

Tânia Mara Fischer Günther

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DAS ASSOCIAÇÕES DE  
VITAMINA C COM VITAMINA K<sub>3</sub> MICROENCAPSULADAS  
OU COM ORTOVANADATO DE SÓDIO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Rozangela Curi Pedrosa

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Günther, Tânia Mara Fischer

Atividade antitumoral das associações de vitamina C com  
vitamina K3 microencapsuladas ou com ortovanadato de sódio  
/ Tânia Mara Fischer Günther ; orientadora, Rozangela Curi  
Pedrosa - Florianópolis, SC, 2013.

161 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Vitamina C (ascorbato de sódio). 3.  
Vitamina K3 (menadiona). 4. Ortovanadato de sódio. 5.  
Atividade antitumoral / estresse oxidativo. I. Pedrosa,  
Rozangela Curi. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DAS ASSOCIAÇÕES DE  
VITAMINA C COM VITAMINA K<sub>3</sub> MICROENCAPSULADAS  
OU COM ORTOVANADATO DE SODIO**

por

**TÂNIA MARA FISCHER GÜNTHER**

Tese julgada e aprovada em sua forma final  
pelos membros titulares da Banca  
Examinadora (Port. 03/PPGBQA/2013) do  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
- UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:

---

**Prof(a) Dr(a) Rozangela Curi Pedrosa (BQA/CCB/UFSC)**

---

**Prof(a) Dr(a) Eduardo Antonio Ferreira (Universidade de Brasília)**

---

**Prof(a) Dr(a) Maria Helena Rossi (Instituto Biológico de São Paulo)**

---

**Prof(a) Dr(a) Pedro Buc Calderon (Toxicology and Cancer Biology, Research  
Group, Université Catholique de Louvain/Bélgica)**

---

**Prof(a) Dr(a) Reginaldo Geremias (UFSC/Araranguá)**

---

**Prof(a) Dr(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza  
(BQA/CCB/UFSC)**

---

**Prof(a) Dr(a) Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica**

Florianópolis, 14 de fevereiro de 2013



## **AGRADECIMENTOS**

**A todos que me acompanharam e ajudaram nesta caminhada.**

À minha família.  
Aos meus amigos.

À Universidade Federal de Santa Catarina.  
Ao Centro de Ciências Biológicas.  
Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica.  
Ao Departamento de Bioquímica.  
Ao Laboratório de Bioquímica Experimental – LABIOEX.  
Ao CNPq

À minha orientadora, Rozangela Curi Pedrosa, pela oportunidade de aperfeiçoamento pessoal, profissional e científico.

Aos meus colegas, Professores do Departamento de Bioquímica.

A todos os colegas do LABIOEX, com quem convivi nesses anos, pela amizade, pelas trocas de experiências, pelos ensinamentos e aprendizado mútuos: Aline Pereira, Ana Claudia, Carla Baron, Fernanda Biscaro, Fernando Cantanhede, Eduardo Ferreira, Eduardo Benedetti Parisotto, Fabiana Ourique, Joseane Garcia, Karina Bettega Felipe, Maicon Kwiecinski, Mirelle Farias, Valdelucia Grinevicius.

Àqueles que colaboraram para a realização experimental desse trabalho:

Dr. Claus Tröger Pich (UFSC /Araquá); Dr. Danilo Wilhelm Filho (UFSC / CCB / ECZ); MSc. João Francisco Gomes Correia (UFSC / CCB / BQA); Dr. Julien Verrax (Toxicology and Cancer Biology, Research Group, Université Catholique de Louvain/Bélgica); Dr. Pedro Buc Calderon (Toxicology and Cancer Biology, Research Group, Université Catholique de Louvain/Bélgica); Dr. Pedro Manique Barreto (UFSC / CCA / CAL); Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau (UFSC / CCB / FMC).

Aos membros da banca pela avaliação desse trabalho.



## RESUMO

**Introdução:** A vitamina C (VC) e vitamina K<sub>3</sub> (VK<sub>3</sub>) têm atividade citotóxica, antiproliferativa e antitumoral. A citotoxicidade da VK<sub>3</sub> é potencializada quando associada com VC. O encapsulamento com quitosana pode retardar ou controlar a liberação de VCK<sub>3</sub> prevenindo contra reações de biotransformação prematuras e aumentar a estabilidade e biodisponibilidade. Relatos na literatura mostram que compostos de vanádio induzem o estresse oxidativo *in vitro* sugerindo este como um possível mecanismo de ação para seu efeito antineoplásico. Adicionalmente, alguns autores têm evidenciado que VC possui atividade antioxidante, mas também possui efeito citotóxico sobre células malignas através de atividade pró-oxidante em elevadas doses. **Objetivo:** nesse trabalho pretendeu-se avaliar a atividade citotóxica, pró-apoptótica e antitumoral da associação das VC e VK<sub>3</sub> microencapsuladas com quitosana e a potencialização do efeito antitumoral do ortovanadato de sódio pela associação com VC. **Metodologia:** A liberação da VC das micropartículas de VC e VCK<sub>3</sub> foi avaliada por CLAE. A citotoxicidade das micropartículas de VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> foi avaliada em células de câncer de mama (MCF7) e a citotoxicidade de ortovanadato e associação de ortovanadato e VC em células de câncer de bexiga (T24). O efeito antitumoral foi avaliado em líquido ascítico de camundongos isogênicos Balb/c inoculados com células de tumor de Ehrlich. **Resultados:** A liberação da VC das micropartículas de VC e VCK<sub>3</sub> mostrou ser sustentada por mais de seis horas. O tratamento com VK<sub>3</sub> encapsulada (E) foi o mais citotóxico (CI50 = 18,15 µM) quando comparado com VC (CI50 > 9,65 mM) e VCK<sub>3</sub> (CI50 = 9,17 mM:51,58 µM) os quais não tiveram as respectivas citotoxicidades aumentadas após microencapsulamento. Na avaliação do efeito antitumoral *in vivo* os tratamentos com VCK<sub>3</sub> (E) e VK<sub>3</sub> (E) resultaram na maior redução da variação do peso do corpo (66,98 e 56,92 %). VCK<sub>3</sub> (E) resultou na maior inibição do crescimento tumoral (66,20 %), seguido de VK<sub>3</sub> (NE) (49,86 %). VCK<sub>3</sub> (E) resultou em maior aumento de tempo médio de sobrevivência (TMS = 16,5 dias) e percentual de longevidade (PAL = 42,30 %) sugerindo assim as micropartículas com efeitos antitumorais mais promissores. O dano oxidativo em proteínas (0,068 µmol/mg) foi maior após o tratamento com VCK<sub>3</sub> (E) o que pode ser resultado de estresse oxidativo. Os tratamentos com VC (NE), VC (E), VCK<sub>3</sub> (NE) causaram os maiores aumentos nos níveis de peroxidação lipídica (9,0; 7,5; 7,0 nmol/g, respectivamente). A apoptose foi determinada nas células ascíticas de tumor de Ehrlich especialmente após VCK<sub>3</sub> (E) e VK<sub>3</sub> (NE) observando-se 38 e 52 % de células apoptóticas. Na avaliação da potencialização do efeito antitumoral de ortovanadato de sódio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) e associação com VC a citotoxicidade,

inibição da proliferação celular, geração de ERO e fragmentação de DNA foram feitas com a linhagem de células de câncer de bexiga (T24). Ortovanadato de sódio (0,5-10  $\mu\text{M}$ ) foi citotóxico contra a linhagem tumoral (CI50 = 5,8  $\mu\text{M}$ ), mas a associação com VC (100  $\mu\text{M}$ ) apresentou maior citotoxicidade (CI50 = 3,3  $\mu\text{M}$ ). A associação ortovanadato e VC aumentou a inibição da proliferação celular (mais de 20 %) dependente da concentração e a geração de ERO (quatro vezes) indicando que esse pode ser um mecanismo de ação da associação ortovanadato e VC. Não foi significativa a clivagem do DNA plasmidial, sendo assim, não houve sinergismo da associação ortovanadato/VC, pois o efeito da associação não foi maior que a ação do ortovanadato e VC individualmente. A avaliação da atividade antitumoral sobre células de carcinoma ascítico de Ehrlich inoculadas em camundongos Balb/c mostrou que os tratamentos com ortovanadato (18,75 mg/kg/dia) e associação ortovanadato/VC (18,75:187,50 mg/kg/dia) reduziram as medidas de variação de peso do corpo, variação da circunferência abdominal e volume de líquido ascítico quando comparados aos grupos de controle (com tumor e sem tratamento). Houve inibição do crescimento do tumor (73,71 %) quando comparado ao tratamento realizado somente com ortovanadato de sódio (45,07 %) e aumento da longevidade (TMS = 55,56 %). As células de tumor de Ehrlich retiradas dos camundongos foram usadas para determinar a atividade de enzimas antioxidantes, o dano oxidativo e o tipo de morte celular. Nessas células os tratamentos com ortovanadato sozinho e em associação com VC aumentaram a atividade da catalase, mas somente a associação ortovanadato e VC aumentou a atividade de SOD (mais de quatro vezes). O dano oxidativo em proteínas e lipídios foi maior devido ao tratamento feito com associação ortovanadato/VC (2-3 vezes). A morte celular após o tratamento com associação ortovanadato e VC ocorreu por apoptose (41,18 %) e foi devido à inibição de Bcl-xL e ativação de Bax. **Conclusão:** com isso sugere-se que a associação VC e VK<sub>3</sub> microencapsuladas com quitosana e associação ortovanadato/VC apresentaram efeitos citotóxico, pró-apoptótico e antitumoral nas linhagens celulares testadas e nos ensaios *in vivo* e possivelmente o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio seriam um dos mecanismos de ação associado a estes efeitos observados.

**Palavras-chave:** Vitamina C. Ascorbato. Vitamina K<sub>3</sub>. Menadiona. Ortovanadato de sódio. Citotoxicidade. Atividade antitumoral. Estresse oxidativo. ERO. Bcl-xL. Bax.

## ABSTRACT

**Introduction:** There are at least three decades, efforts have been directed towards developing drugs as or more effective than traditional chemotherapy, but less toxic and less likely to induce multidrug resistance. Vitamin C (VC) and vitamin K<sub>3</sub> (VK<sub>3</sub>) have cytotoxic, antiproliferative and antitumor activities. The cytotoxicity of VK<sub>3</sub> is enhanced when combined with VC. It has also been shown that vanadium compounds induce oxidative stress and lipid peroxidation *in vitro* and there are some reports indicating the possible anticancer effect of vanadium on tumor cells. Additionally, some authors have shown that VC has antioxidant activity, but also possesses cytotoxic effect in elevated doses on malignant cells through pro-oxidant activity. **Objective:** In this study, we evaluated the cytotoxic, pro-apoptotic and anti-tumor involvement of the VC and VK<sub>3</sub> microencapsulated with chitosan. It was also investigated the potentiation of antitumor effect of sodium orthovanadate by the association with VC. **Methodology:** The VC release from the microparticles was analyzed by HPLC when it was proved that the release is sustained for more than six hours. The evaluation of cytotoxicity of microparticles VC and VK<sub>3</sub> was performed on MCF7 cells. **Results:** Treatment with encapsulated VK<sub>3</sub> (E) was the most cytotoxic (IC<sub>50</sub> = 18.15 μM), whereas the treatments evaluated with VC (IC<sub>50</sub> > 9.65 mM) and VCK<sub>3</sub> (IC<sub>50</sub> = 9.17 mM: 51.58 μM) had increased their cytotoxicities after microencapsulation. In evaluating the antitumor effect on cells of Ehrlich ascites tumor in Balb-c mice, it was found an antitumor effect after all treatments with the microparticles. VCK<sub>3</sub> (E) and VK<sub>3</sub> (E) resulted in greater reduction of the body weight variation (66.98 and 56.92 %). VCK<sub>3</sub> (E) also resulted in the greatest inhibition of tumor growth (66.20 %), followed by VK<sub>3</sub> (NE) (49.86 %). VCK<sub>3</sub> (E) resulted in an increase of median survival time (MST = 16.5 days) and a higher percentage increase in lifespan (PAL = 42.30 %). Thus the microparticles with the combination VCK<sub>3</sub> (E) have promising antitumor effects. Oxidative damage of proteins (0.068 μmol/ mg) was higher after treatment with VCK<sub>3</sub> (E) comparing with negative control (0.007 μmol / mg) which may result from oxidative stress. The treatments with VC (NE), VC (E), and VCK<sub>3</sub> (NE) caused the greatest increases in the levels of lipid peroxidation (9.0; 7.5; 7.0 nmol/g). Apoptosis was determined in cells of ascitic Ehrlich tumor after VCK<sub>3</sub> especially (E) and VK<sub>3</sub> (NE) with 38 and 52 % of apoptotic cells. In evaluating the antitumor effect of sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) it was found that the potentiation of the toxicity was associated with the combination with VC. Cytotoxicity, inhibition of cell proliferation, generation of ROS and DNA fragmentation were evaluated using T24 cells. Sodium orthovanadate (0.5-10 μM) was cytotoxic against tumor cells T24 (IC<sub>50</sub> = 5.8 μM) whereas the association

with VC (100  $\mu\text{M}$ ) showed  $\text{IC}_{50} = 3.3 \mu\text{M}$ . The association orthovanadate/VC caused increased concentration dependent inhibition of cell proliferation (over 20 %) and increased generation of ROS (four fold) indicating that this may be one mechanism of action of the association orthovanadate/VC in T24 cells. There was no cleavage of plasmid DNA, so there was no synergism for the association orthovanadate/VC, because the effect of the combination was not higher than the action of orthovanadate and VC individually. Antitumor activity was evaluated on cells of Ehrlich ascites carcinoma inoculated into Balb/c mice. Treatment with orthovanadate (18.75 mg/kg/day) and association orthovanadate/VC (18.75:187.50 mg/kg/day) reduced significantly the measures of variation of body weight, waist circumference variation and volume of ascites fluid compared to animals in the negative control group (tumor without treatment). There was inhibition of tumor growth (73.71 %) compared to treatment carried out only with sodium orthovanadate (45.07 %) also increased the longevity of animals (MST = 55.56 %). Cells taken from mice with tumor Ehrlich ascites were used to determine the activity of antioxidant enzymes, oxidative damage and type of cell death. In these cells orthovanadate alone and in combination with VC increased catalase activity, but only the association orthovanadate / VC increased the activity of SOD (more than 4 fold). Oxidative damage to proteins and lipids were higher due to the association with treatment done orthovanadate / VC (2-3 times). It was demonstrated that cell death after treatment with combination orthovanadate / VC occurred by apoptosis (41.18 %) related to the inhibition of Bcl-xL and Bax activation. **Conclusion:** from these results it can be suggested that the association with VC and  $\text{VK}_3$  microencapsulated chitosan and association orthovanadate / VC showed cytotoxic, pro-apoptotic and anti-tumor activities related to increased generation of reactive oxygen species in cell lines tested and *in vivo* assays .

**Keywords:** Vitamin C. Ascorbate. Vitamin  $\text{K}_3$ . Menadione. Sodium orthovanadate. Cytotoxicity. Antitumoral activity. Oxidative stress. ROS. Bcl-xL. Bax.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia celular na apoptose. Modificado de Walker <i>et al.</i> (1988).....	27
Figura 2 - Esquema das duas principais vias de indução de apoptose na célula: via mitocondrial (intrínseca) e via receptor de morte (extrínseca) (adaptado de CLARKE & ALLAN, 2009).....	28
Figura 3 - Ciclo de oxido-redução entre vitamina C e vitamina K <sub>3</sub> . Fonte: Verrax <i>et al.</i> , 2005.....	35
Figura 4- Estrutura da quitina-quitosana. Fonte: Pillai; Paul; Sharma (2009).....	38
Figura 5 - Esquema de corte da molécula de DNA Plasmidial. Fonte: Adaptado de Berg, Tymoczko e Stryer (2008).....	52
Figura 6 - Imagem típica de um gel de agarose obtido a partir da eletroforese do DNA plasmidial após sua incubação com várias concentrações de compostos. Fonte: Mancin <i>et al</i> (2005).....	54
Figura 7 - Fotografias das micropartículas de quitosana não encapsulada e VC, VK <sub>3</sub> e VCK <sub>3</sub> encapsuladas produzidas por <i>spray drying</i> . (a.1) Quitosana não encapsulada (aumento 30X); (a.2) Quitosana não encapsulada (aumento 50X); (a.3) Quitosana não encapsulada (aumento 200X); (b.1) VC (E) (aumento 300X); (b.2) VC (E) (aumento 750X); (b.3) VC (E) (aumento 1500X); (c.1) VK <sub>3</sub> (E) (aumento 500X); (c.2) VK <sub>3</sub> (E) (aumento 1000X); (c.3) VK <sub>3</sub> (E) (aumento 2000X); (d.1) VCK <sub>3</sub> (E) (aumento 300X); (d.2) VCK <sub>3</sub> (E) (aumento 1000X); (d.3) VCK <sub>3</sub> (E) (aumento 2000X). MEV, 10 kV.....	67
Figura 8 - Representação gráfica da curva de calibração de vitamina C não encapsulada dissolvida em água e a equação da reta. Cada medida representa a média de três repetições (linha amarela) e linha de tendência linear (linha azul). ....	70
Figura 9 - Representação gráfica das curvas de calibração da vitamina C a partir da liberação desta das micropartículas de VC e VCK <sub>3</sub> encapsuladas, após 30 minutos de incubação. C = vitamina C não encapsulada; C MICRO = micropartículas de quitosana com vitamina C; CK <sub>3</sub> MICRO = micropartículas de quitosana com vitamina C e vitamina K <sub>3</sub> . ....	71
Figura 10 - Representação gráfica da liberação de vitamina C nas micropartículas de VC e VCK <sub>3</sub> durante 24 h. VC = vitamina C; VCK <sub>3</sub> = VC e VK <sub>3</sub> . ....	72
Figura 11 - Efeito sobre a viabilidade celular do tratamento com VC (NE e E) em células MCF7, nos tempos de 12, 24 e 48 h nas concentrações de 1,2 a 9,6 mM de VC. Os resultados estão expressos em	

