



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Cássia Gonçalves Pereira

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE ARCTIINA E
ARCTIGENINA COM β -CICLODEXTRINA E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DO CÂNCER DE MAMA**

**Juiz de Fora
2020**

Cássia Gonçalves Pereira

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE ARCTIINA E
ARCTIGENINA COM β -CICLODEXTRINA E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos naturais bioativos.

Orientador: Prof. Dr Ângelo Márcio Leite Denadai

Coorientador: Prof. Dr Ademar Alves da Silva Filho

**Juiz de Fora
2020**

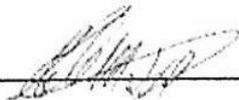
Cássia Gonçalves Pereira

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE ARCTIINA E
ARCTIGENINA COM β -CICLODEXTRINA E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DO CÂNCER DE MAMA**

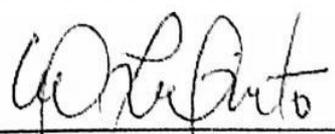
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos naturais bioativos.

Aprovada em 19 de junho de 2020.

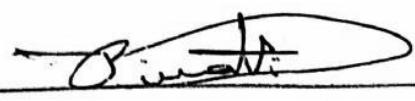
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dra. Priscila de Faria Pinto
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Ildefonso Binatti
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais

Resumo

O câncer de mama é o tipo de doença mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil. Considerado o segundo mais prevalente depois do câncer de pele não melanoma. Os tratamentos disponíveis apresentam uma série de efeitos adversos e são ineficazes em alguns casos. A arctiina (AC) e a arctigenina (AG) são lignanas, presente na espécie *Arctium lappa* L. (Asteraceae), que possuem diversas atividades farmacológicas como antioxidante, anti-inflamatória, antiparasitária e antitumoral. A complexação dessas moléculas com a β -ciclodextrina (β CD) pode auxiliar na atividade diante de modelos biológicos, melhorando a solubilidade, a biodisponibilidade e reduzindo a toxicidade. O presente trabalho tem como objetivo geral a preparação e caracterização dos nanoprecipitados hidrofóbicos obtidos a partir dos complexos de inclusão arctiina/ β -ciclodextrina (AC/ β CD) e arctigenina/ β -ciclodextrina (AG/ β CD); e avaliação da citotoxicidade desses compostos frente às linhagens tumorigênicas de adenocarcinoma de mama humano (T47D, MCF-7 e MDAMB-231). Para isto, os complexos de inclusão foram produzidos e caracterizados por espectrometria de infravermelho (IV), titulação calorimétrica isotérmica (ITC), espalhamento de luz dinâmico (DLS), medidas de potencial zeta (PZ) e condutividade elétrica. Após a caracterização, a citotoxicidade *in vitro* foi avaliada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium (MTT). O complexo arctigenina/ β -ciclodextrina (AG/ β CD) apresentou o melhor resultado *in vitro*, com redução significativa na viabilidade celular na linhagem de células de câncer de mama.

Palavras-chave: câncer de mama, *Arctium lappa* L., arctiina, arctigenina, ciclodextrina.

Abstract

Breast cancer is the most common type of disease among women in the world and in Brazil. Considered the second most prevalent after non-melanoma skin cancer. The available treatments have a number of adverse effects and are ineffective in some cases. Arctiine (AC) and arctigenine (AG) are lignans, present in the species *Arctium lappa* L. (Asteraceae), which have several pharmacological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, antiparasitic and antitumor. The complexation of these molecules with β -cyclodextrin (β CD) can help in the activity before biological models, improving solubility, bioavailability and reducing toxicity. The general objective of this work is the preparation and characterization of hydrophobic nanoprecipitates obtained from the inclusion complexes arctiine/ β -cyclodextrin (AC/ β CD) and arctigenine/ β -cyclodextrin (AG/ β CD); and assessment of the cytotoxicity of these compounds against the tumorigenic strains of human breast adenocarcinoma (T47D, MCF-7 and MDAMB-231). For this, the inclusion complexes were produced and characterized by infrared (IR) spectrometry, isothermal calorimetric titration (ITC), dynamic light scattering (DLS), zeta potential measurements (PZ) and electrical conductivity. After characterization, in vitro cytotoxicity was evaluated by the standard 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium (MTT) bromide assay. The arctigenine/ β -cyclodextrin complex (AG/ β CD) showed the best in vitro result, with significant reduction in cell viability in breast cancer cell lineage.

Key words: breast cancer, *Arctium lappa* L., arctiin, arctigenin, cyclodextrin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Número de novos casos de câncer em 2018, no mundo, ambos os sexos e todas as idades.....	16
Figura 2. Taxas de mortalidade por câncer de mama, padronizadas por idade, sexo feminino, Brasil, de 1980 a 2016.....	17
Figura 3. Alguns compostos naturais e derivados com efeito antitumoral para o câncer de mama.....	26
Figura 4. Estrutura das enterolignanas.....	27
Figura 5. Folhas e frutos da <i>Arctium lappa</i> L. (Asteraceae).....	28
Figura 6. Estrutura da arctiina (arctigenina-4-glicosídeo, $C_{27}H_{34}O_{11}$) e arctigenina ($C_{21}H_{24}O_6$).....	29
Figura 7. Principais nanocarreadores dispostos em ordem cronológica.....	32
Figura 8. Comparação do perfil farmacocinético da droga livre e da nanopartícula.....	34
Figura 9. Estruturas, dimensões geométricas aproximadas e volumes aproximados das cavidades de α , β e γ -CD.....	35
Figura 10. Estrutura da β -ciclodextrina na forma de um cone truncado.	36
Figura 11. Formação de complexos fármaco - CD com estequiometria 1:1 e 1:2.	38
Figura 12. Representação esquemática da formação de um complexo de inclusão em solução aquosa.	39
Figura 13. Fluxograma das etapas do trabalho.	43
Figura 14. Esquema de preparação dos complexos de inclusão com a β CD.....	45
Figura 15. Processo de preparação das misturas mecânicas.	45

Figura 16. Preparo das amostras para realização dos experimentos de infravermelho.....	46
Figura 17. Representação esquemática do Microcalorímetro.	47
Figura 18. Leitura das amostras por Fotometria de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	49
Figura 19. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho da AC, AC/ β CD, MM e β CD.	54
Figura 20. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho da AG, AG/ β CD, MM e β CD.....	56
Figura 21. Titulação calorimétrica de (1) solução de AC/ β CD e (2) solução de AG/ β CD em DMSO e H ₂ O. Curva final após subtração da curva de titulação do solvente.	59
Figura 22. Representação esquemática da dessolvatação das moléculas de Arctiina e Arctigenina para a formação dos respectivos complexos de inclusão AC/ β CD e AG/ β CD.....	61
Figura 23. Distribuição de tamanho de partículas em suspensão em função da concentração. Em (1) AC e AC/ β CD e (2) AG e AG/ β CD.	64
Figura 24. Gráficos de potencial zeta (PZ) em função da concentração crescente. Em (1) AC e AC/ β CD e (2) AG e AG/ β CD.	66
Figura 25. Valores de condutividade elétrica em função da concentração.....	68
Figura 26. Ensaio de citotoxicidade em linhagem não tumorigênica (MGF10A) e linhagens tumorigênicas (T47D, MCF-7 e MDAMB-231), utilizando β CD, a 100 μ M e 200 μ M, em 48 horas.	70
Figura 27. Ensaio de citotoxicidade em linhagem não tumorigênica (MGF10A) e linhagens tumorigênicas (T47D, MCF-7 e MDAMB-231), utilizando AC e	

AG/ β CD, a 100 μ M e 200 μ M, em 48 horas. Asterisco (*) indica diferença significativa em relaao ao grupo controle. **** > *** > ** > *72

Figura 28. Ensaio de citotoxicidade em linhagem não tumorigênica (MGF10A) e linhagens tumorigênicas (T47D, MCF-7 e MDAMB-231), utilizando AG e AG/ β CD, a 100 μ M e 200 μ M, em 48 horas. Asterisco (*) indica diferença significativa em relaao ao grupo controle. **** > *** > ** > *73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de subtipos moleculares do câncer de mama.....	22
Tabela 2: Características fenotípicas e genotípicas das linhagens celulares de câncer de mama utilizadas.....	50
Tabela 3. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho da AC, AC/ β CD, MM e β CD.....	55
Tabela 4. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho da AG, AG/ β CD, MM e β CD.....	57
Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos de interação de AC/ β CD e AG/ β CD a 298,15 K.....	59
Tabela 6. Valor médio de viabilidade celular (%) da linhagem não tumorigênica (MGF10A) e linhagens tumorigênicas (T47D, MCF-7 e MDAMB-231), utilizando β CD, a 100 μ M e 200 μ M, em 48 horas.	70
Tabela 7. Valor médio de viabilidade celular (%) da linhagem não tumorigênica (MGF10A) e linhagens tumorigênicas (T47D, MCF-7 e MDAMB-231), utilizando AC e AC/ β CD, a 100 μ M e 200 μ M, em 48 horas.	72
Tabela 8. Valor médio de viabilidade celular (%) da linhagem não tumorigênica (MGF10A) e linhagens tumorigênicas (T47D, MCF-7 e MDAMB-231), utilizando AG e AG/ β CD, a 100 μ M e 200 μ M, em 48 horas.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC - Arctiina

AC/ β CD - Arctiina/beta-ciclodextrina

AG - Arctigenina

AG/ β CD - Arctigenina/beta-ciclodextrina

ATCC - Coleção de Cultura Americana

CD - Ciclodextrina

CDI - Carcinoma Ductal Invasivo

CDIS - Carcinoma Ductal *in situ* ou não Invasivo

CI - Complexo de Inclusão

CLI – Carcinoma Lobular Invasivo

DLS - Fotometria de Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dynamic light scattering*)

ER - Receptor de Estrogênio

DMSO-d₆- Dimetilsulfóxido deuterado

FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

HER2 - Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano

ITC - Titulação Calorimétrica Isotérmica

IV - Infravermelho

MM - Mistura Mecânica

MTT - Brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium)

NIPPAN - Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais

NPH - Nanoprecipitado Hidrofóbico

β CD- beta-ciclodextrina

PR - Receptor de Progesterona

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

TRH - Terapia de Reposição Hormonal

UV- Ultravioleta

ZP - Potencial Zeta

SUMÁRIO

SUMÁRIO	11
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
1.2 CÂNCER DE MAMA	15
1.2.1 Fatores de risco	17
1.2.2 Patogenia	19
1.2.3 Tratamento	22
1.2.4 Produtos naturais com efeito antitumoral para o câncer de mama	25
1.3 A ESPÉCIE <i>Arctium lappa</i> L. (Asteraceae).....	27
1.3.1 Arctiina e arctigenina	29
1.4 NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS.....	31
1.5 CICLODEXTRINAS.....	34
1.5.1 Formação do complexo de inclusão (CI)	37
1.5.2 Nanoprecipitados hidrofóbicos	40
2 OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVO GERAL	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 INSTRUMENTAÇÃO	43
3.2 MATERIAIS E REAGENTES	44
3.3 PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO.....	44
3.3.1 Preparo das misturas mecânicas	45
3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM ESTADO SÓLIDO	46

3.4.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV).....	46
3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM SOLUÇÃO/SUSPENSÃO	46
3.5.1 Titulação calorimétrica isotérmica (ITC).....	47
3.5.2 Análise por fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS)	47
3.5.3 Condutividade elétrica e potencial zeta (PZ).....	49
3.6 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DO CÂNCER DE MAMA <i>IN VITRO</i> ..	50
3.6.1 Manutenção de células tumorigênicas e não tumorigênica.....	50
3.6.2 Avaliação da citotoxicidade em células do câncer de mama <i>in vitro</i>.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM ESTADO SÓLIDO	52
4.1.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV)	52
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM SOLUÇÃO/SUSPENSÃO	57
4.2.1 Titulação calorimétrica isotérmica (ITC).....	57
4.2.2 Análise por fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS) dos nanoprecipitados hidrofóbicos.....	62
4.2.3 Condutividade elétrica e Potencial zeta dos nanoprecipitados hidrofóbicos.....	64
4.3 CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	68
5 CONCLUSÃO	74
8 REFERÊNCIAS.....	75

AGRADECIMENTOS

Muito difícil encontrar palavras para agradecer a todos que me ajudaram no decorrer desses últimos anos. Não foram anos muito fáceis, pois perdi meu tio, que era como um irmão e descobri a gravidez no meio do mestrado. É claro que a minha pequena Maria Cecília começou a ser prioridade, mas finalizar o mestrado sempre esteve em meus planos, mesmo que em muitos momentos eu quisesse desistir.

Primeiro agradeço a Deus pela força concedida a mim para enfrentar todos os desafios e agradeço a ele pela oportunidade de fazer um curso tão incrível, com excelentes professores e disciplinas. Foi muito aprendizado, que com certeza levarei para toda a vida.

Aos meus pais, Joaquim Pereira do Vale e Mary Terezinha Gonçalves Pereira, por sempre me apoiarem nos estudos durante minha trajetória. Sem vocês nada disso seria possível!

A minha irmã, Cynthia Gonçalves Pereira, por cuidar da minha filha enquanto eu escrevia e estudava, você é muito especial para mim!

Ao meu esposo, Bruno Luiz Tófoli, pela paciência, compreensão e apoio, pois foram muitos os meus dias de choro, obrigada por não deixar que eu desistisse.

Aos Professores Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai, Dr. Ademar Alves da Silva Filho e Dra. Priscila de Faria Pinto, obrigada pelo apoio de vocês quando dei a notícia da minha gravidez. O carinho de vocês foi essencial para que eu continuasse.

Ao IF Sudeste MG - Campus Barbacena, que concedeu a licença para meus estudos, sem ela seria impossível finalizar o mestrado.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho. Muito obrigada! Que Deus abençoe a todos vocês!

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade”

Albert Einstein

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O câncer de mama, assim como outras neoplasias malignas, resulta de uma proliferação incontrolável de células anormais, que surgem em função de alterações genéticas, sejam elas hereditárias ou adquiridas por exposição a fatores ambientais ou fisiológicos. Tais alterações genéticas podem provocar mudanças no crescimento celular ou na morte celular programada, levando ao surgimento do tumor (BRASIL, 2013).

O câncer de mama é o segundo câncer mais prevalente no Brasil e possui uma alta taxa de mortalidade. Os tratamentos mais utilizados são cirurgia, radioterapia e quimioterapia (INCA, 2019). A cirurgia, além do sofrimento físico, gera ainda um sofrimento psicológico e diminui a autoestima da paciente. Já os tratamentos com radioterapia e quimioterapia, são muitas vezes ineficazes e possuem muitos efeitos adversos, como a perda de cabelo (CAMPELO; ÁLVAREZ; LLORED, 2014).

Diante do descrito, a descoberta de novos princípios ativos para o tratamento do câncer de mama é necessária. Os produtos naturais possuem uma diversidade química única, com diversas atividades farmacológicas, desempenhando um papel de referência na descoberta de novos fármacos (ALAMGIR, 2017; YUAN *et al.*, 2016).

Embora o potencial farmacológico dos produtos naturais seja promissor, muitos exigem uma formulação especial para superar problemas como baixa solubilidade, instabilidade em meio biológico, baixa biodisponibilidade e efeitos adversos (RAWAT *et al.*, 2006).

Nesse contexto, para superar todos esses problemas, diversas propostas sobre os novos métodos de encapsulamento de fármacos, geralmente baseados em nanossistemas, com a formação de nanopartículas, tem sido relatadas na literatura (CABAN *et al.*, 2014).

No presente trabalho, foram utilizadas duas moléculas, arctiina e artigenina, obtidas a partir dos frutos da espécie *Arctium lappa* L. por Dias, 2013. Ambas possuem efeito antitumoral para o câncer de mama demonstrado em alguns estudos, porém possuem baixa solubilidade em água e necessitam

de formulação especial para serem utilizadas no meio biológico (CAI *et al.*, 2018; JIN *et al.*, 2018). Para isso, foram preparados nanoprecipitados hidrofóbicos a partir dos complexos de inclusão arctiina/ β -ciclodextrina e arctigenina/ β -ciclodextrina, por meio de uma técnica simples de nanoprecipitação (BITTENCOURT *et al.*, 2019; DENADAI *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2018).

A escolha da β -ciclodextrina, foi baseada em diversas vantagens que possui, como seu alto nível de biocompatibilidade, podendo se complexar com diferentes tipos de moléculas, sua disponibilidade e baixo custo (PINHO *et al.*, 2014).

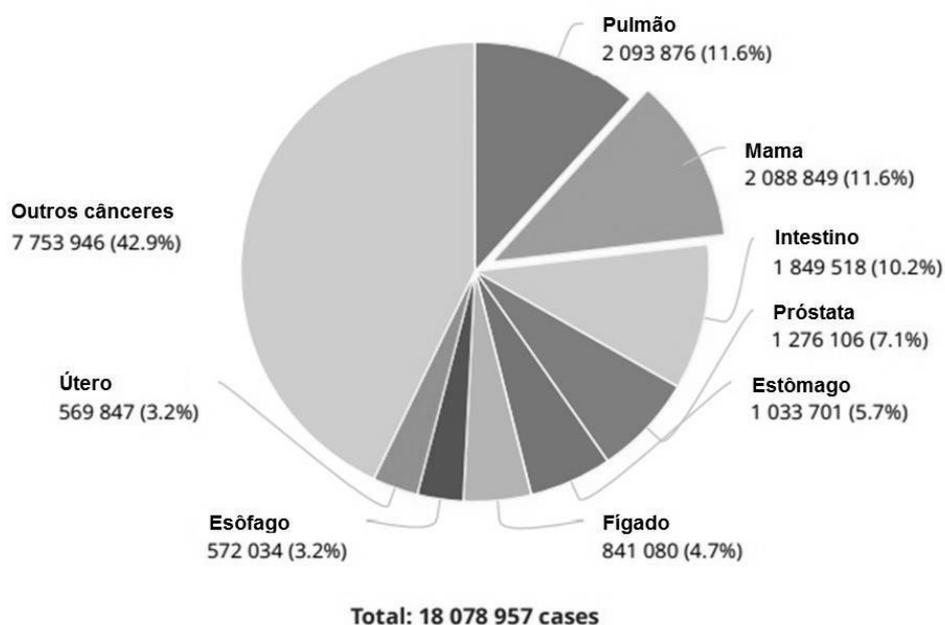
Para comprovar a formação dos complexos de inclusão, foram realizadas análises de caracterização físico-química, como espectrometria de infravermelho (IV), titulação calorimétrica isotérmica (ITC), espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial zeta (PZ) e condutividade elétrica. A verificação da citotoxicidade dos compostos *in vitro* para linhagens normais e tumorigênicas do câncer de mama, foi realizada através do ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium) (MTT).

1.2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o tipo de doença mais comum entre as mulheres em todo o mundo (SALEHINIYA; GHONCHEH; POURNAMDAR, 2016). Já nos homens, é uma doença rara, acometendo apenas 1% de todos os cânceres de mama (SANGUINETTI *et al.*, 2016).

Em 2018, no mundo, o número de novos casos foi de 2.088.849, correspondendo a 11,6% de todos os cânceres (figura 1) e 626.679 mortes, com incidência de 46,3 pessoas por cada 100.000 habitantes e mortalidade de 13 pessoas por cada 100.000 habitantes (GLOBOCAN, 2018).

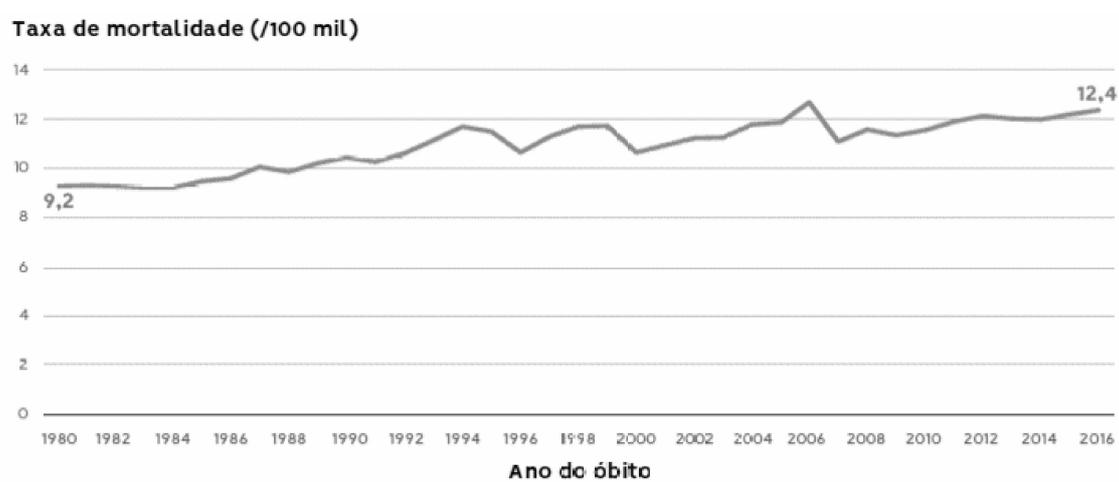
Figura 1. Número de novos casos de câncer em 2018, no mundo, ambos os sexos e todas as idades.



Fonte: Adaptado de GLOBOCAN, 2018.

No Brasil, depois do câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é o segundo câncer mais prevalente, com percentual de 29% de novos casos todos os anos (INCA, 2019). Entre 1980 e 2016, as taxas padronizadas de mortalidade por câncer de mama no Brasil, variaram de 9,2 óbitos a 12,4 óbitos por 100 mil mulheres, o que representa um aumento de 33,6% em 35 anos de observação (figura 2).

Figura 2. Taxas de mortalidade por câncer de mama, padronizadas por idade, sexo feminino, Brasil, de 1980 a 2016.



Fonte: (INCA, 2019).

Em 2017, no Brasil, o número de mortes relacionadas ao câncer de mama foi de 16.724 mulheres e 203 homens (INCA, 2019).

A incidência de câncer de mama nos países desenvolvidos é maior, enquanto a mortalidade relativa é maior nos países menos desenvolvidos. O alto índice de mortalidade ocorre devido ao grande número de diagnósticos realizados em estágios avançados da doença, sendo necessário aumentar a conscientização sobre os fatores de risco e a detecção precoce (SALEHINIYA; GHONCHEH; POURNAMDAR, 2016).

O aumento dos casos de câncer, assim como o aumento nas taxas de mortalidade indicam a necessidade de intervenção com medidas de controle mais efetivas bem como a busca por novos compostos para o tratamento.

1.2.1 Fatores de risco

Os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do câncer de mama são envelhecimento, histórico familiar de câncer em parentes de primeiro grau, fatores reprodutivos, exposição estrogênica, estilo de vida e obesidade (KAMIŃSKA *et al.*, 2015).

