma meia-vida prolongada, reduz os efeitos secundários e, finalmente, aumenta a eficiência da terapia (DAVIS, 2002; ABUCHOWSKI et al., 1977).

Vários polímeros vêm sendo testados para esta finalidade, mas o polietilenoglicol é o mais utilizado devido suas propriedades biocompatíveis em sistemas biológicos e baixo custo de produção para as indústrias farmacêuticas (DAVIS, 2002; ABUCHOWSKI et al., 1977).

A primeira droga comercialmente produzida a base de polietilenoglicol foi o ADAGEN® (adenosina-desaminase), utilizada para tratamento de uma deficiência imunológica combinada grave (SCID) (VELLARD, 2003). Também outros produtos vêm sendo desenvolvidos como o interferon alfa (PEGasys®, PEG-Intron®), o hormônio do crescimento (Somavert®), a asparaginase (Oncaspar®), a camptocina e a insulina. A Associação do polietilenoglicol a estes fármacos foi capaz de prolongar o tempo da biodisponibilidade quando comparado ao fármaco livre, e potencializou a ação farmacológica (JEVSĚVAR et al., 2010).

Proteínas associadas ao polietilenoglicol são importantes biofármacos. Algumas citocinas como o interferon são utilizadas em formulações como o PEG-Interferon α -2b e PEG-Interferon α -2a (REDDY, 2002), que são usados para o tratamento de infecções virais, capazes de modular a resposta imunológica do indivíduo.

2.2. Plantas Medicinais

O emprego de plantas com fins medicinais, desde tempos remotos, são utilizados tanto para prevenção como para o tratamento de doenças, e representa um importante recurso terapêutico (VEIGA JÚNIOR, PINTO; MACIEL, 2005).

As plantas sempre foram objetos de estudos na tentativa de descobrir novas fontes terapêuticas eficazes, baseadas na cultura popular ou cientificamente validadas como medicinais (LORENZI et al., 2002). Estudos relatam que as plantas estão sendo utilizadas para estimular células, podendo atuar como forma alternativa no tratamento de certas doenças (CORRÊA et al., 2006; FRANÇA et al., 2010).

Substâncias químicas isoladas de plantas que apresentam atividades terapêuticas e os extratos brutos de plantas usadas na medicina popular, testados *in vivo* e *in vitro*, demonstraram efeitos antibacteriano,

antimicrobiano, anti-helmíntico, anti-séptico, anti-inflamatório e imunomodulador (SENEL; MCCLURE, 2004; TREVISAN et al., 2006).

Na cultura popular, uma mistura de sete plantas está sendo muito utilizada e estudo revelou que este composto pode potencializar respostas imunológicas, atuando no aumento da atividade celular e na redução de infecções (REINAQUE et al., 2012). Esta mistura denominada composto “Mais Vida” inclui a preparação do extrato das plantas que é composta por 75% das folhas secas de Babaçu (*Orbignia martiana* Rodr.), 2% da entre casca de Ipê Roxo (*Tabebuia avellanedae* L.G.), 4% de folhas de Bardana (*Arctium lappa* L.), 5% das pétalas de Rosa (*Rosa centifolia* L.), 5% de folhas de Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.), 5% de folhas de Boldo Baiano (*Vernonia condensata* Baker) e por 4% das folhas de Tuia (*Thuja occidentalis* L.) (CORRÊA et al., 2006; FRANÇA et al., 2010) (figura 01).

O babaçu (*Orbignya martiana* Rodr.) é encontrado principalmente nos estados de Goiás, Tocantins, Piauí, Maranhão e em florestas extensas (EMMERICH; LUENGO, 1996). Há relatos da utilização do mesocarpo do Babaçu, no tratamento de obesidade, colite, constipação, inflamações uterinas e alguns tipos de câncer (SILVA; PARENTE, 2001). Estudos relatam a importância de algumas propriedades terapêuticas do Babaçu, tais como antitireoidiana (GAITAN et al., 1994), antimicrobiana (CAETANO et al., 2002), antitrombótica (AZEVEDO, 2007), anti-inflamatório (SILVA; PARENTE, 2001), cicatrizante (MARTINS et al., 2006) e gastro-protetora (BATISTA et al., 2006).

A Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.) é um arbusto perene, com crescimento lento podendo atingir cinco metros de altura, pertencente à família Celastraceae (DUARTE; DEBUR, 2005) e é uma espécie nativa da região Sul do Brasil (CIPRIANI, 2007). É utilizada popularmente no tratamento de problemas do trato gastrointestinal, tais como gastrite crônica, indigestão, dispepsia e úlceras (LORENZI; MATOS, 2002) e no tratamento de alguns tipos de câncer (FOX, 1991). Foi relatada a importância de algumas de suas propriedades como antioxidante (MARIOT; BARBIERI, 2007), anti-inflamatória, antiulcerogênica (JORGE, 2004; FERREIRA, 2004) e antifúngica (PORTILLO, 2001).

A Rosa Branca (*Rosa centifolia* L.), pertencente à família Rosaceae é encontrada tanto em áreas desérticas e de clima extremamente quente como os desertos do Irã e do Chaparral Mexicano, como em climas frios próximos do Círculo Polar Norte e grandes altitudes do Tibete. Apresenta algumas propriedades medicinais, anti-inflamatório, anti-séptico, calmante, adstringente, cicatrizante e anti-radicaís livres (LUBBE, 2011).

O Boldo baiano (*Vernonia condensata* Baker) também conhecido popularmente como figatil, pertencente à família Asteraceae é uma planta herbácea, nativa da África tropical e trazida ao Brasil pelos escravos (LOLIS; MILANEZE-GUTIERRE, 2003). Farmacologicamente o extrato de suas folhas possuem propriedades tanto anti-inflamatórias como analgésicas (VALVERDE, 2001).

A Bardana (*Arctium lappa* Linne) pertencente à família Asteraceae, originada da Europa é uma planta perene, mundialmente conhecida e difundida por todo Brasil. Está espécie pode atingir até 2,5 metros de altura e apresenta como características folhas grandes e flores arroxeadas (HOLETZ et al., 2002). Estudos relatam que está espécie possui atividade anti-inflamatória, é sequestrante de radicaís livres e, além disso, inibe a enzima conversora de angiotensina e tem efeito hepatoprotetor na administração crônica de etanol (LIMA et al., 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2006).

O Ipê-Roxo (*Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb), é encontrado em todo o país, desde o Pará e Amazonas até o Rio Grande do Sul, pertence à família Bignoniaceae, podendo atingir 30 metros de altura e 90 cm de diâmetro (LORENZI, 1992). Esta espécie é tradicionalmente utilizada como antiulcerogênico, hipoglicemiante, cicatrizante e depurativo (BYEON et al., 2008). Há comprovações de sua ação como anticoagulante, anti-inflamatória, antibiótica, antifúngica, anticancerígena, adstringente, diurética e laxativa (CHOI et al., 2003; MACHADO et al., 2003; AWALE et al., 2005; BOHLER et al., 2008).

A Tuia (*Thuja occidentalis* L.) é uma planta arbórea, originada no sul do Canadá e nordeste dos Estados Unidos que pertence à família Cupressaceae e é uma espécie exótica no Brasil bastante utilizada em paisagismos (BIONDI; LEAL, 2008). Farmacologicamente suas propriedades têm sido utilizadas em numerosos modelos, demonstrando atividades

antivirais e imunostimuladoras, além de serem muito utilizadas na homeopatia e fitoterapia (NASER et al., 2005).



Orbignya martiana
(Babaçu)

Maytenus ilicifolia
(Espinheira Santa)

Rosa centifolia
(Rosa)

Vernonia condensata
(Boldo Baiano)



Arctium lappa
(Bardana)

Tabebuia avellanedae
(Ipê-Roxo)

Thuja occidentalis
(Tuia)

Figura 01. Plantas que compõem o composto “Mais Vida” (LORENZI et al., 2002).

Estudos relatam que o composto “Mais Vida” está sendo considerado um potente estimulador, pois aumenta a produção do ânion superóxido pelos fagócitos do sangue humano, modula a atividade funcional de células humanas, ativa os mecanismos oxidativos celulares e o sistema imunológico (CORRÊA et al., 2006; FRANÇA et al., 2010).

O termo imunomodulação, refere-se na capacidade do sistema imunológico em modificar suas funções biológicas (MAKARE et al., 2001). As substâncias responsáveis pela imunomodulação são denominadas

imunomoduladores e estes possuem origem variada, podendo ser endógena ou exógena, tais como produtos microbianos, substâncias sintéticas, plantas medicinais (BLECHA, 2001; REINAQUE et al., 2012; SCHERER et al., 2011; FRANÇA et al., 2014), anticorpos (HONORIO-FRANÇA et al., 2001; FRANÇA et al., 2011) hormônios (FAGUNDES et al., 2012; HARA et al., 2013) e citocinas (FAGUNDES et al., 2013).

O composto “Mais Vida” segundo estudos realizados sobre sua triagem fitoquímica (REINAQUE, 2012) revela que alguns metabólitos secundários como, por exemplo, da classe dos taninos e flavonoides, são capazes de ativar o sistema imunológico e revelaram-se efetivos na ação dos processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Tabela 01: Triagem fitoquímica do composto “Mais Vida”.

Grupo Químico	Composto Fitoterápico
Taninos	++
Leucoantocianidinas e Taninos Catéquicos	++
Fenóis	+
Antocianinas, Antocianidinas, Chalconas e Auronas	+
Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas	+
Triterpenoides	+
Saponinas	+
Alcalóides	-
Compostos Quaternários	-

(++) reação fortemente positiva (+) reação positiva (-) reação negativa

(REINAQUE, 2012)

Um importante trabalho pioneiro utilizando microesferas de PEG adsorvidas ao composto “Mais Vida” relatou que as microesferas internalizadas pelos fagócitos foram capazes de estimular a liberação de ânion superóxido, a fagocitose e a atividade microbicida (REINAQUE et al., 2012). Além disso, as microesferas não alteraram a ação imunoestimulatória do composto, confirmando propriedades de inércia química do material (POLLETO et al., 2008A; VERONESE et al., 2005). Portanto, esse sistema

possivelmente pode ser utilizado para uma variedade de terapias a base de plantas e pode funcionar como um mecanismo adicional no tratamento de infecções (REINAQUE et al., 2012). É possível que este fitoterápico adsorvido em microesferas de PEG também possa atuar na sobrevivência de células tumorais.

2.3. Células tumorais

A divisão celular é regulada por fatores de crescimento extracelulares, proteínas que levam as células em repouso a se dividirem, ou até mesmo, em alguns casos a se diferenciar. Nas células tumorais a divisão celular ocorre de maneira descontrolada, e o câncer pode ser originado através dos defeitos na síntese, na regulação ou no reconhecimento dos fatores de crescimento (NELSON, 2002), sendo caracterizado como uma doença de múltiplos estágios, sendo os principais estágios iniciação, promoção e progressão (POLLOCK, 2006).

Iniciação é o estágio onde acontecem as mutações em células-tronco, devido a fatores como: exposição a carcinógenos, como compostos químicos, radiações X ou ultravioletas ou a vírus que alteram irreversivelmente a composição ou estrutura básica do DNA, iniciando assim o câncer. Neste estágio alguns eventos podem ser revertidos por mecanismos de reparo do DNA (POLLOCK, 2006).

Promoção é o estágio onde o câncer envolve a expansão clonal seletiva, a alteração da expressão do gene e a proliferação das células que sofreram iniciação. Este estágio é caracterizado pela reversibilidade (POLLOCK, 2006).

Progressão é o estágio caracterizado por desprendimento de células da massa, alterações moleculares adicionais, movimento na direção de tecidos e órgãos adjacentes e a penetração de células neoplásicas individuais no sistema circulatório, sendo transportada e aprisionada em órgãos e tecidos distantes, ocorrendo a metástase (POLLOCK, 2006).

A partir do século XX, o câncer teve um aumento relevante em todo mundo, sendo considerado um dos problemas de saúde pública mais

importante tanto nos países desenvolvidos como nos que estão em desenvolvimento (GUERRA et al., 2005).

Com os avanços científicos e tecnológicos somado a melhoras nos diagnósticos e tratamentos foi possível a cura de várias doenças, inclusive de alguns tipos de câncer, prolongando a sobrevida dos pacientes. Fato este interessante, pois contribuiu para a diminuição da mortalidade das doenças controláveis. Estes avanços, apesar de terem prolongado a sobrevida, podem gerar maiores sofrimentos devido aos efeitos adversos dos tratamentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2005).

O câncer de mama é um dos mais frequentes entre as mulheres em todo o mundo. Estudos revelam que tanto o câncer de mama bem como outros tipos de cânceres, possuem alta heterogeneidade no que se refere aos tipos celulares e suas origens no interior dos tecidos. Essa diversidade se estende à ausência de regulação de proliferação e diferenciação celular (KREEGER et al., 2010).

O câncer de mama possui uma etiologia variada, sendo influenciada tanto por fatores genéticos como por fatores ambientais (ELLSWORTH et al., 2010). A origem ocorre por mutações em células epiteliais constituintes dos túbulos e lóbulos mamários (TIEZZ, 2009).

As células MCF-7 provenientes de uma linhagem de adenocarcinoma mamário são utilizadas como modelo de estudo de câncer de mama. Estas células são resistentes a uma variedade de drogas e não expressam caspases-3 (SIMSTEIN et al., 2003; JÄNICKE, 2009). Caspases são proteases de cisteína que formam um sistema proteolítico central para a ativação da apoptose. Estas enzimas participam de uma cascata, que é desencadeada em resposta a sinais proapoptóticos e geram clivagem de um conjunto de proteínas, resultando na morte celular (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998).

No entanto, trabalhos relatam que a fragmentação de DNA em MCF-7, pode ocorrer através de mecanismos independentes de caspases 3 ou por outras caspases, que podem ser as responsáveis por essa alteração morfológica (MC GEE et al., 2002; SEMENOV, et al., 2004; GUAN, et al., 2012; ÖZGÜR et al., 2012).

Na literatura, trabalhos com hormônios, em especial com a melatonina revelaram que este hormônio foi capaz de estimular a resposta imunológica, (NETO et al., 2004), mostrando potencial para atuar na atividade antitumoral de células humanas MCF-7 devido ao aumento na liberação intracelular de cálcio e a apoptose (FRANÇA et al., 2015). A ativação de cálcio intracelular e indução de apoptose em células MCF-7 também foram observadas para IgA secretória extraída do colostro humano adsorvida a microesfera de PEG (HONORIO-FRANÇA et al., 2016).

Várias são as pesquisas que associam os efeitos oncostáticos da melatonina, mas seu uso promissor está sendo como adjuvante de outras terapias, ou seja, a maioria dos estudos demonstraram melhoria da qualidade de vida, diminuição dos efeitos tóxicos da quimioterapia e potencialização dos efeitos de outras drogas (NETO et al., 2004).

Levando em consideração toda essa problemática é possível que a interação de um sistema de liberação modificada de polietilenoglicol (PEG) associado ao composto “Mais Vida” possa influenciar na sobrevivência de células tumorais, podendo ser um novo material funcional que possa atuar sobre as células tumorais.

2.4. Análise Reológica

Para o estabelecimento de um material funcional com a finalidade de administração e uso humano há necessidade de uma caracterização entre os possíveis efeitos que este poderia gerar quando em contato com os tecidos ou com a circulação sanguínea. Assim, as avaliações reológicas têm se tornado fundamental para verificar as interações e possíveis efeitos adversos que o material funcional possa gerar no sangue.

O termo reologia, deriva da palavra grega rheo “fluxo” e logos “ciência” (AULTON, 2005) e corresponde a “ciência da deformação e fluxo da matéria”, foi definido por Eugene C. Bingham em 1929 (SCOTT, 1974). O estudo da reologia envolve a relação entre a aplicação de uma tensão ou de uma deformação sob a resposta de um material (TATTERSALL; BANFIL, 1983).

A Reologia é o estudo da deformação ou escoamento de um material, quando sofre a ação de uma tensão (LACHMAN et al., 2001) e é essencial para compreender os diferentes fenômenos fundamentais à vida, eficiência dos medicamentos e de seus processos tecnológicos (FERREIRA, 2008; NETZ, 2002).

Na reologia um dos parâmetros mais importantes principalmente na aplicação industrial farmacêutica é a viscosidade (FERREIRA, 2008). No sangue, a viscosidade é reflexo do comportamento reológico que é dependente de seus componentes (células e plasma) e de suas interações (CHEIN, 1981).

A viscosidade é a propriedade que mede a resistência do material para fluir. Assim, quanto maior for a viscosidade do material, maior será sua resistência para fluir (DARR, 1979). Na reologia, para que um material flua, é exercida sobre ele uma força chamada de tensão de cisalhamento (T), que produz um gradiente de velocidade chamado de gradiente de cisalhamento, taxa de cisalhamento ou velocidade de deformação (D). Esta é dependente da resistência interna da substância, ou seja, de sua viscosidade (N) (RIBEIRO et al., 1999).

O processo de caracterização de materiais envolve várias etapas, sendo de fundamental importância a avaliação do comportamento reológico para obtenção de informações sobre suas estruturas. O estudo do comportamento reológico fornece dados como área de histerese, tensões e taxas de cisalhamento sustentado pelo material e viscosidade (DRAKE, 2007; LEITE et al., 2013).

Na viscosidade, conforme suas propriedades de deformação e fluidez, os materiais caracterizam-se reologicamente em newtonianos e não newtonianos (DARR, 1979).

Os fluidos newtonianos satisfazem a relação de proporcionalidade proposta por Isaac Newton, ou seja, apresentam relação constante entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento (MASSEY, 2002).

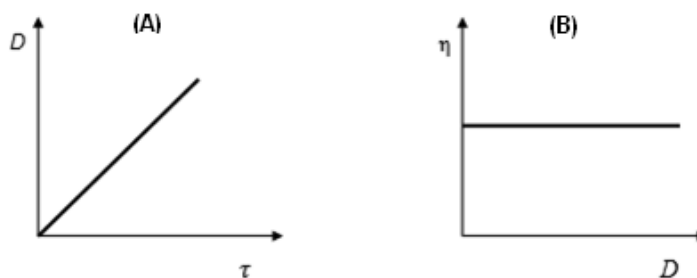


Figura 02. Características gerais dos sistemas newtonianos. O gráfico A relaciona a taxa de cisalhamento (D) e a tensão de cisalhamento, enquanto o gráfico B relaciona a viscosidade e a taxa de cisalhamento (D) (LAHOUD; CAMPOS, 2010).

Os fluidos não newtonianos exibem uma relação não linear em relação à tensão e taxa de cisalhamento. Assim a viscosidade dos fluidos depende de outros fatores, como: tempo de repouso, estrutura da substância, forma de preparo, entre outras características dos fluidos que levam o quociente entre a tensão e a taxa de cisalhamento não ser uma constante (FERREIRA, 2008; AULTON, 2005). Os fluidos não newtonianos, de acordo com seu comportamento classificam em três grupos principais: pseudoplástico, plástico ou de Bingham e dilatantes (ALMEIDA; BAHIA, 2003). Estes comportamentos são classificados como independentes do tempo (TATTERSALL; BANFILL, 1983).

- a) **Comportamento pseudoplástico:** o reograma forma uma curva a partir de uma origem zero e a relação entre tensão e taxa de cisalhamento é não linear em qualquer parte da curva (MASSEY, 2002). Desta forma a viscosidade destes materiais diminui com o aumento da taxa de cisalhamento (NETZ, 2002).

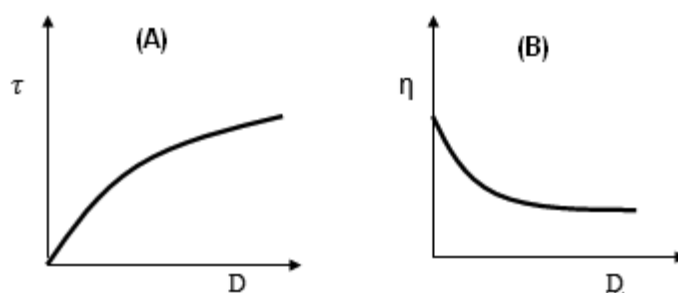


Figura 03. Reogramas representando comportamento pseudoplástico (LAHOUD; CAMPOS, 2010).