Média ± Desvio Padrão, n=3. (\*) e (\*\*) representam diferença significativa em nível de  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente. ( $\alpha$ ) representa diferença estatística entre VC (NE) 12 h e VC (E) 24 h; ( $\beta$ ) representa diferença estatística entre VC (NE) 24 h e VC (E) 24 h; ( $\delta$ ) representa diferença estatística entre VC (E) 24 h e VC (NE) 48 h; ( $\gamma$ ) representa diferença estatística entre VC (NE) 24 h e VC (E) 48 h; ( $\epsilon$ ) representa diferença estatística entre VC (NE) 48 h e VC (E) 48 h..... 74

Figura 12 - Efeito sobre a viabilidade celular do tratamento com VK<sub>3</sub> (NE e E) em células MCF7, nos tempos de 12, 24 e 48 h com concentrações de 6,62 a 54,31  $\mu$ M de VK<sub>3</sub>. Os valores são Média ± Desvio Padrão (n = 3). ..... 78

Figura 13 - Efeito sobre a viabilidade celular do tratamento com VCK<sub>3</sub> (NE e E) em células MCF7, nos tempos de 12, 24 e 48 h nas concentrações de 1,2 a 9,6 mM de VC e 6,6 a 54,31  $\mu$ M de VK<sub>3</sub>. Os valores são Média ± Desvio Padrão (n = 3). \*P < 0,05 \*\*P < 0,01 representam diferença significativa. ( $\alpha$ ) representa diferença estatística entre VCK<sub>3</sub> (E) 12 h e VCK<sub>3</sub> (E) 48 h; ( $\beta$ ) representa diferença estatística entre VCK<sub>3</sub> (NE) 12 h e VCK<sub>3</sub> (E) 48 h; ( $\gamma$ ) representa diferença estatística entre VCK<sub>3</sub> (NE) 24 h e VCK<sub>3</sub> (E) 48 h..... 81

Figura 14 - Avaliação do tipo de morte celular com a coloração de brometo de etídeo/laranja acrinidina em células de tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6/200 \mu$ L/animal) inoculadas em camundongos Balb/c por via intraperitoneal e posteriormente tratados durante nove dias com: A) NaCl 0,9 % (controle negativo); B) VC (E) 100 mg/kg/dia; C) VC (NE) 10 mg/kg/dia; D) VK<sub>3</sub> (E) 10 mg/kg/dia; E) VK<sub>3</sub> (NE) 1 mg/kg/dia; F) VCK<sub>3</sub> (E) 100 mg/kg/dia; G) VCK<sub>3</sub> (NE) 10:1 mg/kg/dia. Os resultados foram expressos em Média ± Desvio padrão (n=3). Número (%) de células viáveis, apoptóticas.  $\alpha^{***}P < 0,001$  representa diferença estatística significativa no número de células viáveis em relação ao grupo controle negativo (n=6).  $\beta^{***}P < 0,001$  representa diferença estatística significativa no número de células apoptóticas em relação ao grupo controle negativo. .... 89

Figura 15 - Efeito na inibição do crescimento do tumor (%) após os tratamentos com VC (E), VC (NE), VK<sub>3</sub> (E), VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (E), VCK<sub>3</sub> (NE), controle positivo (doxorubicina). Resultados expressos em Média ± Desvio Padrão (n=6). \*\*\* P < 0,001 representa diferença estatística significativa em relação ao tratamento com doxorubicina (controle positivo). ..... 94

Figura 16 - Conteúdo de tióis não proteicos (GSH) em líquido ascítico de camundongos inoculados com TAE, tratados com: controle negativo (salina),.....	97
Figura 17 - Níveis de peroxidação lipídica (expressos relativamente como concentração de TBARS) em amostras de líquido ascítico de camundongos portadores de TAE e tratados com: salina (controle negativo, CN), VC (E) 100 mg/kg, VC (NE) 10 mg/kg, VK <sub>3</sub> (E) 10 mg/kg, VK <sub>3</sub> (NE) 1 mg/kg, VCK <sub>3</sub> (E) 100 mg/kg e VCK <sub>3</sub> (NE) 10:1 mg/kg. E = micropartículas encapsuladas com quitosana; NE = vitaminas não encapsuladas. ....	100
Figura 18 - Nível de carbonilação protéica em líquido ascítico de camundongos inoculados com TAE, tratados com: salina (controle negativo, CN), VC (E) 100 mg/kg/dia, VC (NE) 10 mg/kg/dia, VK <sub>3</sub> (E) 10 mg/kg/dia, VK <sub>3</sub> (NE) 1 mg/kg/dia, VCK <sub>3</sub> (E) 100 mg/kg/dia, VCK <sub>3</sub> (NE) 10:1 mg/kg/dia. Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão (n = 6). $\alpha^{***}$ P < 0,001 representa diferença significativa em relação ao controle negativo (CN).....	102
Figura 19 - Efeito do tratamento com ortovanadato de sódio (2,5 $\mu$ M a 10 $\mu$ M) e associação de ortovanadato de sódio e VC (2,5 $\mu$ M-10 $\mu$ M : 100 $\mu$ M) sobre a proliferação de células T24 após 24 h de tratamento e incubação durante dez dias. * P < 0,05 representa diferença estatística significativa, comparando-se o tratamento com ortovanadato de sódio com relação ao tratamento com a associação entre ortovanadato de sódio e VC (n = 3).....	106
Figura 20 - Efeito do tratamento com ortovanadato de sódio (10 $\mu$ M) e associação de ortovanadato de sódio e VC (10 $\mu$ M : 100 $\mu$ M) sobre o conteúdo intracelular de ERO em células T24. NAC (N-acetilcisteína, 3 mM) e CAT (catalase, 100 U/mL). *** P < 0,001 representa diferença estatística significativa comparando-se o tratamento com ortovanadato de sódio em relação ao tratamento com a associação entre ortovanadato de sódio e VC (n = 3). ....	107
Figura 21 - Efeito de VC (100 $\mu$ M), ortovanadato de sódio (10 $\mu$ M) e da associação de ortovanadato de sódio e VC (10:100 $\mu$ M) sobre o DNA plasmidial após 16 hs de incubação a 50 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média ± Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN = controle negativo (DNA tratado apenas com o veículo de diluição). EcoRI = controle positivo (DNA tratado como veículo de diluição e enzima de restrição EcoRI 50 kU). Barra de cor preta = FI (forma	

intacta, não clivada); barra de cor branca = FII (quebra simples); Barra cinza = FIII (quebra dupla). ..... 109

Figura 22 - Efeito do tratamento de células MCF7 durante 6 h com ortovanadato de sódio (5  $\mu\text{M}$ ) e associação de ortovanadato de sódio (5  $\mu\text{M}$ ) e VC (1 mM) na expressão das proteínas Bax, Bcl-xL, p53, CDK2 após análise por Western blot.  $\beta$ -actina foi usada como controle para cada linha. .... 111

Figura 23 - Resultados da inibição do crescimento do tumor e aumento percentual de longevidade em camundongos Balb/c previamente inoculados por via intraperitoneal com células de tumor ascítico de Ehrlich (5 x 10<sup>6</sup>/200  $\mu\text{L}$ /animal) e posteriormente tratados durante nove dias com: 1) salina (controle negativo); 2) VC (187,50 mg/kg/dia); 3) ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia); 4) associação de ortovanadato de sódio e VC (18,75:187,50 mg/kg/dia). Barras claras = Inibição do crescimento do tumor; Barras escuras = Aumento do percentual de longevidade (%). Resultados expressos em Média  $\pm$  Desvio padrão (n = 6). \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  representam diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo ou entre os tratamentos indicados (teste *t* e ANOVA *one way* complementada pelo teste de Tukey-Kramer). ..... 113

Figura 24 - Tipo de morte celular: número (%) de células viáveis e apoptóticas induzida em células de tumor ascítico de Ehrlich (5 x 10<sup>6</sup>/200  $\mu\text{L}$ /animal) inoculadas em camundongos Balb/c por via intraperitoneal e posteriormente tratados durante nove dias com: salina (controle negativo); VC (187,50 mg/kg/dia); ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia); associação de ortovanadato de sódio e VC (18,75:187,50 mg/kg/dia). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Desvio padrão (n = 3). \*\*\*  $P < 0,001$  representam diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo. .... 116

Figura 25 - (A) Gráfico de pontos da avaliação por citometria de fluxo após incorporação de anexina V – FITC e iodeto de propídio do tipo de morte celular induzida em células de tumor ascítico de Ehrlich (5 x 10<sup>6</sup>/200  $\mu\text{L}$ /animal) inoculadas em camundongos Balb/c por via intraperitoneal e posteriormente tratados durante 9 dias com: salina (controle negativo); VC (187,50 mg/kg/dia); ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia); associação de ortovanadato de sódio/VC (18,75:187,50 mg/kg/dia). Os quadrantes representam: quadrante superior esquerdo – células mortas (Anexina V-, IP+); quadrante superior direito – células em estágio de apoptose tardia e/ou necrose (Anexina V+, IP+); quadrante inferior esquerdo – células não

apoptóticas ou viáveis (Anexina V-, IP-); quadrante inferior direito – células em estágios iniciais de apoptose (Anexina V+, IP-). B) Número (%) de células viáveis, apoptóticas e necróticas. Os resultados foram expressos em Média ± Desvio padrão (n = 3). \*\*\* P < 0,001 representam diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo..... 118

Figura 26 - Conteúdo de glutatona reduzida (GSH) em líquido ascítico de camundongos Balb/c previamente inoculados por via intraperitoneal com células de tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6$  / 200  $\mu$ L/animal) e posteriormente tratados durante 9 dias com: salina (controle negativo, CN); ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia); associação de ortovanadato de sódio/VC (18,75:187,50 mg/kg/dia); VC (187,50 mg/kg/dia). Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão (n = 6).  $\alpha^{**}$  representa diferença estatística em relação ao CN (P < 0,01).  $\beta^*$  representa diferença significativa entre os tratamentos (P < 0,05). CN = controle negativo; SO = ortovanadato de sódio; SO/VC = associação vitamina C e ortovanadato de sódio; VC = vitamina C..... 120

Figura 27 - Níveis de peroxidação lipídica (TBARS) em líquido ascítico de camundongos Balb/c previamente inoculados por via intraperitoneal com células de tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6$  / 200  $\mu$ L/animal) e posteriormente tratados durante nove dias com: salina (controle negativo, CN); VC (187,50 mg/kg/dia); ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia); associação de ortovanadato de sódio/VC (18,75:187,50 mg/kg/dia). Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão (n = 6). \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001 representam diferença significativa entre os tratamentos. .... 121

Figura 28 - Níveis de carbonilação proteica em líquido ascítico de camundongos Balb/c previamente inoculados por via intraperitoneal com células de tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6$  / 200  $\mu$ L/animal) e posteriormente tratados durante nove dias com: salina (controle negativo, CN); VC (187,50 mg/kg de peso); ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg de peso); associação de ortovanadato / VC (18,75:187,50 mg/kg). Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão (n = 6). \* P < 0,05 e \*\*\* P < 0,001 representam diferença estatística significativa comparando-se os tratamentos em relação ao controle negativo (Neg) ou entre os tratamentos, respectivamente. .... 123

Figura 29 - Atividade da enzima catalase (CAT) em líquido ascítico de camundongos inoculados com TAE e tratados durante nove dias com VC (187,50 mg/kg/dia), ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia) e associação de ortovanadato com VC (18,75:187,50 mg/kg/dia). CN = controle negativo (tratado com salina). Os resultados foram expressos

como Média  $\pm$  Desvio Padrão (n = 6). \*\*\* P < 0,001 representa diferença estatística significativa comparando-se os tratamentos ao controle negativo (CN)..... 124

Figura 30 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em líquido ascítico de camundongos inoculados com TAE e tratados durante nove dias com VC (187,50 mg/kg/dia), ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia) e associação de ortovanadato com VC (18,75:187,50 mg/kg/dia). CN = controle negativo (tratado com salina). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (n = 6). \*\*\* P < 0,001 representa diferença estatística significativa comparando-se os tratamentos feitos com ortovanadato de sódio e com a associação de ortovanadato de sódio e VC..... 125

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tamanho das micropartículas de quitosana e VC, VK <sub>3</sub> e VCK <sub>3</sub> encapsuladas com quitosana.....	69
Tabela 2 - Valores obtidos na determinação de CI50, em células MCF7, resultantes dos tratamentos com VC não encapsuladas (NE) e encapsuladas (E) com quitosana.....	75
Tabela 3 - Valores obtidos na determinação de CI50, em células MCF7, resultantes dos tratamentos com VK <sub>3</sub> não encapsuladas (NE) e encapsuladas (E) com quitosana.....	79
Tabela 4 - Valores obtidos na determinação de CI50, em células MCF7, resultantes dos tratamentos com VCK <sub>3</sub> não encapsuladas (NE) e encapsuladas (E) com quitosana.....	82
Tabela 5 - Relação dos tratamentos administrados para a avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em camundongos previamente inoculados com o TAE.....	84
Tabela 6 - Avaliação da viabilidade das células tumorais pelo método de exclusão do corante azul de tripan em tumor ascítico de Ehrlich (5 x 10 <sup>6</sup> /200 µL/animal) inoculadas em camundongos Balb/c por via intraperitoneal e posteriormente tratados durante 9 dias com: doxorrubicina (1,2 mg/kg, controle positivo); salina (NaCl 0,9 %, controle negativo); VC (E) 100mg/kg, VC (NE) 10 mg/kg, VK <sub>3</sub> (E) 10 mg/kg, VK <sub>3</sub> (NE) 1 mg/kg, VCK <sub>3</sub> (E) 100 mg/kg e VCK <sub>3</sub> (NE) 10:1mg/kg. ....	86
Tabela 7 - Variação de peso corporal (g) e redução na medida da variação do peso (%) em tumor ascítico de Ehrlich (5 x 10 <sup>6</sup> /200 µL/animal) inoculadas em camundongos Balb/c por via intraperitoneal e posteriormente tratados durante 9 dias com: salina (controle normal, CN); salina (controle negativo); doxorrubicina (1,2 mg/kg, controle positivo); VC (E) 100 mg/kg, VC (NE) 10 mg/kg, VK <sub>3</sub> (E) 10 mg/kg, VK <sub>3</sub> (NE) 1 mg/kg, VCK <sub>3</sub> (E) 100 mg/kg e VCK <sub>3</sub> (NE) 10:1 mg/kg.....	91
Tabela 8 - Variação da circunferência abdominal e inibição do crescimento tumoral (%) após o tratamento com VC (E), VC (NE), VK <sub>3</sub> (E), VK <sub>3</sub> (NE), VCK <sub>3</sub> (E), VCK <sub>3</sub> (NE), controle normal, controle negativo (salina), controle positivo (doxorrubicina). ....	93
Tabela 9 - Tempo médio de sobrevida (TMS) e do percentual de aumento de longevidade (PAL) após o tratamento com VC (E), VC (NE), VK <sub>3</sub> (E), VK <sub>3</sub> (NE), VCK <sub>3</sub> (E), VCK <sub>3</sub> (NE), controle normal, controle negativo (salina), controle positivo (doxorrubicina). ....	96

Tabela 10 - Valores obtidos na determinação de CI50 ( $\mu\text{M}$ ) em células T24 resultantes dos tratamentos com ortovanadato de sódio (OS) na concentração de 0,5-5,0 $\mu\text{M}$ e associação de ortovanadato de sódio e vitamina C (OS/VC) nas concentrações de 0,5 a 5,0 $\mu\text{M}$ /100 $\mu\text{M}$ .....	104
Tabela 11 - Resultados da avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em camundongos Balb/c previamente inoculados por via intraperitoneal com células de tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6$ /200 $\mu\text{L}$ /animal) e posteriormente tratados durante 9 dias com: salina (controle negativo); doxorubicina (1,2 mg/kg, controle positivo); ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg);ortovanadato de sódio/VC (18,75 mg/kg / 187,50 mg/kg); VC (187,50 mg/kg). .....	112
Tabela 12 - Avaliação da viabilidade das células tumorais pelo método de exclusão do azul de tripan em camundongos Balb/c previamente inoculados por via intraperitoneal com células de tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6$ /200 $\mu\text{L}$ /animal) e posteriormente tratados durante nove dias com: salina (controle negativo); doxorubicina (1,2 mg/kg, controle positivo); ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia); ortovanadato de sódio/VC (18,75:187,50 mg/kg/dia); VC (187,50 mg/kg/dia). .....	115

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CI50 – Concentração que resulta em diminuição de 50% da sobrevida celular
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DCFH-DA - 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato
- DMEM –
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- DNPB –
- E – Encapsulada(s)
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- HBSS – Hank's buffered Salt Solution (solução salina de Hank tamponada)
- HEPES –
- HRP – horse radish peroxidase (peroxidase de rabanete)
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- I.P. – Via intraperitoneal
- I.V. – Administração intravenosa
- LDL – Lipoproteínas de baixa densidade
- MCF7 – células de câncer de mama
- MDR – Multi-drug resistance (*multirresistência a fármacos*)
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MPT – Poro de transição da permeabilidade mitocondrial
- MTT – 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (corante)
- NE – Não encapsulada (s)
- NM – nanômetro (nm)
- OS – Ortovanadato de sódio
- OS/VC – Associação de ortovanadato de sódio/vitamina C
- PAL – Percentual médio de aumento de longevidade (%)
- PBS – Salina tamponada com fosfato
- RIPA – Solução tampão (Radio Immuno Precipitation Assay buffer)
- RPM – Rotações por minuto
- SALINA – Solução de NaCl 0,9 %
- SDS – PAGE
- T24 – Células de câncer de bexiga
- TAE – Tumor ascítico de Ehrlich
- TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
- TBE – Tampão Tris Borato com EDTA
- TLT – Células de câncer de bexiga
- TMS – Tempo médio de sobrevida (dias)