Envelhecimento: Além do sexo, o envelhecimento é um dos mais importantes fatores de risco para o câncer de mama, porque sua incidência

está altamente relacionada ao aumento da idade. Na América, durante o ano de 2016, aproximadamente 99,3% e 71,2% de todas as mortes por câncer de mama, foram relatadas em mulheres acima de 40 e 60 anos de idade, respectivamente (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019; SUN *et al.*, 2017).

Histórico familiar: Quase 25% de todos os casos de câncer de mama são relacionados ao histórico da família. Mulheres, cuja mãe ou irmã tem um câncer de mama são mais propensas a desenvolver a doença (BREWER *et al.*, 2017).

Fatores reprodutivos: Menarca precoce, menopausa tardia, idade tardia da primeira gravidez e baixa paridade podem aumentar o risco de câncer de mama. A cada um ano de atraso na menopausa, o risco de câncer de mama aumenta em 3%. A cada um ano de atraso na menarca ou cada parto adicional, diminui o risco de câncer de mama em 5% a 10%, respectivamente (DALL; BRITT, 2017).

Exposição estrogênica: Tanto os estrógenos endógenos quanto os exógenos, são associados ao risco de câncer de mama, pois estimulam a produção de fatores de crescimento promovendo o desenvolvimento do tumor. O estrogênio endógeno é geralmente produzido pelo ovário em mulheres na pré-menopausa (KEY, 2013). As principais fontes de estrogênio exógeno são os contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal (TRH). A TRH envolve administração de estrogênio exógeno ou outro hormônio para a menopausa ou pós-menopausa em mulheres (SUN *et al.*, 2017).

Estilo de vida: O consumo de álcool pode elevar o nível de estrogênio no sangue, aumentando o risco de câncer de mama (SUN *et al.*, 2017). Evidências demonstram que fumar aumenta o risco de ocorrência da doença, a duração mais longa, o aumento da quantidade e a idade de início do tabagismo estão associados ao alto risco de câncer de mama. Pesquisas demonstram que a fumaça de cigarro induz alterações nas células epiteliais da mama (CATSBURG; MILLER; ROHAN, 2015; KISPERT; MCHOWAT, 2017).

Obesidade: A obesidade também pode aumentar o risco de câncer de mama, principalmente devido a maior produção de estrogênio pelo tecido adiposo (DEGLISE *et al.*, 2019)

Os fatores de risco para o câncer de mama representam importantes indicadores para o prognóstico da doença, e assim estão diretamente

relacionados à sobrevida dos pacientes (NELSON *et al.*, 2012). Quando esses fatores são identificados, auxiliam a elaboração e implementação de programas educativos, de promoção à saúde e controle da doença (BORGHESAN; PELLOSO; CARVALHO, 2008).

1.2.2 Patogenia

O câncer de mama consiste em um grupo de doenças biologicamente e molecularmente heterogêneas originárias da mama. Geralmente, ele começa nas células do epitélio que reveste a camada mais interna do ducto. O termo carcinoma *in situ* se refere a uma proliferação neoplásica de células epiteliais que está limitada aos ductos e lóbulos pela membrana basal. O carcinoma invasivo é aquele que infiltra a membrana basal e se desenvolve em meio ao estroma. Nesses casos, as células têm potencial para invadir a vascularização e, conseqüentemente, atingir linfonodos regionais e sítios distantes. De acordo com as características patológicas e de invasividade, o câncer de mama pode ser dividido em três grupos: carcinoma ductal *in situ* ou não invasivo (CDIS), carcinoma invasivo sem outras especificações e carcinoma lobular invasivo (CLI) (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Carcinoma Ductal in situ ou não invasivo (CDIS): representa de 15 a 30% de todo câncer de mama diagnosticado (RUSSO, 2016). É caracterizado histologicamente pela proliferação anormal de células epiteliais malignas que são delimitadas pela membrana basal dos ductos de leite do tecido mamário. Essas células se acumulam no interior dos ductos e se expandem sem evidências de invasão ao estroma circundante, permanecem no lugar, por isso o nome *in situ*. Embora o CDIS não seja invasivo, possui alto potencial para se tornar invasivo, portanto, o tratamento precoce é necessário e de grande importância para alcançar a cura da doença ou impedir sua progressão (ALLRED, 2010; VIRNIG *et al.*, 2010). O CDIS progride para doença invasiva em 20-50% dos casos; embora não seja possível prever com precisão quais casos progredirão e quais não (LISA, 2015).

Carcinoma invasivo sem outras especificações: É o tipo mais comum de câncer de mama com cerca de 75% de todos os cânceres de mama invasivos. Caracteriza-se por iniciar-se nos ductos de leite, crescem localmente ou

atingem outros órgãos do corpo. Possui massas firmes, duras, bem a mal definidas e com difentes tamanhos, de milímetros a muitos centímetros. Em 70% a 80% dos casos mostram positividade para o receptor de estrogênio (RE) e 15 a 30% para o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (CORBEN, 2013).

Carcinoma Lobular Invasivo (CLI): Compreende aproximadamente 10% de todos os cânceres de mama (SLEDGE, 2016). Histologicamente, é caracterizado pela presença de células tumorais pequenas e relativamente uniformes crescendo isoladamente nos lóbulos mamários. Cresce em um padrão mais difuso com menor formação de tumores sólidos densos, sendo muitas vezes, mais difícil de detectar por radiografia em seus tumores primários e em locais metastáticos (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016; RUSSO, 2016).

Quando ocorrem metástases, o câncer é em grande parte incurável, exceto quando ocorrem casos locorregionais operáveis. Metástases à distância estão diretamente relacionadas às baixas taxas de sobrevida de pacientes com carcinoma mamário (JUNG *et al.*, 2012). Metástases de câncer de mama podem ser encontradas nos linfonodos da axila e/ou em locais distantes como pulmão, fígado, ossos e cérebro. Mesmo após a remoção do tumor, células tumorigênicas podem aparecer pelo corpo através de micrometástases, permitindo que o câncer retorne e volte disseminar (FENG *et al.*, 2018). De 20 a 30% dos pacientes evoluem para doença metastática após a remoção cirúrgica primária do tumor. Uma vez que os pacientes apresentam câncer de mama metastático, o objetivo de seu tratamento é manter a qualidade de vida e prolongar a sobrevida (TSUJI; PLOCK, 2017)

Além dos tipos diferentes de câncer de mama identificados com base em critérios de características patológicas e invasividade, a outra classificação para a doença, ocorre pela ausência ou presença da superexpressão dos receptores hormonais e receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (WAKS; WINER, 2019).

A mama feminina é uma glândula especializada que passa por ciclos repetidos de alterações induzidas por fator de crescimento e hormônios que definem as diferentes fases do desenvolvimento mamário. A desregulação dessa biologia complexa leva a um grupo diversificado de câncer da mama,

conectados inerentemente à sinalização hormonal ou por fator de crescimento (HAMMER; MCPHEE, 2016).

O câncer de mama consiste em três principais subtipos de tumor, categorizados de acordo com a superexpressão dos Receptores de Estrogênio (RE), Receptor de Progesterona (RP) e Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2) (RUSSO, 2016; WAKS; WINER, 2019).

A amplificação do gene receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) gera como produto, proteínas que atuam como receptoras de fatores de crescimento. Essas proteínas são comuns em cânceres de mama não-invasivos e invasivos, sendo sua superexpressão responsável pelo crescimento e divisão de células cancerígenas de forma descontrolada (HAMMER; MCPHEE, 2016).

De acordo com a ausência ou presença da superexpressão dos receptores citados, o câncer de mama é classificado em quatro subtipos moleculares: Luminal A, Luminal B, HER2 amplificado e Basal ou triplo negativo (RUSSO, 2016). Um resumo dos subtipos moleculares do câncer de mama pode ser visto na Tabela 1.

Os subtipos luminais A e B têm denominação advinda da similaridade que as células neoplásicas desses grupos possuem com as células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários, as chamadas células luminais (SOTIRIOU *et al.*, 2003).

Subtipo luminal A: Representa cerca de 60% dos casos de carcinomas de mama, e apresenta, em relação aos demais, o melhor prognóstico. São tumores com baixa proliferação, positivos para receptor de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP), e negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER2 (CIRQUEIRA *et al.*, 2011).

Subtipo luminal B: Comparado ao subtipo luminal A, possui maior índice de proliferação celular, está associado a um maior risco de recorrência e a uma menor sobrevida. São tumores com alta proliferação, positivos para receptor de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP), e negativos ou positivos para amplificação e/ou superexpressão de HER2 (HARBECK; GNANT, 2017; RUSSO, 2016).

Subtipo HER2 amplificado: Possui o segundo pior prognóstico em relação aos demais. São tumores negativos para receptor de estrogênio (RE) e

progesterona (RP), e positivos para amplificação e/ou superexpressão de HER2 (CIRQUEIRA *et al.*, 2011; RUSSO, 2016).

Subtipo basal ou triplo negativo: Representa 15-25% dos casos de câncer de mama, é caracterizado por um perfil de expressão semelhante ao das células mamárias normais mioepiteliais. São tumores negativos para receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e negativos para amplificação e superexpressão de HER2. Possuem características epidemiológicas e clínico patológicas distintas de outros subtipos. Apresentam recidivas frequentes e precoces com localizações viscerais. Apesar de uma relativa sensibilidade à quimioterapia, o prognóstico é o pior comparado aos outros subtipos (BERTUCCI; FINETTI; BIRNBAUM, 2011).

Tabela 1. Classificação de subtipos moleculares do câncer de mama.

Subtipo molecular	Receptor de Estrogênio (RE)	Receptor de Progesterona (RP)	Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2)
Luminal A	+ e/ou	+	-
Luminal B	+ e/ou	+	+/-
HER2 amplificado	-	-	+
Basal ou triplo negativo	-	-	-

Fonte: Adaptado de RUSSO, 2016.

1.2.3 Tratamento

O tratamento do câncer de mama depende do estágio de desenvolvimento e localização do tumor, consiste em cirurgia e radioterapia como tratamento local; e quimioterapia, terapia antiestrogênica e terapia alvo como tratamento sistêmico (INCA, 2019). O câncer de mama precoce, sem a presença de metástases distantes é uma doença potencialmente curável, devido principalmente à remoção cirúrgica do tumor, aliado a um tratamento eficaz.

Cirurgia: Pode ser conservadora, quando apenas uma parte da mama é retirada, ou radical, quando toda a mama é retirada, sendo possível realizar posteriormente, a reconstrução mamária. Embora o benefício da cirurgia esteja

bem documentado, em alguns casos como no tumor triplo ou HER2 amplificado, a terapia sistêmica primária é a mais adequada (HARBECK; GNANT, 2017; SUN *et al.*, 2017). Após a cirurgia, o tratamento adjuvante sistêmico e/ou local também tem por objetivo eliminar possíveis micrometástases. (INCA, 2019).

Radioterapia: É um dos principais tratamentos para o câncer de mama, desempenhando um papel importante no tratamento de 40% dos pacientes que são curados. É um método altamente eficaz para o tratamento paliativo e controle dos sintomas em casos avançados ou recorrentes. Embora o efeito benéfico da radioterapia esteja bem documentado, esse tratamento pode estar relacionado a várias complicações, que podem afetar a qualidade de vida e sobrevida do paciente, como danos cardíacos e pulmonares, linfedema, plexopatia braquial e mobilidade do ombro prejudicada (GANTCHEW, 2010; SENKUS-KONEFKA; JASSEM, 2006).

Quimioterapia: Tem como objetivo geral causar a morte de células tumorigênicas ou inibir sua proliferação e metástase, no entanto, na maioria dos casos, não é possível administrar os fármacos separando efeitos antitumorais, da toxicidade normal do tecido, gerando como consequência uma diversidade de efeitos adversos. A curto prazo, podem ocorrer febre, infecção, neutropenia, trombocitopenia, desidratação, distúrbios eletrolíticos, náusea, vômito, diarreia, anemia, trombose venosa profunda, embolia pulmonar e desnutrição. A longo prazo, podem causar toxicidade cardíaca, leucemia secundária, disfunções cognitivas e neurotoxicidade (AZIM *et al.*, 2011; CHABNER; LONGO, 2019; HASSETT *et al.*, 2006; KAISER; BLEADOWSKI; DIETRICH, 2014).

Terapia antiestrogênica: Consiste no uso de moduladores seletivos dos receptores de estrogênio, infrareguladores seletivos dos receptores de estrogênio e inibidores da aromatase (BRUNTON *et al.*, 2010; RANG *et al.*, 2016).

- *Moduladores seletivos dos receptores de estrogênio:* Ligam-se ao receptor de estrogênio e exercem efeitos estrogênicos ou antiestrogênicos, dependendo do órgão específico. Além de seus efeitos antagonistas sobre o estrogênio no câncer de mama,

alguns também exercem efeitos agonistas estrogênicos em outros tecidos (BRUNTON *et al.*, 2010; RANG *et al.*, 2016).

- *Infrareguladores seletivos dos receptores de estrogênio*: Também denominados “antagonistas puros”, ligam-se ao receptor de estrogênio bloqueando competitivamente a ligação do estrogênio e suprimindo a expressão dos genes dependentes desse hormônio (BRUNTON *et al.*, 2010; RANG *et al.*, 2016).
- *Inibidores da aromatase*: Inibem a aromatase, a enzima envolvida na etapa final de conversão dos androgênios em estrogênios. Diminuindo assim o nível desse hormônio no sangue (BRUNTON *et al.*, 2010; RANG *et al.*, 2016).

Os efeitos adversos da terapia antiestrogênica incluem risco de câncer de endométrio, causando fenômenos tromboembólicos, fogachos, retenção hídrica, amenorreia, alteração do ciclo menstrual, corrimento vaginal, sangramento vaginal, câncer do colo uterino, náusea, perda de peso, mudança de humor, depressão, osteoporose e problemas cardíacos (LEAL; CUBERO; DEL GIGLIO, 2010).

Anticorpos monoclonais: É um tratamento direcionado, que procura afetar as células do câncer de maneira seletiva, com base em características moleculares específicas. No câncer de mama, o anticorpo monoclonal liga-se ao receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) impedindo sua superexpressão e além disso, também são capazes de promover a morte celular por outros mecanismos. Devido à especificidade da terapia, os efeitos adversos são menores quando comparados aos outros tratamentos (CHARLTON; SPICER, 2016; RANG *et al.*, 2016).

Os moduladores seletivos dos receptores da progesterona são substâncias sintéticas derivadas dos esteroides que têm a capacidade de ocupar os receptores da progesterona e passam a ter ação como antagonista ou agonista dependendo do tecido alvo. São pouco utilizados para o câncer de mama, pois apresentam muitos efeitos adversos, como alterações endometriais, sangramento vaginal e propriedades abortivas (DANIEL; HAGAN; LANGE, 2011; SILVA; LARA, 2011).

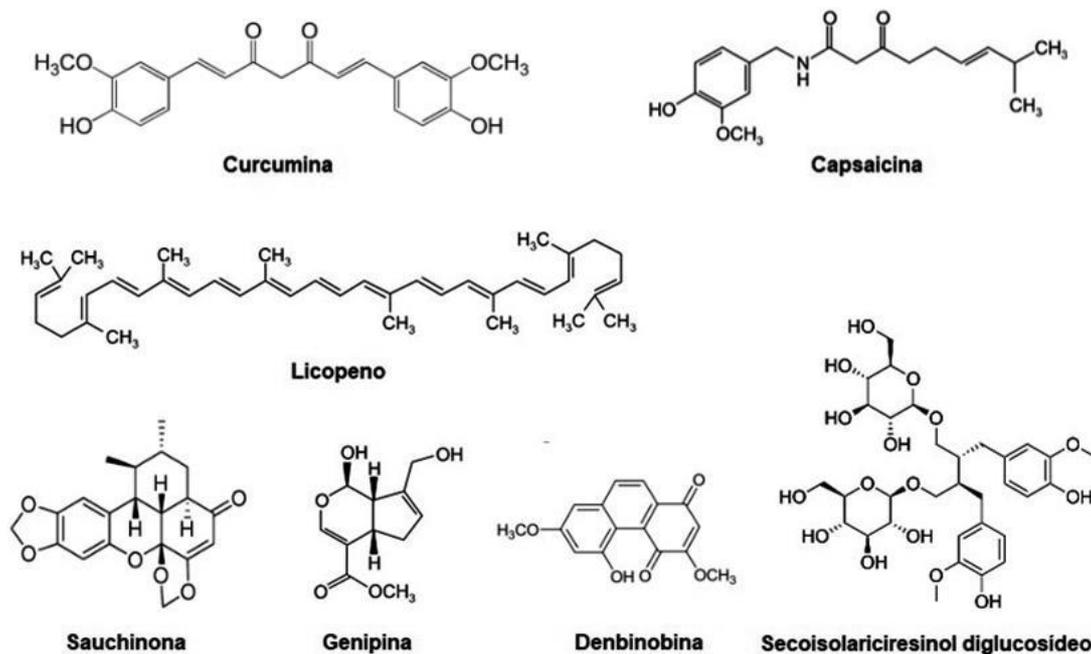
1.2.4 Produtos naturais com efeito antitumoral para o câncer de mama

A utilização de plantas medicinais ocorre desde a antiguidade, sendo a base do tratamento de muitas doenças ao redor do mundo. As plantas são capazes de produzir diversos metabólitos secundários como terpenos, compostos fenólicos e alcaloides, que são ricas fontes de compostos bioativos (CHEUNG, 2015).

Os metabólitos secundários possuem efeitos benéficos à saúde e bem-estar do homem e dos animais, são produzidos pelas plantas e podem atuar como defesa contra doenças, predadores, radiação ultravioleta e parasitas, assim como facilitar processos reprodutivos e para a competição entre espécies (CHEUNG, 2015).

Na figura 3, encontram-se alguns dos mais relevantes compostos com efeito antitumoral para o câncer de mama como curcumina, capsaicina, licopeno, sauchinona, genipina, denbinobina e secoisolariciresinol diglucosídeo (KO; MOON, 2015). Dentre esses compostos, podemos destacar o secoisolariciresinol diglucosídeo, pertencente à classe das lignanas, a mesma dos compostos arctiina e arctigenina presentes no estudo (CALADO, 2018, CHEN *et al.*, 2009).

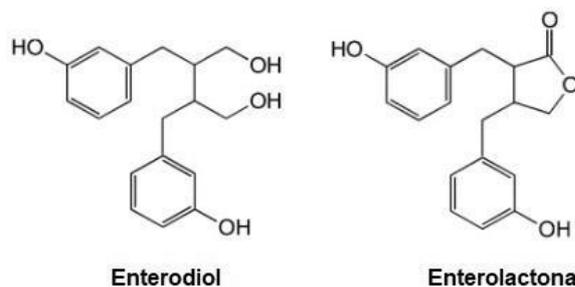
Figura 3. Alguns compostos naturais e derivados com efeito antitumoral para o câncer de mama.



Fonte: Adaptado de KO; MOON, 2015; SETCHELL *et al.*, 2014.

As lignanas são compostos fenólicos, formadas pelo acoplamento de dois resíduos de álcool coniferílico, amplamente distribuídas no reino vegetal. Existem dois tipos gerais de lignanas, aquelas encontradas em plantas, como secoisolariciresinol diglicosídeo, arctiina e arctigenina; e as lignanas de mamíferos, enterodiol e enterolactona (figura 4), que são formadas no trato intestinal pela ação bacteriana sobre precursores da lignana vegetal (SETCHELL *et al.*, 2014).

As lignanas de mamíferos são estruturalmente semelhantes ao estrogênio e funcionam como antiestrogênicos, permitindo sua ligação aos receptores celulares e inibindo o crescimento de células cancerígenas (CALADO *et al.*, 2018; MILDNER *et al.*, 2007). Além do efeito antiproliferativo, a ingestão de lignanas está associada a um efeito profilático, com menores riscos do desenvolvimento do câncer de mama (JUNG *et al.*, 2012).

Figura 4. Estrutura das enterolignanas.

Fonte: (KUIJSTEN *et al.*, 2005)

1.3 A ESPÉCIE *Arctium lappa* L. (Asteraceae)

A *Arctium lappa* L. é uma espécie de origem europeia, pertencente à família Asteraceae, conhecida mundialmente e propagada espontaneamente por todo o Brasil (LIMA *et al.*, 2006). Segundo o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, a planta possui sinônimos como *Arctium chaorum* Klokov e *Lappa major* Gaernt. A utilização das raízes por decocção é indicada como antidiarréico, diurético e anti-inflamatório (BRASIL, 2011).

No Brasil é popularmente conhecida como: bardana, bardana maior, pegamaço, orelha de gigante e erva de tinhosos (QUATTROCCHI, 2000). É uma planta herbácea, perene, que cresce espontaneamente nos campos e onde há solos ricos de matéria orgânica, sendo considerada muitas vezes planta invasora (LORENZI; MATOS, 2002). Possui raízes delgadas, finas, afiladas, com até 1,20 metros de comprimento, geralmente marrom por fora e branca na parte interna, podendo atingir até 3 metros de altura (LIM, 2015).

Possui folhas grandes, alternadas e cordiformes que têm um longo pecíolo, sendo pubescentes na parte inferior. As folhas inferiores são maiores que as superiores, possuindo hastes longas e sólidas. As flores florescem sempre no verão, são arroxeadas e agrupadas em capítulos globulares, rodeados por involúcros que se curvam formando um gancho. Os frutos são aquênios, longos e com papus curtos (figura 5). A planta armazena a maior parte dos nutrientes durante o primeiro ano (EL-DARIER; SALAMA, 2016; KORIEM *et al.*, 2016).

Figura 5. Folhas e frutos da *Arctium lappa* L. (Asteraceae)



Fonte: Autora, 2020. Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia - UFJF

A *Arctium lappa* L. tem sido usada terapeuticamente na Europa, na América do Norte e na Ásia por centenas de anos. A raiz é a parte mais utilizada com fins terapêuticos, embora as folhas, frutos e sementes também sejam utilizados (CHAN *et al.*, 2011).

Diversos estudos comprovam sua eficácia terapêutica, que possui efeito hepatoprotetor (PREDES *et al.*, 2014), anti-inflamatório e antialérgico (SOHN *et al.*, 2011), antioxidante (LIU *et al.*, 2014), anti-proliferativo (MACHADO *et al.*, 2012), antidiabético (AHANGARPOUR *et al.*, 2017) e anti-ulcerogênico (LI *et al.*, 2016).