- b) **Comportamento plástico ou de Bingham:** é caracterizado por materiais que se apresentam como sólidos até que seja exercida uma tensão mínima, tornando-se linear através da relação entre tensão e taxa de cisalhamento (SCHRAMM, 2006).

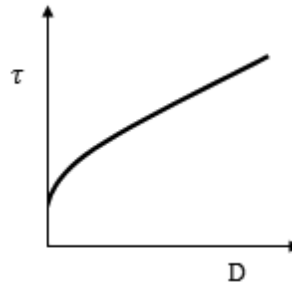


Figura 04. Caracterização dos fluidos plásticos (LAHOUD; CAMPOS, 2010).

- c) **Comportamento dilatante:** a viscosidade aumenta continuamente com o aumento da taxa de cisalhamento (AULTON, 2005).

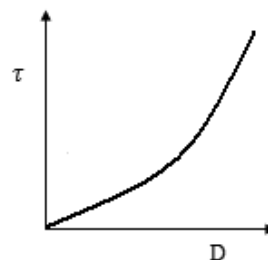


Figura 05. Comportamento característico de fluxo dilatante (LAHOUD; CAMPOS, 2010).

Os fluidos não newtonianos apresentam comportamentos que são classificados como dependentes do tempo (FOX; McDONALD, 1998).

- a) **Comportamentos tixotrópicos:** quando os fluidos diminuem a viscosidade com o tempo a uma taxa de cisalhamento constante.
- b) **Comportamentos reopéticos:** quando os fluidos aumentam a viscosidade com o tempo a uma taxa de cisalhamento constante.

As curvas de fluxo apresentam um parâmetro reológico de grande relevância, o valor da área de histerese entre as curvas. A área de histerese

é a curva originada que indicará a ocorrência de uma quebra na estrutura da substância sob ação do cisalhamento e é usada como índice do grau desta quebra (AULTON, 2005; MASSEY, 2002).

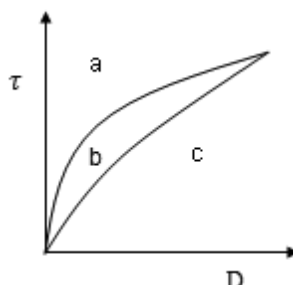


Figura 06. Reograma produzido por um material tixotrópico pseudoplástico, onde (a) representa a curva ascendente, (c) representa a curva descendente e (b) a área de histerese (LAHOUD; CAMPOS, 2010).

Os ensaios reológicos relacionados à área de histerese fornecem duas informações fundamentais: quanto menor a área de histerese (área entre as curvas ascendentes e descendentes), maior a eficiência da dispersão e segundo, o perfil da curva de cisalhamento indica a natureza reológica do material (PILEGGI, 2001).

Na área farmacêutica, estudos tanto com drogas, com fitoterápicos, a avaliação do comportamento reológico de produtos naturais, bem como dos veículos que controlam a liberação, se torna importante no sentido de verificar a facilidade com que o produto pode ser escoado de um frasco ou ser espalhado sobre a pele quando submetido à ação de uma força, além de proporcionar dados pertinentes à estrutura do produto e permitir o acompanhamento das modificações decorrentes dos processos de desestabilização (TADROS et al., 2004). Assim, conhecer as características reológicas do composto “Mais vida” adsorvido à microesferas de PEG em contato com o sangue se torna fundamental e poderá fornecer informações importantes para a validação deste material.

2.5. Ensaio Biológicos por Citometria de Fluxo

Além da reologia a citometria de fluxo também tem se tornado uma ferramenta importante na caracterização de materiais funcionais (SHERER

et al., 2011; FAGUNDES et al., 2012; REINAQUE et al., 2012, CÔRTEZ et al., 2013).

A citometria de fluxo surgiu na década de 90 e exibiu melhorias e progressos na área de Ciências Biológicas. No final dos anos 50 começou a ser utilizada para contagem e análise das células sanguíneas, proporcionando um considerável crescimento, estimulada pelas áreas da imunologia e da hematologia (CÔRTE-REAL et al., 2002). Sua utilização generalizou-se para outras áreas e em diferentes células, devido ao aprimoramento de citômetros, o descobrimento dos anticorpos monoclonais e novos fluorocromos (LOUREIRO; SANTOS, 2004).

É uma técnica apropriada para avaliar um grande número de células em um curto período de tempo e está sendo considerada promissora como adjuvante ao diagnóstico citológico das neoplasias (GREEN; GRIFFIN, 1996; CIBAS, 1995; FUHR et al., 1992; O'LEARY, 1998). Está sendo amplamente aplicada em laboratórios de pesquisa e em laboratórios clínicos, pois proporciona rapidez, sensibilidade, objetividade e precisão nas análises (NOLAN; MANDY, 2006; QUIXABEIRA; SADDI, 2008).

A citometria de fluxo é um método que permite a medida de características físicas e/ou químicas de células ou partículas biológicas, que podem ser marcadas com fluorocromos. É uma técnica na qual as medidas são feitas em um meio líquido, onde as células fluem uma a uma no sistema (SHAPIRO, 1995).

No centro da câmara de fluxo, a qual se encontra preenchida por um fluido envolvente denominado *sheath fluid*, é inserida a suspensão líquida a ser analisada, com uma velocidade muito inferior à do fluido envolvente. Através de um fenômeno físico, denominado focagem hidrodinâmica, as partículas são submetidas a se movimentarem em fluido laminar, uma a uma, no centro do fluxo. O esquema do sistema de focagem hidrodinâmica está apresentado na figura 07 (CARTER; MEYER, 1990; DEAN, 2002; LOUREIRO; SANTOS, 2004).

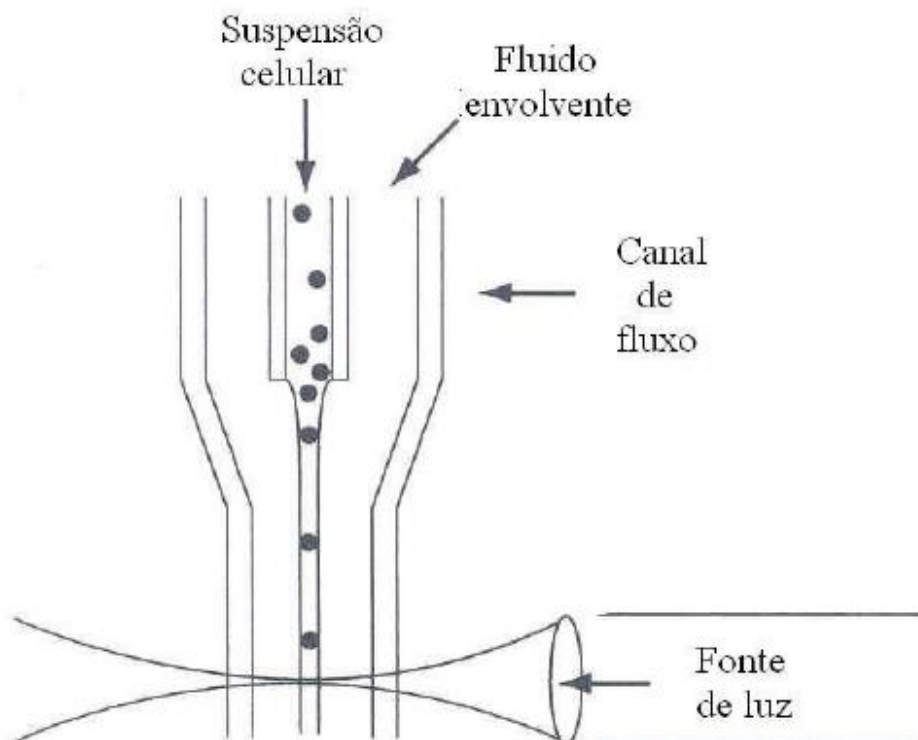


Figura 07. Sistema de focagem hidrodinâmica. A amostra é envolvida por um fluido que confina as células no centro do canal de fluxo, onde o laser incide sobre a suspensão líquida. Modificado de DEAN, N.P. (2002).

O processo de dispersão fotônica e emissão de fluorescência acontecem, à medida que as células da suspensão líquida, marcadas ou não com fluorocromos, são interceptadas por um feixe de luz contínuo (*laser*) (CÔRTE-REAL et al., 2002; DEAN, 2002; LOUREIRO; SANTOS, 2004).

As lentes localizadas adjacentes à zona de interceptação (célula-laser) reúnem a luz dispersa e conduzem-na para os filtros fotomultiplicadores (PMTs), que aumentam e transformam os sinais luminosos em pulsos elétricos, exibindo forma digital (transformação analógico-digital) em escala logarítmica ou linear. Os sinais são transmitidos para o computador, que produz os gráficos (citogramas em dot plot ou histogramas), utilizando programas computacionais exclusivos (CARTER 1990; ORMEROD, 1990; ORFAO et al., 1995; DEAN, 2002).

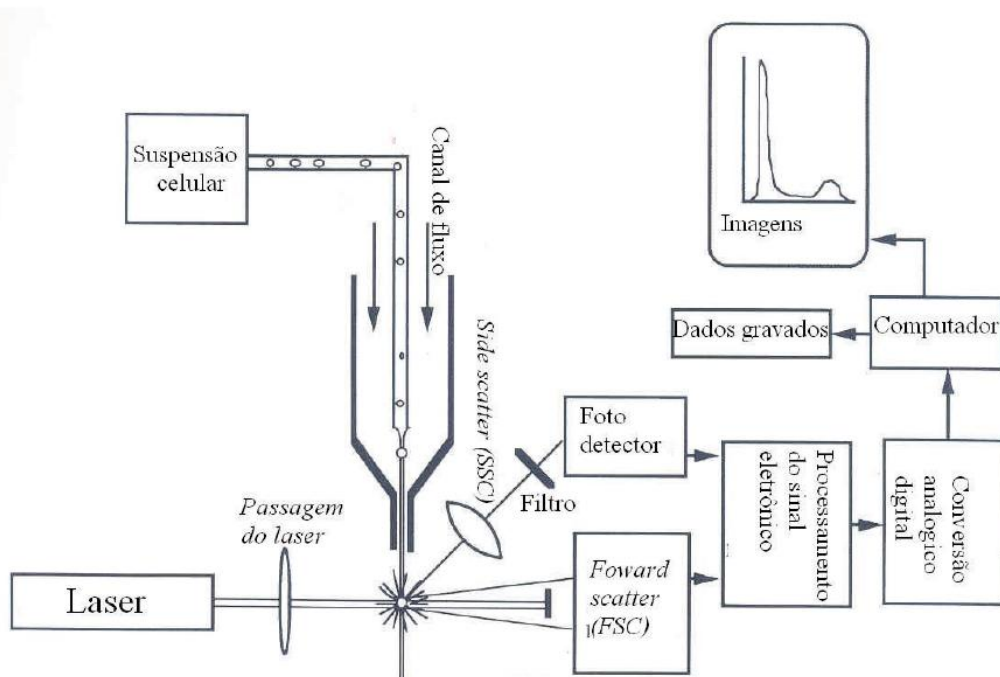


Figura 08. Diagrama esquemático do citômetro de fluxo. Modificado de COON; WEINSTEIN (1991).

Os critérios celulares avaliados pela técnica dividem-se em dois grupos principais: 1) intrínsecos: FSC-*Forward Scatter* que contempla o tamanho celular e SSC- *Side Scatter* a heterogeneidade interna ou a granulosidade e 2) extrínsecos: integração da influência de um ou mais fluorocromos adsorvidos na membrana ou no interior das células.

Os fluorocromos utilizados na marcação celular apresentam, de maneira específica, um modelo espectral distinto de absorção e de emissão de luz. São usados de duas formas: 1) ligação covalente e não covalente do fluorocromo às moléculas que se aglomeram especialmente a componentes celulares e 2) fluorocromos que alteram suas propriedades em função do microambiente que os envolve. Os covalentes são utilizados para sinalizar proteínas, lipídeos ou outras moléculas biológicas (BERTHO et al., 2000).

Os fluorocromos que se interligam não covalentemente contêm composições moleculares especiais, ligando-se a determinados componentes celulares, como por exemplo: 1) marcadores de DNA e RNA, sendo mais comumente utilizado o iodeto de propídeo (PI), 2) marcadores de potencial de membrana como a rodamina e as cianinas (BERTHO et al., 2000).

Marcadores fluorescentes sensíveis ao microambiente são usados para avaliar as características do ambiente em que estão localizados, visto que variam seu espectro de excitação ou emissão perante a aplicação das particularidades do microambiente que os envolve. Podem ser empregados para demarcação de diferentes estados funcionais celulares, como por exemplo: atividade enzimática, Ph, potencial redox, nível de cálcio, polaridade e viscosidade/fluidez (REILLY; BARNETT, 2001). A disponibilidade de fluorocromos exclusivos e suas características são fundamentais para o avanço das aplicações em citometria de fluxo (BERTHO et al., 2000; REILLY; BARNETT, 2001).

A citometria de fluxo é mais comumente aplicada na identificação de linhagens celulares, seguida posteriormente da análise dos ácidos nucleicos. A análise citométrica do conteúdo de DNA demonstra circunstâncias para a regulação da apoptose (BAUER et al., 1993; ARDEN et al., 2007), avaliar a ploidia e atividade proliferativa em tumores, auxiliando nas avaliações de estadiamento, prognóstico e direcionamento terapêutico em diferentes tipos de câncer, como de estômago, tireoide, mama (PRAUSOVA et al., 2007; BANITO et al., 2007) e neoplasias hematológicas (DWORZAK et al., 2008).

O uso da citometria de fluxo se torna fundamental para as análises biológicas, uma vez que utiliza de uma tecnologia capaz de estudar várias características de uma célula de forma rápida e fornece dados de diversos parâmetros. Dentro as aplicações biológicas este método permite gerar informações importantes sobre a proliferação celular, morte por apoptose e liberação de produtos intracelulares, como o cálcio intracelular. Estas informações são extremamente importantes para avaliar o efeito de materiais funcionais sobre células cancerígenas.

Neste contexto, a utilização do método de citometria de fluxo irá contribuir para o melhor entendimento dos efeitos biológicos que o composto “Mais Vida” possa exercer sobre a linhagem de células MCF-7.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral.

Avaliar o efeito antitumoral do composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG) sobre linhagens de células de câncer de mama (MCF-7), bem como o potencial imunomodular deste material sobre células MN do sangue em cocultura com as células MCF-7.

3.2. Objetivos específicos.

- ✓ Caracterizar os parâmetros reológicos do composto “Mais Vida” adsorvida a microesferas de Polietilenoglicol (PEG) em células MN;
- ✓ Analisar a viabilidade de células MN, células MCF-7 e células MN em cocultura com células MCF-7 na presença do composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG);
- ✓ Avaliar a apoptose de células MN, células MCF-7 e de células MN em cocultura com células MCF-7 na presença do composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG);
- ✓ Verificar a liberação de cálcio intracelular de células MN, células MCF-7 e células MN em cocultura com células MCF-7 na presença do composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Sujeitos.

Foram coletadas 12 amostras de sangue periférico humano, por punção venosa, com volume aproximado de 5 mL, de indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 25 e 40 anos, clinicamente saudáveis e que não estavam fazendo o uso de nenhum tipo de medicamento. As amostras foram coletadas no Laboratório de Cronoimunomodulação e Imunologia da Relação Materno - Infantil, da Universidade Federal de Mato Grosso – Campus Araguaia – Unidade Barra do Garças – MT.

Todos os participantes foram informados sobre a pesquisa e as amostras somente foram coletadas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso no Campus Araguaia/UFMT conforme o parecer consubstanciado do CEP nº 1.415.375 de 19 de fevereiro de 2016. (Anexo I).

4.2. Preparação da microesfera de Polietilenoglicol.

As microesferas de PEG foram produzidas de acordo com o método descrito por Scott et al., 2010, com adaptações (SCHERER et al., 2011). Assim, 2 g de PEG 6000 (Synth®) foram diluídas em 100 mL de PBS (Tampão Fosfato Salino), e incubadas por 30 minutos a 37°C em banho-maria. A essa solução foi misturado igual volume de solução de sulfato de sódio (Na_2SO_4) 2% em PBS (Tampão Fosfato Salino), e novamente foi incubado por 45 minutos a 37°C em banho-maria. Após a incubação, a mistura foi diluída em uma proporção de 1:3 em PBS (Tampão Fosfato Salino), centrifugada a 5000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante não foi desprezado. A seguir foi realizado diluição 1:10 (PBS), e incubado por 25 minutos a 37°C em banho-maria. A formação de microesferas foi induzida termicamente, submetendo a solução por 5 minutos a 95°C em banho-maria.

4.3. Preparação do composto “Mais Vida”.

O composto “Mais Vida” contém 75% da folha seca do Babaçu (*Orbignya martiana*), 2% da entre casca do Ipê-Roxo (*Tabebuia avellanedae*), 4% da folha da Bardana (*Arctium lappa*), 5% das pétalas de Rosa Branca (*Rosa centifolia*), 5% da folha da Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*), 5% da folha do Boldo Baiano (*Vernonia condensata*) e 4% da folha da Tuia (*Thuja occidentalis*) (Corrêa et al., 2006). O preparo da mistura envolveu as etapas do processo de alcoolatura e processo de rotaevaporação.

4.3.1 - Processo de alcoolatura.

As alcoolaturas são formas farmacêuticas obtidas pela ação dissolvente do álcool sobre uma ou várias partes vegetais frescas. Foram preparadas de acordo com Código Farmacêutico Brasileiro (Farmacopéia, 1959).

As partes vegetais foram maceradas colocando-as em frascos de vidro de boca larga, sendo 200 g da planta para um litro de álcool 70%. Os frascos foram tampados e a planta em maceração foi deixada por 30 dias em temperatura ambiente. Durante os 10 primeiros dias os vidros foram agitados uma vez ao dia. Após esse período o preparado foi filtrado utilizando filtro de papel.

4.3.2 - Processo de rotaevaporação.

Os extratos são preparações concentradas, obtidas de drogas vegetais ou animais, frescas ou secas, por meio de um dissolvente apropriado, seguido de evaporação total ou parcial e ajustagem do concentrado a padrões previamente estabelecidos. Os extratos foram preparados de acordo com Código Farmacêutico Brasileiro (Farmacopéia, 1959).

Com exceção da Tuia (*Thuja occidentalis*), as amostras foram passadas em rotaevaporador e foram concentradas até a consistência xaroposa, em temperatura de até 40°C. Após os concentrados foram misturados obtendo-se um extrato hidroalcolico misto (aproximadamente

30% de álcool etílico e proporções de plantas citadas acima). Foi utilizado como conservante o Nipagim.

Todas as plantas estão depositadas no Herbário da Reserva Ecocerrado Brasil, Araxá/MG, Brasil, localizada a Latitude 19°36'47, 1" Longitude 47° 08'20, 9", com 939 m de altitude.

4.4. Adsorção do composto “Mais Vida” a microesfera de Polietilenoglicol (PEG).

A adsorção do composto “Mais Vida” a microesferas de PEG foi realizada de acordo com protocolo previamente desenvolvido por Reinaque et al., (2012). As suspensões de microesferas em PBS (Tampão fosfato salino) foram incubadas com o composto “Mais Vida” a 37°C durante 30 minutos no banho-maria.

4.5. Caracterização Reológica.

Os parâmetros reológicos foram medidos no reômetro de modelo: Modular Compact Rheometer - MCR 102 (Anton Paar® GmbH, Ostfildern, Germany) acoplado ao Software Rheoplus V3.61, com controle permanente do gap de medição com suporte TruGap™ em 0,099 mm, célula de medição Toolmaster™ CP 50 e controle preciso da temperatura com recurso T-Ready™.

Para os ensaios foram colocados 600 µL da amostra sobre a superfície da placa de leitura, sendo removido o excesso de amostra.