VC – Vitamina C

VCK<sub>3</sub> – Associação de vitamina C e vitamina K<sub>3</sub>

VK<sub>3</sub> – Vitamina K<sub>3</sub>

WHO - World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

## SUMÁRIO

1.1	CÂNCER.....	25
1.2	TIPOS DE MORTE CELULAR.....	26
1.3	AGENTES TERAPÊUTICOS E INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO .....	30
1.4	ATIVIDADE ANTITUMORAL DAS VITAMINAS C E K <sub>3</sub> .....	31
1.4.1	Atividade antitumoral da vitamina C.....	31
1.4.2	Atividade antitumoral da vitamina K <sub>3</sub> .....	33
1.4.3	Atividade antitumoral da associação das vitaminas C e K <sub>3</sub> .....	34
1.5	MICROENCAPSULAMENTO E UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA COMO MATRIZ POLIMÉRICA .....	36
1.6	ATIVIDADE ANTITUMORAL DO VANÁDIO.....	39
2	OBJETIVOS.....	43
2.1	OBJETIVO GERAL.....	43
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1	REAGENTES.....	45
3.2	PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS .....	45
3.2.1	Preparação das micropartículas de Vitamina C (VC).....	45
3.2.2	Preparação das micropartículas de Vitamina K <sub>3</sub> (VK <sub>3</sub> ).....	46
3.2.3	Preparação das micropartículas com associação de VC e VK <sub>3</sub> (proporção de 100/1 de VC para VK <sub>3</sub> ) .....	46
3.2.4	Encapsulamento de VC, VK <sub>3</sub> e VCK <sub>3</sub> com quitosana pelo método de spray drying.....	46
3.3	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS .....	47
3.4	ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DE VC DAS MICROPARTÍCULAS DE VC E VCK <sub>3</sub> .....	47
3.4.1	Curva padrão da VC na fase móvel e água por CLAE .....	47
3.4.2	Curva de liberação de VC das micropartículas encapsuladas com quitosana.....	47
3.4.3	Cinética da liberação de VC microencapsulada com quitosana... ..	48
3.5	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....	48
3.5.1	Manutenção da cultura de células.....	48
3.5.2	Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT .....	48
3.5.2.1	Avaliação da citotoxicidade com micropartículas de VC, VK <sub>3</sub> , VCK <sub>3</sub>	49
3.5.2.2	Avaliação da citotoxicidade da associação de vitamina C e ortovanadato de sódio .....	50
3.5.3	Avaliação da citotoxicidade tempo-dependente .....	51
3.5.4	Determinação do conteúdo de ERO intracelular .....	51
3.5.5	Avaliação de dano no DNA plasmidial .....	52
3.5.6	Ensaio de formação de colônia .....	54

<b>3.5.7 Análise por Western blot .....</b>	<b>54</b>
3.6 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	55
<b>3.6.1 Animais e grupos experimentais.....</b>	<b>55</b>
3.6.1.1 Tratamentos com micropartículas de VC, VK <sub>3</sub> , VCK <sub>3</sub> .....	55
3.6.1.2 Tratamentos com associação de vitamina C e ortovanadato de sódio	
56	
3.6.1.3 Avaliação da Variação de Peso.....	57
3.6.1.4 Avaliação da inibição do crescimento do tumor.....	57
3.6.1.5 Determinação do volume total de líquido ascítico e volume de	
células compactadas.....	57
3.6.1.6 Avaliação da viabilidade celular através do método de exclusão do	
corante Azul de Tripán.....	58
3.6.1.7 Avaliação do tipo de morte celular <i>in vivo</i> por coloração diferencial	
por brometo de etídio/ laranja de acridina.....	58
3.6.1.8 Avaliação do tipo de morte celular <i>in vivo</i> por citometria de fluxo	
.....	59
3.6.1.9 Avaliação do tempo médio de sobrevida (TMS) e percentual de	
aumento da longevidade (PAL).....	60
3.6.1.10 Indicadores de estresse oxidativo e defesa antioxidante no	
líquido ascítico.....	61
3.6.1.10.1 Conteúdo total de tióis não proteicos (GSH).....	61
3.6.1.10.2 Avaliação da peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS.....	61
3.6.1.10.3 Avaliação do nível de carbonilação protéica.....	62
3.6.1.10.4 Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	
.....	63
3.6.1.10.5 Avaliação da atividade da enzima catalase (CAT).....	64
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
4.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DA	
ASSOCIAÇÃO DE VITAMINA C COM VITAMINA K <sub>3</sub>	
MICROENCAPSULADAS.....	65
<b>4.1.1 Caracterização das micropartículas de VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub></b>	
<b>microencapsuladas.....</b>	<b>65</b>
<b>4.1.2 Liberação de vitamina C das micropartículas de VC e VCK<sub>3</sub>.....</b>	<b>69</b>
<b>4.1.3 Citotoxicidade <i>in vitro</i> das vitaminas C e K<sub>3</sub> encapsuladas e não</b>	
<b>encapsuladas.....</b>	<b>73</b>
4.1.3.1 Citotoxicidade da vitamina C microencapsulada não	
microencapsulada.....	73
4.1.3.2 Citotoxicidade da vitamina K <sub>3</sub> encapsuladas e não encapsuladas....	
.....	77
4.1.3.3 Citotoxicidade da associação de vitamina C e vitamina K <sub>3</sub>	
encapsuladas e não encapsuladas.....	80
<b>4.1.4 Atividade antitumoral <i>in vivo</i> das vitaminas C e K<sub>3</sub> encapsuladas e</b>	
<b>não encapsuladas.....</b>	<b>84</b>
4.1.4.1 Associação VCK <sub>3</sub> encapsulada e não encapsulada.....	84

4.1.4.1.1	Concentração de vitaminas C e K <sub>3</sub> nas micropartículas encapsuladas e nos tratamentos realizados.....	84
4.1.4.1.2	Avaliação da viabilidade das células tumorais <i>in vivo</i> pelo método de exclusão do corante vital azul de Tripán .....	85
4.1.4.1.3	Avaliação do tipo de morte celular pela coloração com brometo etídio / laranja acrinidina.....	87
4.1.4.1.4	Avaliação morfofisiológica .....	89
4.1.4.1.4.1	Efeito sobre a variação de peso corporal .....	90
4.1.4.1.4.2	Avaliação da inibição do crescimento do tumor .....	92
4.1.4.1.4.3	Efeito sobre o tempo médio de sobrevida (TMS) e percentual médio de aumento de longevidade (PAL).....	95
4.1.4.1.5	Indicadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes .....	97
4.1.4.1.5.1	Conteúdo total de tióis não proteicos (GSH) no líquido ascítico	97
4.1.4.1.5.2	Avaliação da peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS....	99
4.1.4.1.5.3	Avaliação do nível de carbonilação proteica .....	101
4.2	ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DA ASSOCIAÇÃO DE VITAMINA C COM ORTOVANADATO DE SÓDIO	103
4.2.1	Citotoxicidade de ortovanadato de sódio e da associação de ortovanadato de sódio e vitamina C .....	103
4.2.2	Avaliação da proliferação celular.....	105
4.2.3	Formação de ERO .....	106
4.2.4	Fragmentação do DNA plasmidial .....	108
4.2.5	Expressão de proteínas relacionadas à apoptose .....	109
4.2.6	Atividade antitumoral <i>in vivo</i> .....	111
4.2.6.1	Avaliação morfofisiológica.....	111
4.2.6.1.1	Avaliação da viabilidade das células tumorais <i>in vivo</i> pelo método de exclusão do corante vital azul de Tripán .....	114
4.2.6.1.2	Avaliação do tipo de morte celular pela coloração com brometo etídio / laranja acrinidina.....	116
4.2.6.1.3	Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo e incorporação de anexina V – FITC e iodeto de propídio .....	117
4.2.6.2	Efeito do ortovanadato de sódio e associação de ortovanadato de sódio/ascorbato de sódio sobre as defesas antioxidantes e estresse oxidativo	119
4.2.6.2.1	Conteúdo de tióis não proteicos (GSH).....	119
4.2.6.2.2	Avaliação da peroxidação lipídica .....	121
4.2.6.2.3	Avaliação do nível de carbonilação protéica.....	122
4.2.6.2.4	Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase.....	123
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>131</b>



## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 CÂNCER

Weinberg (1996) lembra que a palavra “câncer” é um termo generalizado que abrange mais de 100 formas de doença e, embora cada tipo de câncer tenha aspectos particulares, causas básicas comuns parecem estar envolvidas no seu desenvolvimento. Nos vários tipos de câncer é comum o crescimento desordenado de células, as quais comprimem, invadem e destroem tecidos e órgãos vizinhos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo num processo que é chamado metástase (WHO, 2012). Também ocorre a perda do controle dos mecanismos de regulação do ciclo celular e da morte celular (INCA, 2012). Câncer é uma doença aonde ocorre proliferação celular inadequada e uma redução na sensibilidade a sinais que normalmente fazem uma célula aderir, diferenciar ou morrer (COLLINS; JACKS; PAVLETICH, 1997).

A carcinogênese é um processo patológico que ocorre em várias etapas e envolve a mutação e posterior expansão clonal seletiva da célula mutante (INCA, 2012).

Vários são os mecanismos de ação pelos quais os agentes químicos provocam câncer, incluindo a via de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem induzir e/ou modular o processo da carcinogênese. O dano oxidativo a macromoléculas como os ácidos nucleicos pode surgir através da superprodução de ERO, diminuição da capacidade antioxidante da célula ou supressão dos mecanismos de reparo do DNA. Por outro lado, as ERO podem estimular vias de transdução de sinal e levar à ativação de fatores de transcrição essenciais como Nrf2 e NF-Kb que estimulam a proliferação celular (KLAUNIG *et al.*, 2010).

Entretanto, dois mecanismos chaves têm sido propostos como essenciais para a indução do câncer. Num deles ocorre um aumento da síntese de DNA e mitose por carcinógeno não genotóxico que pode induzir mutação durante a divisão celular. As mutações podem se expandir a partir das células pré-neoplásicas iniciais, para um estado de célula neoplásica (TRUSH & KENSLER, 1991; GUYTON & KENSLER, 1993). O outro mecanismo conta com um desequilíbrio entre proliferação e morte celular programada. Se o dano ao DNA é muito grande, o processo de apoptose, que elimina seletivamente as células alteradas, também pode ser danificado. Neste caso, o processo

carcinogênico pode ser descrito como um desequilíbrio entre a proliferação celular e morte celular, sendo levado à predominância da proliferação celular (HENGARTNER, 2000).

Câncer é uma das principais causas de morte no mundo; 13% entre todos os casos de morte em 2008 (7,6 milhões de mortes) ocorreram devido ao câncer (WHO, 2012). A estimativa de número de novos casos em 2012, para o Brasil foi de 518.510 novos casos, sendo 257.870 novos casos para homens e 260.640 novos casos para mulheres (INCA, 2012). O câncer é um problema de saúde pública com dimensões internacionais e nacionais (WHO, 2012).

Como o câncer compreende muitas doenças, são usados diferentes tratamentos. O curso do tratamento depende do tipo de câncer, da sua localização, e de seu estado de avanço. A cirurgia, muitas vezes, é o primeiro tratamento, e é utilizada para remover tumores sólidos (INCA, 2012; HARTWELL, 2013).

Outros tipos de tratamentos para o câncer são: a quimioterapia, radioterapia, imunoterapia ou transplante de medula óssea sendo que, em muitos casos, combinam-se mais de uma modalidade (ALMEIDA *et al.*, 2005).

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais (MACHADO, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Além disso, o desenvolvimento de multirresistência à quimioterapia é o principal mecanismo pelo qual muitos tipos de câncer desenvolvem resistência a fármacos quimioterápicos, e é um fator importante para o fracasso de muitas formas de quimioterapia (Nature Biotechnology, 2000).

Dessa forma, ainda existe necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos com ação seletiva sobre células tumorais, específicos para células tumorais.

## 1.2 TIPOS DE MORTE CELULAR

As vias de morte celular descritas na literatura são denominadas: apoptose, morte celular autofágica, necrose, ou associado à catástrofe mitótica (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). Os diferentes tipos de morte celular são frequentemente definidos por critérios morfológicos (DUPREZ *et al.*, 2009).

Adicionalmente, segundo Duprez *et al.* (2009), a morte celular é definida com base em: 1) critérios enzimológicos, incluindo o

envolvimento de diferentes classes de proteases (caspases, calpaínas, catepsinas e transglutaminases) e nucleases; 2) aspectos funcionais (programada ou acidental, fisiológica ou patológica) ou em características imunológicas (imunogênica ou não-imunogênica).

Apoptose é um tipo de “morte celular programada” ou “suicídio celular” (processo controlado geneticamente de autodestruição), no qual a célula sofre condensação do DNA, “blebbing” da membrana (Figura 1) e outras características específicas que são, geralmente, o resultado da ativação das proteases intracelulares específicas chamadas caspases (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; WALKER *et al.*, 1988).

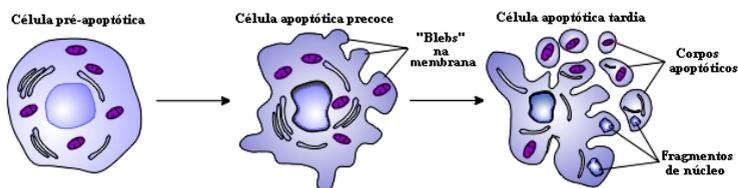


Figura 1 - Morfologia celular na apoptose. Modificado de Walker *et al.* (1988)

As caspases são cisteino-proteases que clivam ligações após aspartato (Asp) e são necessárias para a manifestação rápida e completa das características da apoptose. As caspases-8, -9, e -10 são iniciadoras e as caspases-3, -6, e -7 são as executoras (FUENTES-PRIOR & SALVESEN, 2004).

A apoptose pode ser iniciada de duas maneiras: a partir de eventos que envolvem a mitocôndria (via intrínseca) ou através da ação de ligantes específicos na superfície da célula que ativam receptores de morte (via extrínseca) (Figura 2) (CLARKE & ALLAN, 2009). No esquema da via intrínseca, na Figura 2, a ativação da protease apoptótica caspase-9 ocorre num grande complexo citoplasmático, o apoptossomo. Esse é formado com Apaf-1 em resposta à liberação de citocromo c das mitocôndrias. A caspase-9 ativada cliva e ativa as caspases 3 e 7, que fazem a morte celular por apoptose. A liberação de citocromo c é mediada por Bax e Bak (caixas rosa), as quais são inibidas por Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1 (caixas verdes), que estão localizados em mitocôndrias e outras estruturas citoplasmáticas. Estas proteínas anti-apoptóticas são opostas por proteínas pró-apoptóticas ligadas apenas nos seus domínios BH3 (caixas azuis) e que respondem a diferentes estímulos apoptóticos. No esquema da via extrínseca, na Figura 2, ocorre a ativação direta da atividade da caspase-8 em resposta a ação de ligantes aos receptores de morte celular, a qual leva à liberação de citocromo c na via intrínseca,

através da clivagem proteolítica do domínio BH3 da proteína Bid para produzir tBid ativado (Bid truncada) e para ativação direta das demais caspases da sequência (CLARKE & ALLAN, 2009).

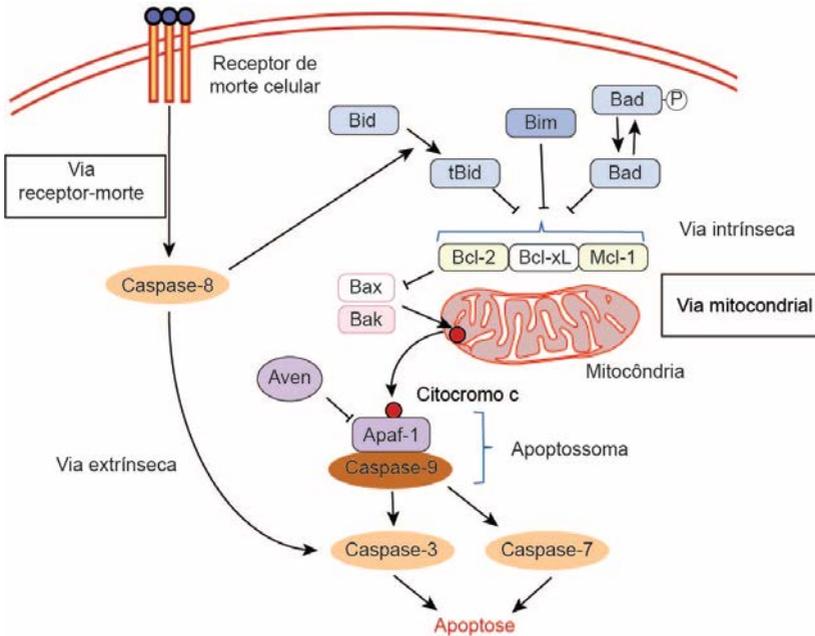


Figura 2 - Esquema das duas principais vias de indução de apoptose na célula: via mitocondrial (intrínseca) e via receptor de morte (extrínseca) (adaptado de CLARKE & ALLAN, 2009).

Segundo Kroemer; Galluzzi; & Brenner (2007) ativação induzida por ligantes de receptores de morte induz a organização do complexo de sinalização indutor de morte (DISC) no lado citoplasmático da membrana plasmática. Isso promove a ativação da caspase-8 (e possivelmente da caspase-10) que então é capaz de clivar as caspases efetoras -3, -6, e -7. A ativação da caspase-8 pode também proteoliticamente ativar Bid, que promove permeabilização da membrana mitocondrial (MMP) e representa a principal ligação entre as vias apoptóticas extrínseca e intrínseca (KROEMER; GALLUZZI; & BRENNER, 2007).

Apoptose e câncer são fenômenos opostos, entretanto tem sido proposto que ERO estão envolvidas em ambos os processos. Evidências

de que a apoptose pode ser induzida por ERO é fornecida por estudos que se baseiam no fato de que ERO são ativadores de caspases ou ativam este processo via abertura do poro de transição da permeabilidade da mitocôndria (MPT) (CHANDRA *et al*, 2000; LEHNINGER, 2008; RICCI; GOTTLIEB; GREEN, 2003).

Por outro lado, também a indução da carcinogênese tem sido ligada ao dano oxidativo ao DNA e produtos oxidativos deste, como a 8-oxo-2'-deoxiguanosina, que são altamente mutagênicos (MILLS *et al*, 1998).

As ERO também contribuem para a carcinogênese através da interferência no sistema de cascata de sinalização, incluindo entre outros o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), proteína-1 ativada (AP-1), fosfolipase A2, proteínas cinases ativadoras de processo mitogênico (MAPKs) e c-Jun cinase (MANNA *et al*, 1998; MUSONDA & CHIPMAN, 1998).