Estudos fitoquímicos revelam a presença de diversos metabólitos secundários em diferentes partes da planta. As lignanas, arctiina e arctigenina, são encontradas nas folhas, frutos, sementes e raízes; os terpenóides, como beta-eudesmol, são encontrados nos frutos; polifenóis, ácido cafeico e ácido clorogênico, são encontrados nas folhas e raízes; frutoses e esteroides, são encontrados nas raízes (CHAN *et al.*, 2011). Além da arctiina e seu glicosídeo arctigenina, as sementes contêm menores concentrações das lignanas matairesinol, secoisolariciresinol e neoarctin (BARCELOUX, 2008). Alguns ácidos fenólicos, em particular o ácido cafeico, ácido clorogênico e cinarina

foram identificados nas sementes; os flavonoides luteolina e quercetina, foram identificados nas raízes; e flavonoides nas folhas (FERRACANE *et al.*, 2010).

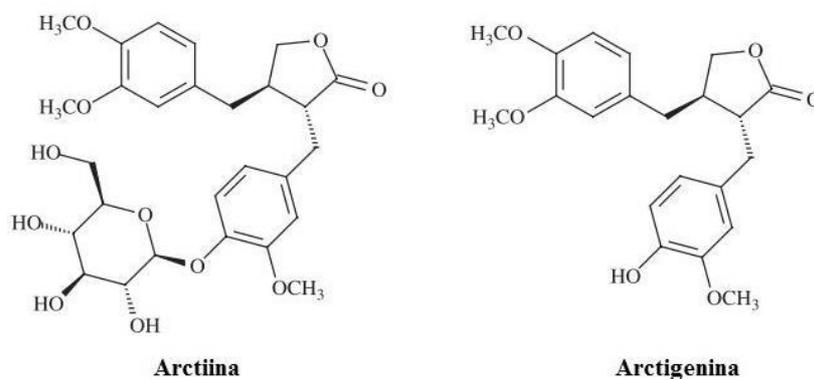
1.3.1 Arctiina e arctigenina

As lignanas arctiina e arctigenina (figura 6) são metabólitos secundários muito presentes na *Arctium lappa* L, possuindo uma variedade de atividades biológicas (BARCELOUX, 2008; CHAN *et al.*, 2011). Os efeitos anti-inflamatório e antioxidante têm sido atribuídos a essas lignanas predominantes em raízes e frutos da planta (LIMA *et al.*, 2006). Possuem atividade antiviral *in vitro* potente contra o vírus Influenza A (HAYASHI *et al.*, 2010).

A atividade antiparasitária das duas lignanas é citada na literatura contra *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) em peixes dourados (*Carassius auratus*) (WANG *et al.*, 2009).

As duas moléculas podem ser obtidas pela extração e isolamento, sendo que a arctigenina também pode ser obtida através da hidrólise ácida da arctiina, onde a molécula de glicose é retirada, dando origem a arctigenina, uma dibenzibutirolactônica, com dois anéis aromáticos e um anel lactônico presentes em sua estrutura (GAO *et al.*, 2008).

Figura 6. Estrutura da arctiina (arctigenina-4-glicosídeo, $C_{27}H_{34}O_{11}$) e arctigenina ($C_{21}H_{24}O_6$).



Fonte: (BARCELOUX, 2008).

Arctiina: O estudo de Bae *et al.* (2014) sugere efeito antioxidante da arctiina, demonstrado por meio da proteção na disfunção celular induzida por espécies reativas de oxigênio em células da papila dérmica de cabelo, sendo útil na prevenção e tratamento da alopecia.

Li, Jing *et al.* (2017) verificaram que a arctiina pode atenuar a hipertrofia cardíaca pelo bloqueio das vias de sinalização intracelular, das proteínas quinases ativadas por mitógenos e da proteína quinase B.

O estudo de Min *et al.* (2014) demonstrou que a arctiina foi capaz de inibir a adipogênese nas células adipócitas 3T3-L1 e diminuir o peso corporal em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, sugerindo um efeito benéfico na prevenção da obesidade.

Seu efeito quimiopreventivo foi investigado na retinopatia diabética induzida pela estreptozotocina em ratos, sendo que os resultados comprovaram uma diminuição no nível de hemoglobina glicosilada em todos os grupos tratados com arctiina quando comparado com o grupo controle, e o nível sérico de glicose também foi diminuído nos ratos tratados com a maior dose de arctiina. Além disso, o tratamento com arctiina melhorou o edema retiniano, o desprendimento da retina e a expressão do fator de crescimento endotelial vascular na retina, detectada por meio de exames histológicos e imunquímicos. Juntos, esses achados demonstram que a arctiina diminui a gravidade das complicações diabéticas, demonstrando a importância desse composto como inibidor da retinopatia diabética (LU *et al.*, 2012).

Seu efeito anti-inflamatório foi verificado em um estudo, onde a arctiina foi capaz de suprimir a indução de macrófagos capazes de secretar óxido nítrico e uma série de citocinas pró-inflamatórias (KIM *et al.*, 2011).

Um estudo realizado por Matsuzaki *et al.* (2008) revela a ação anti-proliferativa da arctiina, responsável por inibir o crescimento celular em câncer de mama através da regulação negativa na expressão da proteína ciclina D1, presente em vários tipos de células tumorigênicas humanas.

Arctigenina: Estudos sugerem que a arctigenina é capaz de modular as respostas imunes do organismo, beneficiando o tratamento de diversas doenças. Possui efeito anti-inflamatório, observado pela supressão na produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos, inibindo fortemente a expressão da atividade enzimática da óxido nítrico

sintetase e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (CHO *et al.*, 2004; ZHAO; WANG; LIU, 2009).

Como agente antitumoral, a arctigenina foi estudada por Awale *et al.* (2006), a lignana foi capaz de causar 100% de citotoxicidade em células cancerígenas desprovidas de nutrientes. Em ensaios *in vivo*, demonstrou suprimir fortemente o crescimento do tumor pancreático em camundongos desprovidos de nutrição.

Um estudo revelou a inibição da viabilidade das células tumorigênicas do câncer de mama, MCF-7, quando tratadas com arctigenina. Além disso, os efeitos sinérgicos entre arctigenina e tamoxifeno sugerem que o seu consumo pode ser um co-tratamento eficaz (MAXWELL *et al.*, 2018). Em outro estudo, os resultados indicaram que a arctigenina também foi capaz de inibir o crescimento de células do câncer de mama, MDAMB-231, induzindo a apoptose *in vitro* e *in vivo* (HSIEH *et al.*, 2014).

Segundo Maxwell *et al.* (MAXWELL *et al.*, 2017), a arctigenina foi capaz de diminuir a metástase do câncer de mama, independentemente da expressão do receptor de estrogênio.

Embora muitas lignanas sejam obtidas sinteticamente, não foram encontrados na literatura relatos sobre a síntese da arctiina e da arctigenina, justificando o isolamento dessas substâncias. (FANG; HU, 2018; OKURA; SAIMARU; MONMA, 2009).

Como visto anteriormente, tanto a arctiina, quanto a arctigenina possuem atividade farmacológica para o tratamento de diversas doenças, entre elas o câncer de mama, porém a solubilidade de ambas as moléculas é muito baixa para ser absorvida pelo organismo, tornando a aplicação clínica limitada (JIN, XIN *et al.*, 2018). Portanto, é importante utilizar meios que melhorem a solubilidade e a biodisponibilidade dessas moléculas (CAI *et al.*, 2018).

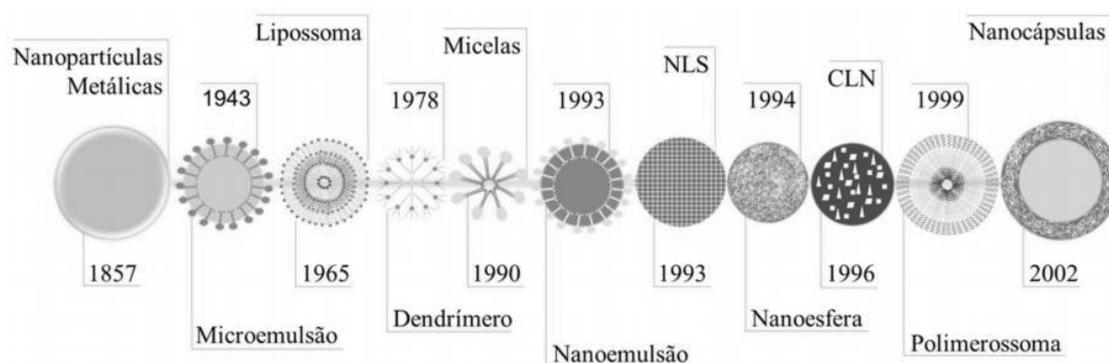
Para isso, associações com outras moléculas, como a ciclodextrina, permite a formação de um complexo de inclusão nanoestruturado, que possui fácil obtenção, baixo custo relativo e boa aceitação em diferentes formulações.

1.4 NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Muitos fármacos de origem vegetal demandam por uma formulação especial para superar problemas como baixa solubilidade, instabilidade em meio biológico, baixa biodisponibilidade e efeitos adversos graves (RAWAT *et al.*, 2006).

Neste contexto, diversas propostas sobre os novos métodos de encapsulamento de fármacos, geralmente baseados em nanocarreadores, tem sido relatadas na literatura (figura 7). O uso de nanopartículas na indústria farmacêutica superou as barreiras envolvidas no fornecimento de fármacos biotecnológicos e seu sucesso e aceitação podem ser implicados pela aprovação de diversos fármacos (CABAN *et al.*, 2014, OGIER; ARNAULD; DORIS, 2009; RAWAT *et al.*, 2006).

Figura 7. Principais nanocarreadores dispostos em ordem cronológica.



NLS = nanocarreador lipídico sólido; CLN = carreador lipídico nanoestruturado

Fonte: (APOLINÁRIO *et al.*, 2020).

Para ser considerada uma nanopartícula, o tamanho deve ser menor que 1000 nm, sendo possível observar essa característica, através de técnicas de caracterização físico-química como dispersão de luz, considerada um método valioso para a medição e análise de nanopartículas (BRAR; VERMA, 2011).

A redução no tamanho da partícula resulta em um aumento da área superficial, pois há um maior número de átomos expostos, que facilitam a adesão às superfícies. A adesão à superfície das nanopartículas à parede intestinal, depois da administração oral, melhora a biodisponibilidade e a absorção do fármaco. O aumento da área superficial, aumenta a diversidade de interações e permite uma maior probabilidade de interação da nanopartícula

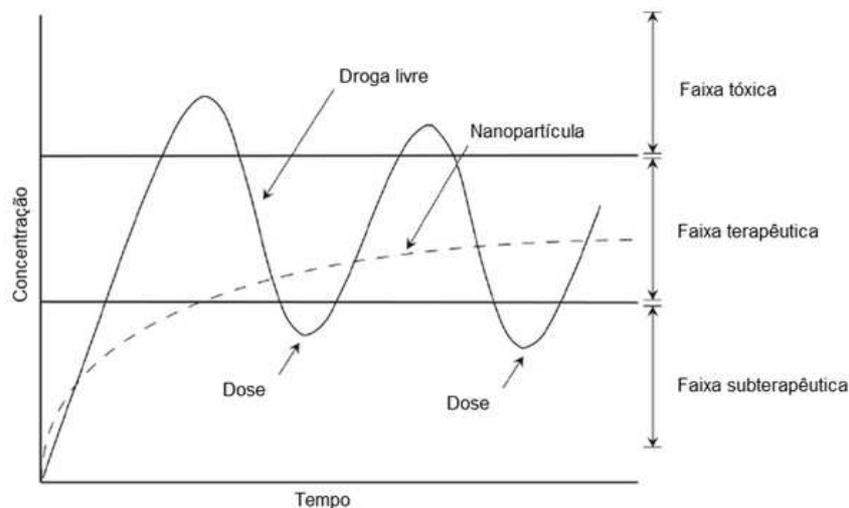
com biomoléculas e membranas. Também ocorre uma redução do atrito entre partículas, reduzindo a viscosidade de dispersões, auxiliando o processamento industrial e a difusão no meio biológico (DURÁN *et al.*, 2010; FANGUEIRO *et al.*, 2012).

O sistema de liberação controlada do fármaco é uma das principais vantagens da utilização de nanopartículas, pois os fármacos tradicionais necessitam de altas doses para atingir o efeito terapêutico, resultando em muitos efeitos adversos para o paciente. A nanotecnologia permite que o índice terapêutico de quase todos os fármacos, seja melhorado através de sistemas eficientes, de entrega da droga aos alvos biológicos. A melhor maneira de aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade de um medicamento é manter sua concentração no local por tempo suficiente para que a ação terapêutica tenha efeito (SULTANA; ARAYNE, 2006).

A melhora na biodisponibilidade de um fármaco através do sistema de liberação controlada é possível devido à retenção do princípio ativo na matriz de encapsulamento, que além de reter a droga, ajuda a evitar a fagocitose e a elevação indesejada das concentrações em locais indesejados (DAS *et al.*, 2011).

Nessa perspectiva, uma boa formulação deve manter a concentração do fármaco no plasma dentro da faixa terapêutica por um longo período de tempo, pois evita doses frequentes de administração, reduz os efeitos adversos e aumenta a adesão do paciente. Na figura 8 está representado o gráfico que demonstra o benefício do uso de sistemas de liberação controlada, comparado à droga livre na sua forma convencional.

Figura 8. Comparação do perfil farmacocinético da droga livre e da nanopartícula.



Fonte: Adaptado de DAS *et al.*, 2011.

Em um sistema de liberação controlada ideal, com apenas uma dose, o dispositivo é capaz de ampliar a concentração do fármaco na faixa terapêutica por um longo período. Já a droga livre, apresenta tempo de ação relativamente curto, precisando de várias doses para alcançar a faixa terapêutica.

Para atingir a faixa terapêutica rapidamente, a concentração da droga livre geralmente é mais alta, atingindo a faixa tóxica e causando efeito colateral para o paciente. Como o tempo de ação é curto, a droga passa da faixa tóxica para a faixa subterapêutica rapidamente, onde a concentração é baixa e ineficaz para o efeito farmacológico, necessitando de outra dose.

Diante do descrito, tratamentos com menores efeitos adversos são explorados em pesquisas ao redor do mundo. As nanopartículas melhoram a eficácia do tratamento do câncer de mama, com efeitos adversos significativamente minimizados associados à terapêutica padrão e podendo em alguns casos, retardar o início da disseminação metastática (BAWARSKI *et al.*, 2008; GOLDMAN *et al.*, 2017; WANG; BILLONE; MULLETT, 2013).

1.5 CICLODEXTRINAS

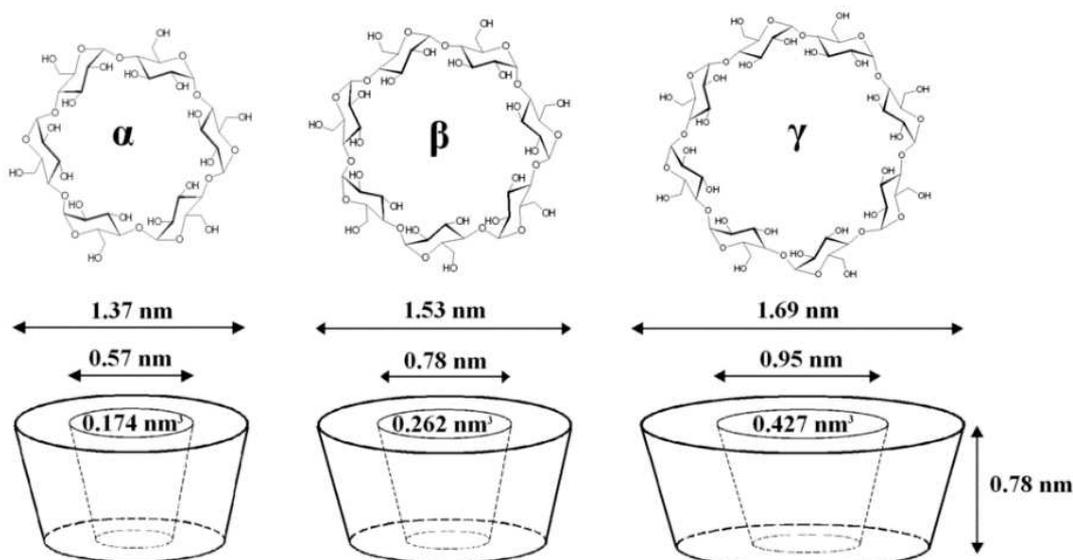
As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos produzidos a partir da degradação do amido pela enzima amilase ciclodextrinaglicosiltransferase

presente em diferentes bacilos, como *Bacillus macerans* e *B. circulans* (BILENSOY, 2011). Possuem facilidade em formar estruturas supramoleculares para seu uso na administração de fármacos. São capazes de desenvolver sistemas 'inteligentes' para entrega eficiente de fármacos, especialmente os hidrofóbicos. Para o desenvolvimento desses sistemas, são formadas nanopartículas por meio de uma técnica simples de nanoprecipitação (BITTENCOURT *et al.*, 2019; DENADAI *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2018)

Possuem um alto nível de biocompatibilidade e podem se complexar com diferentes tipos de moléculas (PINHO *et al.*, 2014). São aplicadas nas indústrias farmacêutica, alimentícia, de papel, de artigos de higiene, cosmética, têxtil, química e agrícola (JIN, 2013).

Dependendo das condições exatas da reação, três CDs principais podem ser obtidas: α , β e γ -ciclodextrinas, constituídas por 6, 7 ou 8 unidades de glicopirranose, respectivamente (figura 9). Analisando a figura 9, pode-se observar que a altura do cone é de aproximadamente 7,9 Å para qualquer ciclodextrina, enquanto o diâmetro da cavidade varia em função do número de unidades glicosídicas (BILENSOY, 2011).

Figura 9. Estruturas, dimensões geométricas aproximadas e volumes aproximados das cavidades de α , β e γ -CD.

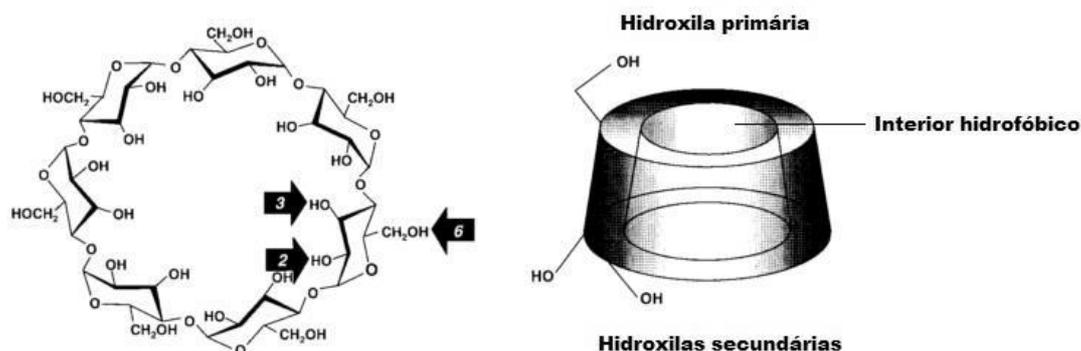


Fonte: (JIN, 2013).

São moléculas cíclicas e rígidas devido à falta de rotação livre no nível das ligações entre as unidades de glicopirranose. Elas não são totalmente

cilíndricas, mas sim toroidais ou cônicas, constituindo um cone truncado, que possui uma cavidade hidrofóbica e um exterior hidrofílico (figura 10) (BILENSOY, 2011). O principal interesse em CDs reside na sua capacidade de formar complexos de inclusão com várias moléculas.

Figura 10. Estrutura da β -ciclodextrina na forma de um cone truncado.



Fonte: Adaptado de UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998.

Os grupos hidroxila secundários (C2 e C3), localizados na borda mais larga e os primários (C6), localizados na borda mais estreita do anel, estão posicionados externamente, conferindo características hidrófilas às CDs, tornando-as solúveis em água e insolúveis na maioria dos solventes orgânicos. A hidrofobicidade da cavidade da molécula é devido à presença dos grupamentos C-H e a expulsão das moléculas de água do interior das CDs, que ocorre pela tensão do anel, impedindo as ligações de hidrogênio da água com os grupos presentes na cavidade. A hidrofobicidade da cavidade permite que a CD se associe a uma ou mais moléculas orgânicas apolares para formar complexos de inclusão. Além disso, uma ou duas moléculas hóspedes podem ser capturadas por uma, duas ou três CDs (BILENSOY, 2011; JIN, 2013; MOREIRA, 2016).

Das CDs naturais, a β CD é a mais utilizada, pois apesar da sua reduzida solubilidade em água, que limita a sua aplicação farmacêutica, ela apresenta uma capacidade de complexação de um elevado número de fármacos hidrófobos, seu custo é baixo, está disponível em elevadas quantidades e sua utilização é aprovada como excipiente para preparações farmacêuticas (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

O número de artigos e patentes dedicados à aplicação industrial de CDs aumenta constantemente e grande parte deles refere-se a aplicações farmacêuticas (BILENSOY, 2011).

É crescente a busca por fármacos com formulações mais estáveis, melhores propriedades de biodisponibilidade e sistemas de liberação de droga mais eficazes. Todos esses fatores impulsionam a pesquisa de combinações de ciclodextrinas com diversas moléculas com potencial farmacológico, visando o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e com menores efeitos adversos.

1.5.1 Formação do complexo de inclusão (CI)

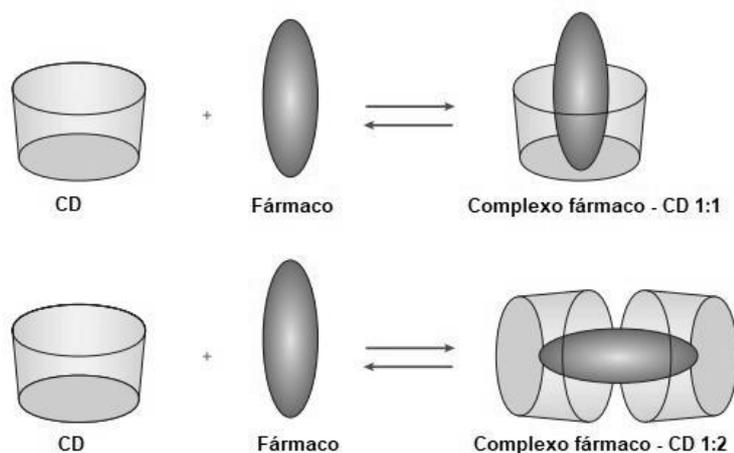
Existem vários métodos para a formação de complexos de inclusão (CI) entre CDs e moléculas bioativas. Na escolha, deve-se levar em consideração as propriedades da molécula hóspede, a simplicidade do método, os custos envolvidos e a facilidade em transposição em escala. Podem ser divididos em fase líquida, fase semi-sólida e fase sólida, sendo que os melhores resultados são obtidos em fase líquida. Dentre os métodos de fase líquida, tem-se: coprecipitação, neutralização, liofilização e secagem por pulverização (CHORILLI *et al.*, 2007; PINHO *et al.*, 2014).