As curvas de fluxo e de viscosidade foram determinadas sob tensão de cisalhamento (τ), com variação de 0 a 5 Pa para curva ascendente e de 5 a 0 Pa para a curva descendente, sendo assim possível determinar a área de histerese, que representa os níveis de diferença entre a curva ascendente e a descendente. Para fluidos newtonianos o valor da área de histerese é entre 0 e ± 1 Pa.s, um valor menor que -1 Pa.s indica um fluxo não-newtoniano com tixotropia e valores maiores que +1 Pa.s indicam fluxo não-newtoniano com tixotropia do tipo pseudoplástico.

Os ensaios das curvas de fluxo e viscosidade em relação a tensão de cisalhamento foram realizados em temperatura constante de 37°C, e a

presença de tixotropia é um indicativo da característica de não linearidade na curva de viscosidade.

4.6. Separação das células do sangue

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA como anticoagulante. A seguir foi realizada a separação das populações celulares por gradiente de densidade com Ficoll-Paque (Pharmacia Upsala-Suécia), centrifugadas durante 40 minutos a 1500 rpm em temperatura ambiente. Após este período, foi retirado o anel enriquecido de células mononucleares (MN) e lavado por duas vezes com 3mL de PBS. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e foi acrescentado 1mL de PBS. As células foram contadas em câmara de Neubauer e as concentrações celulares ajustadas para 2×10^6 células/mL.

4.7 Linhagens de células tumorais e cultura.

Foram utilizadas linhagens celulares ATCC (American Type Culture Collection, USA) de adenocarcinoma de mama (MCF-7).

As linhagens foram cultivadas e congeladas em nitrogênio líquido para estocagem. Posteriormente foram cultivadas em meio RPMI (Sigma ®), acrescido de HEPES (Sigma ®), penicilina (Sigma ®), estreptomicina (Sigma ®), bicarbonato de sódio (Sigma ®), piruvato de sódio (Sigma ®) e soro fetal bovino (SFB, Sigma ®). As células foram cultivadas em garrafas e mantidas a 5% de CO₂ a temperatura de 37 °C até a formação de monocamada celular, depois as garrafas de células foram submetidas a tripsinização, para isso, as células foram lavadas com 5 mL RPMI, e as linhagens submetidas à 1 mL de tripsina-EDTA (Sigma ®) até o desprendimento das células do fundo das garrafas. A seguir, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio de cultura acrescido de 10% de soro fetal bovino para a neutralização da tripsina. O volume da suspensão celular obtido em uma garrafa foi transferido para outras duas garrafas, de modo a obter quantidade celular adequada para os experimentos.

A seguir foram ajustadas as concentrações de células MCF-7 para 1×10^4 células/mL. A seguir as células foram subcultivadas em meio RPMI acrescido 10% soro bovino fetal em placas com 24 orifícios, na presença ou ausência de 50 μ l do composto “Mais Vida” adsorvido ou não a microesfera de PEG, durante 24 horas a 5% de CO₂ e temperatura de 37 °C. Um controle, foi realizado utilizando células MCF-7 na ausência de tratamento. As células MCF-7 também foram colocadas em cocultura com células MN do sangue (2×10^6 células/mL) e subcultivadas utilizando o mesmo protocolo descrito acima.

Após este período as células MCF-7 em cocultura ou não com células MN do sangue foram novamente tripsinizadas, lavadas duas vezes e submetidas aos ensaios de viabilidade celular, apoptose e liberação de cálcio intracelular.

4.8. Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o método de permeabilidade parcial ao iodeto de propídeo. Foram obtidas suspensões de células individuais a partir de culturas celulares em monocamada ou em suspensão, conforme descrito item anterior. Após as lavagens as células foram incubadas com 5 μ L de solução de iodeto de propídeo por 5 minutos a temperatura ambiente no escuro. A seguir as leituras foram realizadas no citômetro de fluxo (FacsCalibur, BD Bioscience, USA).

Para avaliar o índice de proliferação as células MN e células MCF-7 separadas ou em cocultura foram colocadas em placas de cultura de 24 poços na presença ou não de imunomoduladores adsorvidos ou não a microesfera de PEG, sendo um grupo imediatamente processado (tempo 0 horas) e outro mantido em cultura por 24 horas em estufa CO₂ a 37°C. Após cada período as células foram lavadas e coradas com 10 μ l de solução corante de iodeto de propídeo (440 μ g/mL), Triton X-100 (5,5%) e EDTA (110 mM). Um controle sem corante foi realizado para determinação do branco. A intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de células (WAN et al., 1994). A intensidade de fluorescência foi determinada utilizando citômetro de fluxo (FacsCalibur, BD Bioscience, USA). O número

de células viáveis foi calculado pela diferença entre os tempos (DENGLER et al., 1995). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de proliferação.

4.9. Ensaio de Apoptose

Para o ensaio de apoptose foi utilizado o Kit APO – DIRECT™ (BD Biosciences - USA). Suspensões de células MCF-7 foram colocadas em placas de 24 poços e pré-tratados ou não com composto “Mais Vida” adsorvido ou não a microesfera de PEG e incubadas durante 24 horas (37°C - 5% de CO₂). A seguir, as células MCF-7 foram retiradas das placas e lavadas duas vezes com 1mL de PBS e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. Após este período, as células MCF-7 foram fixadas, ajustadas e posteriormente armazenadas a – 20°C por 12 a 18 h. Posteriormente as células passaram pelo processo de coloração onde foram ressuspensas 1mL das células controle positivo, negativo e todas as outras amostras e centrifugadas por 5 minutos a 2.800 rpm, eliminando o etanol, por aspiração, tendo o cuidado para manter o pellet. Após esta etapa as amostras foram ressuspensas e lavadas duas vezes com 900 µL de tampão de lavagem sendo descartado o sobrenadante, em seguida ressuspendeu cada amostra com 50 µL de solução de DNA, incubou-se por 60 minutos a 37°C na estufa. Após esse período de incubação adicionou-se 900 µL de tampão de lavagem a cada tubo de amostra, centrifugando por 5 minutos a 2800 rpm e posteriormente descartou-se o sobrenadante, em seguida repetiu o procedimento de lavagem por mais uma vez. Após as lavagens o pellet foi ressuspendido em 460 µL de tampão de coloração (Iodeto de propídeo) e as células incubadas no escuro durante 30 minutos a temperatura ambiente e analisadas no Citômetro de Fluxo (FacsCalibur, BD Biosciences, USA).

4.10. Liberação de Cálcio Intracelular pelos fagócitos do sangue periférico humano.

A liberação de cálcio intracelular foi realizada utilizando o cromógeno Fluo-3 (Fluo3-Acetoxymethyl, AM-Sigma, St. Louis, USA). Foram obtidas suspensões de células individuais a partir de culturas celulares em

monocamada ou em suspensão, na presença ou ausência de moduladores, conforme descrito anteriormente.

A seguir a suspensão de células foram centrifugadas duas vezes (1500 rpm, 10 min, 4 °C) ressuspensas em PBS contendo BSA (5 mg/mL) e incubadas com 5 µL de Fluo-3 (1 mg / mL) por 30 min a 37°C. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes em PBS contendo BSA (5 mg/mL; 1500 rpm, 10 min). Após esta etapa as células foram mantidas 4 °C, overnight. Após este período foram analisadas por citometria de fluxo FacsCalibur (BD San Jose EUA). O Fluo-3 foi detectado utilizando-se filtro na faixa de 530/30nm. A quantificação da liberação de cálcio intracelular foi expressa como a média geométrica da intensidade de fluorescência do Fluo-3.

4.11. Análise estatística.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas, teste de Tukey. As estatísticas foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0.05 ($p < 0.05$).

5. RESULTADOS

5.1. Características reológicas.

As curvas de fluxo do sangue normal (SN) e do sangue normal na presença do composto “Mais Vida” (SN+MV) estão apresentadas na Figura 09. Observa-se que o sangue apresenta curva de fluxo não linear em relação à tensão e taxa de cisalhamento, ou seja, comportamento de um fluido não newtoniano. A curva de fluxo do sangue do indivíduo normal não apresentou alterações quando em presença do composto “Mais Vida” (S+MV) e não houve diferença significativa entre as curvas de fluxo do sangue tratado ou não com o modulador.

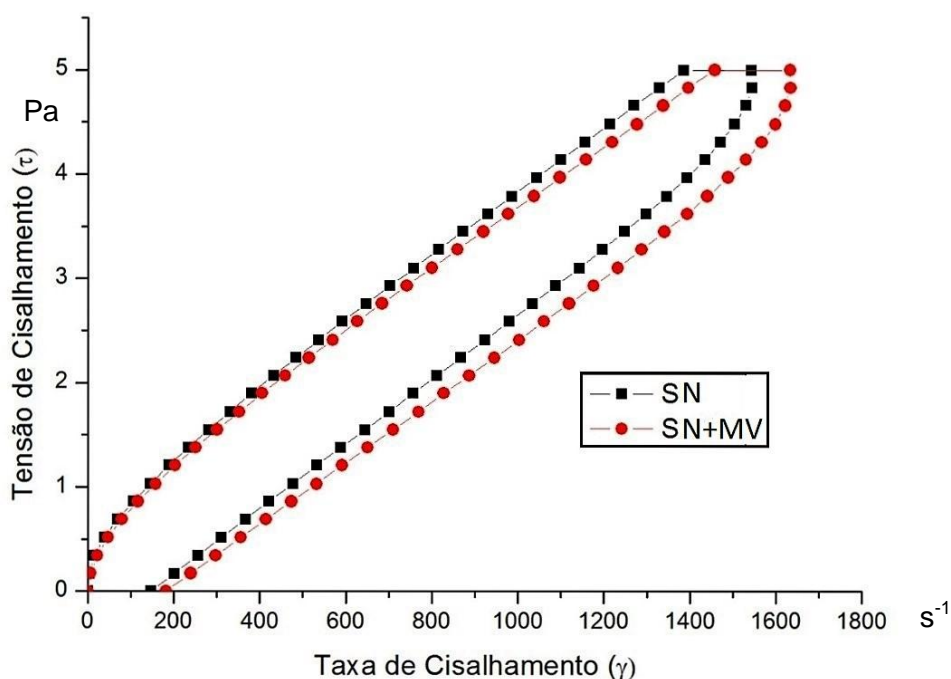


Figura 09. Curva de fluxo do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o composto “Mais Vida” - (SN+MV). Os dados representam a média obtida do sangue de 12 indivíduos. * $p = 0.54$.

As curvas de fluxo do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com a microesfera de Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG) estão apresentadas na Figura 10. Quando em presença da

microesfera de PEG, verificou-se comportamento de fluido não newtoniano, característico do sangue. Não houve diferença significativa entre as curvas de fluxo, e houve sobreposição entre as curvas do sangue tratado com o não tratado.

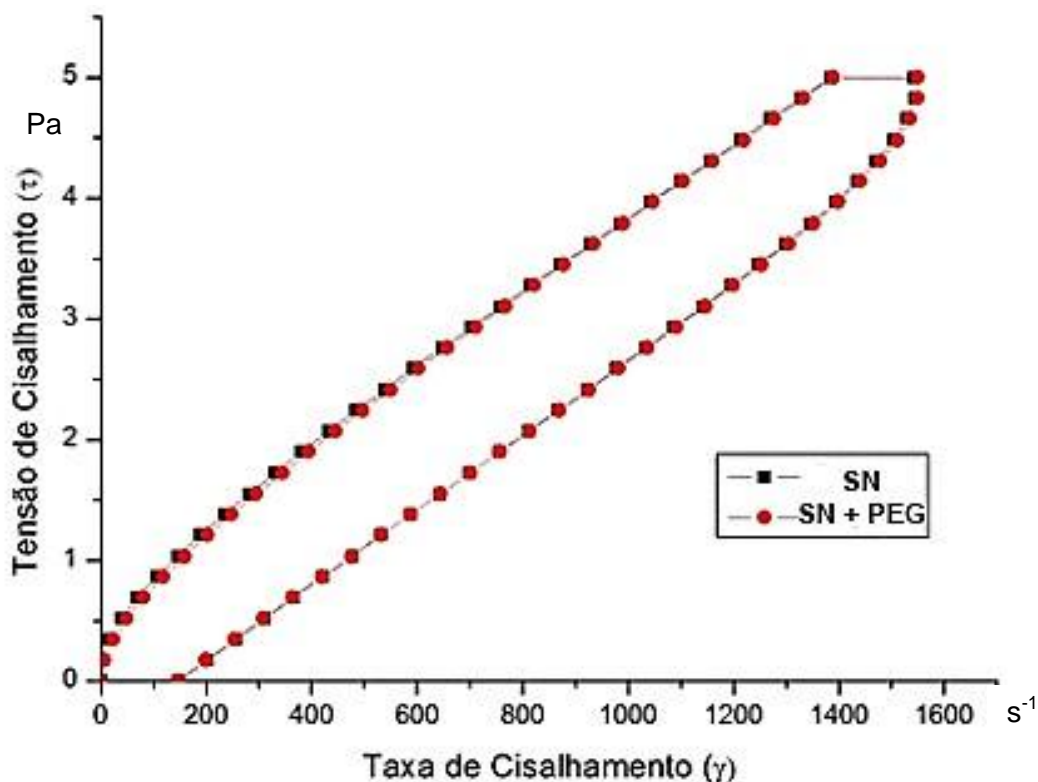


Figura 10. Curva de fluxo do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com microesfera de Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG). Os dados representam a média obtida do sangue de 12 indivíduos. * $p = 0.94$.

As curvas de fluxo do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG+MV), estão apresentadas na Figura 11. A curva de fluxo do sangue tratado com o estímulo do composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de PEG apresentou comportamento característico de um fluido não newtoniano do tipo pseudoplástico e não houve diferença significativa na taxa de cisalhamento.

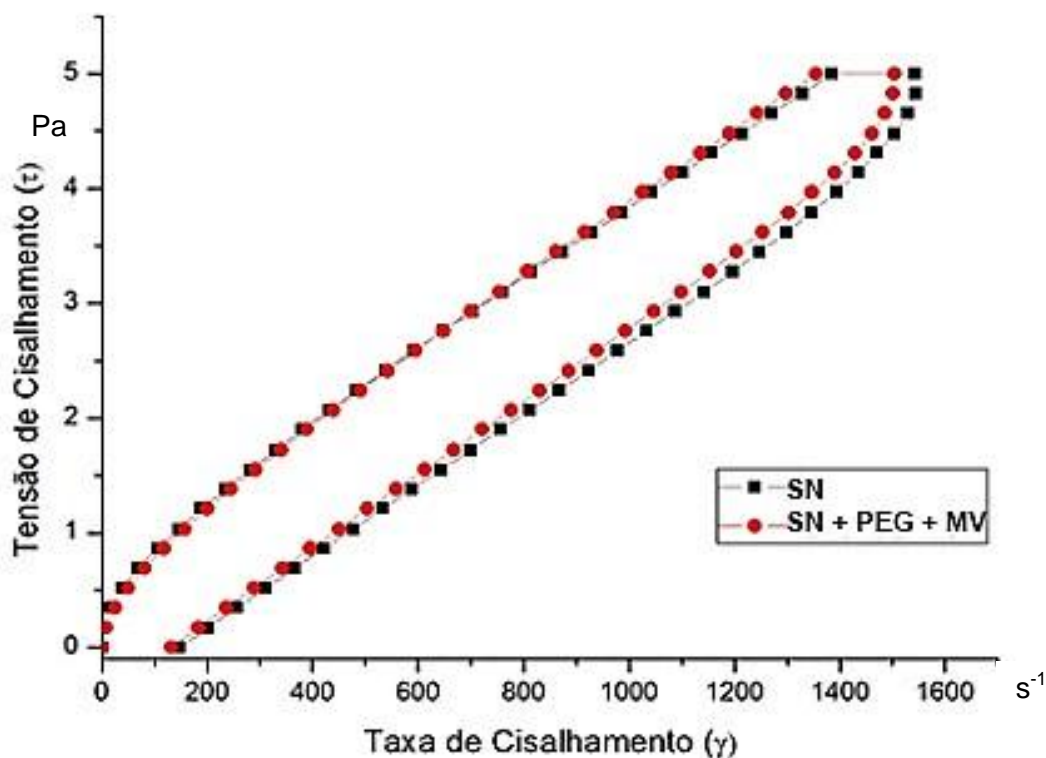


Figura 11. Curva de fluxo do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG+MV). Os dados representam a média obtida do sangue de 12 indivíduos. * $p = 0.82$.

A rampa de temperatura do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o composto “Mais Vida” (SN+MV) estão apresentadas na Figura 12. Observa-se que o sangue tratado com o “Mais Vida” não alterou a viscosidade independente da temperatura, bem como não apresentou diferença significativa na viscosidade sanguínea.

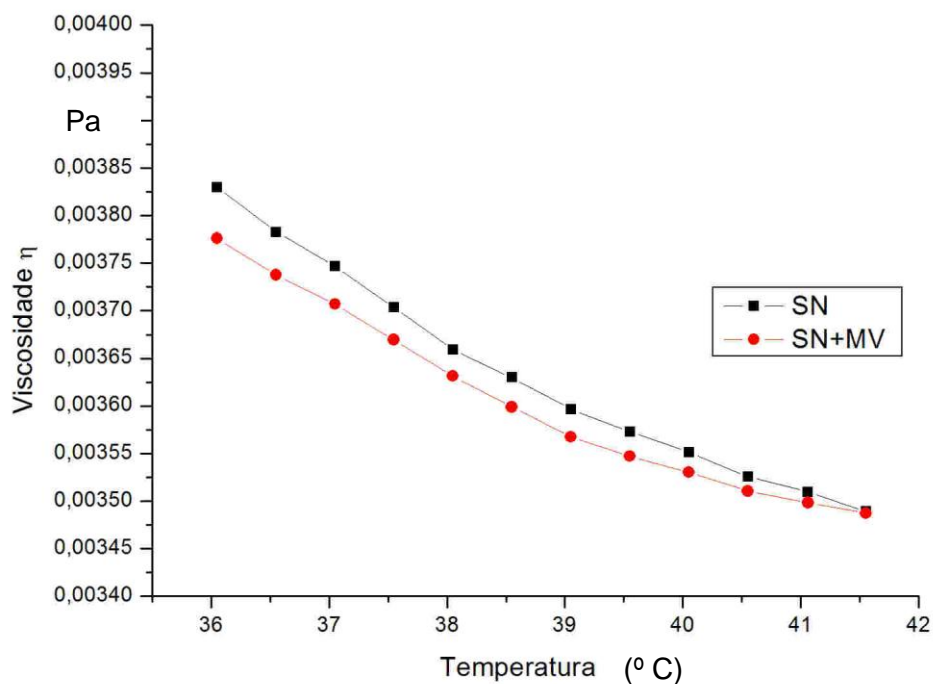


Figura 12. Rampa de temperatura do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o composto “Mais Vida” - (SN+MV). Os dados representam a média obtida do sangue de 12 indivíduos. * $p = 0.46$.

A rampa de temperatura do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG) estão apresentadas na Figura 13. Observou-se que não houve alteração na viscosidade sanguínea quando o sangue normal foi tratado com a microesfera de PEG.

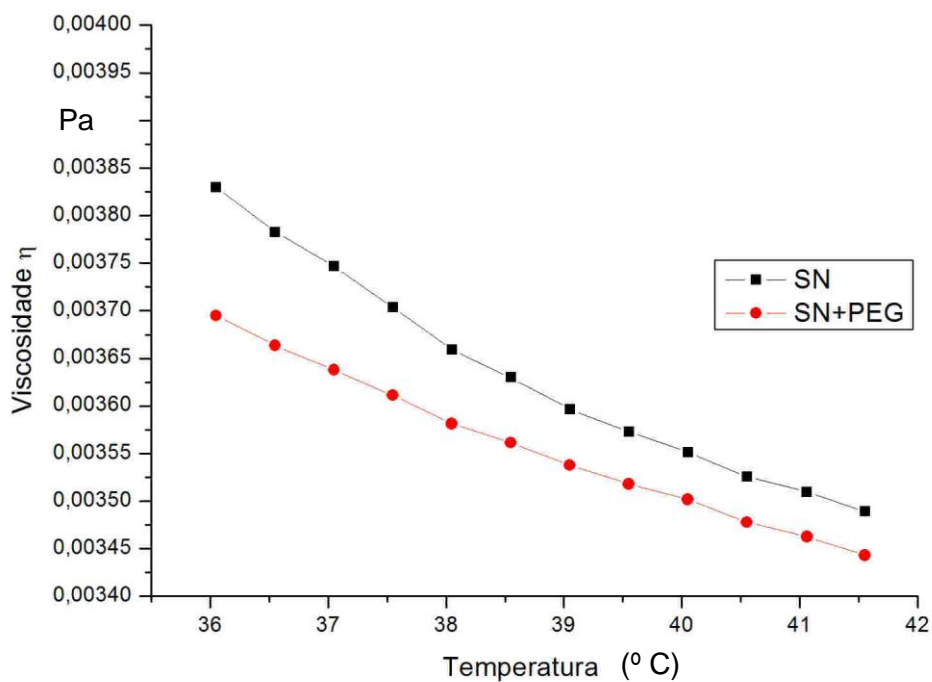


Figura 13. Rampa de temperatura do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com microesfera de Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG). Os dados representam a média obtida do sangue de 12 indivíduos. * $p = 0.27$.