As células reagem rapidamente ao desequilíbrio no potencial redox com respostas biológicas, incluindo parada de ciclo celular, transcrição gênica, iniciação de transdução de sinal e reparo do dano ao DNA. Estes eventos são os que determinam se a célula irá passar pelo processo de necrose, senescência, apoptose ou então sobreviver e proliferar (LIMOLLI *et al*, 1998; CAGNOL & CHAMBARDE, 2009). Entretanto, aquelas que sofreram mutações que atingiram os genes supressores tumorais podem caminhar para um processo neoplásico por perda do controle dos mecanismos de apoptose (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Membros da família de proteínas Bcl-2 (linfoma de célula B-2) e outras proteínas citoplasmáticas são reguladores chave da apoptose, sendo esta um programa de suicídio celular crítico para o desenvolvimento, homeostase tecidual e proteção contra patógenos (ADAMS & CORY, 1998). Alguns membros da família de proteínas Bcl-2 podem ser pró-apoptóticos sendo que alguns iniciam a morte celular (Bim - mediador de morte celular que interage com Bcl-2; Puma - mediador super regulado de apoptose p53 ou Bid - domínio que interage com Bcl-2) ou ativam as vias efetoras de apoptose (Bax e Bak); outros membros da família são anti-apoptóticos (incluindo o próprio Bcl-2, Bcl-xL e Bcl-w, entre vários outros) (ALMEIDA *et al.*, 2004; KELLY & STRASSER, 2011).

A progressão do ciclo celular é realizada, em parte, pela atividade regulada de numerosos complexos CDK-ciclina. As funções de CDK2 acontecem na fase S, atuando juntamente com a ciclina A, em células de

mamíferos. A ligação de ciclina A estimula a atividade de CDK2 (COLLINS; JACKS; PAVLETICH, 1997).

A apoptose está prejudicada em muitos tumores humanos, sendo que a supressão da apoptose durante carcinogênese tem um papel no desenvolvimento e progressão de alguns tipos de câncer (KERR; WINTERFORD; CURRIE, 1994).

Necrose é causada por ruptura física na célula, decorrente de injúria, toxinas bacterianas ou privação nutricional. Por um longo tempo, a necrose foi considerada uma forma acidental e não controlada de morte celular, sem eventos de sinalização conhecidos. Isso pode ser verdade para morte celular que ocorre por dano físico severo, tais como hipertermia ou citólise induzida por detergente (FESTJENS; VANDEN BERGHE; VANDENABEELE, 2006; GOLSTEIN & KROEMER, 2007). Algumas das principais mudanças morfológicas que ocorrem na morte celular por necrose incluem inchaço celular, formação de vacúolos citoplasmáticos; retículo endoplasmático dilatado; formação citoplasmática de bolhas; mitocôndrias condensadas, inchadas ou com rupturas; desagregação e separação dos ribossomos; membranas das organelas rompidas; lisossomos inchados e com rupturas, e eventualmente ruptura da membrana celular (KERR *et al*, 1972; MAJNO e JORIS, 1995; TRUMP *et al*, 1997).

### 1.3 AGENTES TERAPÊUTICOS E INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é um processo biológico onde ocorre um desequilíbrio intracelular entre a síntese de espécies pró-oxidantes e antioxidantes, com deslocamento em direção à formação de pró-oxidantes, levando a danos celulares. Estes pró-oxidantes podem ser tanto substâncias químicas exógenas ou produtos do metabolismo aeróbico normal da célula. Desta forma, os pró-oxidantes podem gerar radicais livres primários (peroxil, alcoxil, alquil, etc), que desencadeiam um processo tipo cascata que pode levar a liberação de radicais livres secundários e espécies reativas de oxigênio (radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, entre outros). Tanto os radicais livres primários como os secundários podem iniciar a peroxidação lipídica, levando a geração de radicais livres terciários (alcoxil lipídico, peroxil lipídico) (BYCZKOWSKI & KULKARNI, 1998). Fatores adicionais como a idade, deficiência dietética ou a presença de metais de transição podem aumentar o estresse oxidativo. O esgotamento de antioxidantes celulares como vitamina E, GSH e das defesas

enzimáticas como CAT, SOD e GPx deficitárias podem aumentar os níveis de radicais livres e gerar danos a componentes celulares, e consequentemente levar a apoptose (BYCZKOWSKI & KULKARNI, 1998).

O mecanismo de ação de alguns antineoplásicos utilizados no tratamento do câncer baseia-se principalmente na indução da apoptose e/ou necrose (LIU *et al.*, 2002) causados por agentes citostáticos (ciclofosfamida, metotrexato), corticosteróides (dexametasona) e radiação. Estes fármacos agem principalmente: 1) causando dano ao DNA, iniciando uma cascata de eventos que levam a morte celular, podendo induzir apoptose através dos receptores de morte (TNFR, Fas) e por ativação de proteases; 2) lesando diretamente o DNA (etoposídeo); 3) impedindo a formação dos microtúbulos (taxol, vimblastina e vincristina) (HANNUN, 1997).

Outro mecanismo importante para indução de apoptose em células tumorais seria a geração de ERO que poderiam ativar a via do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (MPT) que pode desencadear este processo de morte celular independente da regulação pelo p53. Desta forma, é importante avaliar o estado redox da célula tumoral, particularmente a expressão das barreiras antioxidantes, uma vez que estas poderiam eventualmente proteger a célula da ativação da via MPT.

A maioria das células tumorais pode exibir estresse oxidativo elevado com atividade metabólica aumentada e produção de ERO (NAKAGAWA *et al.*, 2002; TSANG *et al.*, 2003). O mecanismo de ação de muitos agentes quimioterápicos envolve apoptose mediada por estes radicais, uma vez que estas células em geral tem menor capacidade de neutralizar ERO. Por exemplo, os fármacos antitumorais clássicos cisplatina e adriamicina produzem ERO em níveis elevados, resultando em dano ao DNA e morte celular. Desta forma, avanços no conhecimento da regulação do estresse oxidativo têm levado ao delineamento de novos agentes terapêuticos.

## 1.4 ATIVIDADE ANTITUMORAL DAS VITAMINAS C e K<sub>3</sub>

### 1.4.1 Atividade antitumoral da vitamina C

Alguns autores têm evidenciado que o ácido ascórbico não possui somente atividade antioxidante, mas também possui efeito citotóxico sobre células malignas, através da atividade pró-oxidante

(YAMAMOTO *et al.*, 1987; GONZÁLEZ *et al.*, 1998; VERRAX & CALDERON, 2009).

Foi relatado que a vitamina C (VC), ou ácido ascórbico, é citotóxica para células de mieloma maligno, células leucêmicas humanas, neuroblastomas, células de tumor ascítico, leucemia linfoblástica aguda e carcinoma epidermoide, células TLT (PRASAD *et al.*, 1979; BRAM *et al.*, 1980; PARK *et al.*, 1980; LEUNG *et al.*, 1993; DE LAURENZI *et al.*, 1995; VERRAX & CALDERON, 2009).

A vitamina C (ascorbato) em concentrações elevadas pode levar à produção de peróxido de hidrogênio por oxidação (do oxigênio) em sistemas biológicos, de acordo com Halliwell (1996), Asano *et al* (1999) e Verrax & Calderon (2009). Este peróxido de hidrogênio pode gerar espécies reativas de oxigênio como o radical hidroxil e produtos de oxidação como aldeídos, que podem danificar membranas biológicas e levar à morte celular (CLÉMENT *et al.*, 2001).

A vitamina C também pode ser citotóxica devido a atividade redutora de intermediários metabólicos instáveis, como por exemplo, a ação sobre a vitamina K<sub>3</sub> (menadiona), onde ocorre uma transferência de 1 elétron da vitamina C para o intermediário metabólico vitamina K<sub>3</sub> (uma quinona) que é reduzida a semiquinona. Na presença de oxigênio, a semiquinona é reoxidada a quinona e o oxigênio produz ânion superóxido o que leva à formação de peróxido de hidrogênio e outras ERO (GILLOTEAUX *et al.*, 2001; GRAD *et al.*, 2001; VERRAX *et al.*, 2009).

As células tumorais apresentam perda do controle da proliferação celular e, além disso, muitos tipos mostram um perfil metabólico predominantemente glicolítico mesmo na presença de oxigênio, observação que, segundo Hanahan & Weinberg (2011), foi demonstrada por Warburg (1956a, 1956b) e, dessa forma, nessas células ocorre uma menor produção de ATP (cerca de 18 vezes menor eficiência da via glicolítica em relação à fosforilação oxidativa) (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

As células malignas são conhecidas pelo seu metabolismo acelerado, alto requerimento de glicose e captação de glicose aumentada (MACHEDA; ROGERS; BEST, 2005). Por outro lado, nas células tumorais há uma superexpressão dos transportadores de glicose independentes de sódio (GLUT) que aumentam a importação de glicose para o citoplasma (BIRNBAUM; HASPEL; ROSEN, 1987; HANAHAN & WEINBERG, 2011). Segundo vários autores os transportadores GLUT também transportam ácido ascórbico (VERA *et al.*, 1994; TSUKAGUCHI *et al.*, 1999). Dessa forma, tem sido sugerido

que as células neoplásicas possuem uma capacidade de maior captação de ascorbato de sódio em relação às células normais, por apresentarem a superexpressão dos transportadores GLUT (AGUS; VERA; GOLDE, 1999; BIRNBAUM; HASPEL; ROSEN, 1987; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

#### 1.4.2 Atividade antitumoral da vitamina K<sub>3</sub>

A vitamina K<sub>3</sub> (VK<sub>3</sub>, 2-metil-1,4-naftoquinona), ou menadiona, é citotóxica para tumores de mama, estômago, pulmão, cólon, nasofaringe, colo uterino, fígado, leucemia e alguns linfomas (NUTTER *et al.*, 1992; WU *et al.*, 1993). Menadiona é usada clinicamente no tratamento de leucemia (MATZNO *et al.*, 2008).

Segundo Wu (1999) a vitamina K<sub>3</sub> exerce efeito antitumoral inibindo a atividade da cinase dependente da ciclina 1 (CDK1). A ligação da vitamina K<sub>3</sub> à fosfatase cinase dependente de ciclina (CDC25) provoca a formação de CDK1 hiperfosforilado, que é inativo o que subsequentemente induz à parada do ciclo celular e a morte das células.

As ciclinas e as cinases dependentes das ciclinas (CDKs) são enzimas chaves reguladoras do ciclo celular nas células eucarióticas. O complexo CDK1-ciclina B regula a fase M, os complexos CDK2-ciclina A e CDK2-ciclina E controlam a fase S e a transição G1/S e o complexo CDK4-ciclina D controla a progressão da fase G1 (BOUTROS; DOZIER; DUCOMMUN, 2006).

Existem 3 genes CDC25 nos seres humanos: A, B, e C. Os produtos desses genes são fosfatases específicas que possuem resíduo de cisteína nos sítios ativos. O pico de expressão do gene CDC25A ocorre na fase G1 e o pico de expressão do gene CDC25B ocorre na transição G1/S e na fase G2. O CDC25C é predominantemente expresso na fase G2 e regula o tempo para o início da mitose nas células (WANG *et al.*, 1995; BOUTROS; LOBJOIS; DUCOMMUN, 2007).

A vitamina K<sub>3</sub> induz a parada do ciclo celular e consequentemente a morte da célula por inibir a CDC25 fosfatase, a qual promove o acúmulo da proteína retinoblastoma (Rb) inativa hipofosforilada e a CDK1 inativa hiperfosforilada (WU *et al.*, 1993). VK<sub>3</sub> também induz parada na fase G2/M pela inibição da formação do complexo ciclina B/cdk1, e é, portanto, útil como um potencializador de farmacos dependentes da fase-G2 na quimioterapia de câncer hepático (MATZNO *et al.*, 2008). Além disso, a vitamina K<sub>3</sub> também induz

apoptose por fragmentação do DNA e aumento da expressão do gene *c-myc* (WU *et al.*, 1993).

Foram propostos dois mecanismos de ação primários para explicar a citotoxicidade da VK<sub>3</sub>: um é o estresse oxidativo através da cascata de oxiredução da estrutura quinona, gerando ERO e o outro mecanismo é pela arilação direta dos tíóis intracelulares, provocando drástica queda dos níveis de glutathiona (GSH) e inibição de proteínas dependentes de sulfidril. A VK<sub>3</sub> gera semiquinonas, radical superóxido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, provocando a depleção da GSH, peroxidação lipídica e clivagem do DNA. Por outro lado, a vitamina K<sub>3</sub> em baixa concentração é um sequestrador de ânion superóxido. Porém, em maiores concentrações funciona como pró-oxidante, aumentando a geração de ERO (NUTTER *et al.*, 1992).

Nutter *et al.* (1992) mostrou que a VK<sub>3</sub> aumentou a geração de radical hidroxil nas células do câncer de mama humano (MCF7), provocando quebra da mono hélice e da dupla hélice do DNA destas células. Conforme descrito anteriormente, a ação da VK<sub>3</sub> é específica em células que estejam passando por mitose, já que a mesma age nas proteínas de primeira e de segunda fase do processo proliferativo (WANG *et al.*, 1995; WU, 1999).

#### 1.4.3 Atividade antitumoral da associação das vitaminas C e K<sub>3</sub>

A citotoxicidade da vitamina K<sub>3</sub> é potencializada quando associada com a vitamina C numa relação de 1/100 (NOTO *et al.*, 1989; VERRAX *et al.*, 2004). Essa conclusão foi obtida, primeiramente, após a verificação da reativação de DNases ácida e alcalina por vitamina C e vitamina K<sub>3</sub>, levando a morte de células tumorais e regressão de tumor (TAPER; BRUCHER; FORT, 1971; TAPER, 1981; TAPER; DECKERS; DECKERS-PASSAU, 1981).

Também foi observado que a combinação das vitaminas C/K<sub>3</sub> na razão de 100/1, após a inoculação de tumor em camundongos, produziu a inibição do crescimento do câncer em tumor transplantado de fígado com um aumento de sobrevivência de 45,8 %, além da potencialização seletiva da quimioterapia com a ciclofosfamida (80 mg/kg de peso) e radioterapia (20 Gy raios-X de irradiação local) na forma sólida de tumor (TAPER *et al.*, 1996; CALDERON *et al.*, 2002; BECK *et al.*, 2010).

O efeito citotóxico específico da combinação em células tumorais, segundo Taper *et al.* (1996), poderia ser explicado pelo ciclo redox entre as vitaminas C e K<sub>3</sub> e a indução do estresse oxidativo. De

acordo com Taper *et al.* (1996) a vitamina K<sub>3</sub> é reduzida não enzimaticamente pela vitamina C para formar deidroascorbato e um radical livre semiquinona (Figura 3). Tal semiquinona é rapidamente reoxidada para a forma quinona pelo oxigênio molecular então gerando espécies reativas de oxigênio tais como ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxil (·HO). Adicionalmente, tem sido mostrado por vários autores (BECK *et al.*, 2009; CALDERON *et al.*, 2002; TAPER *et al.*, 1987; VERRAX & CALDERON, 2008) que a associação de ascorbato e menadiona é um sistema gerador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que resulta na morte celular de vários tipos de células de câncer (MCF7, K562, TLT).

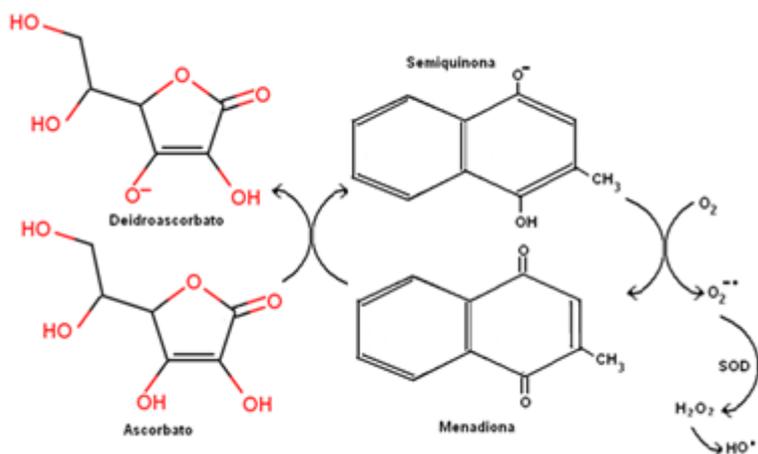


Figura 3 - Ciclo de oxido-redução entre vitamina C e vitamina K<sub>3</sub>. Fonte: Verrax *et al.*, 2005.

Nas células tumorais ocorre expressão aumentada de GLUT e possibilidade de maior transporte de vitamina C para dentro das mesmas (VERA *et al.*, 1994; AGUS, VERA, GOLDE, 1999; TSUKAGUCHI *et al.*, 1999). A associação entre vitamina C e vitamina K<sub>3</sub> poderia exercer um efeito citotóxico seletivo sobre essas células, apresentando efeito pró-oxidante, além de ações isoladas nos processos celulares, as quais poderiam ser mais notáveis agindo em associação. Dessa forma, os efeitos descritos para a referida associação poderiam ser potencializados, os quais levariam à morte celular tumoral.

## 1.5 MICROENCAPSULAMENTO E UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA COMO MATRIZ POLIMÉRICA

Alguns avanços na tecnologia farmacêutica têm propiciado melhoria importante na eficácia dos fármacos, uma vez que estão sendo propostas novas formulações de liberação controlada que permitem uma otimização da dose terapêutica com uma efetiva redução da toxicidade dos quimioterápicos. Isso é particularmente interessante no caso de agentes antitumorais, fármacos de elevada toxicidade intrínseca, pois pode ser conseguida redução da toxicidade, supressão de reações adversas e diminuição do número de doses administradas diariamente (VILLANOVA, *et al.*, 2010).

Dentre estas novas opções de formulações, destacam-se o nano e o microencapsulamento em matriz polimérica que tem como principal objetivo levar à liberação controlada do fármaco no sítio alvo, bem como uma manutenção prolongada de níveis elevados destes a partir de uma dose terapêutica menor (MUNDARGI *et al.*, 2008).