No método de coprecipitação, adiciona-se a molécula hóspede na solução de CD. O sistema é mantido sob agitação magnética com parâmetros de processo controlados. O material precipitado passa por remoção do solvente e água por rotaevaporação, liofilização ou outro processo semelhante, obtendo-se o complexo de inclusão (PATIL *et al.*, 2010).

Em uma solução aquosa, a ciclodextrina com sua cavidade levemente apolar é ocupada por moléculas de água, que são energeticamente desfavorecidas (interação polar-apolar), e, portanto, podem ser facilmente substituídas por “moléculas hóspedes” apropriadas que são menos polares que a água. A ciclodextrina dissolvida é a molécula “hospedeira” e a formação do complexo de inclusão ocorre pela substituição de moléculas de água por um “convidado” apropriado para a molécula (figura 11). Geralmente a proporção hóspede:hospedeiro é 1:1, mas de acordo com o tamanho da cavidade,

tamanho do hóspede e das possíveis interações entre eles, podem haver proporções 2: 1, 1: 2 e 2: 2 (figura 11) (BILENSOY, 2011).

Figura 11. Formação de complexos fármaco - CD com estequiometria 1:1 e 1:2.



Fonte: Adaptado de DAVIS; BREWSTER, 2004.

No processo de complexação, é importante a determinação da constante de associação ou afinidade do complexo (K), pois este parâmetro representa composição química no equilíbrio termodinâmico entre as moléculas livres e complexadas, permitindo avaliar o grau de afinidade entre as espécies. Essa constante é determinada por métodos experimentais. Além disso, parâmetros termodinâmicos, como entalpia, entropia e energia livre de Gibbs, também devem ser considerados como parâmetros importantes na avaliação do processo de complexação (PINHO *et al.*, 2014).

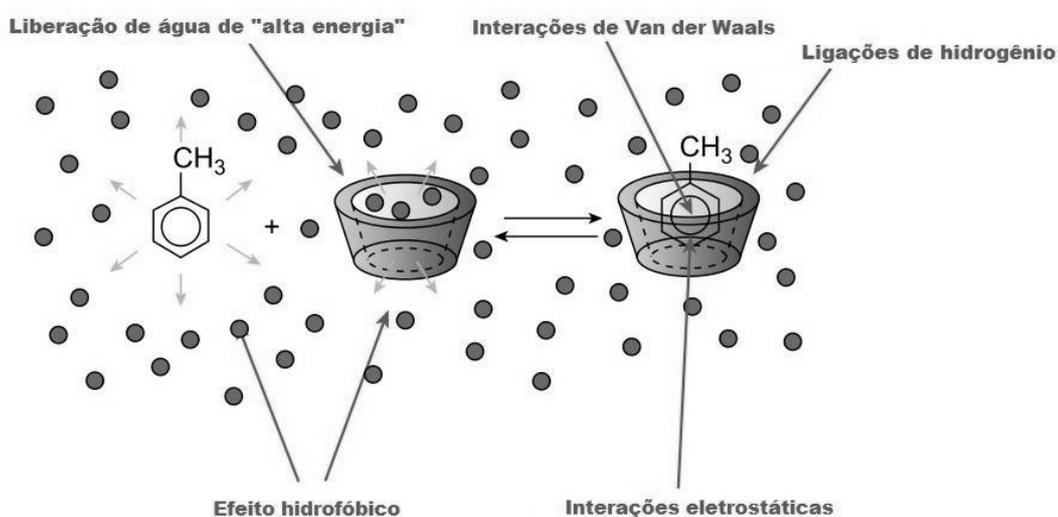
Uma constante de associação alta sugere uma elevada afinidade entre a molécula hóspede e a ciclodextrina, o que implica em liberação prolongada do fármaco. Em alguns casos, uma liberação inicial rápida, seguida por uma liberação prolongada é necessária para que o medicamento atinja rapidamente uma concentração terapêutica eficaz (FU; RECUM, 2014).

As constantes de associação para aplicações farmacêuticas estão no intervalo entre 0 a 10^5 , onde 0 indica que o fármaco é incapaz de formar um complexo com a ciclodextrina e 10^5 indica o limite superior para a formação dos complexos de fármacos com a ciclodextrina (DE MIRANDA *et al.*, 2011;

LOFTSSON; HREINSDÓTTIR; MÁSSON, 2007; VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006).

Durante a formação dos CI, nenhuma ligação covalente é quebrada ou formada, sendo estes complexos mantidos devido às forças hidrofóbicas, interações de Van der Waals, interações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio, que justificam os valores relativamente baixos de constante de equilíbrio (figura 12) (DENADAI *et al.*, 2006; PINHO *et al.*, 2014).

Figura 12. Representação esquemática da formação de um complexo de inclusão em solução aquosa.



Fonte: Adaptado de BILENSOY, 2011.

A ligação de hidrogênio ocorre quando o átomo de hidrogênio se liga a um elemento eletronegativo. Geralmente, as ligações de hidrogênio entre o hóspede e a CD são provenientes dos grupos hidroxilas primários (C6) das CDs, que podem girar na ligação C5-C6. Enquanto as hidroxilas secundárias, ligadas aos carbonos C2 e C3, estão rigidamente ligadas, impossibilitando a ligação de hidrogênio. Este tipo de ligação tem grande importância na formação de complexos de inclusão no estado sólido. Para compostos em solução aquosa, esse tipo de ligação não é a principal responsável pela complexação, pois a água compete com a CD para formar a ligação de hidrogênio com a molécula hóspede (LIU, LEI; GUO, 2002).

A interação de Van der Waals é considerada uma das principais interações responsáveis pela estabilização dos complexos. É causada pela

aproximação entre as moléculas, que desloca a nuvem de elétrons dos átomos e resulta em momentos dipolares momentâneos, orientados de modo a produzir uma atração entre as moléculas. Quanto maior a estabilização do complexo CD-hóspede por forças de Van der Waals maior o colapso da estrutura do agregado de água durante o processo de inclusão, permitindo a remoção de água da cavidade da CD e auxiliando na formação do complexo de inclusão (VENTURINI *et al.*, 2008). De todas as interações de Van der Waals, a interação dipolo-dipolo desempenha um papel essencial na estabilização do complexo, bem como na determinação de sua orientação (LIU, LEI; GUO, 2002).

Outra característica de grande importância para a formação dos complexos de inclusão em solução é o efeito hidrofóbico, que ocorre após a remoção da água presente na cavidade da CD e favorece a inclusão de moléculas hóspedes apolares (VALLE, 2003).

A interação eletrostática ocorre quando duas moléculas de cargas opostas interagem ou quando há pelo menos uma espécie iônica induzindo ou interagindo com um dipolo. Assim, há três tipos de interações eletrostáticas importantes, interação íon-íon, interação íon-dipolo e interação íon-dipolo induzido. De todas essas, a interação íon-dipolo é a mais comumente encontrada entre ciclodextrinas e compostos iônicos, que por sua vez interagem com os grupos C-O-C da cavidade das CDs (LIU; GUO, 2002)

1.5.2 Nanoprecipitados hidrofóbicos

Nanoprecipitados hidrofóbicos (NPHs) são nanopartículas sólidas, de baixa solubilidade, geralmente produzidas em misturas de solventes onde a água é o principal componente. São formados quando o complexo de inclusão previamente dissolvido em um solvente menos polar que a água é misturado em água sob agitação. Constituem sistemas de liberação controlada de princípios ativos pelo mecanismo de difusão, onde as moléculas precisam se difundir das nanoestruturas por efeito de solubilização ou desgaste por atrito (MOREIRA *et al.*, 2018)

Muitas espécies químicas, mesmo na presença de ciclodextrinas, continuam apresentando baixa solubilidade. No entanto, é possível a dispersão

desses complexos de inclusão no meio líquido na forma de nanoprecipitados hidrofóbicos, possibilitando o desenvolvimento de formulações líquidas e reduzindo-se os custos com estabilizantes. Nos nanoprecipitados hidrofóbicos, como existe um número razoável de átomos/moléculas na superfície, ocorre um aumento de interações de Van der Waals entre a nanopartícula e o solvente, do tipo dipolo induzido - dipolo induzido ou dipolo - dipolo induzido, de tal modo a superar a atração gravitacional, impedindo assim a sedimentação (DENADAI *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2018).

Quando as CDs são utilizadas para a formação de nanoprecipitados hidrofóbicos é esperado que a complexação possa reduzir o tamanho dos nanoprecipitados (MOREIRA *et al.*, 2018). Por exemplo, no trabalho de Lanna *et al.* (2016), observou-se a redução do tamanho de nanoprecipitados hidrofóbicos de fitocomplexos de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken em β CD. Moreira *et al.* (2018) mostraram resultado similar quando lactonas macrocíclicas da classe das avermectinas, ivermectina e abamectina, foram complexadas em β CD.

Os NPHs geralmente são mais eficientes do que as moléculas livres, como observado no trabalho de Bittencourt *et al.* (2019), onde foi proposto uma nova formulação de inseticida contra larvas de *aedes aegypti* com NPHs formados por benzoilfeniluréias e β -ciclodextrina.

Outras vantagens na formação de NPHs incluem, permitir a mistura de dois ou mais princípios ativos, resultando em um sistema de liberação multifuncional; ser um método mais simples de fabricação de medicamentos e com custos baixos (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Sendo assim, além da estratégia de se produzir complexos de inclusão supramoleculares, que por si só já constituem nanossistemas de liberação controlada, é interessante se produzir um segundo nível de agregação através da formação de nanoprecipitados hidrofóbicos de complexos de inclusão, produzindo assim nanopartículas ativas, de estabilidade coloidal, que funcionam como reservatórios para liberação dos princípios ativos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral a preparação e caracterização dos nanoprecipitados hidrofóbicos obtidos a partir dos complexos de inclusão arctiina/ β -ciclodextrina (AC/ β CD) e arctigenina/ β -ciclodextrina (AG/ β CD); e avaliação da citotoxicidade desses compostos frente às linhagens tumorigênicas de adenocarcinoma de mama humano (T47D, MCF-7 e MDAMB-231).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

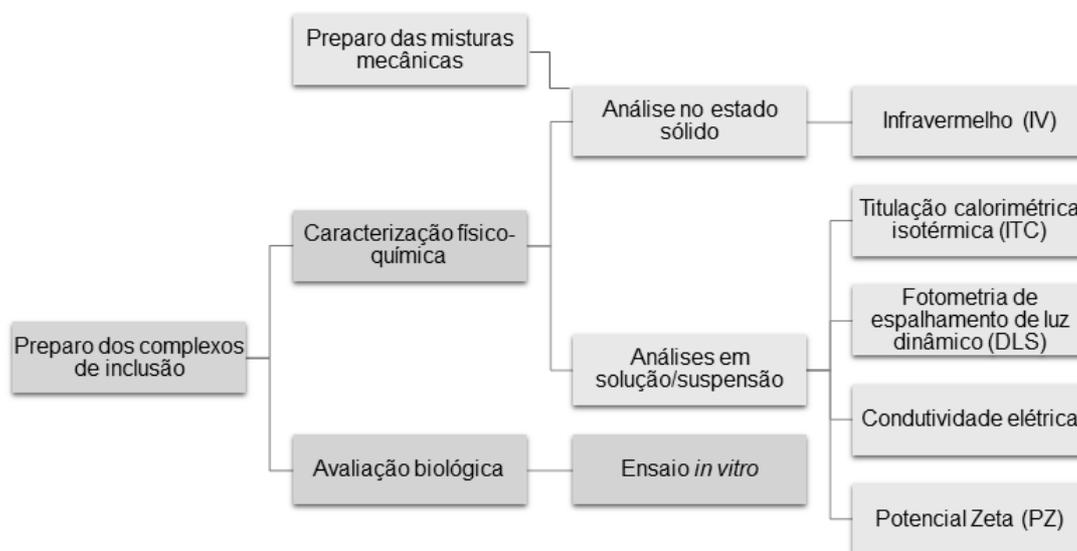
- Preparar os complexos de inclusão arctiina/ β -ciclodextrina (AC/ β CD) e arctigenina/ β -ciclodextrina (AG/ β CD);
- Caracterizar a formação dos complexos obtidos, em fase sólida por espectroscopia na região do infravermelho (IV);
- Determinar os parâmetros termodinâmicos da interação AC/ β CD E AG/ β CD por calorimetria isotérmica de titulação (ITC);
- Avaliar o efeito da ciclodextrina na formação de nanoprecipitado hidrofóbico em mistura de solvente por medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (ZP);
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* da AC e AG e dos seus nanoprecipitados hidrofóbicos obtidos a partir dos complexos de inclusão em ciclodextrinas pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium (MTT) em linhagens celulares não tumorigênica, MCF10A e tumorigênicas para o câncer de mama, T47D, MCF-7 e MDAMB-231.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos deste trabalho foram realizados nos laboratórios: Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) da Universidade Federal de Juiz de Fora; Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Patos de Minas e Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora,

Laboratório de Físico-Química e Fluidos, na Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares. O resumo de todas as etapas do trabalho está descrito na figura 13.

Figura 13. Fluxograma das etapas do trabalho.



Fonte: Autora, 2020.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

O Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN), da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, disponibilizou os seguintes equipamentos para a realização deste trabalho:

- Rotaevaporador (modelo 558, Fisaton®); bomba à vácuo (modelo 121, Primatec®,) e Banho Ultratermostático (modelo CT-281-28, Cientec®);
- Balança semi-analítica (BL 320, Marte®).

O Laboratório de Físico-Química e Fluidos, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, disponibilizou os seguintes equipamentos:

- Espectrômetro de infravermelho médio com transformada de Fourier (modelo Spectrum Two™, Perkin Elmer®) e ATR (PIKE®) acoplado ao espectrômetro;

- Zetasizer Nano (modelo ZS90, Malvern®);
- Microcalorímetro Isotérmico de Titulação (modelo VP-ITC, Microcal®).

O Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia em Patos de Minas disponibilizou o seguinte equipamento para a realização do ensaio de citotoxicidade:

- Incubadora de CO₂ com revestimento de água (Série 3, Thermo Scientific®).

3.2 MATERIAIS E REAGENTES

As substâncias identificadas como Arctiina e Arctigenina foram cedidas pelo Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN).

O grau de pureza dos solventes, reagentes e meios de cultura utilizados variou de acordo com a finalidade:

- para a preparação e caracterização dos nanoprecipitados hidrofóbicos formados a partir dos complexos de inclusão, utilizou-se solventes de grau P.A., das marcas Alphatec®, Cromato Produtos Químicos LTDA®, Isofar®, Quemis®, Sigma®, Vetec®;
- para a realização dos ensaios biológicos *in vitro*, utilizou-se meios de culturas e reagentes de pureza adequada, das marcas Gibco®, Sigma®, Cultilab® e Êxodo Científica®.

3.3 PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Através dos métodos de coprecipitação e liofilização com adaptações, os complexos de inclusão foram preparados usando quantidades equimolares de arctiina, arctigenina e β -ciclodextrina (β CD) (MOREIRA *et al.*, 2018).

O roteiro utilizado está descrito a seguir e esquematizado na figura 14.

As soluções com quantidades equimolares de β CD e moléculas hóspedes foram preparadas em béqueres separados, sendo solubilizadas

respectivamente em água e em etanol. A solução de molécula livre foi vertida na solução de β CD aquosa e mantida sob agitação por 48 h. Após esse período, as suspensões foram rotaevaporadas para a retirada de etanol, congeladas e liofilizadas.

Figura 14. Esquema de preparação dos complexos de inclusão com a β CD.

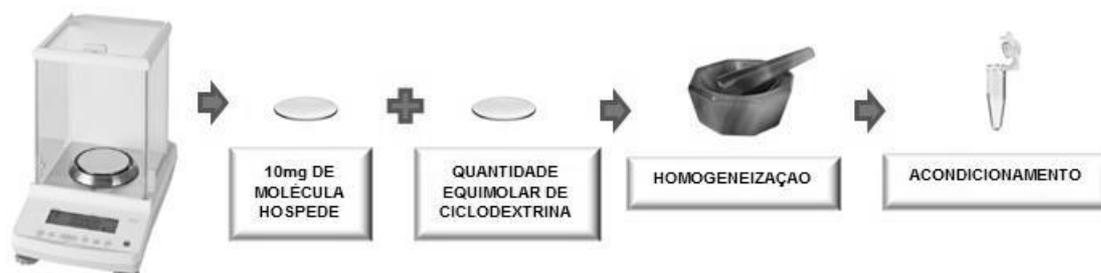


Fonte: Autora, 2020.

3.3.1 Preparo das misturas mecânicas

A preparação das misturas mecânicas das moléculas hóspedes com a β CD foi realizada em quantidades equimolares, utilizando pistilo e grau de ágata para a homogeneização. Foram acondicionadas em tubos eppendorf® e utilizadas para efeitos de comparação com os complexos de inclusão nas análises no estado sólido. Na figura 15 está apresentada uma representação esquemática da preparação.

Figura 15. Processo de preparação das misturas mecânicas.



Fonte: Autora, 2020.

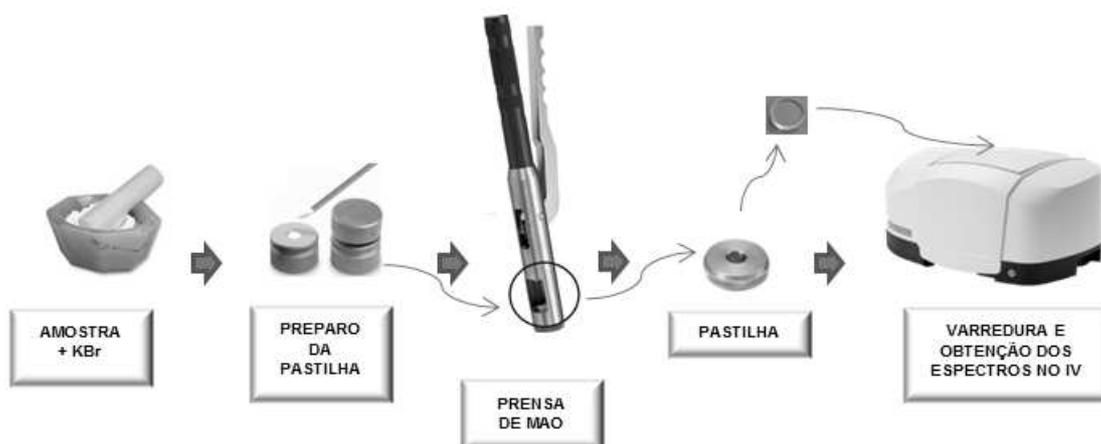
3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM ESTADO SÓLIDO

3.4.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) das moléculas livres, das ciclodextrinas, das misturas mecânicas (MM) e dos complexos de inclusão, foram analisados através do equipamento da marca Perkin Elmer, com transformada de Fourier, modelo Spectrum Two TM, a partir de pastilhas contendo KBr.

Os espectros foram obtidos como a média de 16 varreduras consecutivas, com resolução de 2 cm^{-1} e intervalo de onda de 4000 a 400 cm^{-1} . Para a aquisição e processamento dos espectros foi utilizado o programa Perkin Elmer Spectrum ES (versão do aplicativo: 10.03.08.0133). A figura 16 representa o esquema do experimento. Os dados foram exportados para o Microcal Origin 9.0 para edição.

Figura 16. Preparo das amostras para realização dos experimentos de infravermelho.



Fonte: Autora, 2020.

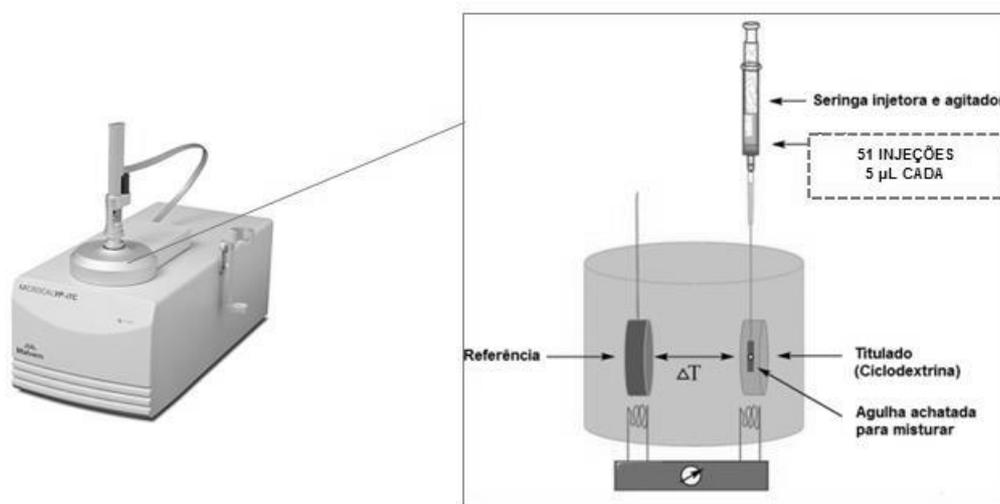
3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM SOLUÇÃO/SUSPENSÃO

3.5.1 Titulação calorimétrica isotérmica (ITC)

A caracterização termodinâmica dos complexos de inclusão foi realizada por calorimétrica isotérmica de titulação. O equipamento utilizado foi o Microcalorímetro Microcal VP-ITC da Malvern (figura 17), usando rotação de 300 rpm, 51 injeções automáticas de 5,0 μL de titulante da molécula hóspede a 30,0 mM, em 1,5 mL do titulado em DMSO:H₂O - 90:10, v/v) (βCD 2,0 mM em mistura de solvente DMSO: H₂O - 90:10, v/v). O solvente DMSO:H₂O foi utilizado em virtude da baixíssima solubilidade dos compostos. Para eliminar os efeitos de difusão de material da seringa para a cela e vice-versa, a primeira injeção de 1,0 μL foi descartada.

A titulação da molécula livre a 30,0 mM em 1,5 mL de DMSO:H₂O (90:10 v/v) é realizada como experimento de referência (branco) e utilizado na subtração das titulações das amostras, a fim de eliminar matematicamente os efeitos de interação do complexo de inclusão com o solvente. Os experimentos foram realizados em duplicata e o tratamento dos dados executado com o auxílio do programa Microcal Origin 7.0 para ITC.

Figura 17. Representação esquemática do Microcalorímetro.