As médias da rampa de temperatura do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG+MV) estão apresentadas na Figura 14. O sangue tratado com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de PEG, independente da temperatura, não apresentou diferença na viscosidade.

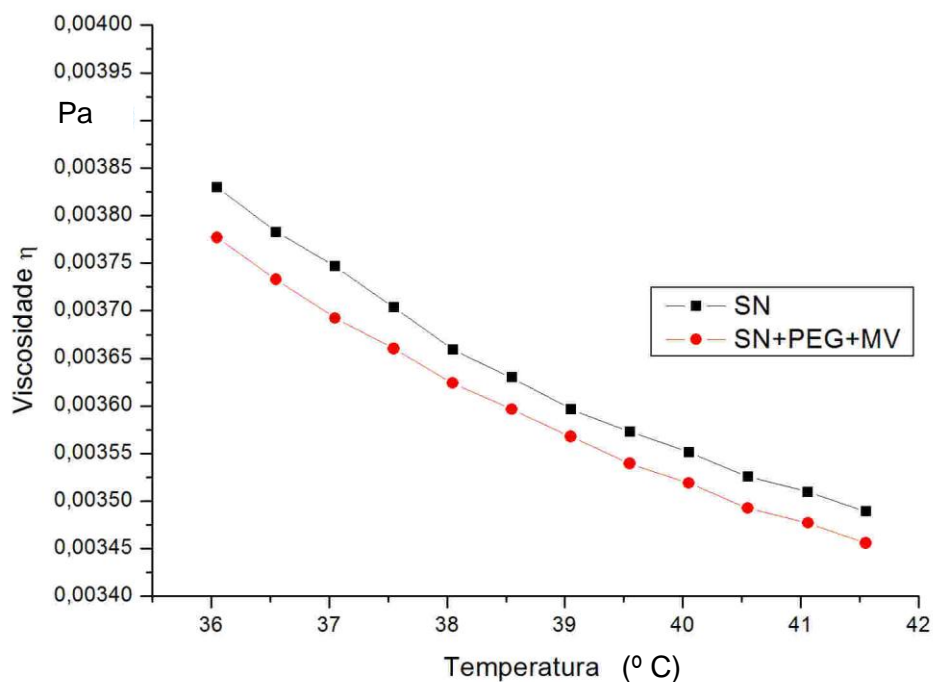


Figura 14. Rampa de temperatura do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG+MV). Os dados representam a média obtida do sangue de 12 indivíduos. * $p = 0.37$.

As curvas de viscosidade do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o composto “Mais Vida” (SN+MV) estão apresentadas na figura 15. Verificou-se que não houve alteração e nem diferença significativa na viscosidade sanguínea, confirmando que o composto “Mais Vida” não interferiu nas propriedades sanguíneas.

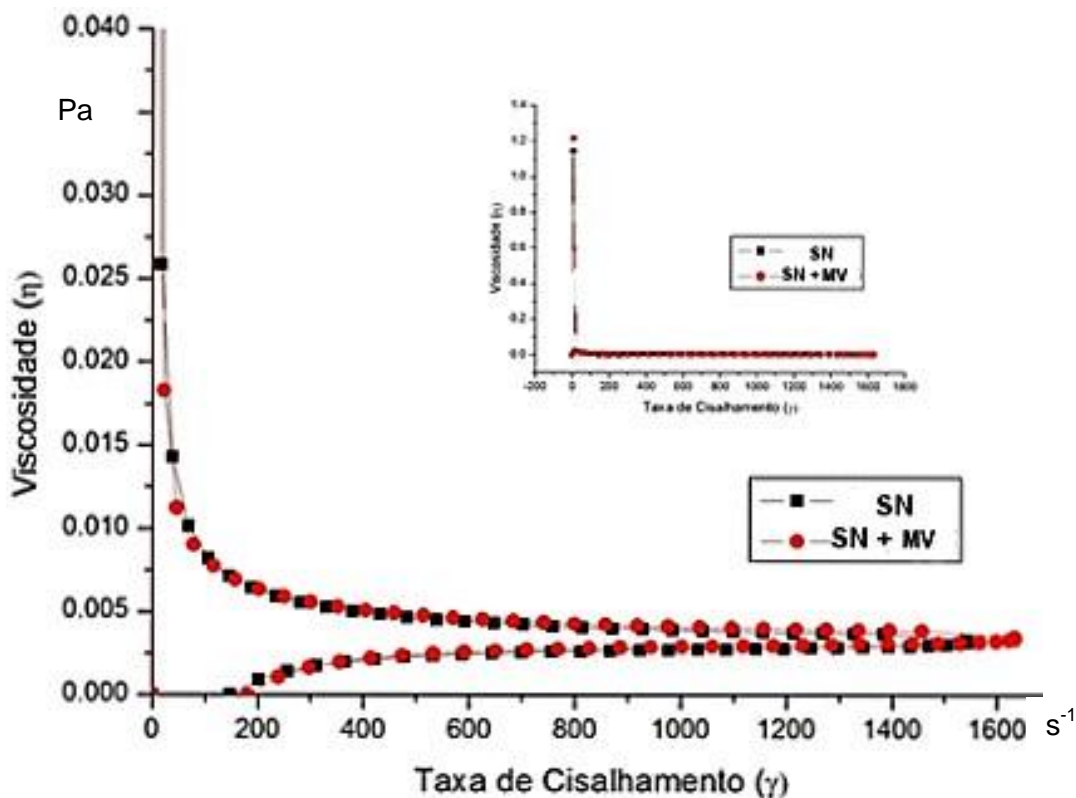


Figura 15. Curva de viscosidade em relação à taxa de cisalhamento do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o composto “Mais Vida” - (SN+MV). Os dados representam a média obtida do sangue de 12 indivíduos. * $p = 0.96$.

As médias das curvas de viscosidade do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG) estão apresentadas na figura 16. Observa-se que também não houve alteração e diferença significativa na viscosidade sanguínea na presença do Polietilenoglicol.

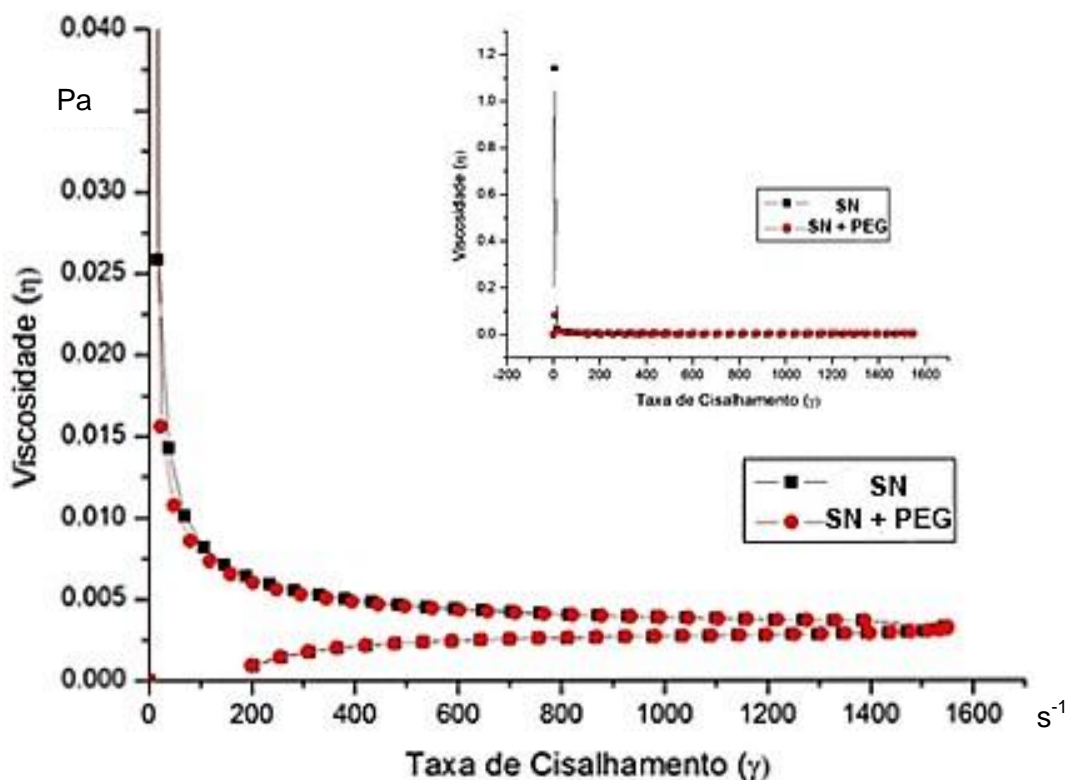


Figura 16. Curva de viscosidade em relação à taxa de cisalhamento do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG). Os dados representam a média obtida do sangue de 12 indivíduos. * $p = 0.34$.

As médias das curvas de viscosidade do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG+MV) estão apresentadas na figura 17. Não houve diferença significativa na viscosidade sanguínea, ou seja, não houve deformação das propriedades sanguíneas do indivíduo normal. A análise indica que o sangue, independente do tratamento, apresentou comportamento de um fluido não newtoniano com tixotropia.

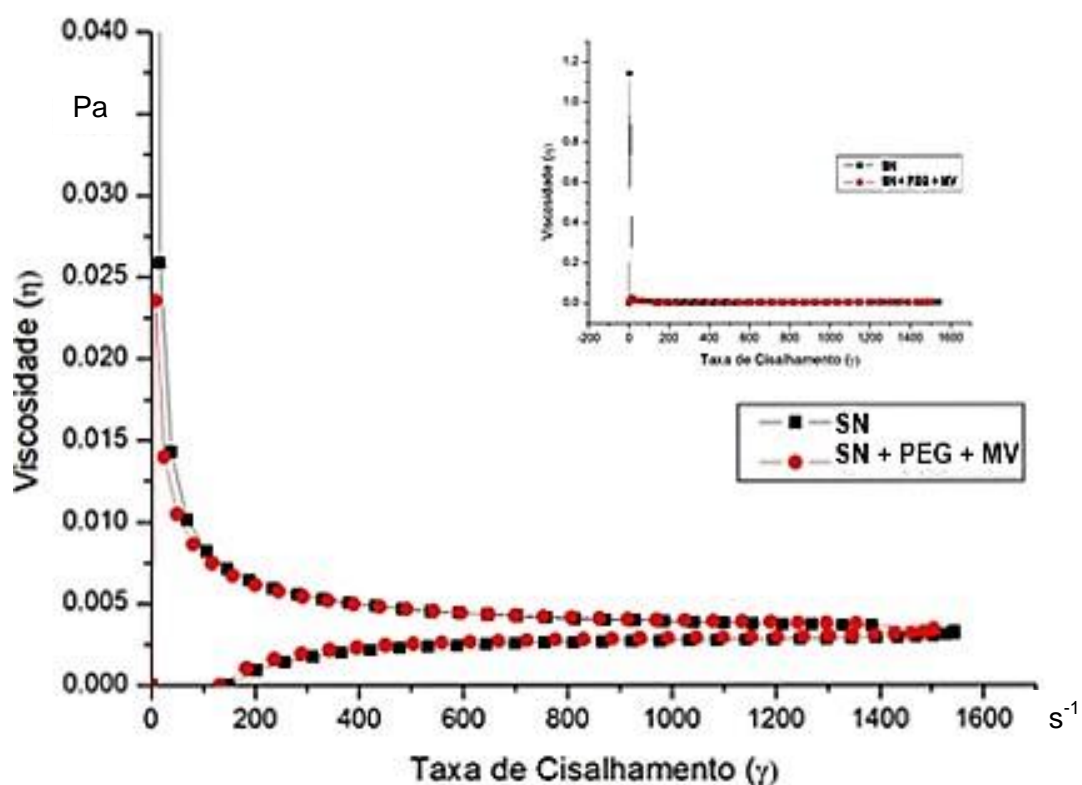


Figura 17. Curva de viscosidade em relação à taxa de cisalhamento do sangue do indivíduo normal (SN) e do sangue do indivíduo normal tratado com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG) - (SN+PEG+MV). Os dados representam a média obtida do sangue de 12 indivíduos. * p = 0.32.

5.2. Viabilidade Celular.

A viabilidade celular de células MN normais tratadas ou não com os estímulos, realizada no tempo 0 está apresentada na figura 18. Não houve diferenças significativas na viabilidade de células MN quando na presença dos diferentes tratamentos, porém os maiores índices de viabilidade foram observados em células MN não tratadas.

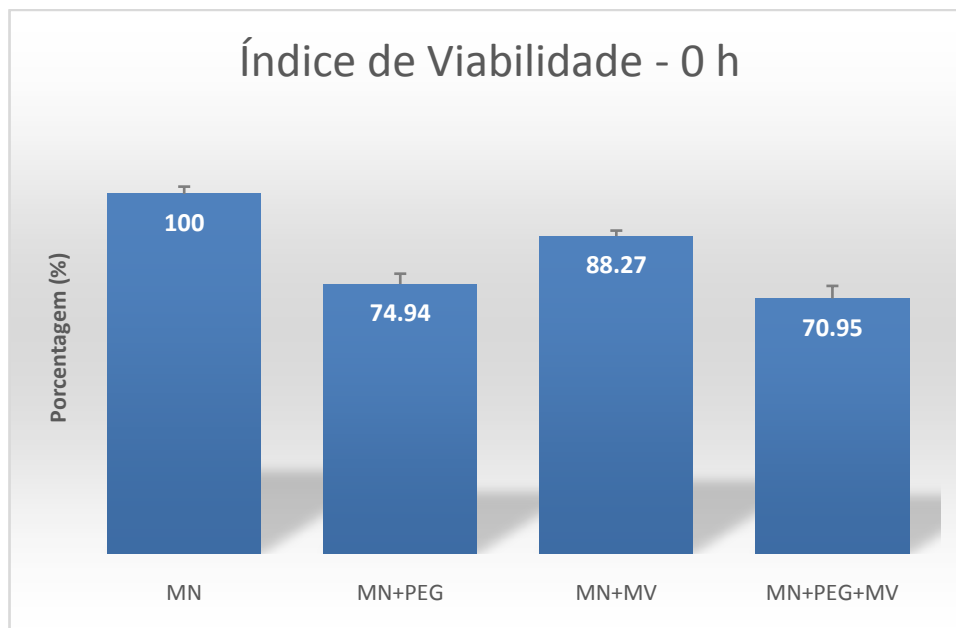


Figura 18. Índice de viabilidade celular das células MN incubadas ou não com Polietilenoglicol (PEG), com composto “Mais Vida” (MV) e com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV), no tempo 0. Os resultados representam a média e desvio padrão de 06 repetições com células do sangue de diferentes indivíduos. * $P > 0.05$, comparando as células tratadas ou não tratadas.

O índice de viabilidade celular de células MN tratadas ou não com os diferentes moduladores no tempo de 24 horas está apresentada na figura 19. Os maiores índices de viabilidade foram observados em células MN não tratadas. A microesfera de PEG reduziu a viabilidade celular. Quando as células MN foram incubadas com o composto “Mais Vida”, houve diminuição na viabilidade celular em comparação à célula MN não tratada. O composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de Polietilenoglicol não alterou a viabilidade das células MN.

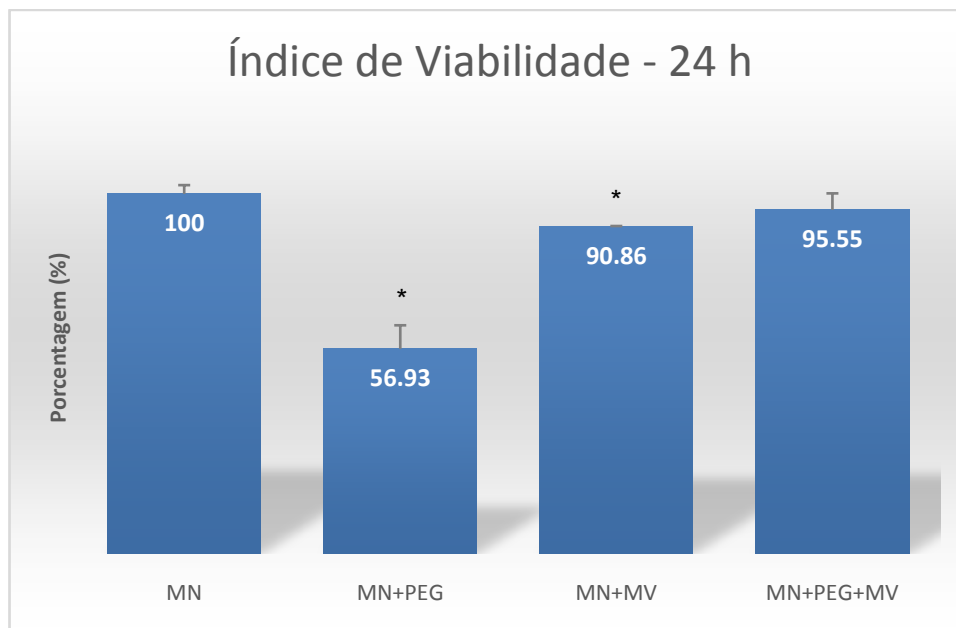


Figura 19. Índice de viabilidade no tempo de 24 horas de células MN e de células MN incubadas com Polietilenoglicol (PEG), com composto “Mais Vida” (MV) e com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV). Os resultados representam a média e desvio padrão de 06 repetições com células do sangue de diferentes indivíduos. *P < 0.05, comparando as células tratadas ou não tratadas.

A viabilidade celular no tempo 0 de células MCF-7 tratadas ou não com os moduladores está apresentada na figura 20. Não houve diferenças na viabilidade de células MCF-7 tratadas e não tratadas com microesfera de PEG, composto “Mais Vida” e composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de Polietilenoglicol.

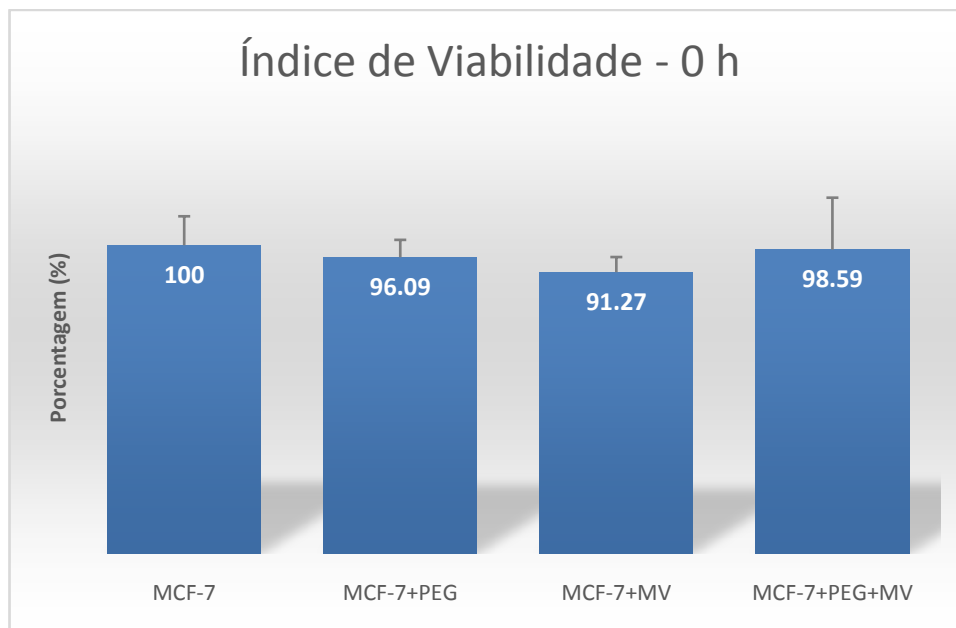


Figura 20. Índice de viabilidade celular no tempo 0 de células MCF-7 tratadas ou não com microesfera de Polietilenoglicol (PEG), com composto “Mais Vida” (MV) e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV). Os resultados representam a média e desvio padrão de 06 repetições com células MCF-7. * $P > 0.05$.