Geralmente, os sistemas poliméricos liberam o fármaco através dos mecanismos de difusão, reação química (degradação ou clivagem) ou ativação de solventes (intumescimento ou pressão osmótica). Entretanto, o mecanismo de liberação mais comum é a difusão, no qual o fármaco migra da posição inicial (interna) no polímero para a superfície e depois para o local de atuação (LANGER, 1990).

O encapsulamento pode ser definido como um processo de formação de um revestimento contínuo, fino, ao redor dos encapsulados (isto é, partículas sólidas, gotículas de líquidos ou gases), os quais serão inteiramente contidos dentro da parede da cápsula como um núcleo de material encapsulado (KIRBY, 1991; DESAI & PARK, 2006).

Uma microcápsula é definida como uma partícula esférica com tamanho variando de 50 nm a 2 mm, contendo um composto no núcleo (centro). Microesferas são, em um sentido estrito, partículas esféricas vazias. No entanto, os termos microcápsulas e microesferas são freqüentemente usados como sinônimos (KUMAR, 2000).

O microencapsulamento é uma tecnologia de embalagem em miniatura para produtos sólidos, líquidos ou substâncias gasosas em cápsulas seladas que podem liberar seu conteúdo a velocidades controladas em condições específicas (SHAHIDI & HAN, 1993). Segundo Jyothi e colaboradores (2010), o microencapsulamento é uma técnica de preservação da qualidade de substâncias sensíveis e um método para produção de materiais com novas propriedades. O microencapsulamento é considerado um processo no qual se engloba

partículas com precisão, em um revestimento polimérico (JYOTHI *et al.*, 2010).

A microcápsula é constituída por uma membrana semipermeável, esférica, fina e forte em torno de um núcleo sólido ou líquido, com diâmetro variando de alguns microns a 1 mm (ANAL & SINGH, 2007). O revestimento protege o conteúdo ativo de estresses ambientais, tais como exposição ao oxigênio, à luz e à acidez (ROKKA & RANTAMÄKI, 2010).

Existem diferentes técnicas disponíveis para o encapsulamento de moléculas. A eficiência do encapsulamento das micropartículas, microesferas ou microcápsulas depende de diversos fatores como a concentração do polímero, a solubilidade do polímero no solvente, velocidade de remoção do solvente e a solubilidade do solvente orgânico na água (JYOTHI *et al.*, 2010). Dentre as técnicas mais utilizadas atualmente para o microencapsulamento existe o método *spray drying* que consiste na transformação de um material que está em estado fluido para um estado particulado, pela pulverização em um ambiente quente. Embora seja considerado um meio de desidratação, pode também ser usado como método de encapsulamento (LUZ; PIRES; SERRA, 2007; ROKKA & RANTAMÄKI, 2010).

Na técnica de *spray drying* ocorre a atomização de uma emulsão ou de uma suspensão e do material carreador para dentro do ambiente onde existe o gás de secagem, local em que ocorre a rápida evaporação da água e as cápsulas são obtidas como pó seco. O processo de *spray drying* é controlado pelo fornecimento, disponibilização do material, fluxo do gás e temperatura (ROKKA & RANTAMÄKI, 2010).

Dentre os possíveis materiais de revestimento para microencapsulamento está incluída a matriz polimérica quitosana (AUGUSTIN & SANGUANSRI, 2008).

A quitosana é um derivado de quitina com grau variável de desacetilação. É um polissacarídeo linear composto de N-acetil-D-glucosamina (unidade acetilada) e D-glucosamina (unidade desacetilada) unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1-4) (Figura 4). A quitosana apresenta grupos amino livres ( $-NH_2$ ) que, em meio ácido, podem estar protonados ( $-NH_3^+$ ). Este biopolímero é biodegradável, biocompatível e apresenta baixa toxicidade (HIRANO *et al.*, 1989; SUDARSHAN; HOOVER; KNORR, 1992).

A quitosana é solúvel em soluções ácidas com pH abaixo de 6,0. Pode ser considerada uma base forte, pois possui grupos amino primários com pKa de 6,3. A presença dos grupos amino indica que o pH altera o estado carregado da molécula e propriedades da quitosana

(YI *et al.*, 2005). Em valores baixos de pH, os grupos amino tornam-se protonados, positivamente carregados e então a quitosana torna-se um polieletrólito catiônico solúvel em água. Quando o pH é maior que 6,0, as aminas da quitosana ficam desprotonadas, o polímero perde cargas e torna-se insolúvel. Essa transição solúvel-insolúvel ocorre no pH em torno do pKa, entre 6,0 e 6,5. Como o valor do pKa é altamente dependente do grau de N-acetilação, a solubilidade da quitosana é dependente do grau de desacetilação e do método de desacetilação usado (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

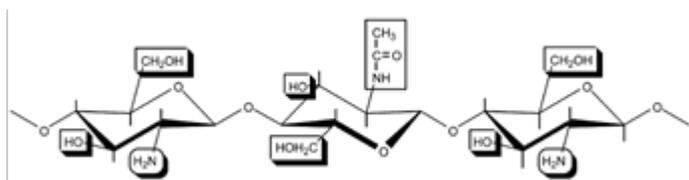


Figura 4- Estrutura da quitina-quitosana. Fonte: Pillai; Paul; Sharma (2009).

Quitosana como matriz polimérica, no formato de esferas e microesferas, têm sido produzidas e empregadas em diversas áreas de biotecnologia, principalmente como veículos de transporte e de liberação de fármacos ou compostos no organismo (JANES *et al.*, 2001; CAMPOS; SANCHEZ; ALONSO, 2001). Este biopolímero, empregado como um transportador de fármacos, pode melhorar a absorção destes, estabilizar seus componentes, favorecendo a liberação e reforçando o efeito em relação ao alvo pretendido. Assim, a quitosana também pode ser usada como transportadora de fármaco para tratamento antitumoral de quimioterapia.

O desenvolvimento de um sistema de encapsulamento para uma determinada aplicação requer conhecimento sobre a estabilidade do componente bioativo (núcleo ou parte central) em foco, as propriedades dos materiais escolhidos para o encapsulamento (encapsulante) e a adequação do sistema de liberação (microcápsula ou micropartícula) para a sua aplicação final (AUGUSTIN & SANGUANSRI, 2008).

Finalmente, na literatura já está demonstrado que a associação VC com VK<sub>3</sub> é citotóxica para células tumorais (CALDERON *et al.*, 2002; BECK *et al.*, 2010) e também que a VC é altamente sensível à oxidação e degradação durante amostragem, manuseio, armazenamento, análises. Vários fatores, tais como temperatura, luz, pH, oxigênio dissolvido, solvente, força iônica, metais como íons férrico e presença

de enzimas podem afetar a estabilidade da VC (KARLSEN; BLOMHOFF; GUNDERSEN, 2007).

Considerando a instabilidade da VC, há necessidade de uma forma de manipulação com estabilidade superior para que seja mantida a sua atividade. A fim de garantir a estabilidade da VC e a disponibilização no meio intracelular, através de liberação controlada, o presente trabalho propôs: a) fazer a preparação e administração de vitamina C, vitamina K<sub>3</sub>, vitamina C associada com K<sub>3</sub>, encapsuladas com quitosana; b) caracterizar as micropartículas; c) avaliar os efeitos biológicos; d) verificar a ocorrência da possível potencialização, no caso da associação de vitamina C e vitamina K<sub>3</sub>.

## 1.6 ATIVIDADE ANTITUMORAL DO VANÁDIO

O vanádio é um metal de transição que pode ocorrer em diversos estados oxidativos e pode participar de reações envolvendo radicais livres (CRANS *et al*, 2004). O vanadato ( $5^+$ , V) pode rapidamente se reduzir a vanadil ( $4^+$ , IV), tanto por antioxidantes enzimáticos, quanto não enzimáticos (VC) e então se ligar a proteínas plasmáticas (LIOCHEV & FRIDOVICH, 1990).

Diversos estudos relatam o possível efeito antineoplásico do vanádio em células tumorais como linfoma de célula B humana, célula T leucêmica (KRESJA *et al*, 1997), células leucêmicas L1210 (DJORDJEVITZ & WAMPLE, 1985), HL-60 e M07e (BERGAMASHI *et al*, 1993), hepatoma humano e de rato (BOSCH *et al*, 1990; KOPF-MAIER, 1994), carcinoma ovariano humano (ITKES *et al*, 1990), câncer testicular (D'CRUZ & UCKUM, 2000), carcinoma nasofaríngeo (SAKURAI *et al*, 1995), osteosarcoma (CORTIZO *et al*, 2000; MOLINUEVO *et al.*, 2004), carcinoma ascítico de Ehrlich (CORTIZO *et al*, 2000), neuroblastoma de rato e camundongo (MONTERO *et al.*, 1981; FAURE *et al.*, 1995), célula Hela (LIASKO; KARKABOUNAS; KABANOS, 2000), células TPC-1 derivadas de carcinoma papilar de tireóide (GONÇALVES *et al.*, 2011).

A exposição de células C3H/10T1/2 (fibroblasto de embrião de camundongo) em cultura a baixas concentrações (5-20  $\mu$ M) de vanadato (V) induziu a expressão de gene da família *proliferin* que indica um estado celular de estresse oxidativo (BYCZKOWSKI & KULKARNI, 1998).

Estudos em animais têm demonstrado que compostos de vanádio induzem o estresse oxidativo e peroxidação lipídica em hepatócitos

(YOUNES & STRUBELT, 1991; STOHS AND BAGCHI, 1995), hipocampo, cerebelo, rim (GARCIA, 2006).

Trabalho realizado por Cruz; Morgan; Min (1995) demonstrou que a administração subcutânea de ortovanadato (500 µg/camundongo/dia durante nove dias) resultou em redução significativa (> 85–100 %) do crescimento do tumor MDAY-D2 nos animais, o que provavelmente foi devido à geração, pelo vanadato (V), de radicais hidroxil e outras espécies ativas de oxigênio.

Huyer *et al.* (1997) mostraram que vanadato é um inibidor competitivo de proteína tirosina fosfatase (PTP) e que liga-se como um análogo de estado de transição às enzimas de transferência de fosforil que ele inibe.

Alguns mecanismos têm sido propostos para a atividade antitumoral de vanádio, tais como: ação sobre a proliferação celular (KRADY *et al.*, 1997; JASPERS *et al.*, 2000), efeito citotóxico via interação direta com o DNA (DJORDJEVITZ & WAMPLER, 1985; KUO; LIU; MARKS, 1995), ou através da formação de radicais livres (SAKURAI; TAMURA; OKATANI, 1994).

Outros estudos também demonstraram que o vanádio pode atuar sobre o processo apoptótico através da modulação de proteínas efetoras chaves no processo de sinalização celular através da produção de radicais livres e dano ao DNA como AP-1, MEK-1, ERK-1, JNK-1, PI-3K e NF-kB (CHEN *et al.*, 1999; JASPERS *et al.*, 2000). Especificamente, com respeito a apoptose, foi demonstrado nos estudos citados a seguir que a produção de espécies radicalares pelo vanádio no citosol e na mitocôndria da célula resulta em dano mitocondrial e liberação de citocromo c (ZHAO *et al.*, 2010), o que ativa as caspases (GREEN & REED, 1998). Além disso, foi demonstrado que o tratamento de células epidérmicas de camundongo com sal de vanádio induziu a apoptose através da produção de peróxido de hidrogênio e ERO os quais ativam p53 (HUANG; ZHANG; DING, 2000), o gene supressor tumoral envolvido na regulação do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose (ASSIMAKOPOULOS *et al.*, 2000).

Com relação ao vanádio, estudos *in vitro* têm confirmado que a redução de vanadato ( $5^+$ , V) a vanadil ( $4^+$ , IV) mediado por ascorbato juntamente com fosfato pode representar um possível e importante caminho para a redução de vanadato ( $5^+$ , V) *in vivo* com a geração de radicais livres (DING *et al.*, 1994; SREEDHARA *et al.*, 1996).

Segundo Ionescu & Poljsak (2010) três fatores são responsáveis pelo comportamento pró- ou antioxidante da vitamina C em sistemas biológicos, ou seja, em meio ambiente celular: 1) o potencial redox do

meio ambiente celular meio ambiente celular (oxidante / redutor); 2) a presença ou ausência de metais de transição; e 3) a concentração de vitamina C no local. Dessa forma, a associação de vitamina C com vanádio poderia ser um modo de geração de espécies reativas, as quais poderiam causar efeito antitumoral.

Segundo Evangelou (2002) o vanádio causa lipoperoxidação da membrana plasmática. Já de acordo com Svoboda *et al.* (1984), o uso exclusivo de vanadato ( $\text{VO}^{3-}$ ) teve baixa capacidade de induzir a peroxidação lipídica, porém, com a adição de ácido ascórbico ( $10^{-4}$  M) a microssomas de cérebro, a lipoperoxidação foi estimulada para o nível máximo.

Embora o vanádio apresente elevada toxicidade (EVANGELOU, 2002; WANG, 2010), tendo em vista a possível potencialização do efeito quando usado em associação com vitamina C, o vanadato poderia então ser usado em menores concentrações, diminuindo assim possíveis efeitos tóxicos.

É conhecido que o ascorbato pode atuar como antioxidante ou pró-oxidante dependendo da dose (SCHWARTZ, 1996; CHEN *et al.*, 2008; IONESCU & POLJSK, 2010). Como foi relatado anteriormente (item 1.4.1) o ácido ascórbico possui efeito citotóxico em células malignas através da atividade pró-oxidante (YAMAMOTO *et al.*, 1987; GONZÁLEZ *et al.*, 1998), podendo levar a produção de peróxido de hidrogênio e espécies reativas que pode levar à morte da célula (CLÉMENT *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2005).

Outros estudos também demonstraram que o vanádio pode ser reduzido pela vitamina C, gerando radicais livres (DING *et al.*, 1994), podendo, desta forma, amplificar a geração de radicais livres a partir dessa associação e então induzir efetivamente o processo de apoptose em células tumorais relacionado a geração de ERO (WANG *et al.*, 2010).

Segundo Wang *et al* (2010) compostos de vanádio atuaram distintamente sobre células hepáticas normais imortalizadas (L02) e células de hepatoma humanas (HepG2) após exposição a espécies reativas de oxigênio. Houve maior produção de ERO nas células L02, porém verificou-se que NAC (N-acetilcisteína) não diminuiu a citotoxicidade de compostos de vanádio nas células HepG2 enquanto foi menos citotóxico para as células L02 (linhagem de células hepáticas imortais). Sendo NAC um antioxidante, pode-se propor um uso terapêutico de compostos de vanádio em associação com outros antioxidantes como agentes sinérgicos com o intuito de reduzir os seus

efeitos tóxicos em células normais sem afetar suas atividades antitumorais em células de câncer.

Portanto, a proposta do presente trabalho foi avaliar a potenciação do efeito antitumoral do ortovanadato de sódio pela sua associação com vitamina C. Esta associação poderia apresentar efeitos semelhantes aos da associação anteriormente citada (vitamina C e  $K_3$ ) nesse trabalho, uma vez que se mantém modelo de ativação do ciclo redox e o padrão pró-oxidante/anti-oxidante indutor de apoptose, além de ações isoladas nos processos de citotoxicidade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi caracterizar a atividade citotóxica, pró-apoptótica e antitumoral da associação de vitamina C com vitamina K<sub>3</sub> microencapsuladas com quitosana e da associação de vitamina C com ortovanadato de sódio, investigando, como possível mecanismo de ação das formulações, a hiperativação do ciclo redox e consequente geração de radicais livres capazes de induzir a morte celular.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a liberação controlada da vitamina C em soluções tampões, meio de cultura;
- Caracterizar as micropartículas encapsuladas com VC, VK<sub>3</sub> e associação VCK<sub>3</sub>;
- Caracterizar *in vitro* o efeito citotóxico da VC, VK<sub>3</sub> e da associação VCK<sub>3</sub> microencapsuladas para a linhagem de células tumorais MCF7;
- Caracterizar o efeito antitumoral seletivo da associação VCK<sub>3</sub> microencapsuladas para camundongos isogênicos Balb-c transplantados com tumor ascítico de Ehrlich;
- Investigar o mecanismo de ação da VC, VK<sub>3</sub> e da associação VCK<sub>3</sub> microencapsuladas com relação ao tipo de morte celular (apoptose/necrose) *in vivo*;
- Caracterizar o efeito citotóxico da associação vitamina C e ortovanadato de sódio em células T24;
- Investigar o mecanismo de ação da associação vitamina C e ortovanadato de sódio com relação ao tipo de morte celular (apoptose/necrose) *in vitro*;
- Investigar a geração de ERO e indução de estresse oxidativo como possível mecanismo de ação da associação vitamina C e ortovanadato de sódio envolvido na citotoxicidade *in vitro*;
- Investigar o mecanismo de ação da associação vitamina C e ortovanadato de sódio através da avaliação de dano ao DNA plasmidial;

- Caracterizar o efeito antitumoral da associação vitamina C e ortovanadato de sódio em camundongos Balb-C inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich;
- Avaliar a indução do estresse oxidativo como possível mecanismo de ação envolvido na atividade antitumoral *in vivo*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES

Ácido cítrico (Sigma); ascorbato de sódio (vitamina C, Sigma); azul de tripan (Sigma); ácido tricloroacético (Vetec); ácido tiobarbitúrico (Sigma); brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT, Sigma); butanol (Vetec); butilhidroxitolueno (BHT, Sigma); L-cisteína, L-cistina, L-metionina e metabissulfito de sódio (Merck, Darmstadt Co.); cloreto de sódio (NaCl, Reagen); diacetato dediclorofluoresceína (DCFH-DA, Sigma-Aldrich); dimetilsulfóxido (DMSO, Amresco); doxorubicina (Sigma); hidróxido de sódio (NaOH, VETEC); menadiona-bissulfito de sódio (vitamina K<sub>3</sub>, VK<sub>3</sub>, Sigma); tripsina-EDTA (0,25 %, Cultilab); ortovanadato de sódio (OS, Sigma); peróxido de hidrogênio; solução salina tamponada com fosfato (PBS); quitosana (Peso Molecular 122.740 Da, grau de desacetilação 90 %, Purifarma, São Paulo, Brasil); kit de extração PerfectprepPlasmid Mini (Eppendorf), plasmídeos Puc 9.1 isolados de *Escherichia coli* DH5SαFIQ; tampão HEPES (pH 7,4); TBE (89 mM Tris Borato, 2 mM EDTA); agarose; brometo de etídio; enzima de restrição (EcoRI); kit para detecção de apoptose contendo anexina V-FITC e iodeto de propídio (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Anticorpo policlonal de coelho contra p53 e contra cinase dependente de ciclina 2 (CDK2) e anticorpo policlonal de camundongo contra Bcl-xL e Bax (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA). Anticorpo de camundongo contra β-actina, anticorpos secundários, kit para detecção de quimiluminescência e anticorpos acoplados a HRP (horse radish peroxidase) (Millipore USA). Todos os demais reagentes usados foram de grau analítico (VETEC).