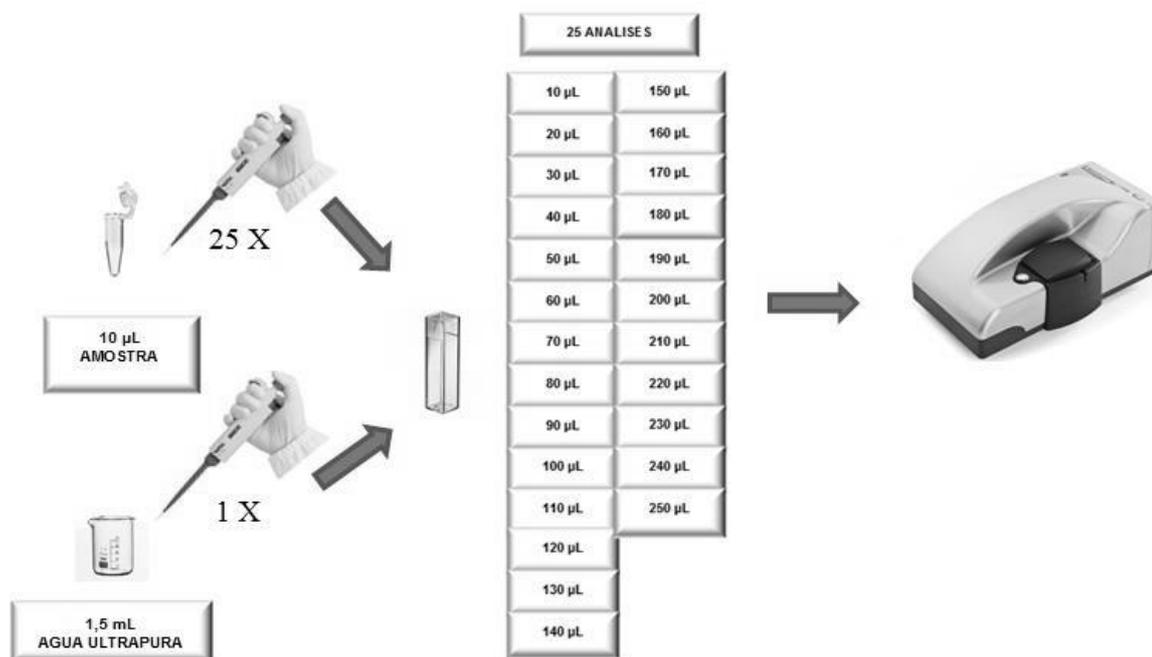
Fonte: Autora, 2020.

3.5.2 Análise por fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS)

As análises em suspensão foram realizadas para os nanoprecipitados hidrofóbicos. O tamanho de partículas em suspensão, expresso pelo diâmetro hidrodinâmico (D_h), foi determinado por medidas de espalhamento de luz dinâmico (do inglês *Dynamic light scattering*, DLS). O equipamento utilizado foi o Zetasizer Nano ZS90 da empresa Malvern, a temperatura foi de 25 °C com termostatização via sistema Peltier. Foi utilizada cubeta de polietileno de 1 cm de caminho óptico, padrão Malvern para a inserção das amostras, que foram submetidas a um feixe de luz monocromático (Laser He-Ne de 4 mW e comprimento de onda de 633 nm), com intensidade de luz espalhada medida a um ângulo de 90°. Para a determinação do D_h utilizou-se a média de cinco medidas independentes, cada uma delas obtida a partir da média de 5 contagens (figura 18) (ALVES *et al.*, 2014).

Para a realização dos experimentos, todas as amostras foram preparadas a uma concentração de 40,0 mM em DMSO. Na primeira análise de todas as amostras, foi adicionado na cubeta de polietileno, o volume de 10,0 μ L de cada uma dessas soluções, acrescidos de 1,5 mL de água ultrapura. Foram realizadas 25 injeções de 10,0 μ L da amostra na cubeta, sendo cada injeção analisada pelo equipamento até chegar em 250,0 μ L. O tratamento dos dados foi executado com o auxílio do programa Microcal Origin 9.0.

Figura 18. Leitura das amostras por Fotometria de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).



Fonte: Autora, 2020.

3.5.3 Condutividade elétrica e potencial zeta (PZ)

O potencial zeta (PZ) e a condutividade elétrica das soluções foram determinados simultaneamente no módulo zetasizer, com a finalidade de avaliar a estabilidade coloidal das nanoestruturas bem como possíveis efeitos de ionização dos nanoprecipitados. Para a determinação desses parâmetros, as amostras foram preparadas da mesma forma que o experimento anterior de DLS. O potencial zeta das nanoestruturas foi determinado pelo mesmo equipamento usado pelo DLS, o Zetasizer Nano ZS90. A técnica usada foi de micro eletroforese Doppler, com ângulo de espalhamento de luz a 173° e diferença de potencial alternada 10 V, a partir dos valores de mobilidade eletroforética, calculado pelo modelo de Smoluchowski (SZE *et al.*, 2003). As amostras foram inseridas em célula capilar de polietileno DPS1060. O valor final de potencial zeta e condutividade elétrica, foram calculados como a média de 5 medidas independentes com 5 contagens cada, assim como a análise de DLS.

3.6 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DO CÂNCER DE MAMA *IN VITRO*

As substâncias isoladas arctiina e arctigenina, assim como seus complexos de inclusão formados com β -ciclodextrina foram avaliados quanto a citotoxicidade em células do câncer de mama *in vitro*. O ensaio foi realizado pelo Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia em Patos de Minas, sob a coordenação e responsabilidade da Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo.

3.6.1 Manutenção de células tumorigênicas e não tumorigênica

Para o estudo foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: MCF 10A, não tumorigênica; T47D, MCF-7 e MDAMB-231, tumorigênicas. Na tabela 2 encontram-se as características fenotípicas e genotípicas das linhagens celulares de câncer de mama utilizadas. Todas foram autenticadas e mantidas nos devidos meios de cultivo de acordo com as recomendações da ATCC (American Type Culture Collection).

Tabela 2: Características fenotípicas e genotípicas das linhagens celulares de câncer de mama utilizadas.

Linhagem	Tipo histológico	Receptores	Subtipo molecular
T47D	Ductal	RE+/RP+/HER2-	Luminal A
MCF-7	Ductal	RE+/RP+/HER2-	Luminal A
MDAMB-231	Ductal	RE-/RP-/HER2-	Basal (triplo negativa)

A linhagem MCF10A foi cultivada em meio DMEM/F-12 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®), 10 μ g/mL de fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth fator*, EGF) (Gibco®), 0,25 μ g/mL de hidrocortisona (Sigma®), 10 μ g/mL de insulina (Gibco®) e 50 μ g/mL de gentamicina (Cultilab®). As células T47D e MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 μ g/mL de gentamicina. A T47D ainda foi suplementada com 10 μ g/mL de insulina. A

linhagem MDAMB-231 foi cultivada em meio L15 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 µg/mL de gentamicina.

Todas foram mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ (Thermo Scientific™ Forma Series 3 Water Jacketed CO₂ Incubator), exceto a linhagem MDAMB-231. Os meios foram trocados em dias alternados, cerca de três vezes por semana, até atingirem 80-90% de confluência, quando foram então utilizadas nos experimentos posteriores.

3.6.2 Avaliação da citotoxicidade em células do câncer de mama *in vitro*

A viabilidade celular após tratamento com as substâncias isoladas e complexadas com β-ciclodextrina (βCD) foi avaliada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium (MTT), segundo as recomendações do fabricante. As linhagens foram plaqueadas em placas de 96 poços, (4x10³ células/poço) e as substâncias diluídas em DMSO 2% (Êxodo Científica®). Para os tratamentos, estas foram utilizadas nas concentrações de 1,52 µM; 3,125 µM; 6,25 µM; 12,5 µM; 25 µM; 50 µM; 100 µM e 200 µM e incubadas por 24 e 48 horas. Após estes períodos, o tratamento foi retirado e adicionou-se meio de cultura com MTT (Sigma®) (10% C/V), incubado por 4 horas. Em seguida, foi descartada a solução de meio com MTT e adicionado 200µL de DMSO por poço, para a diluição dos cristais de Formazan, e posterior leitura a 560 nm em leitora Thermo Plate, TP-Reader. Como controles foram incluídos nos experimentos: (1) amostras incubadas com meio de cultivo contendo a mesma concentração do diluente (DMSO); (2) amostras incubadas apenas com meio de cultivo completo apropriado. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada substância e concentração utilizada. A viabilidade celular foi calculada para cada concentração de cada uma das substâncias a partir de três experimentos independentes realizados em triplicata (n=3), conforme a seguinte fórmula:

$$Viabilidade (\%) = \frac{AA - AC}{ADMSO - AC} \times 100$$

Sendo:

AA = Absorbância da Amostra

AC = Absorbância do controle de viabilidade (apenas com células)

ADMSO = Absorbância do controle de tratamento (DMSO)

Os resultados foram apresentados como média \pm o desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. As diferenças entre os tratamentos foram comparadas utilizando o Software GraphPad Prism 8.0 e a análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguido pelo pós-teste de TUKEY para múltiplas comparações. A significância foi atribuída quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM ESTADO SÓLIDO

4.1.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV)

Existem inúmeras técnicas que permitem obter informações sobre a estrutura molecular, ligações químicas e interações intermoleculares. Dentre estas podemos citar a espectroscopia no infravermelho (IV), que estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus objetivos principais a identificação das moléculas e o estudo de interações intermoleculares. A espectroscopia IV tem sido amplamente utilizada para análise de várias substâncias, fornecendo importantes informações sobre os grupos funcionais da amostra, sendo muito útil para a caracterização de complexos de inclusão (DUTTA, 2017).

A excitação de uma molécula de um nível de energia vibracional para outro ocorre apenas quando há absorção no IV de uma energia específica, significando um comprimento de onda ou uma frequência específicos. Nem todas as vibrações moleculares resultam na absorção de energia no IV, para que isso ocorra, o momento de dipolo da molécula deve variar à medida que a vibração ocorre (FORATO *et al.*, 2010; SOLOMONS; FRYHLE; JOHNSON, 2012). Por essa razão, apenas grupos funcionais polares são sensíveis à técnica.

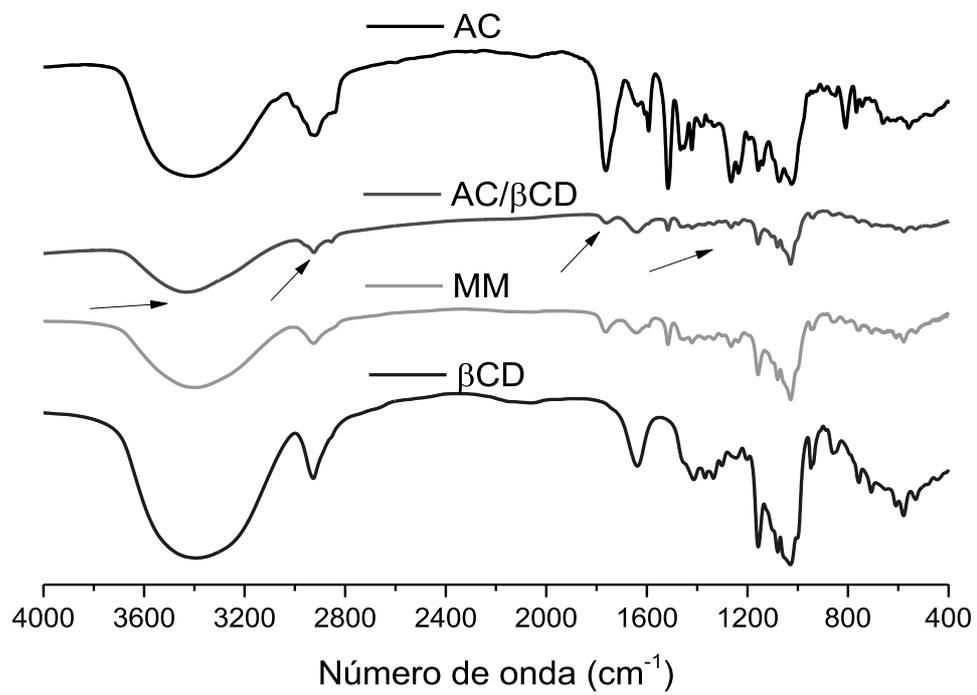
No caso dos complexos de inclusão, a penetração de grupos funcionais de moléculas hóspede na cavidade das ciclodextrinas gera uma série de novas

interações intermoleculares, as quais alteram a distribuição eletrônica sobre os núcleos atômicos envolvidos. Como consequência, o momento de dipolo das ligações ou grupos funcionais podem sofrer alterações, se refletindo no espectro de IV como, aumento ou redução das bandas. Outro efeito que pode ocorrer em decorrência das interações é a restrição ou intensificação da amplitude do movimento vibratório, que se reflete no espectro de IV como deslocamentos das bandas (SUÁREZ *et al.*, 2014). Diante do exposto, foram identificadas as interações entre as moléculas hóspedes e a β CD através da comparação dos espectros de IV das moléculas livres, das misturas mecânicas e dos complexos de inclusão.

Observando o espectro na figura 19 e os dados da tabela 3, para o complexo de inclusão arctiina/ β -ciclodextrina (AC/ β CD), houve mudanças no perfil das bandas do espectro de infravermelho, tais como: afinamento da banda de β CD a 3436 cm^{-1} (referente às hidroxilas), devido à formação de um novo padrão de ligações de hidrogênio; atenuação e deslocamento da banda 1760 cm^{-1} , correspondente a vibrações da ligação C=O; e mudança no perfil e posições de bandas na região de $1500\text{ a }900\text{ cm}^{-1}$ associadas à β CD. As alterações observadas sugerem a formação do complexo de inclusão, pois geralmente alterações principalmente nas vibrações características do grupo C=O, são observadas na complexação e indicam uma modificação no ambiente eletrônico do grupo C=O, sugerindo a existência de interações entre o grupo carbonila e grupos hidroxilas presentes nas CDs. Além disso, a atenuação da banda em 2927 cm^{-1} da AC/ β CD, referente às vibrações da ligação C-H, sugere um novo padrão de interações intermoleculares na cavidade da ciclodextrina, indicando a formação do complexo de inclusão no estado sólido (MOREIRA, 2016).

Na mistura mecânica do complexo de inclusão AC/ β CD (MM) não ocorreram mudanças significativas nas posições das principais bandas observadas para a AC e β CD isoladas, sendo que o perfil observado é justificado pela sobreposição das bandas oriundas de AC e β CD. Portanto, a simples mistura dos dois componentes em fase sólida não é suficiente para promover a inclusão, não havendo neste caso, a formação do complexo de inclusão (ZORNIO, 2013).

Figura 19. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho da AC, AC/ β CD, MM e β CD.



Fonte: Autora, 2020.

Tabela 3. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho da AC, AC/ β CD, MM e β CD.

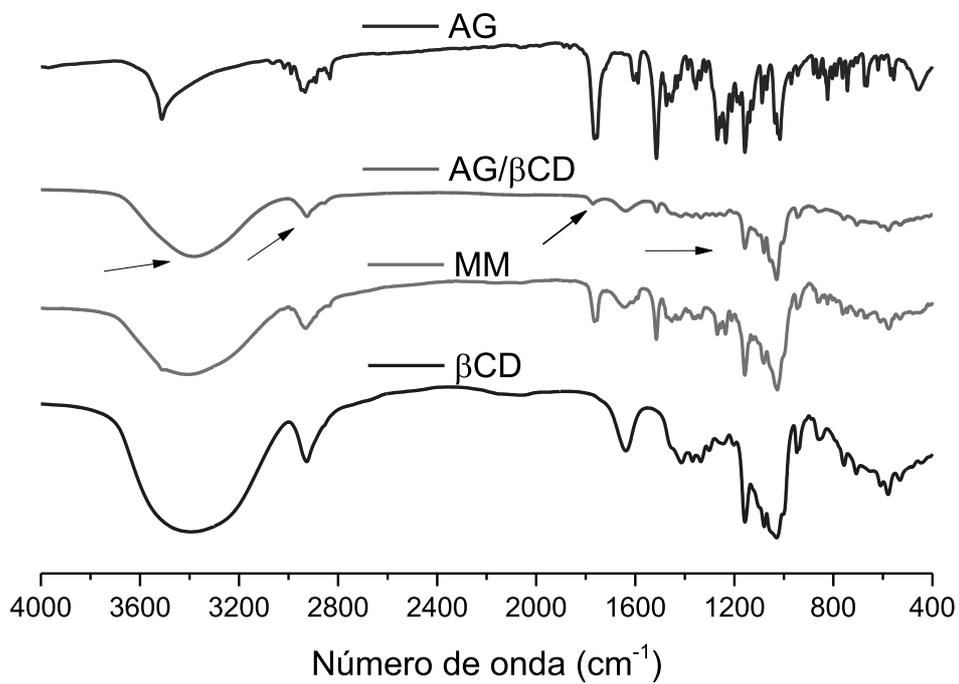
Atribuições*	Número de onda (cm^{-1})			
	AC	AC/ β CD	MM	β CD
Estiramento O-H	3413	3436	3389	3392
Estiramento C-H	2927	2927	2927	2927
Estiramento C=O	1764	1760	1764	-
Deformações O-H	-	1644	1644	1638
Vibrações relativas a C=C	1516 e 1456	1516	1519	-
Deformações C-H	-	1425-1264	1425-1264	1414-1202
Vibração do anel piranose (acoplamento δ (C-O-C), ν (C-C), δ (O-C-H), δ (C- C-H), δ (C-C-O)	-	1154 e 1031	1154 e 1031	1158 e 1028
Ligações C-H de aromáticos	1071 e 1022	-	-	-

*atribuições feitas com base em estudo relatado na literatura (A.AL-SHAMMAA; SAOUR; ABDUL-KHALIK, 2013; EGYED, 1990; NANDANWAR; CHAUDHARI; EKHE, 2016; SRIVASTAVA; YADAV, 2019a).

Observando a figura 20 e os dados da tabela 4, assim como no espectro de AC/ β CD, para o complexo AG/ β CD houve atenuação da banda a 1770 cm^{-1} , referente às vibrações C=O; alterações de bandas de 1500 a 900 cm^{-1} associadas à β CD e atenuação da banda C-H. Os dados são semelhantes aos do complexo AC/ β CD, devido à similaridade entre as moléculas hóspedes, e sugere a formação do complexo de inclusão para ambos os compostos.

A mistura mecânica do complexo de inclusão AG/ β CD (MM) também não sofreu alterações que justificassem a formação do complexo de inclusão, pois o perfil observado ocorre pela sobreposição das bandas oriundas de AG e β CD.

Figura 20. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho da AG, AG/ β CD, MM e β CD.



Fonte: Autora, 2020.

Tabela 4. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho da AG, AG/ β CD, MM e β CD.

Atribuições*	Número de onda (cm ⁻¹)			
	AG	AG/ β CD	MM	β CD
Estiramento O-H	3511	3381	3397	3392
Estiramento C-H	2950	2925	2932	2927
Estiramento C=O	1761	1770	1764	-
Deformações O-H	-	1637	1637	1638
Vibrações relativas a C=C	1605, 1514 e 1466	1513	1514	-
Deformações C-H	-	1417-1240	1452-1210	1414-1202
Vibração do anel piranose (acoplamento δ (C-O-C), ν (C-C), δ (O-C-H), δ (C-C-H), δ (C-C-O))		1157 e 1029	1157 e 1027	1158 e 1028
Ligações C-H de aromáticos	1035 e 1015	-	-	-

*atribuições feitas com base em estudo relatado na literatura (A.AL-SHAMMAA; SAOUR; ABDUL-KHALIK, 2013; EGYED, 1990; NANDANWAR; CHAUDHARI; EKHE, 2016; SRIVASTAVA; YADAV, 2019a).

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM SOLUÇÃO/SUSPENSÃO

4.2.1 Titulação calorimétrica isotérmica (ITC)

A técnica de titulação calorimétrica isotérmica (do inglês *Isothermal Titration Calorimetry*, ITC) permite a medição de parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação entre duas moléculas e baseia-se na medição do calor liberado ou absorvido durante essa interação. É uma técnica importante para a caracterização de complexos de inclusão, visto que podem ser obtidos dados de estequiometria de complexação (N) entalpia ($\Delta_{int}H^0$), entropia ($T\Delta_{int}S^0$),

variação de energia de Gibbs ($\Delta_{int}G^{\circ}$), e constante de complexação (K_c) (HOLDGATE; WARD, 2005; PEROZZO; FOLKERS; SCAPOZZA, 2004).

Na figura 21 estão apresentadas as curvas de titulação de arctiina (AC) (1) e da arctigenina (AG) (2) em β CD após a subtração da curva de diluição. Nos experimentos foi utilizada uma mistura DMSO/H₂O 90:10 v/v, devido à baixa solubilidade em água, similar ao já realizado em outros trabalhos (MOREIRA *et al.*, 2018). Além disso, optou-se por utilizar este solvente devido ao fato de que é importante o conhecimento das interações hóspede-hospedeiro em DMSO, pois é a partir de solução de DMSO que se produz os nanoprecipitados hidrofóbicos. Portanto, entender as interações nesse solvente é importante para se entender a formação dos nanoprecipitados. Contudo, é válido citar que percentual de água de 10% em volume foi utilizado pelo fato de que o DMSO puro é muito higroscópico e pequenas diferenças na concentração de água entre o titulante e titulado causam grandes perturbações nos resultados termodinâmicos. Por outro lado, uma mistura DMSO/H₂O 90:10, por não ser tão hidrosfópica, evita diferenças na concentração de água entre o titulante e titulado.

Na tabela 5 estão apresentados os valores termodinâmicos de interação dos complexos de inclusão com a β CD determinados para uma estequiometria de 1:1. Considerando a baixa afinidade dos compostos, que resultou na ausência de declividade das curvas de titulação (ausência do perfil sigmoidal), foi impossível determinar a estequiometria. Entretanto, os parâmetros foram calculados assumindo-se uma estequiometria de 1:1 similar ao realizado em outros trabalhos (DE SOUSA *et al.*, 2010; DENADAI *et al.*, 2007; LULA *et al.*, 2007).

Figura 21. Titulação calorimétrica de (1) solução de AC/ β CD e (2) solução de AG/ β CD em DMSO e H₂O. Curva final após subtração da curva de titulação do solvente.