Na figura 21 está apresentada o índice de viabilidade celular de células MCF-7 após 24 horas de incubação com os diferentes moduladores. O índice de viabilidade foi maior em células MCF-7 não tratadas. Houve redução na viabilidade celular de células MCF-7 incubadas com microesferas de PEG e com o composto “Mais Vida”. Os menores índices de viabilidade de células MCF-7 foram observados quando as células foram incubadas com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de PEG.

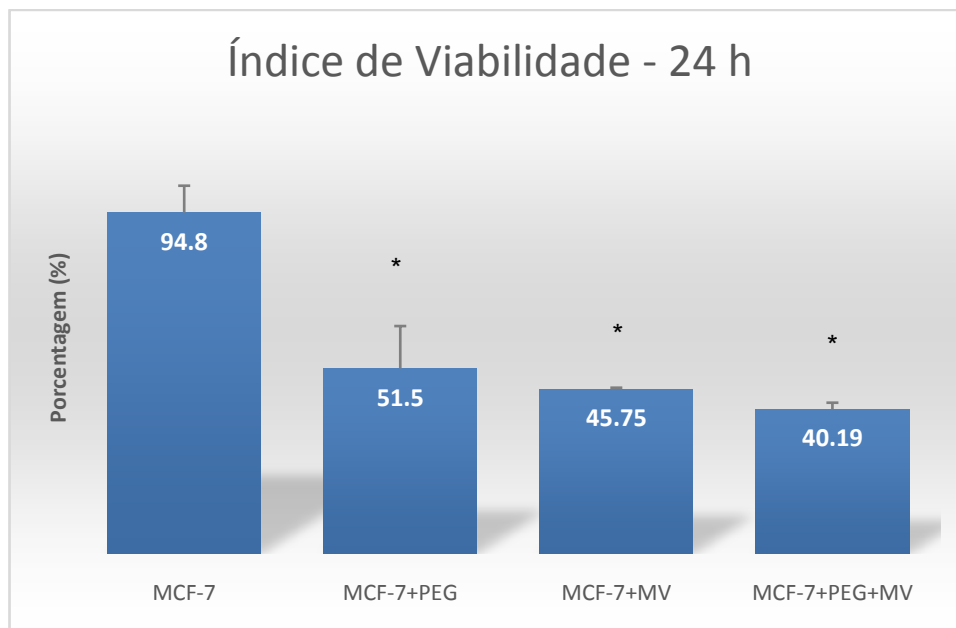


Figura 21. Índice de viabilidade celular das células MCF-7 incubadas com os estímulos do Polietilenoglicol (PEG), do composto “Mais Vida” (MV) e do composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV), realizada em 24h. Os resultados representam a média e desvio padrão de 06 repetições com células MCF-7. * $P < 0.05$, comparando as células tratadas ou não tratadas.

A viabilidade celular no tempo 0 da cocultura de células MN e células MCF-7 tratadas ou não com os moduladores estão apresentadas na figura 22. Os maiores índices de viabilidade foram observados na cocultura celular não tratada. Observou-se que não houve diferença na viabilidade da cocultura de células MN e células MCF-7 tratadas com o composto “Mais Vida”. Já quando incubadas com as microesferas de PEG e com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de PEG houve redução na viabilidade celular.

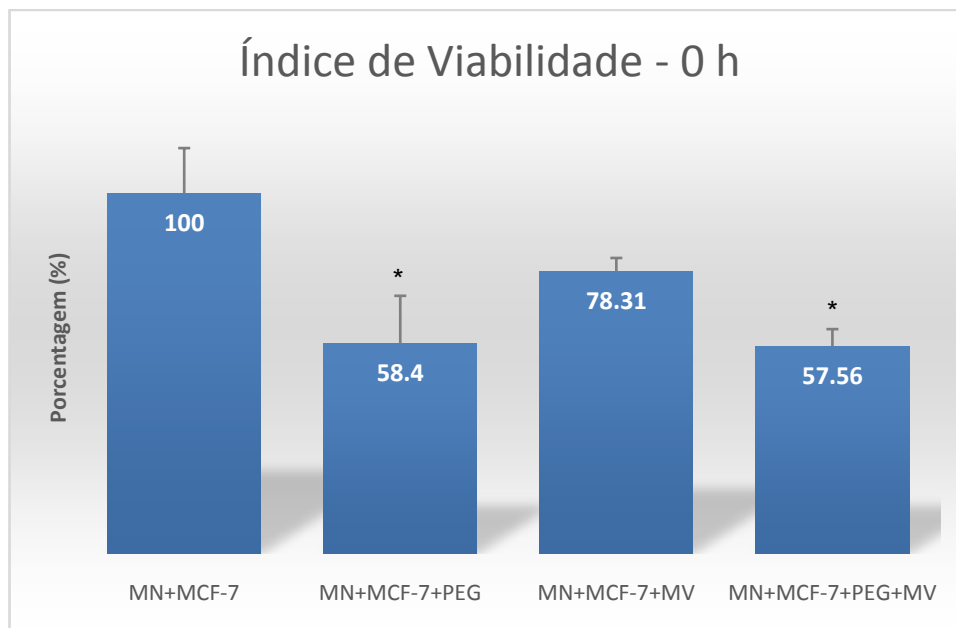


Figura 22. Índice de viabilidade da cocultura de células MN e MCF-7 incubadas com microesfera de PEG (Polietilenoglicol), com composto “Mais Vida” (MV) e com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV), realizada em 0h. Os resultados representam a média e desvio padrão de 06 repetições. * $P < 0.05$, comparando as células tratadas ou não tratadas.

A viabilidade celular no tempo 24 da cocultura de células MN e células MCF-7 tratadas ou não com os moduladores estão apresentadas na figura 23. Os índices de viabilidade, independente do tipo de tratamento, foram menores nos grupos tratados quando da comparação com os índices das células em cocultura não tratadas.

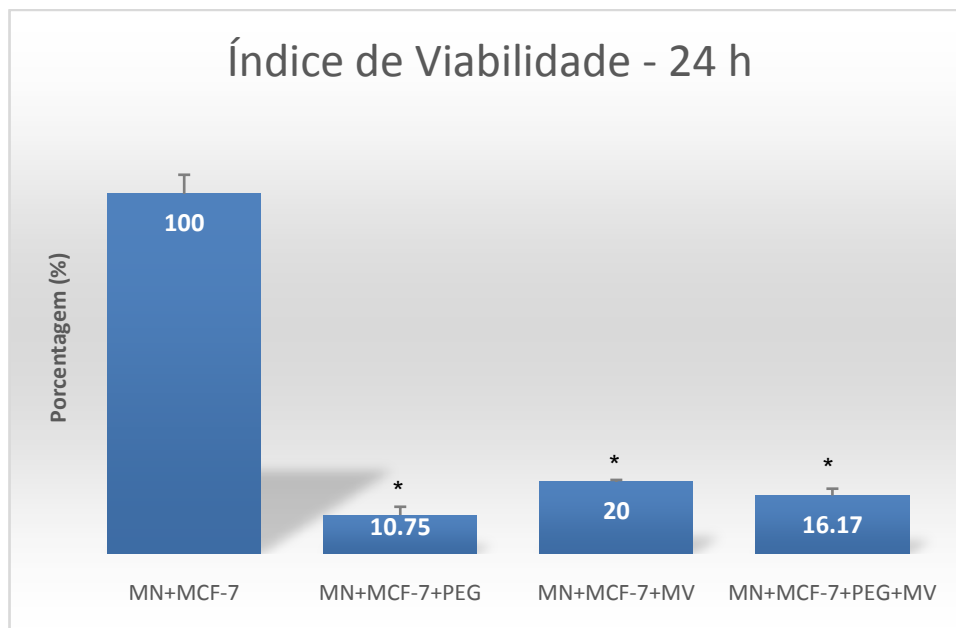


Figura 23. Índice de viabilidade celular no tempo de 24 horas da cocultura de células MN e células MCF-7 tratadas com microesfera de PEG (Polietilenoglicol), com composto “Mais Vida” (MV) e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV). Os resultados representam a média e desvio padrão de 06 repetições com células MCF-7. * $P < 0.05$, comparando as células tratadas ou não tratadas.

A inibição da proliferação das células MCF-7 e da cocultura de células MN e células MCF-7 incubadas com os diferentes moduladores está apresentada na tabela 02. Houve redução na proliferação de células MCF-7 e na cocultura de células, quando incubadas com microesfera de PEG, com composto “Mais Vida” e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de PEG. Não houve diferenças em relação aos índices de inibição da proliferação entre os tratamentos.

Tabela 02 – Índice de inibição de proliferação celular das células MCF-7 e cocultura celular (Células MN + MCF-7) na presença dos estímulos.

Grupos	Tumoral (MCF-7) (%)	Cocultura celular (%)
Meio de cultura	0	0
Microesfera de PEG	76,36	89,25
“Mais Vida”	54,25	80,00
PEG + “Mais Vida”	59,81	83,83

Nota: Resultados representam a média de 06 experimentos. PEG (polietilenoglicol)

5.3. Ensaio de Apoptose.

O índice de apoptose das células MN de indivíduos normais incubadas com microesfera de Polietilenoglicol (PEG), com composto “Mais Vida” adsorvido ou não a microesferas de Polietilenoglicol estão apresentadas na figura 26. Os índices de apoptose quando as células foram incubadas com a microesfera de PEG e com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de Polietilenoglicol não houve diferença quando da comparação aos índices observados em células não tratadas. Houve aumento do índice de apoptose em células MN tratadas com o composto “Mais Vida”.

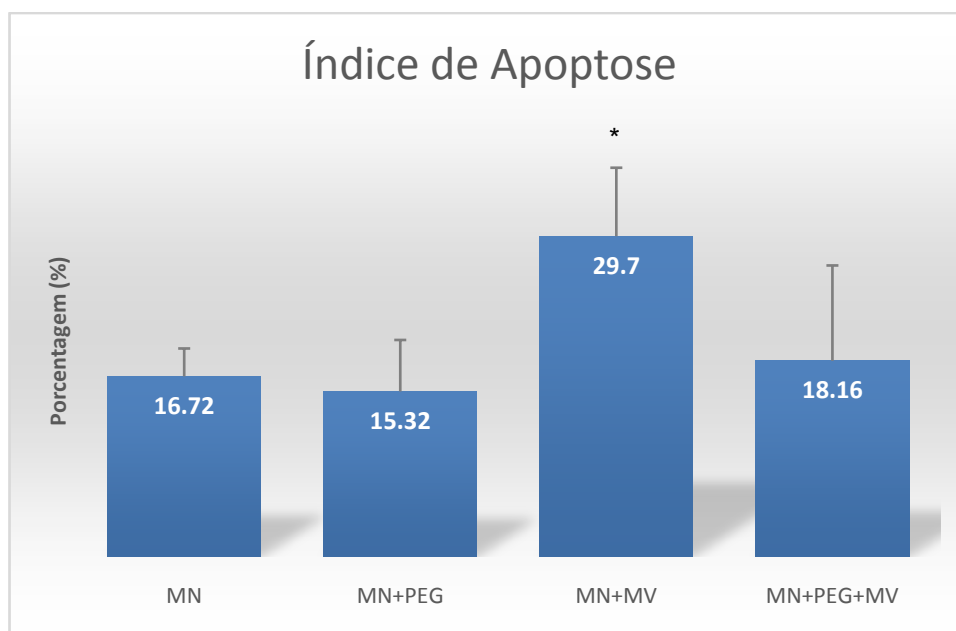


Figura 24. Índice de apoptose das células MN incubadas com microesfera de Polietilenoglicol, com composto “Mais Vida” e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG). Os resultados representam a média e desvio padrão de 06 repetições com células do sangue de diferentes indivíduos. * $P < 0,05$.

Na figura 27 estão representados os resultados do índice de apoptose das células MCF-7 incubadas com os estímulos do Polietilenoglicol (PEG), do composto “Mais Vida” e do composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de Polietilenoglicol. Verificou-se que o índice de apoptose nas células MCF-7 foi maior na presença do composto “Mais Vida”,

apresentando diferença significativa. Já na presença do Polietilenoglicol e do composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol não houve diferença significativa.

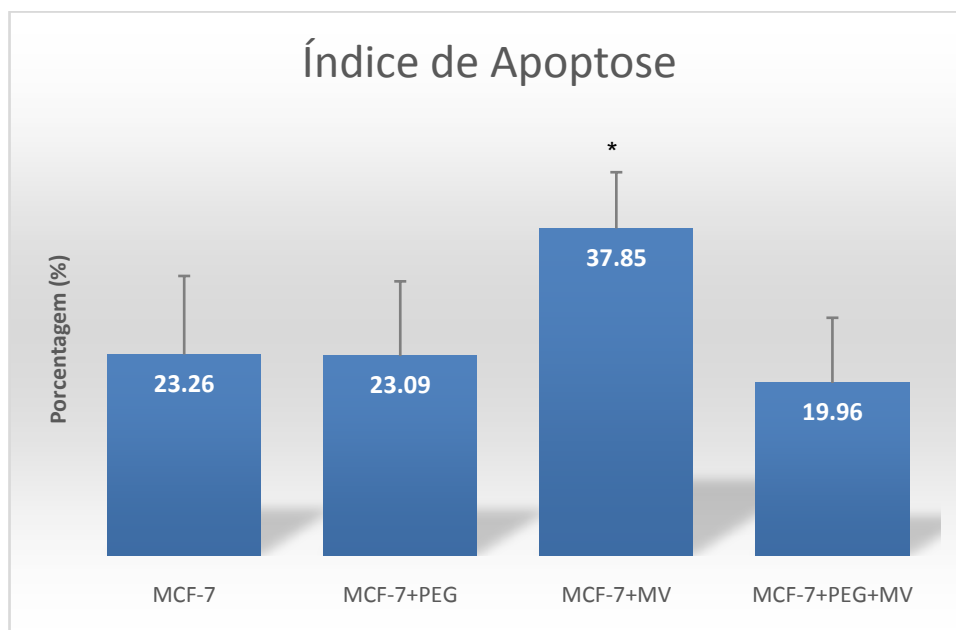


Figura 25. Índice de apoptose das células MCF-7 incubadas com microesfera de Polietilenoglicol, com composto “Mais Vida” e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG). Os resultados representam a média e desvio padrão de 06 repetições com células MCF-7. * $P < 0,05$.

Os índices de apoptose da cocultura de células MN e MCF-7 incubadas com microesfera de Polietilenoglicol (PEG), com composto “Mais Vida” e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de Polietilenoglicol estão apresentados na figura 28. O índice de apoptose quando a cocultura de células foram incubadas com a microesfera de PEG e com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol não houve diferença quando comparado aos índices observados em cocultura de células não tratadas. Verificou-se que o índice de apoptose na cocultura de células foi maior na presença do composto “Mais Vida”, apresentando diferença significativa.

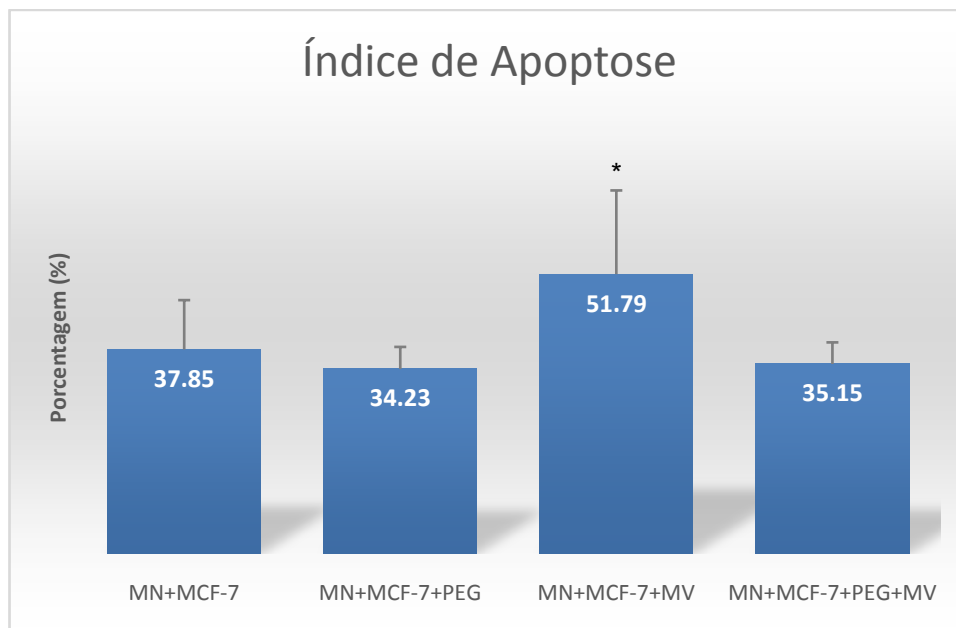


Figura 26. Índice de apoptose da cocultura de células (MN e MCF-7) incubadas com microesfera de PEG (Polietilenoglicol), com composto “Mais Vida” e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG). Os resultados representam a média e desvio padrão de 06 repetições com a cocultura de células. * P < 0,05.

5.4. Liberação de Cálcio Intracelular.

A liberação de cálcio intracelular por células MN tratadas com microesfera de PEG, com composto “Mais Vida” e com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de Polietilenoglicol (PEG) estão apresentadas na figura 29. As células MN exibiram menor liberação espontânea de cálcio intracelular. A liberação de cálcio intracelular foi maior em células MN tratadas com o composto “Mais Vida” adsorvido ou não a microesfera de PEG quando da comparação com as células não tratadas e as tratadas com microesfera de PEG. Os maiores índices de cálcio intracelular foram observados quando as células foram incubadas com o composto “Mais Vida”.

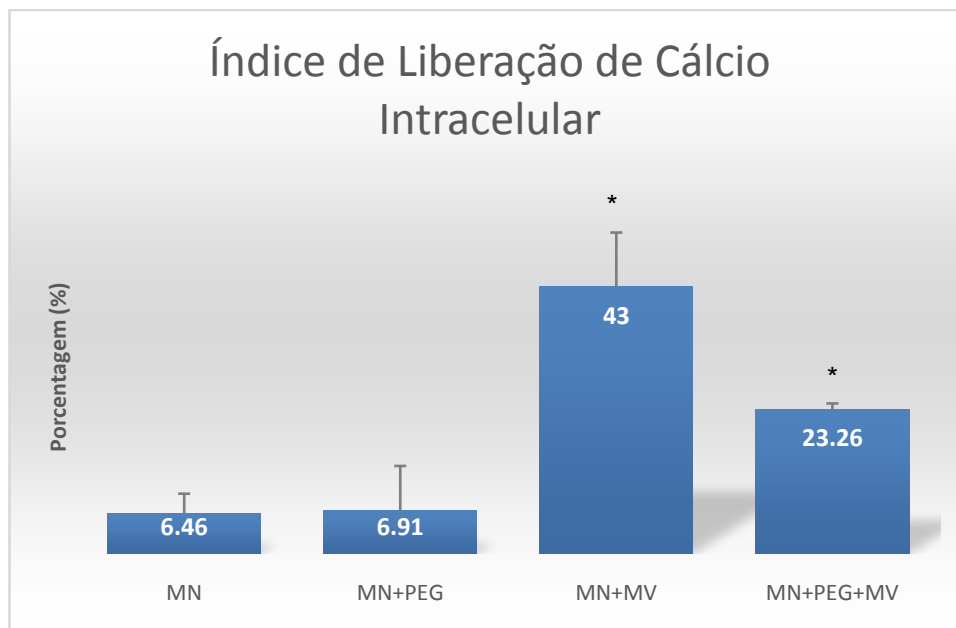


Figura 27. Índice de liberação de cálcio intracelular das células MN incubadas ou não com microesfera de Polietilenoglicol (PEG), com composto “Mais Vida” (MV) e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV). Os resultados representam a média e desvio padrão de 06 repetições com células do sangue de diferentes indivíduos. * $P < 0.05$, comparando as células tratadas ou não tratadas.