#### 3.2 PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

##### 3.2.1 Preparação das micropartículas de Vitamina C (VC)

A solução de VC foi preparada com a concentração de 256 g/L de VC e 0,44 % de quitosana. Inicialmente foi pesado 3,338 g de VC e 4,423 g de quitosana, sendo feitas as diluições necessárias. No final, cada 1 g do material encapsulado, isento de água, continha, teoricamente, 430,1 mg de VC. Foi adicionado 1 g de ácido cítrico para cada 1,11 g de quitosana que foi usada.

### 3.2.2 Preparação das micropartículas de Vitamina K<sub>3</sub> (VK<sub>3</sub>)

A VK<sub>3</sub> encapsulada com quitosana foi preparada pesando-se 1,909 g de VK<sub>3</sub> (bissulfito de menadiona), 1,605 g de quitosana, 1,436 g de ácido cítrico, 0,104 g de metabissulfito sódico (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), o qual foi usado para estabilizar o bissulfito de menadiona. Em seguida, foram feitas as diluições necessárias. No final, cada 1 g do material encapsulado, isento de água, continha, teoricamente, 370,3 mg de VK<sub>3</sub>.

### 3.2.3 Preparação das micropartículas com associação de VC e VK<sub>3</sub> (proporção de 100/1 de VC para VK<sub>3</sub>)

A mistura foi preparada para conter uma proporção de 100 mM de VC para 1 mM de VK<sub>3</sub> e concentração de 0,47 % de quitosana. A mistura de VC e VK<sub>3</sub>, encapsuladas com quitosana, foi preparada pesando-se 3,543 g de VC, 58,5 mg (55,6 mg pura) de VK<sub>3</sub>, 4,7414 g de quitosana, sendo após feitas as diluições necessárias. No final, cada 1 g da mistura encapsulada, isenta de água, contém 424,7 mg de VC e 6,6 mg de VK<sub>3</sub>.

### 3.2.4 Encapsulamento de VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> com quitosana pelo método de spray drying

As micropartículas de VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> encapsuladas com quitosana foram preparadas pelo método de *spray drying*. Para a obtenção das micropartículas encapsuladas inicialmente foram preparadas as soluções saturadas das vitaminas e a quitosana foi rapidamente adicionada a seguir, nas soluções das vitaminas, sob agitação de um misturador e evacuação de ar, através do uso de bomba de vácuo. A seguir procedeu-se à atomização e à etapa de secagem com o *spray dryer* (Mini *Spray Dryer* modelo B-290, Büchi Labortechnik AG) do laboratório do Prof. Pedro Luiz Manique Barreto do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, para a evaporação da água, nas seguintes condições experimentais: temperatura de entrada de ar no secador  $100 \pm 20$  °C; temperatura de saída de ar no secador 70 °C; velocidade de fluxo do líquido 2 mL/min; velocidade do fluxo de ar 10 cm<sup>3</sup>/h e ajuste do aspirador 25 psi. As micropartículas foram obtidas na forma de um pó seco.

As soluções das vitaminas foram preparadas da maneira descrita a seguir. Em todas as soluções o ácido cítrico foi adicionado para

melhorar a solubilidade (SANTOS; SOARES; DOCKAL; CAMPANA FILHO; CAVALHEIRO, 2003).

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

A morfologia, o tamanho e o aspecto da superfície das micropartículas de VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> foram examinados através do microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JSM-6390LV, JEOL Ltd.) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (LCME/UFSC).

As amostras foram fixadas sobre suportes de metal (*stubs*) do MEV usando-se uma fita adesiva de dupla-face e em seguida foram recobertas com ouro, para propiciar a condução dos elétrons e garantir imagens com boa resolução no MEV. As amostras foram analisadas em vácuo, a uma intensidade de 10 kV, com varias ampliações.

A partir da seleção de pelo menos três áreas representativas de cada amostra, escolhidas por observação visual e, mediante as ampliações de cada imagem, obtiveram-se as fotomicrografias das referidas microscopias.

### 3.4 ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DE VC DAS MICROPARTÍCULAS DE VC E VCK<sub>3</sub>

#### 3.4.1 Curva padrão da VC na fase móvel e água por CLAE

Os ensaios para determinação da concentração de VC foram executados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo Lykkesfeldt (2000). Esses ensaios foram realizados na *Unité de Pharmacocinétique, Metabolisme, Nutrition et Toxicologie da Université Catholique de Louvain (PMNT – UCL – Bélgica)*, coordenado pelo Prof. Dr. Pedro Buc Calderon.

Primeiramente, para determinar a linearidade da resposta do detector de CLAE foram preparadas soluções padrão de VC. A correlação linear foi obtida entre a área do pico *versus* concentração de VC na faixa de 0,5-7,5 µg/ml de VC em solução aquosa e na fase móvel (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M / H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; EDTA 2 mM; pH 3,0) após 30 minutos de incubação. Cada medida foi realizada com três repetições.

#### 3.4.2 Curva de liberação de VC das micropartículas encapsuladas com quitosana

Após a obtenção da curva padrão de VC foi avaliada a liberação de VC nas micropartículas contendo VC e VCK<sub>3</sub> encapsuladas com quitosana, em solução aquosa, por CLAE, em diferentes concentrações de micropartículas (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 µg/mL), após 30 minutos de incubação.

### **3.4.3 Cinética da liberação de VC microencapsulada com quitosana**

A avaliação da cinética de liberação de VC das micropartículas de VC e VCK<sub>3</sub> encapsuladas com quitosana em solução aquosa por CLAE foi realizada com as micropartículas de VC e VCK<sub>3</sub> preparadas na concentração de 5,0 µg/mL de micropartículas. O perfil da liberação foi acompanhado durante 24 h.

## **3.5 ENSAIOS *IN VITRO***

### **3.5.1 Manutenção da cultura de células**

Na cultura de células foram utilizadas as linhagens de células de câncer de mama (MCF7) e de câncer de bexiga (T24) obtidas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BCRJ-UFRJ). As células foram mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com soro fetal bovino (10 %) (ambos da Cultilab), contendo L-glutamina (2 mM), glicose (4,5 g/L), bicarbonato de sódio (1,5 g/L), sulfato de gentamicina (50 mg/L), anfotericina B (2 mg/L) ao qual foi adicionada uma mistura de penicilina (100 U/mL) mais estreptomina (100 µg/mL) na concentração final de 1 % (LGCBio). As células foram incubadas na temperatura de 37 °C em atmosfera umidificada (95 %) contendo CO<sub>2</sub> (5 %).

Estas células crescem em monocamada e foram destacadas por tratamento com uma solução de tripsina-EDTA (0,25 %), quando chegaram a uma confluência de aproximadamente 90 %.

### **3.5.2 Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT**

A avaliação da citotoxicidade dos tratamentos que determina a inibição do crescimento celular foi verificada através da medida de

viabilidade celular com brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Neste teste, o sal de MTT (amarelo) solúvel em água é absorvido pelas células metabolicamente ativas e reduzido no interior das mitocôndrias por redutases (p. ex. succinato desidrogenase) a um produto de cor púrpura chamado formazan. Este produto é insolúvel em água e é solubilizado através da adição de DMSO (p.a.). Após dissolução dos cristais foi realizada uma leitura espectrofotométrica onde a densidade óptica observada é diretamente proporcional ao número de células vivas (MOSMANN, 1983). Para controle negativo foram usadas células MCF7 e T24 cultivadas somente em meio de cultura.

Cada tratamento foi realizado em três poços de placas de cultura com 96 poços, tendo sido executados três experimentos independentes em dias diferentes, para cada tratamento.

### 3.5.2.1 Avaliação da citotoxicidade com micropartículas de VC, VK<sub>3</sub>, VCK<sub>3</sub>

Os materiais encapsulados com VC e com a associação de VC e VK<sub>3</sub> foram diluídos em meio de cultura e PBS (1:1). Foram usados 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg/mL de material encapsulado (contendo respectivamente 0,21; 0,42; 0,85; 1,70 mg/mL de VC nas micropartículas de VC e com a associação de VC com VK<sub>3</sub>). Finalmente as concentrações calculadas em molaridade das vitaminas foram 1,21; 2,41; 4,83 e 9,65 mM de VC no material encapsulado com VC e com associação de VC com VK<sub>3</sub>.

Para os tratamentos com VK<sub>3</sub> a diluição sempre foi feita diretamente em meio de cultura, nas quantidades de 5; 10; 20; 40 µg/mL de material encapsulado (contendo respectivamente 1,87; 3,75; 7,50; 15 µg/mL de VK<sub>3</sub> nas micropartículas encapsuladas de VK<sub>3</sub> e associação de VC com VK<sub>3</sub>). No caso do material com VK<sub>3</sub> a concentração calculada de VK<sub>3</sub> foi 5,62; 11,25; 22,5 e 45 µM no material encapsulado com VK<sub>3</sub> e associação de VC com VK<sub>3</sub>.

As mesmas quantidades e proporção de VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> foram utilizadas quando os experimentos foram feitos com as vitaminas não encapsuladas.

Primeiramente, as células MCF7 foram colocadas em meio de cultura completo (DMEM, soro, antibióticos) e distribuídas nas placas de 96 poços (200 µL em cada poço, contendo  $1 \times 10^4$  células por poço), sendo em seguida pré-incubadas por 24 horas, à temperatura de 37 °C, em atmosfera de CO<sub>2</sub> (5 %), com umidade relativa de 90 %. Após esse

período removeu-se o meio, as células foram lavadas com PBS, e incubadas com as diferentes quantidades de VC, VK<sub>3</sub> e associação de VC com VK<sub>3</sub>, encapsuladas com quitosana, por 24 horas.

Da mesma forma foram realizados os experimentos com VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> quando os experimentos foram feitos com as vitaminas não encapsuladas.

Ao final dos períodos dos tratamentos o meio foi descartado, as células foram lavadas com PBS, e realizou-se o ensaio de viabilidade celular pelo método MTT para avaliação da citotoxicidade dos tratamentos. Foram adicionados 100 µL de MTT (0,5 mg/mL, dissolvidos em meio de cultura, sem soro) em cada poço e as placas foram incubadas em estufa (37 °C) por um período de 4 horas. Em seguida, o meio foi descartado por inversão das placas, as células foram lavadas com PBS e o corante MTT foi extraído e solubilizado com 100 µL de DMSO (p.a.). As placas foram submetidas à agitação por 10 min procedendo-se na sequencia a leitura das absorbâncias em comprimento de onda de 540 nm no leitor de microplacas (TECAN, Infinite 200) usando-se DMSO como branco para leitura. A absorbância do controle negativo foi assumida como 100 % de viabilidade e a viabilidade celular dos tratamentos foi calculada (em percentual) de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \{(\text{Abs teste} - \text{Abs branco}) \times [100 / (\text{Abs CN} - \text{Abs branco})]\}$$

Abs teste = absorbância do teste

Abs branco = absorbância do branco

Abs CN = absorbância do controle negativo

Os valores de CI<sub>50</sub> (concentração que inibe em 50 % a viabilidade celular) foram calculados por regressão linear e expressos em Média ± Desvio Padrão. Considerou-se o valor do controle negativo, ou seja, as células cultivadas em meio de cultura sem os tratamentos propostos, como 100 % de viabilidade celular.

### 3.5.2.2 Avaliação da citotoxicidade da associação de vitamina C e ortovanadato de sódio

Inicialmente, as células T24 foram colocadas em meio de cultura completo (DMEM, soro, antibióticos) e distribuídas nas placas de 96

poços (200 µL em cada poço, contendo  $1 \times 10^4$  células por poço), sendo em seguida pré-incubadas por 24 horas, à temperatura de 37° C, em atmosfera de CO<sub>2</sub> (5 %), com umidade relativa de 90 %. Após esse período removeu-se o meio, as células foram lavadas com PBS, e incubadas com as diferentes quantidades de ortovanadato de sódio e com a associação de ortovanadato de sódio e vitamina C por 24 horas.

Os tratamentos com ortovanadato de sódio e com a associação de ortovanadato de sódio e vitamina C foram feitos em concentrações de 0,5 a 5,0 µM.

Ao final dos tratamentos foram feitas as análises de viabilidade celular e CI50 conforme item acima (3.5.2.1).

### 3.5.3 Avaliação da citotoxicidade tempo-dependente

Da mesma forma como foi descrito anteriormente foi avaliada a dependência do tempo sobre a citotoxicidade dos tratamentos nos períodos de 12, 24 e 48 horas para os tratamentos com as micropartículas de VC, VK<sub>3</sub> e associação VCK<sub>3</sub>, encapsuladas e não encapsuladas.

### 3.5.4 Determinação do conteúdo de ERO intracelular

O conteúdo de ERO intracelular foi avaliado com o uso de 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA). O DCFH-DA é inicialmente não fluorescente, e após ser oxidado pelas ERO intracelulares é convertido em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), tornando-se insolúvel em meio lipídico (mantendo-se no interior da célula) e fluorescente (WRONA; PATEL; WARDMAN, 2005). O procedimento experimental foi executado como relatado por Glorieux *et al.* (2011). As células T24 (15.000) foram incubadas com 10 µM de DCFH-DA em HBSS, por 30 min. O excesso de DCFH-DA foi removido através da lavagem com HBSS. As células foram então incubadas por 2 h com os compostos a serem testados: ascorbato de sódio 100 µM; ortovanadato de sódio (2,5 µM a 10 µM); associação de ortovanadato de sódio e ascorbato de sódio (2,5 µM a 10 µM e 100 µM, respectivamente); antioxidantes N-acetilcisteína (NAC, 3 mM) e catalase (CAT, 100 U/mL). Em seguida foram lavadas duas vezes com HBSS, e então foi adicionado 100 µL de HBSS/poço antes da leitura. A fluorescência foi avaliada com um leitor de microplacas (Victor™ X2,

Perkin Elmer) em 485 nm para excitação e 530 nm para emissão. As mudanças nos níveis de ERO foram determinadas pelo cálculo:

$$\Delta F = (F_t - F_c) / F_c,$$

Onde  $F_t$  representa a fluorescência lida a cada ponto do tempo e  $F_c$  é a fluorescência do controle.

### 3.5.5 Avaliação de dano no DNA plasmidial

Além de sua forma superenovelada (F I) normal, o DNA plasmidial pode adotar a forma circular aberta (F II) e a forma linear (F III). Quebras na dupla hélice fazem com que a forma superenovelada (original) transforme-se em forma circular aberta (através de quebras simples) e/ou forma linear (através de quebra dupla de cadeia) (Figura 5).

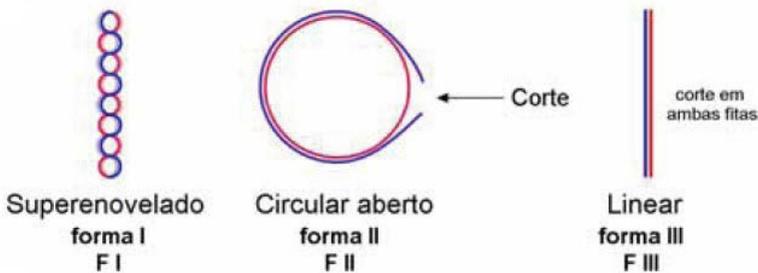


Figura 5 - Esquema de corte da molécula de DNA Plasmidial. Fonte: Adaptado de Berg, Tymoczko e Stryer (2008).

A avaliação de dano ao DNA plasmidial foi executada de acordo com as instruções do kit de extração Perfectprep Plasmid Mini (Eppendorf) com a colaboração do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Claus Pich (UFSC, Araranguá). A quantificação do DNA obtido foi realizada em espectrofotômetro de luz ultravioleta, com leitura em comprimento de onda de 260 nm, onde uma unidade de densidade ótica, em 260 nm, corresponde a 50  $\mu\text{g/mL}$  de DNA (BISO, 2008). O DNA plasmidial obtido (plasmídeos Puc 9.1 isolados de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ FIQ), que não foi utilizado no momento da extração, foi estocado a 4  $^{\circ}\text{C}$ , por no máximo 5 dias.

Para a avaliação da atividade nucleásica realizou-se uma incubação em microtubos, durante 16 horas, a 37 °C, de 5 µl de uma solução de DNA plasmidial (600 ng), 5 µl de tampão HEPES (pH 7,4) e 10 µl de solução de ortovanadato de sódio, vitamina C e associação de ortovanadato de sódio com vitamina C na concentração de 10 µM de ortovanadato de sódio e de 100 µM de vitamina , isolados ou quando associados. Após o período de incubação, o DNA foi submetido a uma corrida eletroforética (70-80 V) em tampão TBE (89 mM Tris Borato, 2 mM EDTA) por 30-45 min, realizada em gel de agarose 0,8 %. A revelação do gel foi realizada com brometo de etídio (0,5 g/mL, 20 min) e foram visualizadas as bandas que representam o perfil de quebra do DNA plasmidial [intacta ou superenovelada (FI), com quebra simples ou circular aberta (FII) e com quebra dupla ou linear (FIII)] induzida pelos tratamentos. Em um computador, através da utilização do programa ImageJ 1.3 software (NIH, USA) procedeu-se a quantificação das bandas e consequente determinação das quantidades das três formas adotadas pelo DNA plasmidial após sua corrida eletroforética (SCARPELLINI *et al*, 2003). As três formas possuem velocidade de migração eletroforética diferenciadas apresentando-se como bandas distintas em géis de eletroforese como demonstrado na Figura 6. A intensidade de DNA superenovelado foi corrigida por um fator de 1,47, como um resultado de sua menor capacidade de corar com brometo de etídio (SREEDHARA; COWAN, 2001). Usou-se como controle positivo a enzima de restrição EcoRI (com atividade de endonuclease) isolada de *E. coli*.