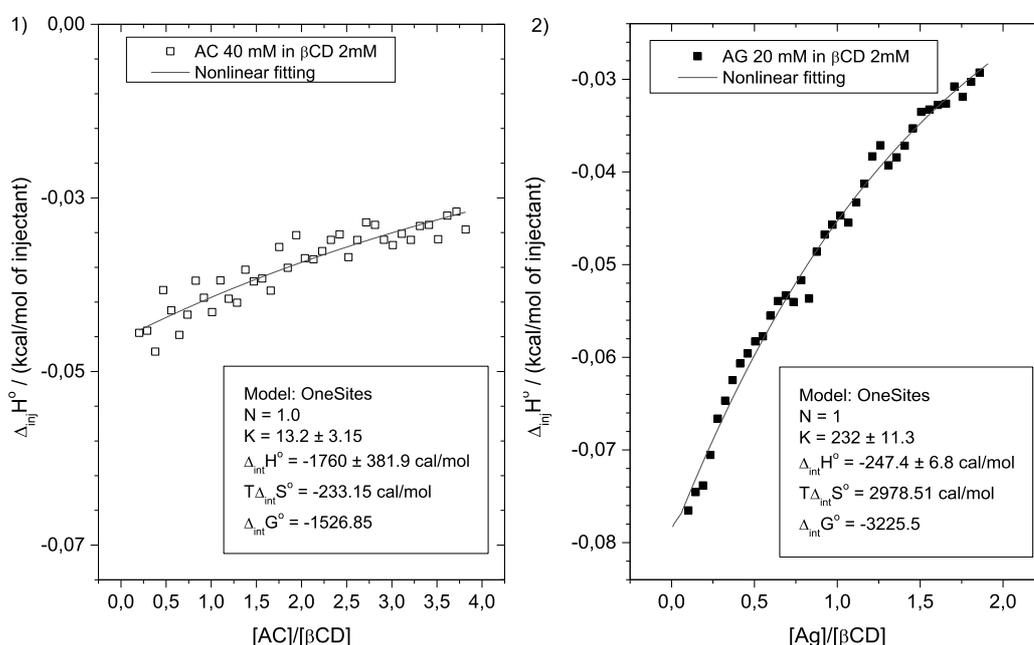


Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos de interação de AC/ β CD e AG/ β CD a 298,15 K.

Composto	N	K	$\Delta_{int}G^{\circ}$ (kJ.mol ⁻¹)	$\Delta_{int}H^{\circ}$ (kJ.mol ⁻¹)	$T\Delta_{int}S^{\circ}$ (kJ.mol ⁻¹)
AC/ β CD	1,00	13,20 \pm 3,15	-6,38	-7,36 \pm 1,59	-0,97
AG/ β CD	1,00	232,00 \pm 11,30	-13,49	-1,03 \pm 0,03	12,46

Fonte: Autora, 2020.

A temperatura e pressão constantes, a direção na qual uma reação avança, ou seja, a direção na qual ela é espontânea é a que leva a uma redução na energia livre (G). A energia de Gibbs (ΔG) prevê a espontaneidade do processo e está relacionada com a entalpia e a entropia do processo por meio da relação $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ (FREIRE, 2004; SRIVASTAVA; YADAV, 2019b). Um ΔG negativo indica que ambos os sistemas liberam energia, isso significa que as reações prosseguem sem entrada de energia (são espontâneas) e avançam para a produção de produtos, sendo a formação do complexo AG/ β CD, mais favorável que a formação do complexo AC/ β CD, devido ao valor mais negativo de ΔG .

Além disso, a formação dos dois complexos é exotérmica ($\Delta_{int}H^{\circ} < 0$) nos dois casos. Por outro lado, o complexo de inclusão AG/ β CD possui valor positivo de entropia ($T\Delta_{int}S^{\circ} > 0$), ao contrário de AC/ β CD que possui $T\Delta_{int}S^{\circ} < 0$. As bruscas diferenças nos valores de constante de equilíbrio (uma ordem de grandeza superior para o sistema AG/ β CD) e de variação de entropia são indicativos de que existam grandes diferenças no mecanismo de interação entre os dois compostos com a β CD, em decorrência das diferenças estruturais.

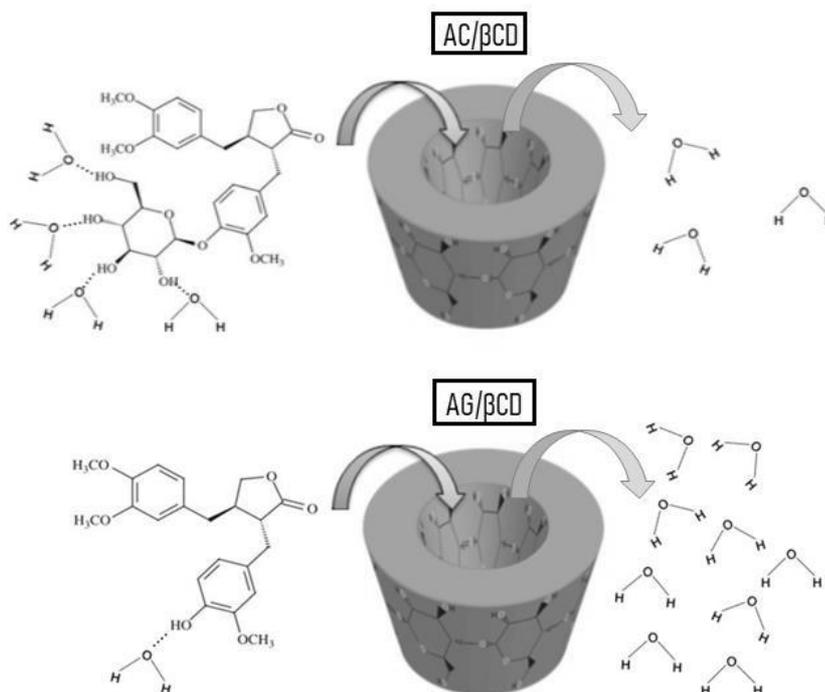
O caráter exotérmico da formação dos complexos de inclusão sugere a formação de interações estáveis entre as espécies (interações de Van der Waals principalmente), bem como a formação de ligações de hidrogênio das moléculas de água liberadas da cavidade com o solvente. As moléculas de água ricas em entalpia da cavidade ciclodextrina são liberadas da cavidade e substituídas por moléculas hóspedes menos polares que a água, com uma diminuição simultânea da energia do sistema (BILENSOY, 2011). Os valores mais negativos de entalpia para o sistema AC/ β CD é condizente com a hipótese de formação de ligações de hidrogênio entre as espécies, já que a arctiina possui quatro hidroxilas do anel glicosídico e a arctigenina apenas uma hidroxila fenólica (DENADAI *et al.*, 2006).

A entropia está relacionada ao grau de desordem que o sistema pode assumir em função dos processos de complexação. O valor negativo de entropia observado para AC/ β CD, pode ser atribuído à arquitetura rígida e nova conformação assumida pelo composto após a complexação, devido à formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas, conferindo maior volume e menores graus de rotação e translação de liberdade, quando comparado à molécula livre (DE SOUSA *et al.*, 2008).

O valor positivo de entropia, apresentado pela titulação do complexo AG/ β CD, pode ser atribuída à quebra da estrutura de solvatação da hidroxila fenólica da AG com consequente liberação de moléculas de água, que ganham graus de liberdade rotacionais e translacionais, responsáveis pela desordem do sistema. Este processo é conhecido como “efeito hidrofóbico” e está relacionado à interação de moléculas hidrofóbicas como AG com a ciclodextrina (FERNANDES *et al.*, 2007). Como a molécula AG é menor e possui somente uma hidroxila, é mais fácil dessolvatar a molécula, gerando um

maior ganho de entropia durante a complexação, já a molécula AC, possui um maior número de hidroxilas, dificultando a dessolvatação e causando menor desordem ao sistema (figura 22).

Figura 22. Representação esquemática da dessolvatação das moléculas de Arctiina e Arctigenina para a formação dos respectivos complexos de inclusão AC/ β CD e AG/ β CD.



Fonte: Autora, 2020.

A extensão da complexação é mensurada pela constante de associação do complexo de inclusão, que estabelece o grau de afinidade entre o fármaco e a cavidade da CD (OLIVEIRA, 2015). Os valores da constante de associação para os sistemas estudados são baixos e demonstram uma fraca interação da molécula com a cavidade da β CD. Contudo estão de acordo com os reportados na literatura para complexos de inclusão, os quais podem variar de 1 (na ausência de interação) a aproximadamente 100.000 (para substâncias que exibem interações extremamente fortes com as ciclodextrinas) (CARRIER; MILLER; AHMED, 2007).

Nos dados apresentados é possível observar que AG/ β CD possui valor de $K_{eq} = 232 \pm 11,3$, possuindo uma interação mais forte com a ciclodextrina do

que AC/ β CD, com constante de $K_{eq} = 13,2 \pm 3,15$. Essa diferença entre os dois sistemas pode estar relacionada à ausência do glicosídeo na molécula de AG, tornando-a mais hidrofóbica, com maior afinidade pela cavidade. Já para o sistema AC/ β CD, apesar da formação de ligações de hidrogênio, a redução de entropia devido à menor mobilidade do composto bem como à menor tendência de dessolvatação tornaram a complexação menos cooperativa.

Considerando que as constantes de formação são muito baixas, é importante uma estratégia para se evitar a dissociação dos compostos. Isso pode ser obtido através da formação dos nanoprecipitados hidrofóbicos que serão descritos no próximo tópico.

4.2.2 Análise por fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS) dos nanoprecipitados hidrofóbicos

No presente trabalho, medidas de espalhamento de luz dinâmico (do inglês *Dynamic light scattering*, DLS), potencial zeta (ZP) e condutividade elétrica, foram utilizadas para avaliar o efeito da β CD no comportamento dos nanoprecipitados hidrofóbicos (NPHs) das moléculas livres de arctiina e arctigenina.

O tamanho de partícula é uma das mais importantes propriedades físicas das nanoestruturas, que precisa ser estimado com precisão, pois desempenha um papel fundamental no controle das propriedades de diferentes nanomateriais, por exemplo determinando a difusividade e a velocidade de solubilização. A medição da nanopartícula é realizada através da técnica de dispersão da luz, comumente utilizada desde o advento da nanotecnologia (BRAR; VERMA, 2011)

A aplicação da técnica não decorre de forma simples, pois muitas partículas são irregulares ou polidispersas e possuem movimento (movimento Browniano) quando estão dispersas em um líquido ou em solução. A velocidade do movimento browniano pode ser medida diretamente a partir do padrão de luz espalhada produzido pelas partículas em movimento (MALVERN, 2013).

No caso de suspensões líquidas, uma das aproximações utilizadas para medidas de tamanho considera que as partículas do sistema, independente do

seu formato, possuem hipoteticamente o diâmetro de uma esfera de mesmo coeficiente de difusão (C_d). Dentro dessa abordagem, o diâmetro das partículas é denominado *diâmetro hidrodinâmico* (D_h) estando inter-relacionado com C_d pela equação de Einstein-Stokes (TANFORD; HUGGINS, 1962):

Equação 1:

$$D_h = \frac{RT}{6\pi\eta N_a C_d}$$

Na equação 1, R é a constante dos gases (J/mol.K), T é a temperatura absoluta (Kelvin), η é a viscosidade do solvente (Pa.s), N_a é o número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$) e C_d o coeficiente de difusão da partícula (m^2/s).

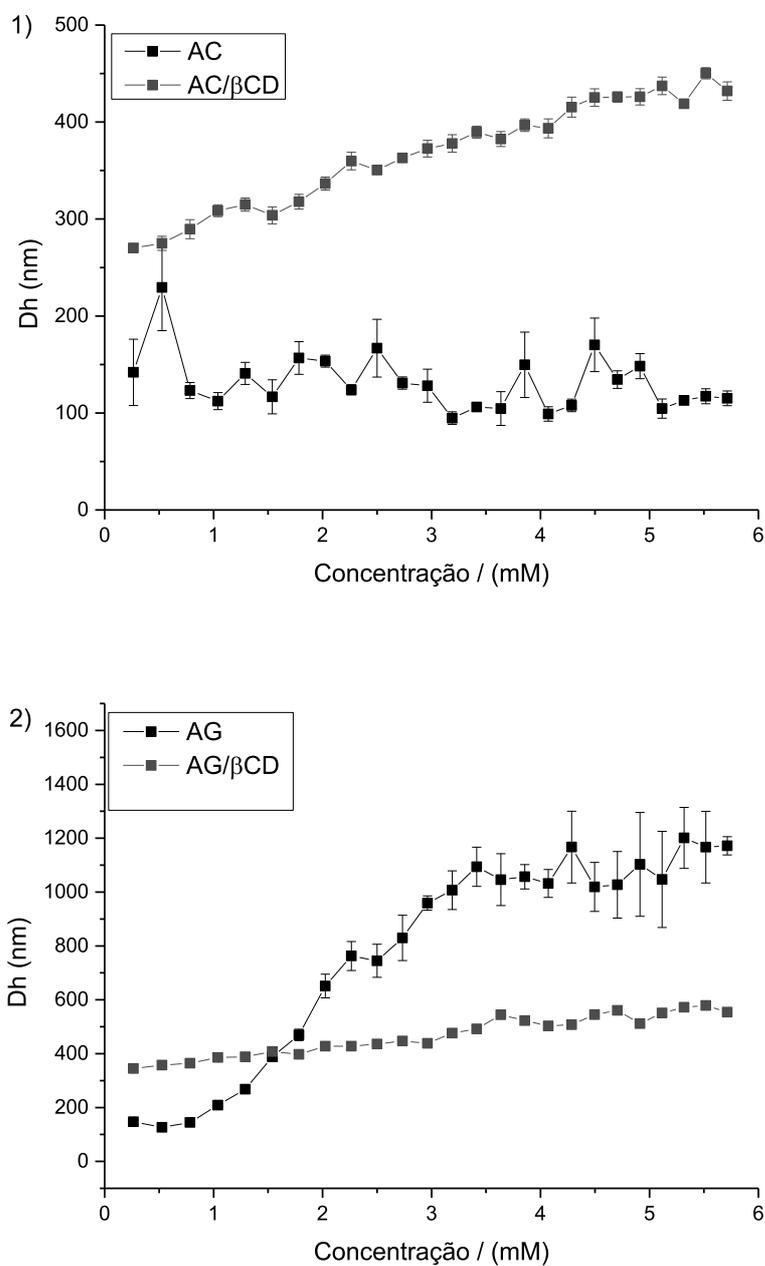
No presente trabalho, as análises de diâmetro hidrodinâmico (D_h) foram realizadas para medir o tamanho dos nanoprecipitados hidrofóbicos, preparados pela dispersão de solução DMSO das moléculas livres e dos respectivos complexos de inclusão, em meio aquoso.

A partir dos resultados apresentados na figura 23 é possível observar que todas as substâncias apresentam diâmetros hidrodinâmicos em escala nanométrica. Pode ser observado ainda que o tamanho de partícula aumenta com o aumento da concentração. Isso pode ser atribuído ao aumento da colisão entre as partículas e ao aumento da dificuldade de estabilização dos nanoprecipitados no ambiente aquoso.

Observa-se no gráfico 1, da figura 23, que para a AC e AC/ β CD, os valores de tamanho de partícula, são maiores para o complexos de inclusão formados, do que para a molécula livre AC. Já no gráfico 2, observa-se que para a AG e AG/ β CD, maiores valores de D_h e de desvios padrões para a molécula livre AG, sugerindo uma maior instabilidade coloidal.

Uma possível explicação pode ser dada pelo fato de que o sistema AC/ β CD é mais rico em ligações de hidrogênio, devido à presença do glicosídeo na molécula AC, pois os dados de ITC apresentaram valores de entalpia bem mais negativos para esse sistema. No caso dos nanoprecipitados hidrofóbicos, essas ligações de hidrogênio poderiam acontecer também entre compostos de inclusão, permitindo assim, um maior tamanho de partícula. Nesta linha de raciocínio, comportamento diferente seria esperado para o sistema AG/ β CD, em que a quantidade de hidroxilas para formação de ligações de hidrogênio é menor.

Figura 23. Distribuição de tamanho de partículas em suspensão em função da concentração. Em (1) AC e AC/ β CD e (2) AG e AG/ β CD.



Fonte: Autora, 2020.

4.2.3 Condutividade elétrica e Potencial zeta dos nanoprecipitados hidrofóbicos

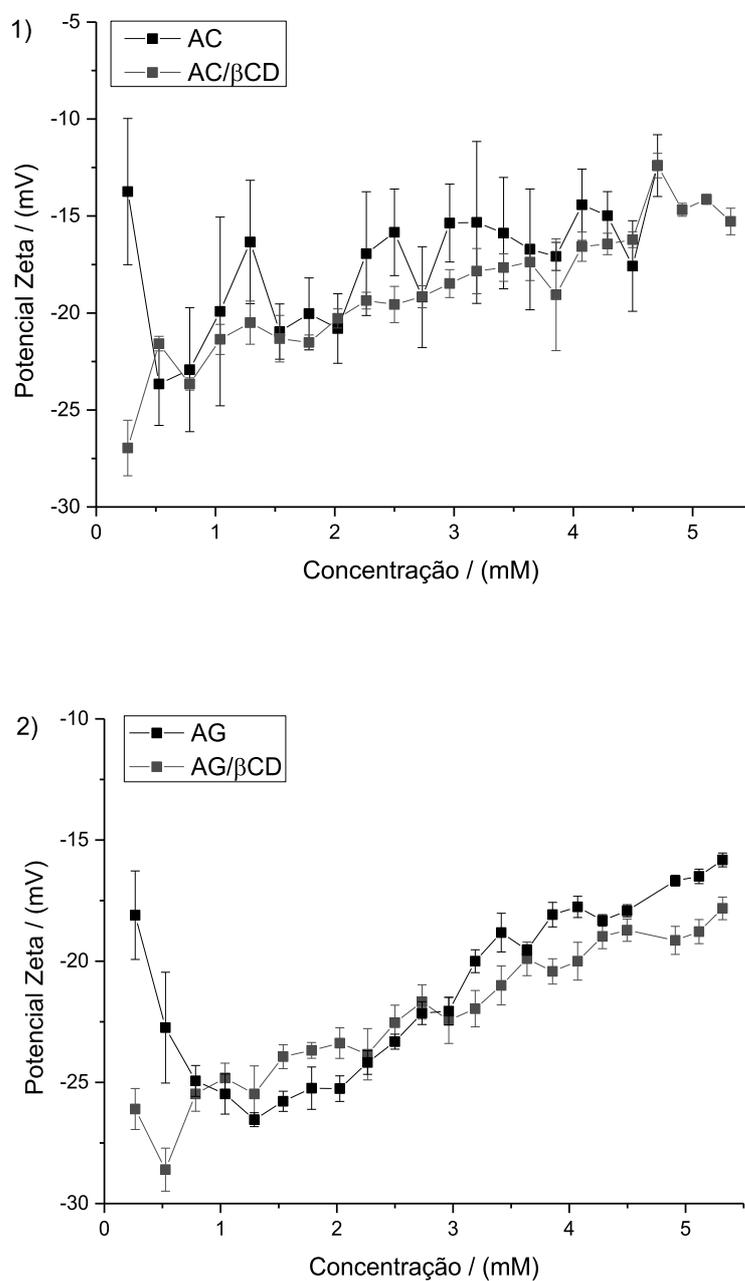
Através da medição do potencial zeta foi possível determinar a carga de superfície das partículas e a estabilidade da dispersão. Quando as partículas

entram em contato com uma solução aquosa de eletrólito elas adquirem uma carga de superfície como resultado de processos de adsorção ou ionização. O valor do potencial zeta refere-se à carga da bicamada elétrica que recobre a partícula, servindo como indicativo da estabilidade coloidal. Quanto maior o valor do módulo desse potencial, maior a repulsão eletrostática entre as partículas, menor agregação, floculação ou sedimentação e melhor a estabilidade da dispersão (ALBERNAZ, 2014; DENADAI *et al.*, 2012).

Se todas as partículas em suspensão tiverem um elevado potencial zeta em módulo, ou seja, muito negativo ou muito positivo, elas tenderão a se repelir e não haverá tendência para as partículas se aglomerarem. No entanto, se as partículas tiverem baixos valores de potencial zeta, haverá uma tendência de coalescência e floculação das partículas. A linha divisória entre suspensões estáveis e instáveis é geralmente tomada em +30 ou -30 mV. Partículas com potenciais zeta mais positivos que +30 mV ou mais que -30 mV são normalmente consideradas estáveis (DUMAN; TUNÇ, 2009; MEKHAMER, 2010).

Conforme os dados dos gráficos da figura 24, para todos os sistemas, foi possível observar a semelhança do comportamento de carga superficial entre as espécies, pois a maior parte dos valores de PZ encontram-se na faixa de -30 mV a +30 mV, em uma região de instabilidade, com tendência de coalescência e sedimentação. Não houve, entretanto, diferença significativa entre os valores de ZP para os sistemas na ausência e na presença de β CD, provavelmente pela falta de sensibilidade do método, já que as medidas de tamanho de partícula e de condutividade elétrica (mostrados abaixo), foram diferentes para cada sistema.

Figura 24. Gráficos de potencial zeta (PZ) em função da concentração crescente. Em (1) AC e AC/ β CD e (2) AG e AG/ β CD.



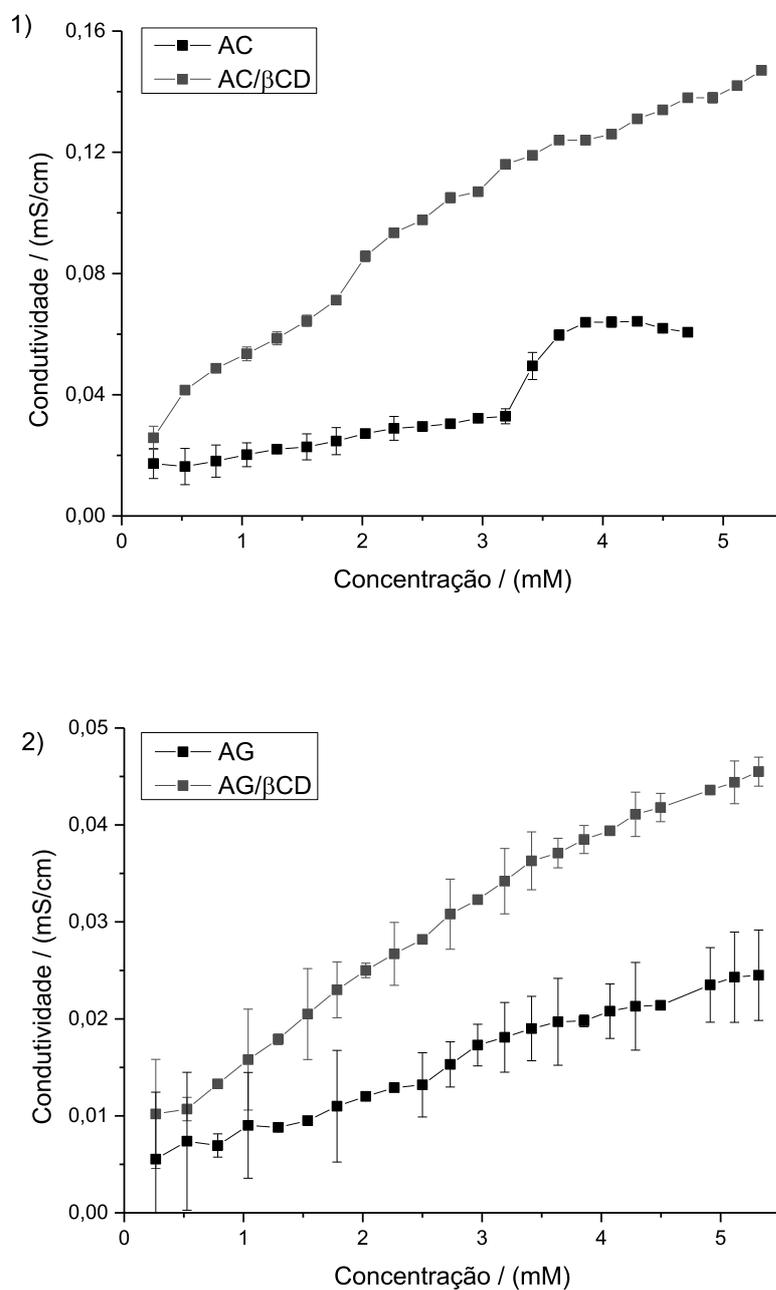
Fonte: Autora, 2020.