A liberação de cálcio intracelular pelas células MCF-7 tratadas com microesfera de PEG, com composto “Mais Vida” e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de Polietilenoglicol (PEG) estão apresentadas na figura 30. As células MCF-7 exibiram menor liberação espontânea de cálcio intracelular. Quando estas células foram incubadas com a microesfera de PEG e com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de Polietilenoglicol, houve um aumento nos níveis de liberação de cálcio intracelular. A liberação de cálcio intracelular foi maior na presença do composto “Mais Vida”.

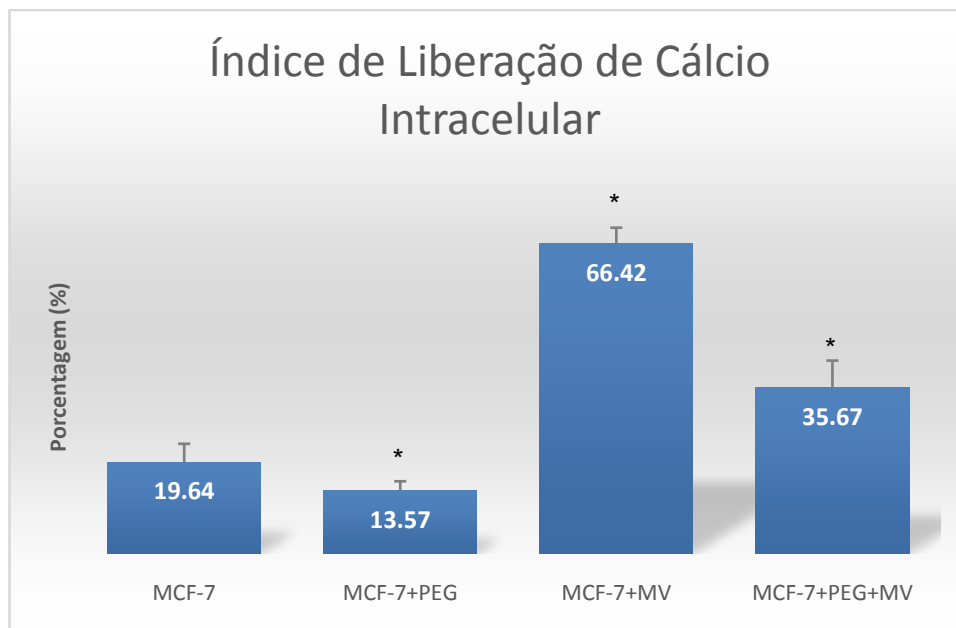


Figura 28. Índice de liberação de cálcio intracelular das células MCF-7 incubadas com microesfera de Polietilenoglicol (PEG), com composto “Mais Vida” (MV) e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV). Os resultados representam a média e desvio padrão de 06 repetições com células MCF-7. * P < 0.05, comparando as células tratadas ou não tratadas.

A liberação de cálcio intracelular em cocultura de células (MN+ células MCF-7) tratadas com microesfera de PEG, com composto “Mais Vida” e com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de Polietilenoglicol (PEG) estão apresentadas na figura 31. Houve menor liberação de cálcio intracelular quando as células em cocultura não foram tratadas. A cocultura de células incubadas com microesfera de PEG apresentou menor índice de liberação de cálcio intracelular. Quando estas células foram incubadas com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de Polietilenoglicol, houve um aumento comparado as células não tratadas e as tratadas com microesfera de PEG. Os maiores índices de liberação de cálcio intracelular foram observados quando as células foram incubadas com o composto “Mais Vida”.

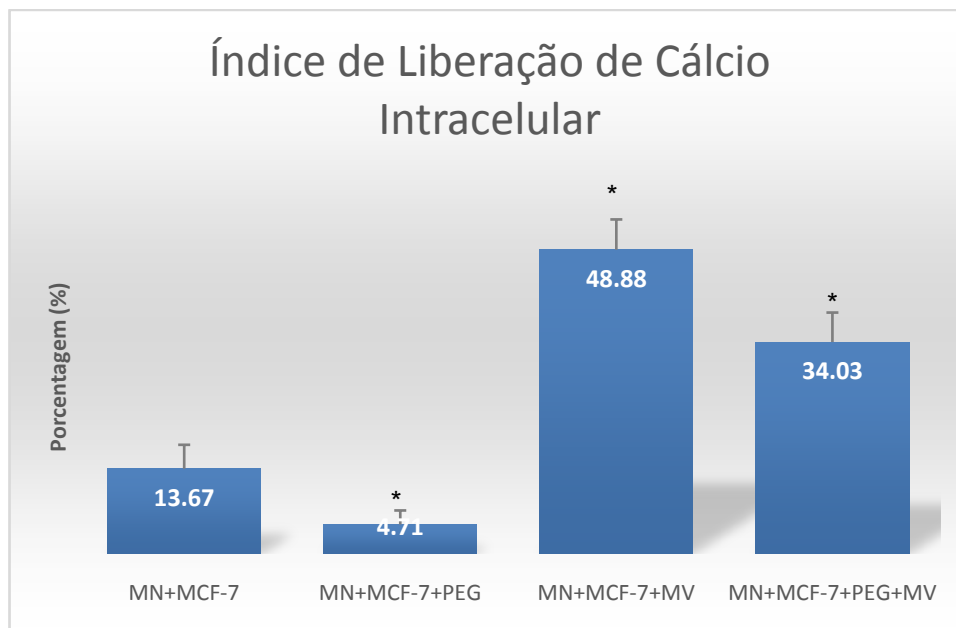


Figura 29. Índice de liberação de cálcio intracelular em cocultura de células (MN + MCF-7) incubadas com microesfera de PEG (Polietilenoglicol), com composto “Mais Vida” (MV) e com composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG+MV). Os resultados representam a média e desvio padrão de 06 repetições. * $P < 0.05$, comparando as células tratadas ou não tratadas.

6. DISCUSSÃO

As plantas medicinais representam as maiores fontes de substâncias ativas podendo ser utilizada na terapêutica, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos, são considerados a fonte mais antiga de medicamentos para o homem (FORMAN et al., 2011).

Medicamentos produzidos a partir de produtos naturais são eficientes no tratamento de doenças humanas, estes produtos podem atuar como antibacterianos, anticoagulantes, antiparasitários, imunossupressores e anticancerígenos (NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M., 2003). No presente estudo caracterizou-se os parâmetros reológicos e avaliou os efeitos imunomoduladores de uma mistura fitoterápica denominada composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de PEG sobre linhagens de células de adenocarcinoma mamário (MCF-7).

Entre as numerosas propriedades das plantas medicinais, destaca-se a capacidade de modulação destes fitoterápicos sobre o sistema imunológico (ASGARY et al., 2008; HONÓRIO-FRANÇA et al., 2008). Os metabólitos secundários, como por exemplo, da classe dos flavonoides e taninos, são eficazes na ativação deste sistema e adequados para atuar em processos inflamatórios (HASLAM, 1996; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Estudos revelam que o composto “Mais Vida” possui metabólitos da classe dos taninos e flavonoides (REINAQUE, 2012), podendo estar correlacionado com efeito antitumoral e antiproliferativo. Neste estudo o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de PEG não alterou a viscosidade do sangue, foi capaz de alterar a viabilidade, reduzir a proliferação, aumentar os índices de apoptoses e a liberação de cálcio intracelular em células MCF-7.

Substâncias poliméricas à base de microesferas são utilizadas como sistema de liberação inteligente na administração de fármacos (RUAN; FENG, 2003) ou fitoterápicos (REINAQUE et al., 2012; PESSOA et al., 2015). As microesferas de PEG são veículos para plantas medicinais e outras substâncias (SCHERER et al., 2011; FAGUNDES et al., 2012, HARA et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2013; FRANÇA et al., 2014) pois o PEG é

biocompatível, não apresenta toxicidade e é naturalmente metabolizado e excretado pelas vias fisiológicas (HENNING, 2002).

As microesferas de PEG são promissoras na viabilização de plantas medicinais, pois são capazes de prevenir a deterioração e aumentar a biodisponibilidade destas substâncias no interior do organismo, aprimorando as funções do sistema imunológico (SCHERER et al., 2011; FRANÇA et al., 2014).

De acordo com a literatura o Polietilenoglicol, possui propriedades que melhoram a biocompatibilidade dos materiais do sangue e dos fluidos biológicos (HUANG, Y.Y.; CHUNG, T.W.; TZENG, T. W. 1999; PARK, S. J.; KIM, S. H. 2004).

Neste estudo as curvas de fluxo do sangue do indivíduo normal tratado ou não com o composto “Mais Vida” adsorvido ou não a microesfera de PEG não alterou os parâmetros reológicos, o que corroboram com outros estudos onde verificaram que o comportamento do fluxo sanguíneo é ascendente e não linear a partir da origem, evidenciando um comportamento de um fluido não newtoniano (VERDIER et al., 2009).

O comportamento reológico de um fluido apresenta oscilações nos fluxos ascendente e descendente, exibindo entre eles, uma área de histerese, representando a propriedade tixotrópica (PIPE; MCKINLEY, 2009). Oscilações nos fluxos ascendente e descendente, com a presença de uma área de histerese, também foram constatadas no presente trabalho.

O comportamento tixotrópico tem grande relevância industrial e acontece devido a uma profunda interação entre as partículas/moléculas. Nos líquidos pseudoplásticos a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento dependendo especialmente da direção das partículas/moléculas no alinhamento com a direção do fluxo. A tixotropia é uma das características fundamentais para produtos farmacêuticos e outros (PEDRO, 2000). Os resultados encontrados neste estudo evidenciam o comportamento tixotrópico.

O composto “Mais Vida” tem sido considerado um potente imunomodulador (CORRÊA et al., 2006; FRANÇA et al., 2010), confirmando seu efeito na análise da curva de fluxo realizada neste estudo.

Há relatos que para recuperação da estrutura e função celular, tem-se utilizado agentes imunomoduladores (FRANÇA et al., 2014; SCHERER et al., 2011; FAGUNDES et al., 2012). Estudo com pacientes diabéticos tem mostrado que microesfera de PEG adsorvida à fitoterápicos pode reduzir a viscosidade do sangue destes pacientes (FRANÇA et al., 2014), melhorando as características do fluxo.

A análise reológica revelou no presente estudo através da rampa de temperatura que o indivíduo normal mesmo em situações adversas, como alterações na temperatura corpórea não apresentam alterações na viscosidade sanguínea, quando o sangue é tratado com o composto “Mais Vida” adsorvido ou não a microesferas de Polietilenoglicol (PEG).

A temperatura corpórea é capaz de causar um impacto relevante sobre as variações na deformabilidade dos eritrócitos e aliadas a outros fatores podem estimular alterações na sua viscosidade (PIAGNERELLI et al., 2003).

Em pacientes com Malária onde ocorre uma variação de temperatura se observa aumento na viscosidade sanguínea, (SCHERER, E. F., 2015), que pode ser restaurada após a ação de agentes imunomoduladores. Neste trabalho o uso do composto “Mais Vida” confirma que estas substâncias não alteram a viscosidade sanguínea mesmo em situações adversas como aumento de temperatura.

O sangue é um fluido não newtoniano complexo que exhibe características de fluidos de Bingham, pseudoplásticos e emulsões concentradas (SECOMB; GROSS, 1983).

O estudo das curvas de viscosidade em relação à taxa de cisalhamento do sangue do indivíduo normal tratado ou não com o composto “Mais Vida” adsorvido ou não a microesferas de Polietilenoglicol, apresentaram comportamento de um fluido não newtoniano do tipo pseudoplástico, colaborando com o resultado do trabalho realizado com a polpa de Pequi (*Caryocar coriaceum*) (SOUSA et al., 2014).

Segundo a literatura, a integridade estrutural e a não deformação das células é relevante durante o fluxo sanguíneo em relação às taxas de viscosidade. A deformação celular sanguínea é um fenômeno complicado, o

qual consiste de inúmeras propriedades celulares, inclusive propriedades da membrana celular (MOHANDAS; CHASIS, 1993).

Alguns estudos mencionam a relevância do estudo da reologia do sangue na microcirculação, devido às diversas doenças que podem modificar as propriedades reológicas sanguíneas, dentre elas alguns tipos de câncer (SCHIMID – SCHÖNBEIN, 1981).

Este trabalho sugere que o composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de Polietilenoglicol possivelmente não influenciará na viscosidade do sangue de pacientes com câncer.

Várias plantas medicinais têm sido relatadas na literatura com propriedades terapêuticas. O chá preparado com folhas da planta *Camellia sinensis*, possui componentes como flavonoides e que apresentam uma série de atividades biológicas, antioxidante, quimioprotetora, antiinflamatória e anticarcinogênica (SCHMITZ et al., 2005).

Substâncias derivadas de vegetais, como a paclitaxel (OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J., 2004) são capazes de regredir o câncer de mama, de ovário, resistentes a terapia tradicional (CARVALHO, J. E., 2006; NOBILI et al., 2009). A Própolis, produzida a partir do alecrim do campo, tem apresentado atividade antiinflamatória, antitumoral, antioxidante e imunomoduladora (FISCHER et al., 2008), enquanto que a *Dendrobium candidum*, um tipo de orquídea valiosa para a medicina, possui efeito antitumoral sobre o câncer de mama (SUN et al., 2016).

No presente estudo o composto “Mais Vida” adsorvido ou não a microesferas de PEG foi capaz de alterar a viabilidade celular de células MN, células MCF-7, bem como em cocultura destas células.

Diversos componentes, dentre eles, as plantas medicinais e hormônios foram testados em células do sangue. Correlacionando a viabilidade celular com a atividade funcional (REINAQUE et al., 2012; CÔRTEZ et al., 2013).

A avaliação do crescimento *in vitro* da linhagem celular de câncer humano, são realizadas através do ensaio de fluorescência de Iodeto de Propídeo (PI), pois são capazes de entrar em membranas celulares danificadas (DENGLER et al., 1995; WAN et al., 1994).

Utilizando está técnica, observou-se que o composto “Mais Vida” reduziu o crescimento das células MCF-7 e que este efeito foi mais acentuado em células tratadas com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de PEG. Estes resultados revelam que as microesferas de PEG modificam a liberação do composto “Mais Vida”, potencializando seus efeitos oncostáticos.

No presente estudo a cocultura de células MN e MCF-7 tratadas com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de PEG, não apresentou citotoxicidade para a célula MN, sugerindo que este sistema possivelmente pode ser utilizado como terapia no tratamento de pacientes com câncer de mama.

De acordo com a literatura as terapias existentes para o tratamento do câncer de mama, estão sendo modificadas para proporcionar aos pacientes maiores benefícios de sobrevivência, com menores índices de toxicidade (BARRETT, 2010).

A cocultura de células tratadas com o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de PEG foi mais efetiva, porque teve uma redução significativa no crescimento das células MCF-7, indicando que houve efeito modulador em células MN e esta foi capaz de atuar sobre a célula tumoral, comprovando a efetividade da cocultura com inibição da proliferação celular na presença do material.

A literatura relata que folhas da espécie *Virola sebifera*, (DENNY et al., 2007) e o extrato da *Dillenia suffruticosa* apresentam atividade antiproliferativa sobre diversas linhagens celulares, dentre elas a linhagem de células MCF-7, do câncer de mama (TOR et al., 2014).

Outros estudos revelam que a semente de linhaça, bem como a Melatonina e a casca da uva (*Vitis vinífera*), possuem mecanismos que podem inibir o crescimento da célula do câncer de mama (CORDEIRO et al., 2009; HILL; BLASK, 1988; BRANDÃO et al., 2010).

Este trabalho utilizando o composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de PEG, revelou material funcional com potencial efeito antitumor capaz de não alterar a viscosidade sanguínea, não apresentar citotoxicidade a células MN, porém capaz de inibir o crescimento celular e

apresentar atividade antiproliferativa em células MCF-7 e cocultura de células.

Esta atividade pode estar associada aos compostos fenólicos, dentre eles flavonoides e taninos, encontrados no composto “Mais Vida” (REINAQUE et al., 2012) que apresentam uma reconhecida atividade antioxidante (MARTINEZ – VALVERDE et al., 2000). Estes compostos fenólicos têm mostrado efeitos anticarcinogênico e estão sendo relatados como estimulantes da apoptose (GIADA, M. L. R.; FILHO, J. M., 2006).

A apoptose refere-se a um sistema fisiológico essencial através do qual os tecidos transportam as células indesejáveis, de maneira controlada e firmemente regulada (KOUDRINE, 1998; BASKIC et al., 2006).

As células apoptóticas são evidenciadas através de mudanças morfológicas como, fragmentação do DNA, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e mudanças bioquímicas (ZIMMERMANN; GREEN, 2001).

Estudos têm relatado a indução da apoptose, por meio da ação do extrato de *Dillenia suffruticosa* (TOR et al., 2014) e de *Lithospermum erythrorhizon* (HOU et al., 2006).

Neste trabalho foi avaliado o índice de apoptose em células MCF-7 e cocultura com células MN na presença do composto “Mais Vida” adsorvido ou não a microesfera de PEG. O composto “Mais Vida” foi capaz de induzir a apoptose, em células normais e em células MCF-7. Quando realizou a cocultura estes índices foram maiores. A adsorção deste composto a microesfera de PEG foi capaz de reduzir os índices de apoptose em células normais e MCF-7, mas em cocultura estes índices permaneceram maiores. Estes dados sugerem que a liberação controlada do fitoterápico é importante para reduzir os efeitos tóxicos, e que a interação deste material com as células normais foi capaz de exercer efeitos significativos na redução de células tumorais.

Na literatura trabalhos utilizando a melatonina ou IgA adsorvida a microesfera de PEG tem revelado que estas substâncias são capazes de exercer efeitos antitumoral em células MCF-7 (FRANÇA et al., 2016; HONORIO-FRANÇA et al., 2016).

A busca por novas estratégias para a prevenção e tratamento do câncer de mama é essencial. Produtos extraídos de plantas são considerados fontes potenciais de agentes anticancerígenos (ZHANG et al., 2013). A Nemorosoma principal constituinte da *Clusia rósea* Jacq (POPOLO et al., 2011) possui mecanismos de ação que são promissores como adjuvante no tratamento do câncer de mama (CAMARGO et al., 2014). Estes estudos corroboram com o presente trabalho que demonstra que o composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol também é promissor no tratamento deste tipo de câncer.

Estudos tem mostrado a relação entre o aumento dos índices de apoptoses com aumento na liberação de cálcio intracelular (HONORIO-FRANÇA et al., 2016).

Neste trabalho o composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de PEG estimulou a liberação de cálcio intracelular, independente do tipo celular avaliado, bem como em cocultura. Estes dados sugerem que o composto “Mais Vida” adsorvido as microesferas de PEG é um material funcional capaz de estimular as células induzindo a liberação de cálcio intracelular e conseqüentemente ativando a via de apoptose.

O cálcio intracelular controla diversos processos celulares, como proliferação, diferenciação e morte celular (FERRARI et al., 2002). Variações no influxo de cálcio intracelular em células humanas são capazes de ocasionar danos celulares, que provavelmente ativam os percursos de morte celular (HARA et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2013).

O controle da liberação de cálcio intracelular é fundamental para os testes de atividade celular em resposta a estímulos de ativação (NOVAK; RABINOVITCH, 1994). Alterações do cálcio intracelular no decorrer da ativação celular, em resposta a hormônios e drogas e no decorrer da injúria celular tem sido relatado (CARAFOLI, 1987). A IgA adsorvida ou não a microesferas de PEG apresentaram aumento no índice de liberação de cálcio intracelular em células MCF-7, aumentando também o índice apoptótico (HONORIO-FRANÇA et al., 2016).