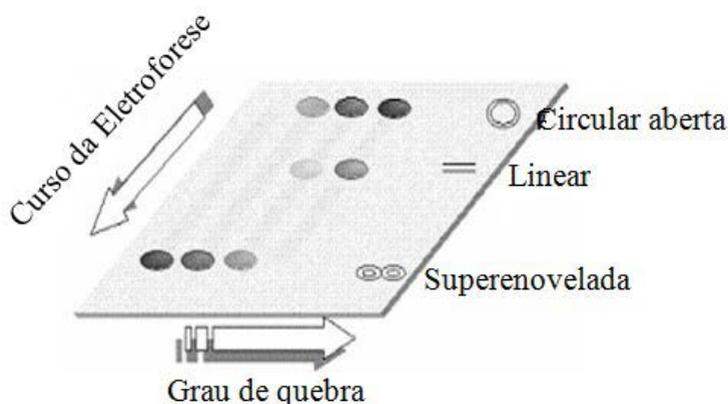


Figura 6 - Imagem típica de um gel de agarose obtido a partir da eletroforese do DNA plasmidial após sua incubação com várias concentrações de compostos. Fonte: Mancin *et al* (2005).

### 3.5.6 Ensaio de formação de colônia

O ensaio de formação de colônia avalia a perda da capacidade de divisão (proliferação) das células. Para essa avaliação 500 células/poço foram colocadas em placas de seis poços e deixadas em incubação com meio de cultura até o dia seguinte, para adesão. O experimento foi feito em triplicata. Após essas 24 horas o meio foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com PBS e então se adicionou novamente meio de cultura juntamente com ortovanadato de sódio nas concentrações de 2,5-10  $\mu\text{M}$  e vitamina C na concentração de 1 mM. Deixou-se novamente por 24 h, então lavando com PBS e adicionando-se novamente meio de cultura. Procedeu-se à incubação por um período de 8-10 dias até a observação das colônias (+/- 50 células). Os poços foram lavados com PBS e adicionou-se violeta cristal 0,5 % (dissolvido em metanol/água, 1:1) para coloração. Em seguida lavou-se com água (5 vezes) e procedeu-se à observação e contagem das colônias (FRANKEN *et al.*, 2006).

### 3.5.7 Análise por *Western blot*

A análise por *western blot* foi feita como descrita por Dejeans *et al.* (2010). Os tratamentos foram feitos em células T24 com ortovanadato de sódio (5  $\mu\text{M}$ ) ou ascorbato de sódio (1 mM) individualmente ou em associação, durante 6 h, obtendo-se as proteínas dos homogenatos totais das células. Como controle foi usado proteínas de homogenatos totais de células não tratadas. Após os tratamentos as células foram lavadas com PBS e lisadas em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 0,25 % desoxicolato de sódio e 1 mM fenilmetilsulfonil fluoreto) suplementado com coquetel de inibidores de proteases (1 %) e de fosfatases (3 %). Após desnaturação com tampão Laemmli (60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 10 % glicerol, 5 %  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,01 % de azul de bromofenol), quantidades iguais (20  $\mu\text{g}$ ) de proteínas dos homogenatos totais das células foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE seguido de eletroblot em membranas de nitrocelulose. Após bloqueio e lavagem as membranas foram incubadas durante uma noite com os anticorpos primários, lavadas novamente e em seguida foram incubadas com os

anticorpos secundários. A imunodeteção foi feita usando-se o kit de detecção de quimiluminescência (Millipore, USA) para anticorpos secundários acoplados a HRP.  $\beta$ -actina foi usada como controle.

### 3.6 ENSAIOS *IN VIVO*

#### 3.6.1 Animais e grupos experimentais

Para os experimentos de avaliação antitumoral *in vivo* foram utilizados camundongos isogênicos (*Mus musculus*), linhagem Balb-c, machos (com peso entre 20-25 g), obtidos da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI, Itajaí, SC), os quais foram mantidos no Biotério Setorial nº BIO011/BQA/CCB, em número de seis animais por gaiola (425x266x155 mm), em ambiente com temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e luz controladas (com ciclo claro-escuro de 12 horas). Todos os animais foram alimentados com água e ração padronizada *ad libitum*. Para os experimentos os animais receberam, por via intraperitoneal, o inóculo de 200  $\mu$ L de uma suspensão (em salina) de células de tumor ascítico de Ehrlich (TAE) contendo  $5 \times 10^6$  células de tumor/mL.

Os animais foram inicialmente pesados (dia zero), medindo-se também a circunferência abdominal inicial. Os tratamentos começaram 24 h após a inoculação (1º dia) de TAE e foram feitos diariamente, durante 9 dias, com a aplicação intraperitoneal de 50  $\mu$ L dos diferentes tratamentos (cada grupo era formado por doze animais). No décimo dia, os animais foram novamente pesados e medida a circunferência abdominal. De cada grupo utilizou-se seis animais os quais foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical e o líquido ascítico foi retirado para a realização das análises. Os seis animais restantes foram deixados em suas gaiolas, e continuaram a receber ração e água *ad libitum* até que ocorresse a morte, sendo então registrado o tempo de sobrevivência.

##### 3.6.1.1 Tratamentos com micropartículas de VC, VK<sub>3</sub>, VCK<sub>3</sub>

Os protocolos para os tratamentos dos animais com VC, VK<sub>3</sub> e associação VC com VK<sub>3</sub> foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) sendo o Processo cadastrado sob o número: 23080.019983/2010-91.

Os animais dos grupos de tratamento (12 animais/grupo) com as micropartículas com quitosana (E) e os compostos não encapsulados

(NE) foram tratados diariamente com 50  $\mu\text{L}$  dos respectivos tratamentos, intraperitonealmente. Todos os tratamentos foram preparados com dissolução em salina (NaCl 0,9 %).

Os grupos tratados foram denominados: 1) controle normal (sem TAE e tratados com solução salina); 2) controle negativo (com TAE e tratados com solução salina); 3) controle positivo (com TAE e tratados com doxorubicina, antitumoral de referência no tratamento de câncer, na concentração de 1,2 mg/kg); 4) VC (E) = tratado com 100 mg/kg de micropartículas de VC encapsulada com quitosana (E); 5) VC (NE) = tratado com 10 mg/kg de VC não encapsulada (NE); 6) VK<sub>3</sub> (E) = tratado com 10 mg/kg de micropartículas de VK<sub>3</sub> encapsulada com quitosana (E); 7) VK<sub>3</sub> (NE) = tratado com 1 mg/kg de micropartículas de VK<sub>3</sub> não encapsulada com quitosana (NE); 8) VCK<sub>3</sub> (E) = tratado com 100 mg/kg de micropartículas de VCK<sub>3</sub> (10:1) encapsulada com quitosana (E); 9) VCK<sub>3</sub> (NE) = tratado com VCK<sub>3</sub> não encapsulada com quitosana (NE) contendo 10 mg/kg de VC e 1 mg/kg de VK<sub>3</sub> (proporção de 10:1).

Ao final dos tratamentos (10<sup>o</sup> dia) os animais foram novamente pesados e anotaram-se as medidas das circunferências abdominais. Seis animais de cada grupo foram anestesiados, foi feito o deslocamento cervical e coletado o líquido ascítico para as análises. Os seis animais restantes foram observados para a verificação do dia da morte (tempo de sobrevivência).

### 3.6.1.2 Tratamentos com associação de vitamina C e ortovanadato de sódio

Os protocolos de tratamento dos animais com ortovanadato de sódio, vitamina C e associação dos compostos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) sendo o Processo cadastrado sob o número: 23080.018826/2009-24.

Todos os tratamentos foram preparados com dissolução em salina (NaCl 0,9 %) e os animais foram tratados diariamente com 50  $\mu\text{L}$  da solução dos respectivos tratamentos, intraperitonealmente. Os grupos para tratamento (12 animais/grupo) foram denominados: 1) controle normal (sem TAE e tratados com solução salina); 2) controle negativo (com TAE e tratados com solução salina); 3) controle positivo (com TAE e tratados com doxorubicina, antitumoral de referência no tratamento de câncer, na concentração de 1,2 mg/kg/dia); 4) OS = tratado com 18,75 mg/kg de peso/dia de ortovanadato de sódio (equivalente a

43,39 mM de ortovanadato de sódio); 5) VC = tratado com 187,50 mg/kg de peso/dia de vitamina C (equivalente a 445,62 mM); 6) OS / VC = tratado com a associação de ortovanadato de sódio e vitamina C (18,75/187,50 mg/kg de peso) (18,75 mg/kg de peso/dia equivalente a 43,39 mM de ortovanadato de sódio; 187,50 mg/kg/dia de peso de vitamina C equivalente a 445,62 mM).

No dia seguinte ao término do tratamento (10º dia) os animais foram novamente pesados e anotados as medidas de circunferência abdominal. Seis animais de cada grupo foram primeiramente anestesiados e em seguida sacrificados por deslocamento cervical, sendo o líquido ascítico coletado para as análises. Os seis animais restantes foram observados para a verificação do dia da morte (tempo de sobrevivência).

### 3.6.1.3 Avaliação da Variação de Peso

A avaliação da variação de peso dos camundongos foi calculada a partir da observação da diferença entre o peso final (após os nove dias de tratamento) e o peso inicial dos animais (apresentado no dia da inoculação do tumor, dia 0). Os resultados obtidos foram expressos em gramas (GUPTA *et al.*, 2000).

### 3.6.1.4 Avaliação da inibição do crescimento do tumor

Para determinar a inibição do crescimento tumoral (%) foi inicialmente acompanhada a variação da circunferência abdominal (em cm) dos camundongos sendo, em seguida, calculada a diferença entre a medida final (após os nove dias de tratamento) e a medida inicial (medida que os mesmos apresentavam no dia da inoculação do tumor, dia 0) da circunferência abdominal dos animais. Os resultados de inibição do crescimento tumoral foram obtidos conforme a fórmula apresentada a seguir e expressos em percentual de inibição do crescimento do tumor (%) (GUPTA *et al.*, 2000; REBELLO, 2004).

Inibição do crescimento do tumor (%) =  $[(\text{Circ. Abd.}_{(\text{TRAT})} \times 100) / \text{Circ. Abd.}_{(\text{CN})}] - 100$

Circ. Abd.<sub>(TRAT)</sub> = variação da circunferência do grupo tratado

Circ. Abd.<sub>(CN)</sub> = variação da circunferência do controle negativo

### 3.6.1.5 Determinação do volume total de líquido ascítico e volume de células compactadas

Todo o líquido ascítico foi retirado de cada animal e o volume (em mL) foi medido utilizando tubos de centrifuga graduados. Os volumes de células compactadas (em mL) também foram anotados após centrifugação (1000 rpm) por cinco minutos (MAZUMDER *et al.*, 2004).

### 3.6.1.6 Avaliação da viabilidade celular através do método de exclusão do corante Azul de Tripán

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de incorporação do azul de tripan, um corante que só penetra em células mortas, cujas membranas não podem mais excluí-lo. Este fenômeno permite, então, estimar indiretamente o grau de integridade da membrana. O percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular (FRESHNEY, 1999). Após a retirada do líquido ascítico dos animais, a viabilidade celular é determinada em câmara de Neubauer, utilizando-se uma solução constituída por 10 µL do líquido, 890 µL de solução salina e 100 µL do corante azul de tripan (0,4 %). Os resultados foram expressos na proporção de células inviáveis/células viáveis (STROBER, 1996).

### 3.6.1.7 Avaliação do tipo de morte celular *in vivo* por coloração diferencial por brometo de etídio/ laranja de acrinidina

A detecção citológica do tipo de morte celular foi realizada através da coloração com brometo de etídio/ laranja de acrinidina (BE/LA). Este método (BE/LA) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose, tendo como base a revelação de alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas através da fluorescência. As células viáveis apresentam coloração verde enquanto as apoptóticas adquirem coloração alaranjada. Já as células necróticas, coram-se de vermelho intenso (McGAHON *et al.*, 1995).

Para esse ensaio foram usados 200 µL do líquido ascítico retirado dos animais tratados com ortovanadato de sódio, vitamina C e associação de ortovanadato de sódio com vitamina C (nas concentrações de 18,75; 187,50; 18,75:187,50 mg/kg/dia, respectivamente) e com salina (controle negativo) no décimo dia após o início dos tratamentos. Essa técnica também foi usada para avaliar o tipo de morte celular após os tratamentos com as micropartículas de VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> com quitosana e os compostos não encapsulados, da seguinte maneira: 1)

controle normal (sem TAE e tratados com solução salina); 2) controle negativo (com TAE e tratados com solução salina); 3) controle positivo (com TAE e tratados com doxorubicina, na concentração de 1,2 mg/kg/dia); 4) grupo tratado com 100 mg/kg/dia de micropartículas de VC encapsulada com quitosana (E), dissolvida em solução salina; 5) grupo tratado com 10 mg/kg/dia de VC não encapsulada (NE) dissolvida em solução salina; 6) grupo tratado com 10 mg/kg/dia de micropartículas de VK<sub>3</sub> encapsulada com quitosana (E), dissolvida em solução salina; 7) grupo tratado com 1 mg/kg/dia de micropartículas de VK<sub>3</sub> não encapsulada com quitosana (NE), dissolvida em solução salina; 8) grupo tratado com 100 mg/kg/dia de micropartículas de VCK<sub>3</sub> (10:1) encapsulada com quitosana (E), dissolvida em solução salina; 9) grupo tratado com VCK<sub>3</sub> não encapsulada com quitosana (NE) contendo 10 mg/kg/dia de VC e 1 mg/kg/dia de VK<sub>3</sub> (proporção de 10:1), dissolvidas em solução salina.

Após a coleta o líquido foi centrifugado durante 10 minutos com rotação de 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 25 µl de solução salina. Em seguida, 1 µl da solução corante (1:1) de brometo de etídio (100 µg/mL)/acrinidina laranja (100 µg/mL) foi adicionado a cada tubo contendo as células (10<sup>6</sup>) e uma alíquota dessas células transferida para uma lâmina, coberta com lamínula e em seguida, levadas para o microscópio de fluorescência para observação dos efeitos celulares. Para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas, apoptóticas), foram contadas 300 células de cada amostra (n=3) preparada nas lâminas e posteriormente fotografadas para o registro visual das possíveis alterações (GENG, ZENG, WANG, 2003).

### 3.6.1.8 Avaliação do tipo de morte celular *in vivo* por citometria de fluxo

Foi usado para esse ensaio o líquido ascítico (TAE) retirado da cavidade peritoneal dos animais tratados com ortovanadato de sódio, vitamina C e associação de ortovanadato de sódio com vitamina C (nas concentrações de 18,75; 187,50; 18,75:187,50 mg/kg/dia, respectivamente) e com salina (controle negativo). Para verificação da atividade pró-apoptótica foi utilizada a técnica de citometria de fluxo podendo-se então avaliar o tipo de morte celular induzido pelos tratamentos mencionados nos animais inoculados com TAE através do uso do kit FITC Annexin V Apoptosis Detection (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante.

Para a realização do ensaio foram utilizadas células do TAE, numa densidade de  $10^6$  células as quais foram retiradas dos camundongos no 10º dia após o início dos tratamentos. Inicialmente foi feita contagem celular em uma alíquota de TAE corando-se as células com azul de tripan. Em seguida, uma segunda alíquota de células ( $10^6$ ) foi utilizada para realização do ensaio de citometria de fluxo. Essas células foram lavadas 2 vezes com PBS, ressuspensas em 100  $\mu$ L de tampão de ligação (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ). 100  $\mu$ L desta suspensão de células foram transferidos para o tubo de citometria. Posteriormente, foi adicionado 5  $\mu$ L de anexina V-FITC, seguido de incubação no escuro pelo tempo de 15 min. Então, por fim, foram adicionados 5  $\mu$ L de iodeto de propídio e realizada a análise no citômetro de fluxo. A intensidade de fluorescência da anexina V-FITC e do iodeto de propídio foram mensuradas utilizando um filtro de excitação a 488 nm. Para a calibração do citômetro FACS Calibur (BD), foram utilizados três controles: controle normal (constituído por células não tratadas, a fim de se descontar a autofluorescência emitida pelas mesmas), controle positivo para apoptose (constituído por células tratadas com doxorrubicina na concentração de 1,2  $\mu\text{g/mL}$ ) e controle positivo para necrose (constituído por células não tratadas, porém congeladas em freezer  $-80^\circ\text{C}$  por 20 min.). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software Cell Quest software. O tipo de morte celular induzido pelos tratamentos foi classificado da seguinte maneira: células marcadas apenas com anexina V foram consideradas em apoptose inicial; células marcadas com anexina V e iodeto de propídio foram consideradas em apoptose tardia; já células marcadas apenas com iodeto de propídio foram consideradas necróticas. Os resultados foram expressos como percentual de células em apoptose inicial, apoptose tardia e em necrose.

#### 3.6.1.9 Avaliação do tempo médio de sobrevivência (TMS) e percentual de aumento da longevidade (PAL)

Para determinação do tempo médio de sobrevivência (TMS) observou-se o tempo em dias em que ocorreu a morte dos animais (seis animais por grupo) após a inoculação com o tumor ascítico de Ehrlich seguido dos tratamentos respectivos conforme indicado nos itens (3.6.1.1) e (3.6.1.2).

Os animais do grupo controle normal (sem TAE e tratados com solução salina) foram observados diariamente, durante um período de trinta dias e anotados os dias em que ocorreram as mortes.