A medição da condutividade elétrica está diretamente relacionada com a capacidade de um material em conduzir corrente elétrica, sendo considerada um parâmetro físico-químico utilizado para identificar e quantificar íons em solução. A condutividade elétrica através das soluções iônicas ocorre devido à

migração de íons positivos e negativos com a aplicação de um campo elétrico alternado (GARCIA VELHO, 2006; SAHA *et al.*, 2016).

Observando os gráficos da figura 25, percebe-se que na presença de β CD, com o aumento da concentração, a condutividade elétrica aumenta em todos os sistemas, na ausência e na presença de β CD, devido ao aumento de íons no meio, em virtude de diversos processos de ionização possíveis tanto para a molécula de β CD quando para as lignanas. Contudo, na presença de β CD, observa-se que os valores de condutividade são sempre maiores. Isso ocorre devido à presença de hidroxilas na ciclodextrina, que podem sofrer ionização liberando H^+ para o meio e aumentando a condutividade elétrica. Comparando-se os dois sistemas, observa-se que para o composto AC/ β CD (1), os valores de condutividade são maiores do que para o AG/ β CD (2), sendo esta informação condizente com a maior quantidade de hidroxilas na arctiina.

Figura 25. Valores de condutividade elétrica em função da concentração.
Em (1) AC e AC/ β CD e (2) AG e AG/ β CD.



Fonte: Autora, 2020.

4.3 CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

A avaliação da citotoxicidade dos compostos foi realizada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium (MTT), um

método colorimétrico de avaliação da viabilidade celular. Células viáveis com metabolismo ativo através da atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais, convertem o reagente MTT, um sal de coloração amarela e solúvel em água, em formazan, sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água, que após dissolvido em dimetilsulfóxido é quantificado por espectrofotometria, em comprimento de onda de 560nm (AHMADIAN *et al.*, 2009).

A linhagem celular epitelial mamária humana, MCF10A, é uma linhagem não tumorigênica, sendo um modelo *in vitro* amplamente utilizado para estudar a função e transformação normais das células mamárias. As linhagens celulares tumorigênicas T47D e MCF-7 representam o subtipo A luminal do câncer de mama, sendo a T47D de carcinoma ductal invasivo. Já a linhagem MDAMB-231 é obtida a partir de adenocarcinoma de mama humano com fenótipo triplo-negativo, sendo esta linhagem a mais agressiva da doença. (QU *et al.*, 2015; TATE *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2017).

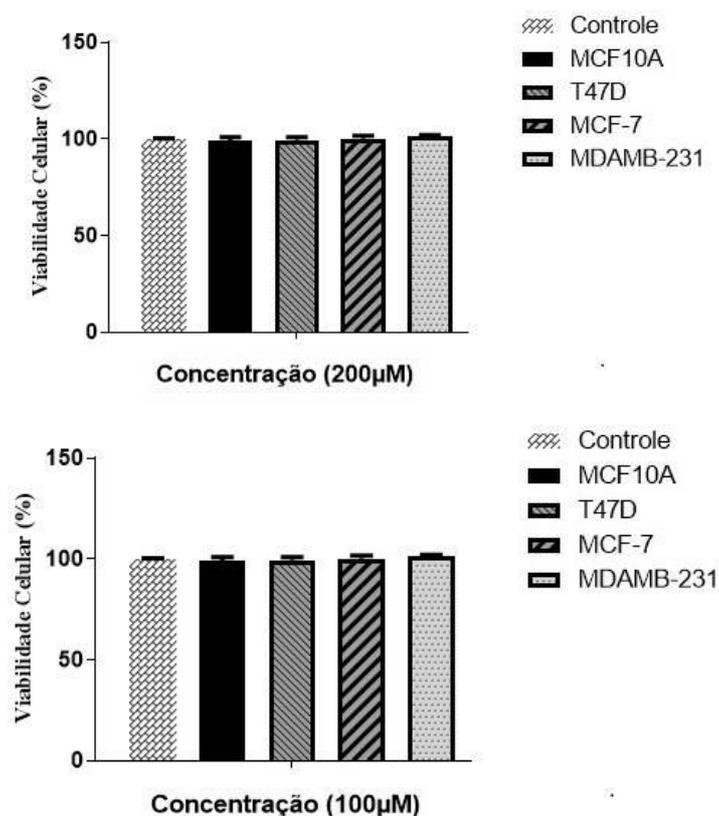
Embora as linhagens T47D e a MCF-7 representem o subtipo A luminal de câncer de mama, elas exibem características moleculares distintas, em presença do estrogênio, a T47D é o modelo *in vitro* ideal para câncer de mama responsivo a progesterona, pois a linhagem MCF-7 não é responsiva à progesterona na presença de estrogênio (YU *et al.*, 2017).

As diferentes linhagens celulares não tumorigênica e tumorigênicas, foram tratadas com concentrações de 100 e 200 μM de arctiina (AC), arctigenina (AG) e seus respectivos complexos de inclusão, sendo estas concentrações definidas após a realização de outros ensaios com concentrações inferiores, que não apresentaram citotoxicidade para as células utilizadas na pesquisa. O tempo de exposição das células tumorigênicas aos compostos foi de 48 horas, haja visto que em teste com tempo inferior, de 24 horas, não houve citotoxicidade considerável. Para os resultados de viabilidade celular a significância foi atribuída quando $p < 0,05$.

Inicialmente foram realizados ensaios de citotoxicidade com βCD pura em linhagem não tumorigênica (MCF-10A) e linhagens tumorigênicas (T47D, MCF-7, MDAMB-231). Como controles foram utilizadas amostras incubadas com meio de cultivo contendo a mesma concentração do diluente (DMSO) e amostras incubadas apenas com meio de cultivo completo apropriado.

Conforme o gráfico da figura 26 e a tabela 6 é possível observar que os tratamentos realizados com β CD pura não apresentaram citotoxicidade para as linhagens celulares testadas.

Figura 26. Ensaio de citotoxicidade em linhagem não tumorigênica (MGF10A) e linhagens tumorigênicas (T47D, MCF-7 e MDAMB-231), utilizando β CD, a 100 μ M e 200 μ M, em 48 horas.



Fonte: Autora, 2020.

Tabela 6. Valor médio de viabilidade celular (%) da linhagem não tumorigênica (MGF10A) e linhagens tumorigênicas (T47D, MCF-7 e MDAMB-231), utilizando β CD, a 100 μ M e 200 μ M, em 48 horas.

Concentração	Composto	Viabilidade Celular (%) das linhagens celulares:			
		MCF10A	T47D	MCF-7	MDAMB-231
100 μ M	β CD	99,8	99,33	100	100
200 μ M	β CD	100	99,5	99,9	100

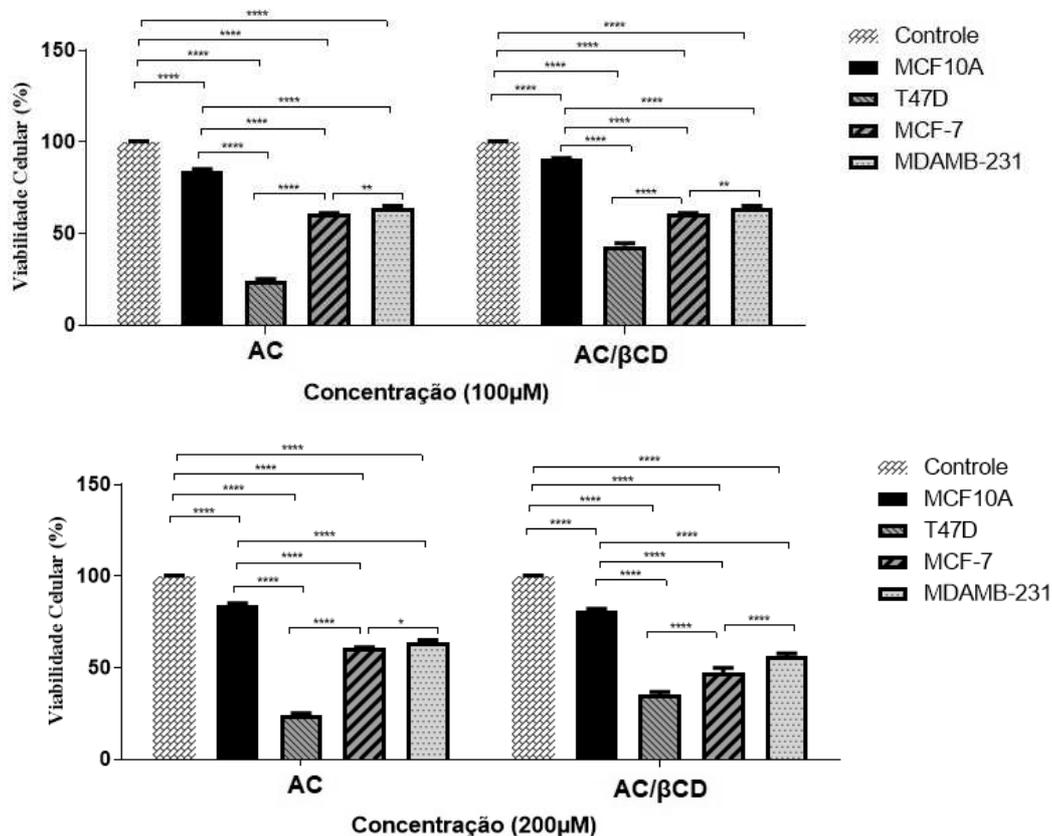
Fonte: Autora, 2020.

Nas figuras 27 e 28 estão apresentados os resultados de avaliação da citotoxicidade das lignanas e seus complexos de inclusão. Embora seja observada uma diminuição na viabilidade celular na linhagem de células normais (MCF10A), os valores obtidos não demonstram citotoxicidade significativa para essas células, sugerindo especificidade dos compostos para células tumorais.

Observando o gráfico da figura 27 e os valores de viabilidade da tabela 7, a AC a 100 μ M, demonstrou ser mais citotóxica para a linhagem T47D, quando comparada ao complexo AC/ β CD. Para a linhagem MCF-7 a média de viabilidade não sofreu alterações entre AC e o complexo AC/ β CD, sendo que ambos não demonstraram potencial citotóxico para essa linhagem. As linhagens MDAMB-231 e MCF10A não apresentaram alterações na citotoxicidade com o tratamento do complexo AC/ β CD e AC a 100 μ M, sendo ambos pouco citotóxicos para essas linhagens.

A AC a 200 μ M, demonstrou ser mais citotóxica para a linhagem T47D, quando comparada ao complexo AC/ β CD. Já para as linhagens MCF-7 e MDAMB-231, a viabilidade foi menor para o complexo AC/ β CD do que para AC, sugerindo maior eficiência do complexo e maior especificidade do mesmo para essas linhagens. A linhagem MCF10A apresentou viabilidade alta para os dois compostos, demonstrando que ambos não apresentaram citotoxicidade para essa linhagem. Os valores obtidos foram significativos e contribuem para posteriores pesquisas a fim do desenvolvimento de um novo fármaco.

Figura 27. Ensaio de citotoxicidade em linhagem não tumorigênica (MGF10A) e linhagens tumorigênicas (T47D, MCF-7 e MDAMB-231), utilizando AC e AC/ β CD, a 100 μ M e 200 μ M, em 48 horas. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. **** > *** > ** > *.



Fonte: Autora, 2020.

Tabela 7. Valor médio de viabilidade celular (%) da linhagem não tumorigênica (MGF10A) e linhagens tumorigênicas (T47D, MCF-7 e MDAMB-231), utilizando AC e AC/ β CD, a 100 μ M e 200 μ M, em 48 horas.

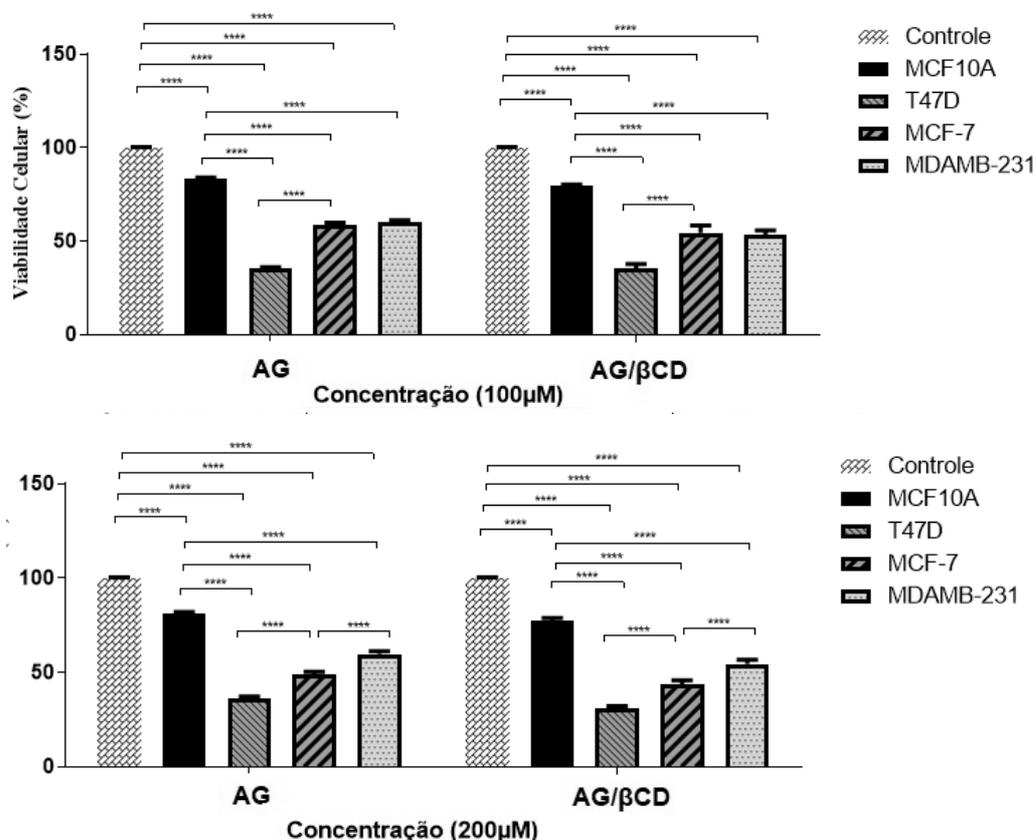
Concentração	Composto	Viabilidade Celular (%) das linhagens celulares:			
		MCF10A	T47D	MCF-7	MDAMB-231
100 μ M	AC	84	24	60,6	64
	AC/ β CD	90,6	47	60,6	64
200 μ M	AC	84	24	60,6	64
	AC/ β CD	81	35	47,3	56,3

Fonte: Autora, 2020.

Analisando o gráfico da figura 28 e os valores de viabilidade da tabela 8 é possível observar que o complexo AG/ β CD a 100 μ M foi mais citotóxico para a linhagem T47D, quando comparado com AG. O complexo também foi mais citotóxico para as linhagens MCF-7 e MDAMB-231, demonstrando valores satisfatórios de citotoxicidade.

Os valores obtidos para AG/ β CD a 200 μ M foram significativos e semelhantes ao de 100 μ M, visto anteriormente, demonstrando que o complexo AG/ β CD tem efeito citotóxico superior à molécula livre AG contra as linhagens tumorigênicas testadas, sugerindo uma maior especificidade do complexo para essas linhagens e apresentando um potencial para futuras terapias.

Figura 28. Ensaio de citotoxicidade em linhagem não tumorigênica (MGF10A) e linhagens tumorigênicas (T47D, MCF-7 e MDAMB-231), utilizando AG e AG/ β CD, a 100 μ M e 200 μ M, em 48 horas. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. **** > *** > ** > *.



Fonte: Autora 2020.

Tabela 8. Valor médio de viabilidade celular (%) da linhagem não tumorigênica (MGF10A) e linhagens tumorigênicas (T47D, MCF-7 e MDAMB-231), utilizando AG e AG/ β CD, a 100 μ M e 200 μ M, em 48 horas.

Concentração	Composto	Viabilidade Celular (%) das linhagens celulares:			
		MCF10A	T47D	MCF-7	MDAMB-231
100 μ M	AG	84	36,6	55	60
	AG/ β CD	81	32,3	44,6	54
200 μ M	AG	81,3	36	48,6	59,6
	AG/ β CD	77,3	31	43,3	54

Fonte: Autora, 2020.

5 CONCLUSÃO

- O presente trabalho conseguiu envolver, diversas áreas do conhecimento e tecnologia, visando contribuições na pesquisa sobre a ciência dos arranjos supramoleculares, bem como suas aplicações no tratamento de doenças;
- Através das análises no estado sólido, dos espectros de infravermelho foi possível observar as interações intermoleculares na formação dos complexos de inclusão;
- As análises de calorimetria de titulação isotérmica confirmaram as interações intermoleculares na formação dos complexos em solução. As constantes de afinidade foram menores para o complexo de inclusão AC/ β CD ($13,2 \pm 3,15$) e maiores para o complexo AG/ β CD ($232 \pm 11,3$), sendo estes, melhores quanto à estabilidade das interações;
- Os experimentos de fotometria de espalhamento de luz dinâmico possibilitaram observar a redução de tamanho do complexo de inclusão AG/ β CD, apresentando uma melhor estabilidade coloidal do que a molécula livre arctigenina (AG). O complexo de inclusão AC/ β CD, apresentou maior tamanho do que a molécula livre arctigenina (AC), devido ao padrão de interações diferentes em sua formação;
- Através da condutividade elétrica, os resultados demonstraram maiores valores de condutividade para todos os complexos de inclusão comparados

às moléculas livres, devido ao aumento de íons no meio, causado pela presença de hidroxilas das ciclodextrinas e nas moléculas hóspede;

- A citotoxicidade *in vitro* para células do câncer de mama, verificada pelo ensaio de viabilidade celular, demonstrou que a arctiina (AC), a arctigenina (AG) e seus complexos de inclusão (AC/ β CD e AG/ β CD), são capazes de reduzir a viabilidade celular de linhagens de células tumorigênicas.
- A análise geral dos resultados sugere que a citotoxicidade dos complexos AC/ β CD e AG/ β CD foi mais eficaz do que as moléculas livres AC e AG, exceto AC para a linhagem T47D.
- Com relação ao caráter inovador, é o primeiro registro de avaliação da citotoxicidade em células do câncer de mama *in vitro* utilizando complexos formados com arctiina/ β -ciclodextrina (AC/ β CD) e arctigenina/ β -ciclodextrina (AG/ β CD).

8 REFERÊNCIAS

A.AL-SHAMMAA, Dhuha; SAOUR, Kawkab Y.; ABDUL-KHALIK, Zaid M. Phytochemical Investigation for the Main Active Constituents in *Arctium lappa* L . Cultivated in Iraq. **Iraqi Journal of Pharmaceutical Science**, v. 22, n. 1, p. 18–24, 2013.

AHANGARPOUR, Akram *et al.* Antidiabetic, hypolipidemic and hepatoprotective effects of *Arctium lappa* root's hydro-alcoholic extract on nicotinamide-streptozotocin induced type 2 model of diabetes in male mice. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 7, n. 2, p. 169–179, 2017.

AHMADIAN, Somaieh *et al.* Cellular toxicity of nanogenomedicine in MCF-7 cell line: MTT assay. **Journal of Visualized Experiments**, 2009.

ALAMGIR, A.N.M. **Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1**. 1. ed. Bangladeche: Springer, 2017.

ALBERNAZ, Vanessa Lima. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização**

fisicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico. 2014. 121 p. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2014.

ALLRED, D. Craig. Ductal carcinoma in situ: Terminology, classification, and natural history. **Journal of the National Cancer Institute - Monographs**, n. 41, p. 134–138, out. 2010.

ALVES, Marcos Roberto Abreu *et al.* Study of the interaction between glucosamine hydrochloride and sodium dodecylsulphate micelles using conductometric, isothermal calorimetry, zeta-potential titrations, and NMR NOESY. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 248–259, 2014.

APOLINÁRIO, Alexsandra *et al.* Abrindo a Caixa de pandora dos nanomedicamentos: Há realmente muito mais “espaço lá embaixo”. **Química Nova** v. X, n. 00, p. 1–14 , 2020.

AWALE, Suresh *et al.* Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. **Cancer Research**, v. 66, n. 3, p. 1751–1757, 2006.

AZIM, Jr A. *et al.* Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer. **Annals of Oncology**, 2011.

BAE, Seunghee *et al.* Arctiin blocks hydrogen peroxide-induced senescence and cell death through microRNA expression changes in human dermal papilla cells. **Biological research**, v. 47, n. 1, p. 50, 2014.

BARCELOUX, DONALD G. **Medical toxicology of natural substances**. 1. ed. Califórnia: JOHN WILEY & SONS, 2008.

BAWARSKI, Willie E. *et al.* Emerging nanopharmaceuticals. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2008.

BERTUCCI, F.; FINETTI, P.; BIRNBAUM, D. Basal Breast Cancer: A Complex and Deadly Molecular Subtype. **Current Molecular Medicine**, 2011.

BILENSOY, Erem. **Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications**. 1. ed. Canadá: JOHN WILEY & SONS, 2011.

BITTENCOURT, Vanessa Cristina Estevam *et al.* Hydrophobic nanoprecipitates formed by benzoylphenylureas and β -cyclodextrin inclusion compounds: synthesis, characterization and toxicity against aedes aegypti larvae. **Heliyon** v. 5, n. 7, p. 1–12, 2019.

BORGHESAN, Deise Helena Peloso; PELLOSO, Sandra Marisa; CARVALHO, Maria Dalva Barros. Câncer de mama e fatores associados. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 7, n. 0, p. 62–68, 2008.