As análises em conjunto dos dados no presente estudo sugerem que este sistema de microesferas de PEG com o composto “Mais Vida” adsorvido pode ser considerado um importante material funcional, com

potencialidades para futuras aplicações oncostáticas, uma vez que não altera os parâmetros reológicos, apresenta atividade antiproliferativa, induz a apoptose e aumento de cálcio intracelular.

7. CONCLUSÕES

Este estudo nos permitiu as seguintes conclusões:

- A caracterização reológica demonstrou que o sangue, independente do tratamento com os diferentes materiais, apresenta comportamento de um fluido não newtoniano com tixotropia do tipo pseudoplástico;
- A viscosidade sanguínea não alterou na presença do composto “Mais Vida” adsorvido ou não a microesfera de Polietilenoglicol (PEG);
- O Polietilenoglicol (PEG) não alterou as propriedades sanguíneas, podendo ser um material promissor como veículo de liberação controlada do fitoterápico;
- O composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de PEG não alterou a viscosidade sanguínea, mesmo com alterações na temperatura;
- O composto “Mais Vida” adsorvido ou não a microesferas de PEG foi capaz de:
 - ✓ Não apresentou citotoxicidade para as células MN;
 - ✓ Alterar a viabilidade celular nas células MCF-7;
 - ✓ Houve redução na viabilidade celular quando as células foram colocadas em cocultura;
 - ✓ Induzir a apoptose nas células MCF-7 e na cocultura celular;
 - ✓ Induzir a liberação de cálcio intracelular em células MCF-7 e na cocultura celular;
- Os resultados sugerem que o composto “Mais Vida” adsorvido a microesferas de PEG podem ser considerados um novo material funcional com ação antitumoral e antiproliferativa;
- Mais estudos deverão ser realizados para verificar os efeitos oncostáticos do composto “Mais Vida” adsorvido a microesfera de Polietilenoglicol (PEG).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUCHOWSKI, A.; MCCOY, J.R.; PALCZUK, N.C.; VAN ES, T.; DAVIS, F. F.; **Effect of covalente attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase.** *J. Biol. Chem.* 252, 3582-3586, 1977.

ALMEIDA I. F.; BAHIA, M. F. **Reologia: interesses e aplicações na área cosmético farmacêutica.** *Cosm. & Toil.*, 15, 3, 96-100, 2003.

ANDRADE, C.T.; COUTINHO, F.M.B; DIAS, M.I.; FLUCAS, E.; OLIVEIRA, C. M. F. & TABAK, D.; **Compêndio de Nomenclatura Macromolecular.** 1ª edição, E-papers, Editora 1, II, 32-43, 2002.

ARDEN, N., MAJORS B.S., AHN, S.H., OYLER, G., BETENBAUGH, M.J. **Inhibiting the apoptosis pathway using MDM2 im mammalian cell cultures,** *Biotechnol. Bioengineer.* 97: 601-614, 2007.

ASGARY, S.; PARKHIDEH, S.; SOLHPOUR, A.; MADANI, H.; MAHZOUNI, P.; RAHIMI, P. **Effect of ethanolic extract of *Juglans regia* L. on blood sugar in diabetes-induced rats,** *J. Med. Food.*, 11, 533-538, 2008.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** 2. Ed. Porto Alegre: *Artmed*, 677, 2005.

AWALE, S.; KAWAKAMI, T.; TEZUKA, Y.; UEDA, J. Y.; TANAKA, K.; KADOTA, S. **Nitric oxide (NO) production inhibitory constituents of *Tabebuia avellanedae* from Brazil.** *Chem. Pharm. Bull.* 53, 710-713, 2005.

AZEVEDO, A. P. **Anti-thrombotic effect of chronic oral treatment with *Orbignya phalerata* Mart.** *J. Ethnopharmacol.* 111, 155 - 159, 2007.

BANITO, A., PINTO, A.E., ESPADINHA, C., MARQUES, A.R., LEITE, V. **Aneuploidy and RAS mutations are mutually exclusive events in the development of well-differentiated thyroid follicular tumours,** *Clin. Endocrinol.*, 6: 706-711, 2007.

BARBOSA-FILHO, J. M.; MARTINS, V. K. M.; RABELO, L. A.; MOURA, M. D.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; SOUZA, M. F. V.; ALMEIDA, R. N.; MEDEIROS, I. A. **Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980 – 2000.** *Rev. Bras. Farmacogn.* 16, 421-446, 2006.

BARRETT, S.V. **Breast cancer.** *J R Coll Physicians Edinb.*, 40 (4):335–338, 2010.

BASKIĆ, D.; POPOVIĆ, S.; RISTIĆ, P.; ARSENIJEVIĆ, N. N. **Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin**

orange/ethidium bromide. *Cell. Biolog. International.*, 30, 11, 924-932, 2006.

BATISTA, C. P.; TORRES, O. J.; MATIAS, J. E.; MOREIRA, A. T.; COLMAN, D.; LIMA, J. H.; MACRI, M. M.; RAUEN, J. R.; FERREIRA, L. M.; FREITAS, A. C. **Effect of water extract of *Orbignya phalerata* (babaçu) in the gastric healing in rats: morfologic and tensiometric study.** *Acta Cir. Bras.* 21, 26-32, 2006.

BAUER, K.D., DUQUE, R.E., SHANKEY, T.V., **Clinical Flow Cytometry: Principles and Application, Lymphomas, Baltimore, MD,** Williams & Wilkins 203-234, 1993.

BERTHO, A.L., SANTIAGO, M.A., COUTINHO, S.G., **Flow Cytometry in the study of cell death,** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 95: 429-433, 2000.

BIONDI, D.; LEAL, L. **Caracterização das plantas produzidas no horto municipal da Barreirinha – Curitiba / PR.** *Rev. SBAU*, 3, (2), 20-36, 2008.

BLECHA, F. **Immunomodulators for prevention and treatment of infeccious diseases in foodproducing animals.** *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 17, 621-633, 2001.

BOHLER, T.; NOLTING, J.; GURRAGCHAA, P.; LUPESCU, A.; NEUMAYER, H. H.; BUDDE, K.; KAMAR, N.; KLUPP, J. ***Tabebuia avellanedae* extracts inhibit IL-2-independent Tlymphocyte activation and proliferation.** *Transp. Immunol.* 18, 319-323, 2008.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, H. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. **Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos derivados de plantas.** *Quim. Nova*, 33, 6, 1359-1369, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Instituto Nacional do Câncer.** Estimativas de novos casos de câncer por estados para 2005 [texto na Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2005. [Citado 2006 Set 13]; disponível em: <http://www.inca.gov.br/cancer/estimativas/2006>.

BYEON, S. E.; CHUNG, J. Y.; LEE, Y.G.; KIM, B. H.; KIM, K. H.; CHO, J. Y. ***In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*.** *J. Ethnopharmacol.* 119, 145-152, 2008.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M. C. B.; MAIA, M. B. S. **Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório.** *Rev. Bras. Farmacogn.* 12, 132 - 135, 2002.

CAMARGO, M.S.; OLIVEIRA, M.T.; SANTONI, M.M.; RESENDE, F.A.; OLIVEIRA-HÖHNE, A.P.; ESPANHA, L.G.; NOGUEIRA, C.H.; CUESTA-RUBIO, O.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. **Effects of nemorosone, isolated from the plant *Clusia rosea*, on the cell cycle and gene expression in MCF-7 BUS breast cancer cell lines.** *Phytomedic.*, 22, 1, 153-7, 2014.

CARAFOLI, E. **Intracellular calcium homeostasis.** *Annual Rev. Biochemist.*, 56, 395-433, 1987.

CARTER, N.P., MEYER, E.W., *Flow Cytometry*, IRL PRESS, New York. Chapters in books: 1, **Introduction to the principles of flow cytometry**, 1-28, 1990.

CARVALHO, J. E. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, 7, 1, 2006.

CHEIN, S. **Determinants of blood viscosity and red cell deformability.** *Scand. J. Clin. Invest.* 41 (supl. 156):7, 1981.

CHOI, B. T.; CHEONG, J.; CHOI, Y. H. **beta-Lapachone-induced apoptosis is associated with activation of caspase-3 and inactivation of NF-KappaB in human colon cancer HCT-116 cells.** *Anticancer Drugs.* 14, 845 - 850, 2003.

CIBAS E.S. **Applications of flow cytometric DNA analysis to diagnostic cytology.** *Diagn. Cytopathol.*, 13:166-171, 1995.

CIPRIANI, T. R. **Polissacarídeos de *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-Santa) com atividade gastroprotetora.** 2007. Tese de Doutorado em Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

CORDEIRO, R.; FERNANDES, P.L.; BARBOSA, L.A. **Semente de linhaça e o efeito de seus compostos sobre as células mamárias.** *Rev. Bras. Farmacogn.*, 19, 3, 727-732, 2009.

CORRÊA, V. S. C.; MAYNIÉ, J. C.; FRANÇA, E. L.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C. **Atividade funcional de fagócitos na presença do fitoterápico “Mais Vida”.** *Rev. Bras. Plan. Med.* 8 (2), 26 - 32, 2006.

CÔRTEZ, M A; FRANÇA, E L; PAULA, A. et al. **Imunomodulação de fagócitos do sangue humano pelo extrato de *Strychnos Pseudoquina* ST. HILL adsorvido em microesferas de polietilenoglicol.** *Polim.*, 1-8, 2013.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F., LUDOVICO, P., PRUDÊNCIO, C., RODRIGUES, F., FORTUNA, M., SOUSA, M., SILVA, M.; LEÃO, C., **Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras**, *Boletim de Biotecnologia*, 71: 19-33, 2002.

DARR, A. **Tecnologia farmacêutica**. Berlim: Aníbia, 366, 1979.

DAVIS, F.F. **The origin of peganology**. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 457-458, 2002.

DEAN, P. N., **Flow Cytometry Instrumentation**, Currents Protocols in Cytometry, Unit 1.0.1-1.0.2, Supplement 20, 2002.

DENGLER, W.A.; SCHULTE, J.; BERGER, D.P.; MERTELSMANN, R.; FIEBIG, H.H. **Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays**. *Anticanc. Drugs.* 6, 522–532, 1995.

DENNY, C.; ZACHARIAS, M. E.; KOHN, L. K.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. **Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae)**. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 17, 4, 2007.

DRAKE, M. A. **Sensory analysis of dairy foods**. *J Dairy Sci, Champaign*, 90, 4925-4937, 2007.

DUARTE, M. R.; DEBUR, M. C. **Stem and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia***. *Fitot.*, 76, 41-49, 2005.

DWORZAK, M.N.; GAIPA, G.; RATEI, R.; VELTRONI, A.S.; SCHUMICH, A.; MAGLIA, O.; KARAWAJEW, L.; BENETELLO, A.; POTCHGER, Z.H.; GADNER, H.; BIONDI, A.; LUDWIG, W.D.; BASSO, G., **Standardization of Flow Cytometric Minimal Residual Disease Evaluation in Acute Lymphoblastic Leukemia: Multicentric Assessment Is Feasible**, *Cytometry Part B*, 74: 331-340, 2008.

ELLSWORTH R.E.; DECEWICZ D.J.; SHRIVER C.D.; ELLSWORTH D.L.; **Breast Cancer in the Personal Genomics Era**. *Current Genomics.*, 11, 61-146, 2010.

EMMERICH, F. G.; LUENGO, C. A. **Babassu charcoal: a sulphurless, renewable, thermo-reducing feedstock for steelmaking**. *Biom. Bioen.*, 10, 41-44, 1996.

FAGUNDES, D.L.G.; FRANCA, E.L.; HARA, C.C.P.; HONORIO-FRANÇA, A.C. **Immunomodulatory effects of poly (ethylene glycol) microspheres adsorbed with cortisol on activity of colostrum phagocytes**. *Int J Pharmacol.*, 8, 510-8, 2012.

FAGUNDES, D.L.G.; FRANÇA, E.L.; MORCELI, G.; RUDGE, M.V.C.; CALDERON, I.M.P.; HONORIO-FRANÇA, A.C. **The role of cytokines in the functional activity of phagocytes in blood and colostrum of diabetic mothers**. *Clin. Dev. Immunol.*, 1-8, 2013.

- FERRARI, D.; PINTON P.; SZABADKAI, G., et al. **Endoplasmic reticulum, Bcl-2 and Ca (2⁺) handling in apoptosis. Cell Calcium.** 32 (5–6):413–420, 2002.
- FERREIRA, A.O. **Guia prático da farmácia magistral.** 1, 3ªEdição, São Paulo: Pharmabooks, 409, 2008.
- FERREIRA, P. M. **A lyophilized aqueous extract of *Maytenus ilicifolia* leaves inhibits histamine-mediated acid secretion in isolated frog gastris mucosa.** *Plant.* 219 (2), 319-324, 2004.
- FISCHER, G.; HÜBNER, S.O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T. **Imunomodulação pela Própolis.** *Arq. Inst. Biol.*, 75, 2, 247-253, 2008.
- FORMAN, D.; WARD, E.; FERLAY, M.; JEMAL, A.; BRAY, F. **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin.* 61 (2) 69-90, 2011.
- FOX, B. W. **Medicinal plants in tropical medicine – 2 – Natural products in câncer treatment from bench to the clinic.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 22-25, 1991.
- FOX, R. W.; McDONALD, A. T. **Introdução à mecânica dos fluidos.** 4ª edição, Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 662, 1998.
- FRANÇA, E. L.; MAYNIE, J. C.; CORRÊA, V. S. C.; PEREIRA, U. C. R.; BATALINI, C.; FERRARI, C. K. B.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C. **Immunomodulatory effects of herbal plants plus melatonin on human blood phagocytes.** *Int. J. Phytomed.* 2, 345-362, 2010.
- FRANÇA, E.L.; MORCELI G.; FAGUNDES, D.L.G.; RUGDE, M.V.C.; CALDERON, I.M.P.; HONORIO-FRANÇA, A.C. **Secretory IgA-Fcα Receptor interaction modulating phagocytosis and microbicidal activity by phagocytes in human colostrum of diabetics.** *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, 119 (10), 710-719, 2011 (A).
- FRANÇA, E.L.; RIBEIRO, E.B.; SCHERER, E.F.; CANTARINI, D.G, PESSOA, R.S, HONORIO-FRANÇA, A.C. **Effects of *Momordica charantia* L. on the blood rheological properties in diabetic patients.** *J. Biomed. Biotechnol.*, 2014; ID 840379.
- FRANÇA, E.L.; HONORIO-FRANÇA, A.C.; FERNANDES, R. T. S.; MARINS, C. M. F.; PEREIRA, C. C. S.; VAROTTI, F. P. **The Effect of Melatonin Adsorbed to Polyethylene Glycol Microspheres on the Survival of MCF-7 Cells.** *Neuroimmunomodulation.*, 2015.
- FRANÇA, E. L.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C.; FERNANDES, R. T. S.; MARINS, C. M. F.; PEREIRA, C. C. S.; VAROTTI, F. P. **The Effect of Melatonin Adsorbed to Polyethylene Glycol Microspheres on the Survival of MCF-7 Cells.** *Neuroimmunomodulation.*, 23, 27-32, 2016.

FUHR, J.E.; KATTINE, A.A.; SULLIVANTA et al. **Flow cytometric analysis of pulmonary fluids and cells for the detection of malignancies.** *Am. J. Pathol.* 141:211-215, 1992.

GAITAN, E.; COOKSEY, R. C.; LEGAN, J.; LINDSAY, R. H.; INGBAR, S. H.; MEDEIROS-NETO, G. **Antithyroid effects *in vivo* and *in vitro* of babaçu and mandioca: a staple food in goiter áreas of Brazil.** *Eur. J. Endocrinol.* 131 (2), 138-144, 1994.

GIADA, M. L. R.; FILHO, J. M. **Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana.** *Ci. Biol. Saúde*, 12, 4, 7-15, 2006.

GREEN, L.K.; GRIFFIN, J. **Increased natural killer cells in fluids. A new, sensitive means of detecting carcinoma.** *Acta. Cytol.*, 40, 1240-1245, 1996.

GUAN, Y. Q., Z. LI, et al. **"Cell cycle arrest and apoptosis of OVCAR-3 and MCF-7 cells induced by co-immobilized TNF- α plus IFN- γ on polystyrene and the role of p53 activation."** *Biomaterials.*, 33(26): 6162-6171, 2012.

GUERRA M. R, GALLO C. V. M, MENDONÇA G. A. S. **Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes.** *Rev. Bras. Cancerol.*; 51(3), 227-34, 2005.

GUIMARÃES, P.C.; HONORIO-FRANÇA, A.C.; HARA, C.C. et al. **Modulation of human colostrum phagocyte activity by the glycine-adsorbed polyethylene glycol microspheres.** *J. Chem.*,2013.

HARA, C.C.P.; HONORIO-FRANÇA, A.C.; FAGUNDES, D.L.G.; GUIMARÃES, P.C.L.; FRANÇA, E.L. **"Melatonin nanoparticles adsorbed to polyethylene glycol microspheres as activators of human colostrum macrophages,"** *J. Nanomater.*, 2013; ID 973179, 8 pages.

HARRIS, J. M.; CHESS, R. B., **Effect of pegylation on pharmaceuticals.** *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2 (3), 214-21, 2003.

HASLAM, E. **Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action.** *J. Na.t Prod.*, 59, 205-215, 1996.

HENNING, T. **"Polyethyleneglycols (PEGs) and the pharmaceutical industry. Fine, Specialty & Performance Chemicals".** *Pharma. Chemical.*, 1, 57-59, 2002.

HILL, S.M.; BLASK, D.E. **Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture.** *Cancer Rev.*, 48, 6121-6126, 1988.

HOLETZ F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. **Screening of some plants used in the**

Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. I. Oswaldo Cruz.* 97, 1027-1031, 2002.

HONÓRIO-FRANÇA, A. C.; LAUNAY, P.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S.; MONTEIRO, R. C. **Colostrated neutrophils express IgA Fc receptors (CD89) lacking γ chain association that mediate non-inflammatory properties of secretory IgA.** *J. Leuk. Biol.* 69 (2), 289-296, 2001.

HONÓRIO-FRANÇA, A. C., MARINS, C. M. F., BOLDRINI, F., & FRANÇA, E. L. **Evaluation of hypoglycemic activity and healing of extract from amongst bark of "Quina do Cerrado" (Strychnos pseudoquina ST. HILL).** *Acta Cirurgica Brasileira*, 23(6), 504-510, 2008.

HONORIO-FRANÇA, A. C.; NUNES, G. T.; FAGUNDES, D. L. G.; MARCHI, P. G. F., FERNANDES, R. T. S.; FRANÇA, J. L.; FRANÇA-BOTELHO, A. C.; MORAES, L. C. A.; VAROTTI, F. P.; FRANÇA, E. L. **Intracellular calcium is a target of modulation of apoptosis in MCF-7 cells in the presence of IgA adsorbed to polyethylene glycol.** *Onco. Targets. Therapy.*, 9, 617-626, 2016.

HOU, Y.; GUO, T.; WU, C.; HE, X.; ZHAO, M. **Effect of shikonin on human breast cancer cells proliferation and apoptosis in vitro.** *Pharma. Soc. Japan*, 12, 1383-1386, 2006.

HUANG, Y. Y.; CHUNG, T. W.; TZENG, T. W.; **A method using biodegradable polylactides/polyethylene glycol for drug release with reduced initial burst.** *Int. J. Pharm.* 182, 93-100, 1999.

JÄNICKE, R. U. **"MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3."** *Breast cancer research and treatment.* 117(1): 219-221, 2009.

JEVSĚVAR, S.; KUNSTEL, J. M.; POREKAR, V. G. **PEGylation of therapeutic proteins.** *Biotechnol. J.* 5, 113-128, 2010.

JORGE, R. M. **Evaluation of antinociceptive, antiinflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*.** *J. Ethnopharm.*, 94 (1), 93-100, 2004.

KOUDRINE, A. V. **Trace elements and apoptosis.** *J. Tr. Elem. in Med. Biol.*, 12, 2, 65-76, 1998.