BRAR, Satinder K.; VERMA, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 4–17, 2011.

BRASIL. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2011. 126 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Controle dos cânceres do colo do útero e da mama**. 2. ed. Brasília: 13, 2013. 124 p.

BREWER, Hannah R. *et al.* Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. **Breast Cancer Research and Treatment**, 2017.

BRUNTON, Laurence *et al.* **Goodman & Gilman. Manual de Farmacologia e Terapêutica**. Porto Alegre: AMGH, 2010. 620 p. .

CABAN, S *et al.* Nanosystems for drug delivery. **OA Drug Design and Delivery**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2014.

CAI, Enbo *et al.* Synthesis and antitumour activity of arctigenin amino acid ester derivatives against H22 hepatocellular carcinoma. **Natural Product Research**, 2018.

CALADO, Ana *et al.* The Effect of Flaxseed in Breast Cancer: A Literature Review. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, n. February, p. 1–7, 2018.

CAMPELO, Paloma Gómez; ÁLVAREZ, Carmen Bragado; LLORED, Maria José Hernández. Psychological distress in women with breast and gynecological cancer treated with radical surgery. **Psycho-Oncology**, v. 23, n. 4, p. 459–466, 2014.

CARRIER, Rebecca L.; MILLER, Lee A.; AHMED, Imran. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 123, n. 2, p. 78–99, 2007.

CATSBURG, Chelsea; MILLER, Anthony B.; ROHAN, Thomas E. Active cigarette smoking and risk of breast cancer. **International Journal of Cancer**, 2015.

CHABNER, Bruce A; LONGO, Dan L. **Cancer chemotherapy and biotherapy : principles and practice**. 6. ed. Filadélfia: Wolters Kluwer, 2019. 1004 p.

CHAN, Yuk Shing *et al.* A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock). **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 245–254, 2011.

CHARLTON, Philip; SPICER, James. Targeted therapy in cancer. **Medicine**, v. 44, n. 1, p. 34–38, 2016.

CHEN, Jianmin *et al.* Flaxseed and Pure Secoisolariciresinol Diglucoside, but

Not Flaxseed Hull, Reduce Human Breast Tumor Growth (MCF-7) in Athymic Mice. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 11, p. 2061–2066, 2009.

CHEUNG, Peter C.K. Preface. **Handbook of Food Chemistry**. Berlim: Springer, 2015. p. 967–1007.

CHO, Min Kyung *et al.* Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: The role in TNF- α inhibition. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 10–11, p. 1419–1429, 2004.

CHORILLI, Marlus *et al.* Efeitos de complexos moleculares com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina na solubilidade da cafeína. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 3, p. 141–147, 2007.

CIRQUEIRA, Magno Belém *et al.* Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v. 39, p. 499–503, 2011.

CORBEN, Adriana D. Pathology of Invasive Breast Disease. **Surgical Clinics of North America**, v. 93, n. 2, p. 363–392, 2013.

DALL, Genevieve Victoria; BRITT, Kara Louise. Estrogen effects on the mammary gland in early and late life and breast cancer risk. **Frontiers in Oncology**, 2017.

DANIEL, Andrea R.; HAGAN, Christy R.; LANGE, Carol A. Progesterone receptor action: Defining a role in breast cancer. **Expert Review of Endocrinology and Metabolism**, 2011.

DAS, Saikat *et al.* Nanotechnology in oncology: Characterization and in vitro release kinetics of cisplatin-loaded albumin nanoparticles: Implications in anticancer drug delivery. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43, n. 4, p. 409, 2011.

DE MIRANDA, Janisse Crestani *et al.* Cyclodextrins and ternary complexes:

Technology to improve solubility of poorly soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4, p. 665–681, 2011.

DE SOUSA, Frederico B. *et al.* Structural and physical-chemical evaluation of Bradykinin Potentiating Peptide and its high soluble supramolecular complex. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry** v. 67, n. 3, p. 407–422, 2010.

DE SOUSA, Frederico B. *et al.* Supramolecular complex of fluoxetine with β -cyclodextrin: An experimental and theoretical study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1–2, p. 160–169, 2008.

DEGLISE, C. *et al.* Impact of obesity on breast cancer treatment. **European Journal of Cancer Supplements** v. 6, n. 7, p. 75, 2019.

DENADAI, Ângelo M.L. *et al.* Self-assembly characterization of the β -cyclodextrin and hydrochlorothiazide system: NMR, phase solubility, ITC and QELS. **Journal of Inclusion Phenomena**, v. 55, n. 1–2, p. 41–49, 2006.

DENADAI, Ângelo M.L. *et al.* Chlorhexidine/losartan ionic pair binding and its nanoprecipitation: Physico-chemical characterisation and antimicrobial activity. **Supramolecular Chemistry** v. 24, n. 3, p. 204–212, 2012

DENADAI, Ângelo M.L. *et al.* Control of size in losartan/copper(II) coordination complex hydrophobic precipitate. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 7, p. 3916–3922, 2013.

DENADAI, Ângelo M.L. *et al.* Novel pharmaceutical composition of bradykinin potentiating penta peptide with β -cyclodextrin: Physical-chemical characterization and anti-hypertensive evaluation. **International Journal of Pharmaceutics** v. 336, n. 1, p. 90–98, 2007

DUMAN, Osman; TUNÇ, Sibel. Electrokinetic and rheological properties of Na-bentonite in some electrolyte solutions. **Microporous and Mesoporous**

Materials, v. 117, n. 1–2, p. 331–338, 2009.

DURÁN, Nelson *et al.* Tecnologia de nanocristais em fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 151–158, 2010.

DUTTA, Aastha. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization**. 1. ed. Aurangabad: Elsevier, 2017. p. 73–93.

EGYED, Orsolya. Spectroscopic studies on β -cyclodextrin. **Analytica Chimica Acta**, v. 240, n. 2, p. 225–227, 1990.

EL-DARIER, Salama M; SALAMA, Shaimaa G. *Arctium Lappa* L . (Asteraceae); a New Invasive Highly Specific Medicinal Plant Growing in Egypt. **Pyrex Journal of Plant and Agricultural Research**, v. 2, n. 2, p. 44–53, 2016.

FANG, Xianhe; HU, Xiangdong. Advances in the synthesis of lignan natural products. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 42–45, 2018.

FANGUEIRO, Joana F *et al.* Desenvolvimento, produção e caracterização de nanocristais de fármacos pouco solúveis. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1848–1853, 2012.

FENG, Yixiao *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes and Diseases**, v. 5, n. 2, p. 77–106, 2018.

FERNANDES, Viviane Conceição *et al.* Caracterização físico-química de complexos de insulina: dimetil-beta-ciclodextrina e insulina: hidroxipropil-beta-ciclodextrina e avaliação da influência do tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 543–553, 2007.

FERRACANE, Rosalia *et al.* Metabolic profile of the bioactive compounds of

burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 399–404, 2010.

FORATO, Lucimara Aparecida *et al.* **A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações**. 1. ed. São Carlos: Embrapa, 2010. 1–16 p.

FREIRE, Ernesto. *Isothermal titration calorimetry: Controlling binding forces in lead optimization*. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 3, 2004.

FU, Andrew S; RECUM, Horst A Von. Affinity-based drug delivery. **Engineering Polymer Systems for Improved Drug Delivery**. 1. ed. Cleveland: John Wiley & Sons, 2014. p. 429–452.

GANTCHEW, M. Radiotherapy risk profile. **Rentgenologiya i Radiologiya**, v. 49, n. 4, p. 282–285, 2010.

GAO, Haiyan *et al.* Arctigenin: A lignan from *Arctium lappa*. **Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online**, 2008.

GARCIA VELHO, Rodrigo. **Medidas de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: um levantamento bibliográfico**. 2006. 170p. Dissertação (Mestrado em Química) Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, 2006.

GLOBOCAN, The Global Cancer Observatory. Breast Cancer. **International Agency for Research on Cancer, WHO**, v. 876, p. 1–2, 2018. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today>>.34.0-43.6.

GOLDMAN, Evgeniya *et al.* Nanoparticles target early-stage breast cancer metastasis in vivo. **Nanotechnology**, v. 28, n. 43, 2 out. 2017.

HAMMER, Gary D.; MCPHEE, Stephen J. **Fisiopatologia da doença: Uma introdução à medicina clínica**. 7. ed. Porto Alegre: AMGH, 2016. 768 p.

HARBECK, Nadia; GNANT, Michael. Breast cancer. **The Lancet** v. 389, n. 10074, p. 1134–1150, 2017.

HASSETT, Michael J. *et al.* Frequency and cost of chemotherapy-related serious adverse effects in a population sample of women with breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, 2006.

HAYASHI, Kyoko *et al.* Therapeutic effect of arctiin and arctigenin in immunocompetent and immunocompromised mice infected with influenza A virus. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 33, n. 7, p. 1199–1205, 2010.

HOLDGATE, Geoffrey a; WARD, Walter H J. Measurements of binding thermodynamics in drug discovery thermodynamics and their use in studies of biomolecular recognition and drug discovery . **Drug discovery today**, v. 10, n. 22, p. 1543–1550, 2005.

HSIEH, Chia Jung *et al.* Arctigenin, a dietary phytoestrogen, induces apoptosis of estrogen receptor-negative breast cancer cells through the ROS/p38 MAPK pathway and epigenetic regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 67, p. 159–170, 2014.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. **A situação do câncer de mama no Brasil: Síntese de dados dos sistemas de informação**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2019. 85 p.

JIN, Xin *et al.* Progress in structural modification of representative lignan compounds. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2018.

JIN, Zheng-Yu. **Cyclodextrin chemistry: Preparation and Application**. 1. ed. Singapura: World Scientific, 2013. 7250-7 p. 58 v.

JUNG, Su Yon *et al.* Factors associated with mortality after breast cancer metastasis. **Cancer Causes and Control**, 2012.

KAISER, Jochen; BLEADOWSKI, Christoph; DIETRICH, Jörg. Neural correlates of chemotherapy-related cognitive impairment. **Cortex**, v. 54, n. 1, p. 33–50, 2014.

KAMIŃSKA, Marzena *et al.* Breast cancer risk factors. **Przegląd Menopauzalny**, v. 14, n. 3, p. 196–202, 2015.

KEY, Timothy. Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: A collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. **The Lancet Oncology**, 2013.

KIM, Kyungjae *et al.* Anti-inflammatory function of arctiin by inhibiting COX-2 expression via NF- κ B pathways. **Journal of Inflammation**, v. 8, p. 1–9, 2011.

KISPERT, Shannon; MCHOWAT, Jane. Recent insights into cigarette smoking as a lifestyle risk factor for breast cancer. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, 2017.

KO, Eun-Yi; MOON, Aree. Natural Products for Chemoprevention of Breast Cancer. **Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 4, p. 223–231, 2015.

KORIEEM, Khaled M.M. *et al.* Therapeutic effect of *Arctium lappa* in Schistosoma haematobium associated kidney disturbance: biochemical and molecular effects. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 4, p. 1246–1254, 2016.

KUIJSTEN, Anneleen *et al.* A validated method for the quantification of enterodiol and enterolactone in plasma using isotope dilution liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences** v. 822, n. 1–2, p. 178–184, 2005.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. **Bases Patológicas das Doenças**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. .

LANNA, Elisa G. *et al.* Physicochemical characterization and biological activities of the ethanol extract of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken incorporated in β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 85, n. 3–4, p. 247–259, 2016.

LEAL, Jorge Henrique Santos; CUBERO, Daniel; DEL GIGLIO, Auro. Hormonioterapia paliativa em câncer de mama: aspectos práticos e revisão da literatura. **Revista BRasileira da Clinica Medica**, 2010.

LI, Jing *et al.* Arctiin protects against cardiac hypertrophy through inhibiting MAPKs and AKT signaling pathways. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 135, n. 3, p. 97–104, 2017.

LI, Xiao-Mei *et al.* Gastroprotective effects of arctigenin of *Arctium lappa* L. on a rat model of gastric ulcers. **Biomedical Reports**, v. 5, p. 589–594, 2016.

LIM, T. K. **Edible Medicinal and Non: Medicinal Plants**. 1. ed. Dordrecht: Springer, 2015. 9 v.

LIMA, Adriene *et al.* Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 531–536, 2006.

LISA A. Newman, Jessica M. Bensenhaver. Ductal Carcinoma In Situ and Microinvasive/Borderline Breast Cancer. p. 168, 2015.

LIU, Lei; GUO, Qing Xiang. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena** v. 42, n. 1–2, p. 1–14, 2002.

LIU, Wei *et al.* In vitro and in vivo antioxidant activity of a fructan from the roots of *Arctium lappa* L. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 65, p. 446–453, 2014.

LOFTSSON, Thorsteinn; HREINSDÓTTIR, Dagný; MÁSSON, Már. The complexation efficiency. 2007, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 624 p.

LU, Lai Chun *et al.* Effects of arctiin on streptozotocin-induced diabetic retinopathy in sprague-dawley rats. **Planta Medica** v. 78, n. 12, p. 1317–1323, 2012.

LULA, Ivana *et al.* Study of angiotensin-(1-7) vasoactive peptide and its β -cyclodextrin inclusion complexes: Complete sequence-specific NMR assignments and structural studies. **Peptides** v. 28, n. 11, p. 2199–2210, 2007.

MACHADO, Fabio Bahls *et al.* Evaluation of the antiproliferative activity of the leaves from *Arctium lappa* by a bioassay-guided fractionation. **Molecules** v. 17, n. 2, p. 1852–1859, 2012.

MALVERN. *Dynamic Light Scattering - Understanding the Basics*. Disponível em: <<https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3662>>. Acesso em: 18 set. 2018.

MATSUZAKI, Y *et al.* Arctiin induces cell growth inhibition through the down-regulation of cyclin D1 expression. **Oncology Reports** v. 19, p. 721–727, 2008.

MAXWELL, Thressi *et al.* Arctigenin inhibits the activation of the mTOR pathway, resulting in autophagic cell death and decreased ER expression in ER-positive human breast cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 4, p. 1339–1349, 2018.

MAXWELL, Thressi *et al.* The anti-metastatic effects of the phytoestrogen arctigenin on human breast cancer cell lines regardless of the status of ER expression. **International Journal of Oncology**, v. 50, n. 2, p. 727–735, 2017.

MEKHAMER, W. K. The colloidal stability of raw bentonite deformed mechanically by ultrasound. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 301–306, 2010.

MILDER, Ivon E. J. *et al.* Relation between Plasma Enterodiol and Enterolactone and Dietary Intake of Lignans in a Dutch Endoscopy-Based Population. **The Journal of Nutrition**, 2007.

MIN, Byulchorong *et al.* Arctiin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells and decreases adiposity and body weight in mice fed a high-fat diet. **Nutrition Research and Practice**, v. 8, n. 6, p. 655–661, 2014.

MOREIRA, Ana M. dos Santos. **Composições nanoestruturadas de avermectinas com β -ciclodextrina: síntese, caracterização físico-química e avaliação da atividade contra larvas do *Aedes aegypti***. 2016. 75 p. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Química de Minas Gerais da) Pós-Graduação em Multicêntrico em Química de Minas Gerais, Universidade Federal de Juiz de Fora, Governador Valadares, MG, 2016.

MOREIRA, Ana M. dos Santos *et al.* Hydrophobic Nanoprecipitates of β -Cyclodextrin/Avermectins Inclusion Compounds Reveal Insecticide Activity against *Aedes aegypti* Larvae and Low Toxicity against Fibroblasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 28, p. 7275–7285, 2018.

NASCIMENTO, Lorryne O. *et al.* Molecular and supramolecular characterization of Ni(II)/losartan hydrophobic nanoprecipitate. **Journal of Molecular Structure**, v. 1074, p. 224–230, 2014.

NELSON, Heidi D. *et al.* Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: A systematic review and meta-analysis a systematic review and meta-analysis. **Annals of Internal Medicine**, 2012.

OGIER, Julien; ARNAULD, Thomas; DORIS, Eric. Recent advances in the field of nanometric drug carriers. **Future Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 693–

711 , 2009.

OKURA, Toshinori; SAIMARU, Mitsugu; MONMA, Hideki. Synthesis and anti-hiv activity of dibenzylbutyrolactone lignans. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 8, p. 429–433, 2009.

OLIVEIRA, Michele F. de. **Estudo de sistemas supramoleculares a base de ciclodextrinas e nanofibras de polímeros biodegradáveis para a liberação controlada de fármacos**. 2015. 139p. Tese (Doutorado em Química) Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

PATIL, J. S. *et al.* Inclusion complex system: a novel technique to improve the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 2, n. 2, p. 29–34, 2010.

PEROZZO, Remo; FOLKERS, Gerd; SCAPOZZA, Leonardo. Thermodynamics of protein-ligand interactions: History, presence, and future aspects. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 24, n. 1–2, p. 1–52, 2004.

PINHO, Eva *et al.* Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 121–135, 2014.

PREDES, Fabricia de Souza *et al.* Hepatoprotective Effect of *Arctium lappa* Root Extract on Cadmium Toxicity in Adult Wistar Rats. **Biological Trace Element Research**, 2014.

QU, Ying *et al.* Evaluation of MCF10A as a reliable model for normal human mammary epithelial cells. **Plos one**, v. 10, n. 7, 6 jul. 2015.

QUATTROCCHI, Umberto. **CRC World Dictionary of Plants names**. Estados Unidos: CRC Press LLC, 2000.

NANDANWAR, R.A; CHAUDHARI, A.R; EKHE, J.D. Nitrobenzene Oxidation for Isolation of Value Added Products from Industrial Waste Lignin. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences** v. 6, n. June, p. 501–513 , 2016.

RANG, H. P. *et al.* **Rang & Dale. Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 808 p.

RAWAT, Manju *et al.* Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790–1798, 2006.

RUSSO, Jose. **The pathobiology of breast cancer**. Filadélfia: Springer, 2016. 1–235 p.

SAHA, Subhadeep *et al.* Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of β -cyclodextrin with vitamin molecules. **Scientific Reports**, v. 6, p. 12, 2016.

SALEHINIYA, H.; GHONCHEH, M.; POURNAMDAR, Z. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, p. 43–46, 2016.

SANGUINETTI, A. *et al.* Male breast cancer, clinical presentation, diagnosis and treatment: Twenty years of experience in our Breast Unit. **International Journal of Surgery Case Reports**, v. 20, p. 8–11, 2016.

SENKUS-KONEFKA, Elzbieta; JASSEM, J. Complications of breast-cancer radiotherapy. **Clinical Oncology**, v. 18, n. 3, p. 229–235, abr. 2006.

SETCHELL, Kenneth D.R. *et al.* Metabolism of secoisolariciresinol-diglycoside the dietary precursor to the intestinally derived lignan enterolactone in humans. **Food and Function**, 2014.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34,

2019.

SILVA, Ana Carolina Japur de Sa Rosa e; LARA, Lucia Alves da Silva. Moduladores seletivos dos receptores da progesterona: revisão da literatura. **Femina** v. 39, n. 12, p. 1–6 , 2011.

SLEDGE, George W.; CHAGPAR, Anees; PEROU, Charles. Collective Wisdom: Lobular Carcinoma of the Breast. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 36, p. 18–21, 2016.

SOHN, Eun Hwa *et al.* Anti-allergic and anti-inflammatory effects of butanol extract from *Arctium Lappa* L. **Clinical and Molecular Allergy** v. 9, 2011.

SOLOMONS, T. W. Graham; FRYHLE, Craig B.; JOHNSON, Robert G. **Química Orgânica Volume 1**. 10. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2012. 619 p.

SOTIRIOU, Christos *et al.* Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2003.

SRIVASTAVA, Deepa; YADAV, Sarita. Isolation and structural determination of arctigenin from *Ipomoea cairica*. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 10, n. 5, p. 32535–39 , 2019a.

SRIVASTAVA, Vijay Kumar; YADAV, Rupali. Isothermal titration calorimetry. **Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources**. Hyderabad, Índia: Elsevier, 2019b. p. 125–137.

SUÁREZ, Diego F. *et al.* Structural and thermodynamic characterization of doxycycline/ β -cyclodextrin supramolecular complex and its bacterial membrane interactions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 118, p. 194–201, 2014.

SULTANA, Najma; ARAYNE, M. Saeed. Review: nanoparticles in drug delivery for the treatment of cancer. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**. v. 19, n. 3, p. 258–268 , 2006.

SUN, Yi Sheng *et al.* Risk factors and preventions of breast cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 11, p. 1387–1397, 2017.

SZE, Alice *et al.* Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 261, n. 2, p. 402–410, 2003.

TANFORD, Charles; HUGGINS, Maurice L. Physical Chemistry of Macromolecules. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 109, n. 3, p. 98C, 1962.

TATE, Chandra R. *et al.* Targeting triple-negative breast cancer cells with the histone deacetylase inhibitor panobinostat. **Breast Cancer Research**, 2012.

UEKAMA, Kaneto; HIRAYAMA, Fumitoshi; IRIE, Tetsumi. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. **Chem Rev**, v. 98, n. 81, p. 2045–2076, 1998.

VALLE, E.M. Martin Del. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, p. 14, 2003.

VEIGA, Francisco.; PECORELLI, Catarina.; RIBEIRO, Laura. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. Coimbra: Minerva Coimbra, 2006. 228 p. 1^a ed.

VENTURINI, Cristina De Garcia *et al.* Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Quimica Nova**, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008.

VIRNIG, Beth A. *et al.* Ductal carcinoma in Situ of the breast: A systematic review of incidence, treatment, and outcomes. **Journal of the National Cancer**

Institute, v. 102, n. 3, p. 170–178, 2010.

WAKS, Adrienne G.; WINER, Eric P. Breast Cancer Treatment. **Journal of the American Medical Association**, v. 321, n. 3, p. 316, 2019.

WANG, Gao Xue *et al.* Bioassay-guided isolation and identification of active compounds from Fructus Arctii against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). **Parasitology Research**, v. 106, n. 1, p. 247–255, 2009.

WANG, Ruibing; BILLONE, Paul S.; MULLETT, Wayne M. Nanomedicine in action: An overview of cancer nanomedicine on the market and in clinical trials. **Journal of Nanomaterials**, 2013.

YU, Sungryul *et al.* The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal A subtype of breast cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 486, n. 3, p. 752–758, 6 maio 2017.

YUAN, Haidan *et al.* The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 18, 2016.

ZHAO, Feng; WANG, Lu; LIU, Ke. In vitro anti-inflammatory effects of arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L., through inhibition on iNOS pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 457–462, 2009.

ZORNIO, Clarice Fedosse. **Preparação e caracterização do complexo de inclusão β -ciclodextrina/(Z)-jasmona e da fibra de algodão enxertada com β -Ciclodextrina**. 2013. 127 p. Dissertação (Mestrado em Química) Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2013.