KREEGER P.K.; LAUFFENBURGER D.A. **Câncer systems biology: a network modeling perspective.** *Carcinogenesis.* 31 (1), 2-8, 2010.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANING, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica.** Lisboa: Fundação Calouse Gulbenkian, 2, 803, 2001.

LAHOUD, M. H.; CAMPOS, R. **Aspectos teóricos relacionados à reologia farmacêutica.** *Visão Acadêmica.* 11, 1, 65-73, 2010.

LANES, P. K. D.; RIBEIRO, E. B.; CHAUD, N. G. A.; PESSOA, R. S.; FRANÇA, E. L.; HONORIO-FRANÇA, A. D. **Effects of microemulsion incorporated with *orbignya martiana* Rodr on the functional activity of blood phagocytes.** *J.K.A.*,23 (1), 2016.

LEITE, P. B.; LANNES, S. C. C.; RODRIGUES, A. M.; SOARES, F. A. S. M.; SARES, S. E.; BISPO, E. S. **Estudo reológico elaborado com diferentes cultivares de cacau (*Theodroma cacao* L.).** *Brasilian J. Food. Technology.* 16 (3), 192-197, 2013.

LIMA, A. R.; BARBOSA, C. **Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de *bardana*.** *Rev. Bras. Farmacog.* 16 (4), 531-536, 2006.

LOLIS, M. I. G. A.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. **Morfo-anatomia das folhas de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae), o “figatil”.** *Rev. Bras. Farmacogn.* 13 (supl), 68-71, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 3ª Edição, Editora Plantarum, , 384, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** 4ª Edição, Editora Plantarum, 512, 2002.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. **Aplicação da Citometria de Fluxo ao estudo do Genoma Vegetal,** *Boletim de Biotecnologia*, 77: 18-29, 2004.

LUBBE, A.; VERPOORTE, R. **Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials.** *Ind. Crops Prod.* 34, (1), 785-801, 2011.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA JUNIOR, V. F., **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** *Rev. Quím. Nov.*, 25, 429-438, 2002.

MACHADO, T. B.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C.; LEAL, I. C.; SILVA, M. G.; AMARAL, A. C.; KUSTER, R. M.; NETTO-DOSSANTOS, K. R. **In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*.** *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 21, 279-284, 2003.

MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. **Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Manguifera indica* L. in mice.** *J Ethnoph.*, 78, 133-137, 2001.

MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L. **Metabólicos secundários e propriedades medicinais da Espinheira-Santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. *E M. aquifolium* Mart.)** *Rev. Bras. Pl. Med.*, 9 (3), 89-99, 2007.

MARTINS, N. L.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J. M.; HEIBEL, M.; BALDEZ, R. N.; VASCONCELOS, P. R.; MOREIRA, H.; MAZZA, M.; NASSIF, P. A.; WALLBACH, T. Z. **Healing process in cutaneous surgical wounds in rats under the influence of *Orbignya phalerata* aqueous extract.** *Acta. Cir. Bras.*, 21, 66-75, 2006.

MARTINEZ – VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. **Nutritional importance of phenolic compounds in the diet.** *Arch. Lat. Amer. Nut.*, 50: 5-18, 2000.

MASSEY, B. S. **Mecânica dos fluídos.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 998, 2002.

MC GEE, M. M., E. HYLAND, et al., (2002). **"Caspase-3 is not essential for DNA fragmentation in MCF-7 cells during apoptosis induced by the pyrrolo-1, 5-benzoxazepine, PBOX-6."** *FEBS letters*, 515(1), 66-70.

MOHANDAS, N.; CHASIS, J.A. **Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids.** *Semin Hematol.* 30: 171-192, 1993.

NASER, B.; BODINET, C.; TEGTMEIR, M.; LINDEQUIST, U. ***Thuja occidentalis* (Arbor vitae): A review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties.** *E.C.A.M.*, 2(1), 69-78, 2005.

NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL, M. **Lehninger Princípios de Bioquímica.** 3ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2002.

NETO, J. A. S., SCALDAFERRI, P. M. **Melatonina e câncer – revisão da literatura.** *Rev. Bras. Cancerologia*, 51(1), 49-58, 2004.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos da físico-química: Uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas.** Porto Alegre: Artmed, 299, 2002.

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

NOBILI, S.; LIPPI, D.; WITORT, E.; DONNINI, M.; BAUSI, L.; MINI, E.; CAPACCIOLI, S.; **Natural compounds for câncer treatment and prevention.** *Pharm. Rev.*, 59, 365, 2009.

NOLAN, J.P., MANDY, F. **Multiplexed and microparticle-based Analyses: quantitative tools for the large-scale analysis of biological systems,** *Cytometry A.* 69(5):318–325, 2006.

NOVAK, E. J.; RABINOVITCH, P. S. **Improved sensitivity in flow cytometric intracellular ionized calcium measurement using Fluo-3 / Fura Red fluorescence ratios.** *Cytom.*, 17, 2, 135-141, 1994.

OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J.; **Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research.** *J. Nat. Prod.*, 67, 129-35, 2004.

O'LEARY, T.J. **Flow cytometry in diagnostic cytology.** *Diagn Cytopathol* 18, 41-46, 1998.

ORFAO, A., RIUZ-ARGUELLES, A., LACOMBE, F., AULT, K., BASSO, G., DANOVA, M. **Flow cytometry: Its applications in Hematology.** *Hemat.*, 80, 69-81, 1995.

ORMEROD, M. G. (1990), *Flow Cytometry*, IRL PRESS, New York. Chapters in books: 1. CARTER, N.P., MEYER, E.W., **Introduction to the principles of flow cytometry**, 1-28.

ÖZGÜR, E., U. MERT, et al., (2012). **"Differential expression of long non-coding RNAs during genotoxic stress-induced apoptosis in HeLa and MCF-7 cells."** *Clinical. Experimental. Medicine*: 1-8.

PARK, S. J.; KIM, S. H.; **Preparation and characterization of biodegradable poly (L-lactide) /poly (ethylene glycol) microcapsules containing erythromycin by emulsion solvent evaporation technique.** *J. Colloid. Interface.*, 271, 336-341, 2004.

PEDRO, R., **"Reologia aplicada a produtos cosméticos"**, Curso de Cosmetologia Express, Racine, São Paulo, 2000.

PESSOA, R. S.; FRANÇA, E. L.; RIBEIRO, E. B.; LANES, P. K. D.; CHAUD, N. G. A.; MORAES, L. C. A.; HONORIO-FRANÇA, A. C. **Microemulsion of babaçu oil as a natural product to improve human immune system function.** *J. L. Drug. Des. Devel. Ther.*, 9, 21-31, 2015.

PIAGNERELLI, M.; BOUDJELTIA, K.Z.; VANHAEVERBEEK, M.; VINCENT, J.L. **Red blood cell rheology in sepsis.** *J. Intens. Care. Med.*, 29, 1052-1061, 2003.

PILEGGI, R. G. **Ferramentas para o estudo e desenvolvimento de concretos refratários.** 2001. 187p. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais), Universidade Federal de São Carlos. São Carlos/SP, 2000.

PIPE, C.J. & MCKINLEY, G.H. **Microfluidic rheometry.** *Mec Res Commun.* 36: 110-120, 2009.

POLETTI, F. S.; FIEL, L. A.; DONIDA, B.; RE, M. I.; GUTERRES, S. S. **Controlling the size of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanoparticles prepared by emulsification-diffusion technique using ethanol as surface agente.** *Coll. Surf A: Physic. Eng. Aspects.* 324, (1), 105-112, 2008 (A).

POLLOCK, R. E. **Manual de Oncologia Clínica**. 8ª edição. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 10, 2006.

POPOLO, A.; PICCINELLI, A. L.; MORELLO, S.; SORRENTINO, R.; OSMANY, C.
R.; RASTRELLI, L.; PINT, O. A. **Cytotoxic activity of nemorosone in human MCF-7 breast cancer cells**. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 50-57, 2011.

PORTILLO, A. **Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine**. *J. Ethnopharmacol.*, 76, 93-98, 2001.

PRAUSOVA, J.; ECKSCHLAGER, T.; MRHALOVA, M.; SLOBODNIK, A.; KUBACKOVA, K.; VINAKURAU, S.; KODET, R., **Clinical, pathological and molecular characteristics of newly diagnosed breast**. *Neoplasma* 54 (5), 407-12, 2007.

QUIXABEIRA, V.B.L.; SADDI, V.A., **Importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: UMA REVISÃO DA LITERATURA**. *Revi. Bras. Anál. Clínic.* 40 (3): 199- 202, 2008.

REINAQUE, AP.B., FRANÇA, E. L., SCHERER, E. F., CÔRTEZ, M. A., SOUTO, F. J. D., HONÓRIO-FRANÇA, A.C.; **Natural material adsorbed onto a polymer to enhance immune function**. *Drug. Des Devel Ther.*, 6, 209–216, 2012.

REDDY, K.R.; MODI, M. W.; PEDDCR, S. **Comprehensive medicinal chemistry II**, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 571-586, 2002.

REILLY, J.T., BARNETT, D., UK **NEQAS for leucocyte immunophenotyping: the first 10 years**, *J. Clin. Pathol.* 54: 508-511, 2001.

RIBEIRO, H. M. et al., **Viscosidade por dois tipos de viscosímetros**. *Cosmet. & Toil.*, 11, 1, 47-50, 1999.

RUAN, G.; FENG, S. S. **“Preparation and characterization of poly (lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) (PLA-PEG-PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel,”** *Biomat.*, 24, 27, 5037–5044, 2003.

SALVADOR, U. **Química orgânica 3**. 1ª Edição, Editora Saraiva, 39, 2000.

SCHERER, E.F.; HONORIO-FRANÇA, A.C.; HARA, C.C.P.; REINAQUE, A.P.B.; CORTES, M.A.; FRANÇA, E.L. **Immunomodulatory Effects of Poly (ethylene glycol) Microspheres Adsorbed with Nanofractions of Momordica charantia L. on Diabetic Human Blood Phagocytes**. *Sci. Adv. Mater.*, 3, 687-694, 2011.

SCHERER, E. F. **Avaliação de parâmetros reológicos e imunológicos na infecção por *Plasmodium vivax***. 2015, 141, Tese - Grau Acadêmico de doutor em Ciências: Parasitologia. Área: Imunoparasitologia. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Belo Horizonte, 2015.

SCHIMID – SCHONBEIN, H.; GAETHGENS, P. **Whats is red cell deformability?** *Scand J. Clin. Lab. Invest.*, 41 (suppl. 156): 13-26, 1981.

SCHMITZ, W.; SAITO, A. Y.; ESTEVÃO, D.; SARIDAKIS, H. O. **O chá verde e suas ações como quimioprotetor.** *Ciênc. Biol. Saúde*, 26, 2, 119-130, 2005.

SCHRAMM, G. **A Practical Approach to Rheology and Rheometry.** 2^a Edição, Karlsruhe, Germany. 291, 2006.

SCOTT, E. A.; NICHOLS, M.D.; KUNTZ-WILLITS, R.; ELBERT, D. L.; **Modular scaffolds assembled around living cells using poly (ethylene glycol) microspheres with macroporation via a non-cytotoxic porogen.** *Acta Biomater.*, 6, 29-38, 2010.

SCOTT BLAIR GW - "**An Introduction to Biorheology**" Amsterdam, New York, Elsevier, 1974.

SECOMB, T. W.; AND GROSS, J. F. **Flow of red blood cells in narrow capillaries: Role of membrane tension.** *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 2, 229-240, 1983.

SEMENOV, D., P. ARONOV, et al., (2004). "**Oligonucleosome DNA Fragmentation of Caspase 3 Deficient MCF-7 Cells in Palmitate-Induced Apoptosis.**" *Nucleos., Nucleot. Nucleic. Acids.*, 23(6-7): 831-836.

SENEL, S.; MCCLURE, S.J. **Potential applications of chitosan in veterinary medicine.** *Adv. Drug Deliv. Reviews*, 56, 1467-1480, 2004.

SHAPIRO, H.M. **Practical Flow Cytometry, third edition**, Wiley-Liss. USA, chapter 1: 1-10, 1995.

SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. **Na anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*.** *Fitoterapia*, 72, 887-893, 2001.

SIMSTEIN, R., M. BUROW, et al., (2003). "**Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system.**" *Experimental biology and medicine* 228(9): 995-1003.

SOUSA, E. P.; MELO, A. J.; FIGUEIREDO, R. M. F.; LEMOS, D. M. **Comportamento reológico e efeito da temperatura da polpa de pequi em diferentes concentrações.** *J. Food Technology*. 17, 3, 226-235, 2014.

SUN, J.; GUO, Y.; FUL, X.; WANG, Y.; LIU, Y.; HUO, B.; SHENG, J.; HUL, X. ***Dendrobium candidum* inhibits MCF-7 cells proliferation by inducing cell cycle arrest at G2/M phase and regulating key biomarkers.** *Orig. Res.*, 9, 21–30, 2016.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. **Formation and stability of nano – emulsions.** *Adv. Coll. Int. Sci.*, Oxford, 108-109, 303-318, 2004.

TATTERSALL, G. H.; BANFILL, P. F. G. **The rheology of fresc concrete.** *Magazine of concrete Research.* 40, 79-89, 1983.

TIEZZ D. G. **Epidemiologia do Câncer de mama.** *Rev. Bras. Ginec. Obstet.*, 31 (5), 213-5, 2009.

THORNBERRY, N. A. & LAZEBNIK, Y. **"Caspases: Enemies Within".** *Sci.*, 281, 1312- 1316, 1998.

TOR, Y. S.; YAZAN, L. S.; FOO, J. B.; ARMANIA, N.; CHEAH, Y. K.; ABDULLAH, R.; IMAM, M. U.; ISMAIL, N.; ISMAIL, M. **Induction of apoptosis through oxidative stress-related pathways in MCF-7, human breast cancer cells, by ethyl acetate extract of *Dillenia suffruticosa*.** *BMC Complem. Alt. Med.*, 14, 55, 2014.

TREVISAN, M.T.S.; BEZERRA, M.Z.B.; SANTIAGO, G.M.P.; FEITOSA, C.M. **Atividades larvicida e colinesterásica de plantas do gênero *Kolanchoe*.** *Quím. Nova*, 29(3), 415-418, 2006.

VALVERDE, A. L. **Analgesic and antiinflammatory activities of verninioside B2 from *Vernonia condensate*.** *Phytother Res.* 15, 263-264, 2001.

VEIGA JÚNIOR, F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. **Plantas medicinais: cura segura?** *Quím. Nova*, 28 (3), 519-528, 2005.

VELLARD, M. **The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals.** *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14, 444-450, 2003.

VERDIER, C.; ETIENNE, J.; DUPERRAY, A.; PREZIOSID, L. **Review: Rheological properties of biological materials.** *C. R. Phys.*, 10, 790-811, 2009.

VERONESE, F. M.; PASUT, G. **PEGylation, successful approach to drug delivery.** *Drug. Discov. Today.*, 10 (21), 1451-58, 2005.

VILLANOVA, J. C. O. & ORÉFICE, R. L. **Synthesis and characterization Polimeros.** *Ciênc Tecnol.*, 20, 51-61, 2010.

WAN, C.P.; SIGH, R.V.; LAU, B.H. **A simple fluorometric assay for the determination of cell numbers.** *J. Immunol. Met.*, 173, 265–272, 1994.

YAM W.; ZHANG, L.; ZHU, J.; ZHOU, W.; WANG, J.; **Characterization of polymethyl methacrylate/polyethylene glycol/aluminum nitride composite as form-stable phase change material prepared by in situ polymerization method.** *Thermochim. Acta.*, 524, 128-134, 2011.

ZHANG, T.; TAN, Y.; ZHAO, R.; LIU, Z. **DNA damage induced by oridonin involves cell cycle arrest at G2/M phase in human MCF-7 cells.** *Contemp. Oncol.* 17, 38-44, 2013.

ZIMMERMANN, K. C.; GREEN, D. R. **How cells die: Apoptosis pathways.** *J. All. Clin. Immunol.*, 108, 4, S99-S103, 2001.

ZUANAZZI, J. A. S. & MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6ªEd. Porto Alegre, Ed. UFRGS/UFSC, cap. 24, p. 615-656, 2007.

9. APÊNDICE



Universidade Federal de Mato Grosso
Campus Universitário do Araguaia
Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Efeito das microesferas de polietilenoglicol (PEG) adsorvida com o composto “Mais Vida” na Sobrevivência de células de câncer de mama (MCF-7).

Pesquisadores e instituições envolvidas:

Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório-França - Instituto Universitário do Araguaia - Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Profa. Dra. Danny Laura Gomes Fagundes – Instituto Uiversitário do Araguaia – Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Prof. Dr. Eduardo Luzía França - Instituto Universitário do Araguaia – Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Aliny Aparecida Lopes Ribeiro - Instituto Universitário do Araguaia – Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Objetivo principal: Avaliar efeitos imunomoduladores do composto “Mais Vida” adsorvido à microesfera de Polietilenoglicol (PEG) em células de câncer de mama (MCF-7).

Procedimentos: Coleta de sangue humano, cerca de 5ml, por punção venosa.

Possíveis riscos e desconforto: não há riscos previsíveis, mas poderá haver certo desconforto, resultante da punção venosa do sangue, apesar desta ser realizado com técnica adequada e de maneira cuidadosa.

Benefícios previstos: Para os atuais participantes do estudo: incentivo à prevenção, assistência e orientações sobre o câncer de mama.

Eu....., fui informada dos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios desta pesquisa, descritos acima. Entendo que terei garantia de confidencialidade, ou seja, que apenas os resultados dos exames realizados com o sangue serão divulgados e ninguém, além dos pesquisadores, terá acesso aos nomes dos participantes desta pesquisa. Entendo também, que tenho direito de receber, sempre que desejar, outras informações sobre o estudo, entrando em contato com o pesquisador (Aliny Aparecida Lopes Ribeiro). Fui informada ainda, que a minha participação é voluntária e que, se eu preferir não participar ou deixar de participar deste estudo em qualquer momento. Compreendendo tudo o que me foi explicado sobre o estudo e, estando de acordo em participar, assino embaixo.

Assinatura do participante (ou do responsável, se menor):

.....

Assinatura do pesquisador principal:

.....

Aliny Aparecida Lopes Ribeiro. Rodovia BR-070, Km 5. Barra do Garças - Mato Grosso. CEP: 78600-000. E-mail: alinylopes_ribeiro@hotmail.com

10. ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MATO GROSSO - CAMPUS DO
ARAGUAIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da microesfera de polietilenoglicol (PEG) adsorvida com o composto ζ Mais Vida na sobrevivência de células de câncer de mama (MCF-7).

Pesquisador: Aliny Aparecida Lopes Ribeiro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 52701915.0.0000.5587

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.415.375

Apresentação do Projeto:

A apresentação deste projeto está adequada.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste projeto é avaliar o efeito do fitoterápico "Mais vida" sobre células tumorais - MCF-7 (cancer de Mama).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Por se tratar de um estudo in vitro os riscos são mínimos. Quanto ao benefícios este projeto poderá contribuir para o entendimento e possível prevenção do câncer de mama.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este projeto pretende avaliar os efeitos tumoricida de forma controlada do "Mais vida". Espera-se com este projeto confirmar o conhecimento popular sobre este fitoterápico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta todos os documentos obrigatórios de forma adequada.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-ICBS
Bairro: Campus do Araguaia CEP: 78.698-000
UF: MT Município: PONTAL DO ARAGUAIA
Telefone: (66)3402-1121 E-mail: professoramarlyaugusta@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MATO GROSSO - CAMPUS DO
ARAGUAIA



Continuação do Parecer: 1.415.375

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_645318.pdf	16/12/2015 17:59:58		Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO.pdf	16/12/2015 17:57:35	Aliny Aparecida Lopes Ribeiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOPESQUISA.pdf	16/12/2015 12:23:50	Aliny Aparecida Lopes Ribeiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMOCONSENTIMENTO.pdf	16/12/2015 10:48:54	Aliny Aparecida Lopes Ribeiro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PONTAL DO ARAGUAIA, 19 de Fevereiro de 2016

Assinado por:

Marly Augusta Lopes de Magalhães
(Coordenador)