Posteriormente foi calculado o tempo médio de sobrevivência (TMS) para cada grupo experimental e o aumento do percentual médio de longevidade (PAL), através das seguintes fórmulas (GUPTA *et al.*, 2000):

$$\text{TMS} = (\text{Dia da 1}^{\text{a}} \text{ morte} + \text{Dia da última morte}) / 2$$

$$\text{PAL} (\%) = [(\text{TMS do grupo tratado} / \text{TMS do grupo controle}) - 1] \times 100]$$

### 3.6.1.10 Indicadores de estresse oxidativo e defesa antioxidante no líquido ascítico

#### 3.6.1.10.1 Conteúdo total de tióis não proteicos (GSH)

Para a determinação de GSH os camundongos Balb/c foram submetidos à inoculação intraperitoneal do tumor ascítico de Ehrlich e tratados respectivamente conforme indicado nos itens (3.6.1), (3.6.1.1) e (3.6.1.2). A concentração de GSH foi determinada em extrato ácido de líquido ascítico a partir da determinação de tióis não proteicos, já que a GSH representa aproximadamente 95 % destes tióis (BEUTLER; DURAN & KELLY, 1963). As amostras de líquido ascítico foram precipitadas com TCA (12 %) nas diluições 1:5 (v/v), homogêneas e em seguida, centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos para a obtenção de extratos ácidos, nos quais, foram imediatamente avaliadas as concentrações de pequenos tióis no sobrenadante. Foram adicionados 0,2 mL de 5,5'- ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB, 2,5 mM) nas cubetas contendo 1,9 mL de tampão fosfato de potássio (80 mM, pH 8,0) e 0,1 mL do sobrenadante do extrato ácido, permitindo assim, após cerca de 2 minutos de reação, a determinação do conteúdo do ânion tiolato (TNB) formado de cor amarela, mensurável espectrofotometricamente em 412 nm. As análises foram feitas em triplicatas e os valores expressos em  $\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$  proteína. O conteúdo de proteínas totais foi determinado espectrofotometricamente pelo método de Bradford (1976), usando soroalbumina bovina para a curva padrão.

#### 3.6.1.10.2 Avaliação da peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS

Camundongos Balb/c foram submetidos à inoculação intraperitoneal do tumor ascítico de Ehrlich e tratados respectivamente conforme indicado nos itens (3.6.1), (3.6.1.1) e (3.6.1.2). Para avaliação dos níveis de peroxidação lipídica as amostras foram preparadas a partir

de líquido ascítico, adicionando-se imediatamente após a coleta 400 µL de líquido tumoral em 1600 µL de ácido fosfórico (1,1 %) contido num tubo *ependorf*, agitando-se vigorosamente durante alguns segundos. Os níveis de peroxidação lipídica no líquido ascítico foram estimados medindo-se a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), cromógeno cereja gerado nesta reação, cujo conteúdo pode ser determinado espectrofotometricamente (532 nm) sendo proporcional ao nível de peroxidação lipídica na amostra (BIRD & DRAPER, 1984). As análises foram realizadas em triplicata e a leitura das amostras foi realizada em dois comprimentos de onda distintos, 532 e 600 nm (HERMES-LIMA; WILLMORE; STOREY, 1995). A absorbância inespecífica de 600 nm foi subtraída da absorbância de 532 nm e foi utilizado para o cálculo o coeficiente de extinção molar de 156 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. A concentração final de TBARS foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{TBARS (nmol} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}) = \{[\text{Absorbância da amostra (A}^{532} - \text{A}^{600}) \cdot 10^3 \cdot 340]/156\} / \text{mg de proteína.}$$

340 = fator de diluição

156 = coeficiente de extinção molar do ácido tiobarbitúrico (156 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

A<sup>532</sup> = comprimento de onda (nm)

A<sup>600</sup> = comprimento de onda (nm)

Os resultados foram expressos em nmol de TBARS/mg de proteína. O conteúdo de proteínas totais foi determinado espectrofotometricamente pelo método de Bradford (1976), usando soroalbumina bovina para a curva padrão.

### 3.6.1.10.3 Avaliação do nível de carbonilação protéica

Camundongos Balb/c foram submetidos à inoculação intraperitoneal do tumor ascítico de Ehrlich e tratados respectivamente conforme indicado nos itens (3.6.1), (3.6.1.1) e (3.6.1.2). Para o preparo da amostra para esse ensaio, coletou-se 200 µL de tumor ascítico e adicionou-se em 800 µL de ácido sulfosalicílico (5 %), agitando-se vigorosamente durante alguns segundos. A medida de dano oxidativo às proteínas por carbonilação foi determinada a partir deste homogenato ácido. Submeteu-se o precipitado à reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 10 mM) e posterior dissolução em guanidina (6,0 M em KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM). As absorbâncias máximas no intervalo de 360 – 370

nm foram medidas e os valores finais do conteúdo de proteínas carboniladas determinados utilizando o coeficiente de extinção molar do DNPH ( $\epsilon = 22000 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em nmol/mg de proteína (REZNICK & PACKER, 1994). O conteúdo de proteínas totais foi determinado espectrofotometricamente pelo método de Bradford (1976), usando soroalbumina bovina para a curva padrão.

#### 3.6.1.10.4 Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

Camundongos Balb/c foram submetidos à inoculação intraperitoneal do tumor ascítico de Ehrlich e tratados respectivamente conforme indicado nos itens (3.6.1) e (3.6.1.2). A avaliação de SOD foi feita apenas no líquido ascítico dos animais tratados com a associação de vitamina C e ortovanadato de sódio.

Para avaliação desta enzima citoprotetiva preparou-se um homogenato imediatamente após a coleta do líquido ascítico, adicionando-se 400  $\mu\text{L}$  de tumor em 1600  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 20 mM, pH 7,4 (0,1 % de Triton e 150 mM de NaCl), agitando-se vigorosamente durante alguns segundos.

A atividade da SOD foi determinada espectrofotometricamente em 480 nm de acordo com o método de Misra e Fridovich (1971), modificado por Boveris *et al* (1983) o qual é baseado na oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0), que forma o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo. A enzima SOD presente na amostra retarda essa formação. Em uma cubeta de plástico (3 mL) foram adicionados o tampão glicina (50 mM, pH 10) a temperatura ambiente e 50  $\mu\text{L}$  da solução de adrenalina (60 mM, pH 2,0) a qual foi mantida em gelo durante o ensaio. Em seguida, observa-se o gráfico com a oxidação da adrenalina expressa pela formação de uma curva ascendente. Agregou-se alíquota de amostra antes que a reação de oxidação terminasse, ou seja, antes do início do decaimento da curva expressa no gráfico. Repetiu-se o ensaio com mais 2 ou 3 alíquotas distintas. A porcentagem de inibição foi calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ inibição} = [(k_2/k_1) - 1].100,$$

Onde  $k_1$  corresponde a porção ascendente da curva de oxidação da adrenalina e  $k_2$  corresponde a porção de inibição, expressa no gráfico, provocada pela SOD presente na amostra.

Para o cálculo seguinte, traçou-se um gráfico de log da porcentagem de inibição (% , eixo y) *versus* alíquota de amostra ( $\mu\text{L}$ , eixo x), e extrapolando 50 % de inibição determinou-se o volume de alíquota correspondente. A curva teve no mínimo 3 pontos. Então,  $1 \text{ U SOD/mg de proteína} = [1/(x \mu\text{L} \cdot 1000 \cdot \text{diluição})] \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$  (MISRA & FRIDOVICH, 1971).

#### 3.6.1.10.5 Avaliação da atividade da enzima catalase (CAT)

Camundongos Balb/c foram submetidos à inoculação intraperitoneal do tumor ascítico de Ehrlich e tratados respectivamente conforme indicado nos itens (3.6.1) e (3.6.1.2). A avaliação de CAT foi feita apenas no líquido ascítico dos animais tratados com a associação de vitamina C e ortovanadato de sódio.

O homogenato para essa análise foi preparado como descrito no item anterior (3.6.1.10.4). Para avaliação da atividade desta enzima foi utilizado o método descrito por Aebi (1984) que quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima presente na amostra. Uma solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) foi preparada, titulada e foi usada como substrato da reação. Em uma cubeta de quartzo, foram colocados 2 mL da solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) e 20  $\mu\text{L}$  de amostra. Após homogeneização, a velocidade de decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi obtida através da medida da absorbância em 240 nm, durante 20 segundos. As amostras foram analisadas em triplicata, sendo os valores expressos em  $\text{mmol de H}_2\text{O}_2 \text{ consumido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$  (AEBI, 1984).

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos *in vitro* foram realizados pelo menos em triplicata, em três dias diferentes enquanto que para os ensaios *in vivo* utilizaram-se grupos de doze animais para cada tratamento. Para as análises estatísticas os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas com o *software GraphPad Prism* versão 4.00. A significância estatística dos resultados foi determinada pelo teste *t* e por análise de variância (ANOVA *one way*) complementada pelo teste de Tukey-Kramer admitindo níveis de significância de no mínimo  $p < 0,05$ .

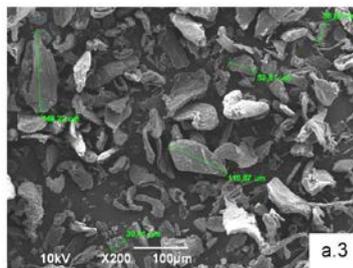
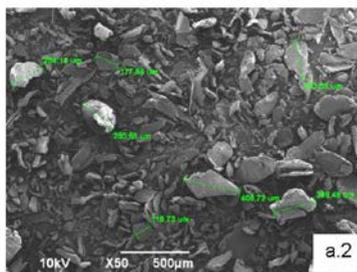
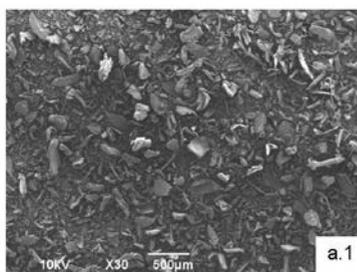
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DA ASSOCIAÇÃO DE VITAMINA C COM VITAMINA K<sub>3</sub> MICROENCAPSULADAS

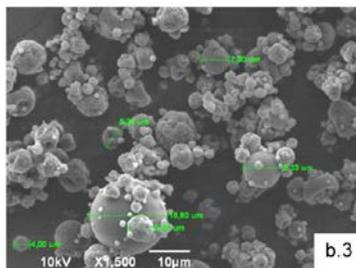
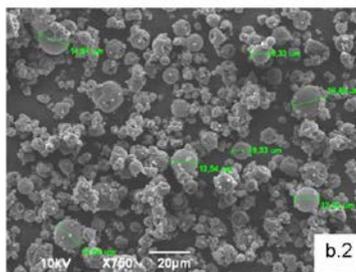
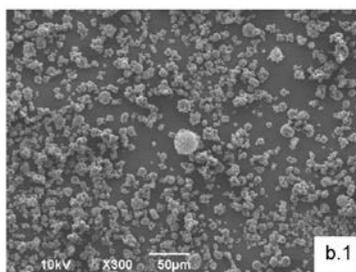
O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito citotóxico e antitumoral dos tratamentos *in vitro* e *in vivo* com vitamina C, vitamina K<sub>3</sub> e a associação destas microencapsuladas ou não com quitosana. Além disso, foi investigada a geração do estresse oxidativo como um possível mecanismo de ação citotóxica e antitumoral da associação.

#### 4.1.1 Caracterização das micropartículas de VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> microencapsuladas

As imagens obtidas por microscopia eletrônica (Figura 7) mostram a morfologia das partículas de quitosana não encapsulada e das micropartículas de VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> encapsuladas com quitosana e preparadas pela técnica de *spray drying*. Observa-se que a amostra de quitosana não encapsulada (Figura 7-a.1; a.2 e a.3) apresenta partículas com formas irregulares diferentes das micropartículas de VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> encapsuladas com quitosana. As micropartículas de VC encapsuladas com quitosana são majoritariamente esféricas sendo que algumas se apresentam em forma de discos côncavos. A maior parte delas apresenta superfície rugosa (Figura 7-b.1; b.2 e b.3). As micropartículas de VK<sub>3</sub> se apresentaram predominantemente na forma de anel (Figura 7-c.1; c.2 e c.3). Já aquelas de VCK<sub>3</sub> também apresentaram formas esféricas ou aproximadamente esféricas (Figura 7-d.1; d.2 e d.3), com aspecto semelhante às micropartículas de VC encapsuladas com quitosana.



(a) Partículas de quitosana não encapsulada



(b) Micropartículas de VC encapsuladas com quitosana

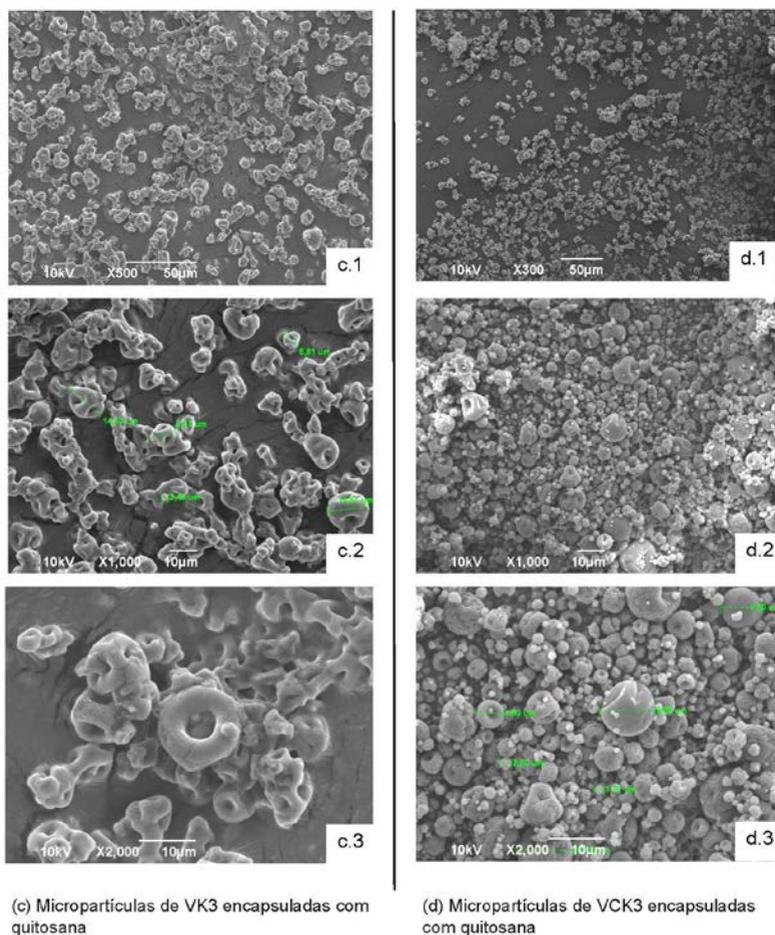


Figura 7 - Fotografias das micropartículas de quitosana não encapsulada e VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> encapsuladas produzidas por *spray drying*. (a.1) Quitosana não encapsulada (aumento 30X); (a.2) Quitosana não encapsulada (aumento 50X); (a.3) Quitosana não encapsulada (aumento 200X); (b.1) VC (E) (aumento 300X); (b.2) VC (E) (aumento 750X); (b.3) VC (E) (aumento 1500X); (c.1) VK<sub>3</sub> (E) (aumento 500X); (c.2) VK<sub>3</sub> (E) (aumento 1000X); (c.3) VK<sub>3</sub> (E) (aumento 2000X); (d.1) VCK<sub>3</sub> (E) (aumento 300X); (d.2) VCK<sub>3</sub> (E) (aumento 1000X); (d.3) VCK<sub>3</sub> (E) (aumento 2000X). MEV, 10 kV.

Os efeitos de diferentes concentrações de quitosana sobre a formação de microesferas por *spray drying* foram avaliados por He *et al*

(1999) e Oliveira *et al.* (2005). No trabalho de Oliveira *et al.* (2005) foi avaliado o efeito das concentrações de 0,5 e 2,5 % de quitosana, em massa sobre a formação de microesferas, com e sem adição do agente de reticulação (D,L-gliceraldeído). Foi mostrado que as soluções com uma concentração mássica de quitosana maiores que 2,5 % eram muito viscosas o que garantiu, durante a atomização, a formação de gotas com tamanho e morfologia controladas (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A morfologia das microesferas de quitosana preparadas pela técnica de *spray drying* também foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) que revelou formas aproximadamente esféricas, independentemente da concentração de quitosana usada em solução aquosa (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por He *et al.* (1999). Nesse trabalho foram preparadas microesferas de quitosana pela técnica de *spray drying* elevando a concentração mássica de quitosana de 0,1 a 0,5 % resultando em um aumento do tamanho médio de partícula. Com este aumento na concentração das soluções de quitosana o diâmetro médio das partículas cresceu de 2,69 para 4,22  $\mu\text{m}$ . Segundo os autores isto provavelmente se deve ao efeito da viscosidade da solução sobre o tamanho das gotas formadas durante a etapa de atomização. Em geral, o tamanho médio das gotas formadas por atomização é proporcional à viscosidade e à tensão superficial o que afeta o tamanho das partículas geradas, sendo uma variável importante no processo de encapsulamento (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

No preparo das micropartículas de VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> pelo método de *spray drying* com quitosana observou-se uma grande variação no tamanho das partículas e, assim, aquelas de VC apresentaram tamanho entre 0,90 a 18,80  $\mu\text{m}$ , as de VK<sub>3</sub> de 2,40 a 14,67  $\mu\text{m}$  e as de VCK<sub>3</sub> entre 0,58 a 1,84  $\mu\text{m}$  (Tabela 1). Portanto, as micropartículas de VCK<sub>3</sub> foram as que apresentaram o menor tamanho de partículas.

É importante notar que as concentrações de quitosana usadas no preparo das micropartículas (ver item 2.2 da Metodologia) foram 0,44 % de quitosana no preparo da solução de VC, 0,16 % no preparo da solução de VK<sub>3</sub> e 0,47 % no preparo da solução contendo a associação VC e VK<sub>3</sub>.

Tabela 1 - Tamanho das micropartículas de quitosana e VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> encapsuladas com quitosana

<i>Micropartículas</i>	<i>Quitosana (concentração em %)</i>	<i>Tamanho (<math>\mu\text{m}</math>)</i>
Quitosana	---	30,41-146,22
VC	0,44	0,90 - 18,80
VK <sub>3</sub>	0,16	2,40 - 14,67
VCK <sub>3</sub>	0,47	0,58 - 1,84

Tendo em vista que a concentração de quitosana usada no preparo das micropartículas foi equivalente à maior concentração usada por He *et al.* (1999) pode-se inferir então que a viscosidade das soluções de quitosana empregada no preparo das micropartículas de VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> usadas nos nossos experimentos foram muito elevadas o que não permitiu a obtenção de partículas menores.

#### 4.1.2 Liberação de vitamina C das micropartículas de VC e VCK<sub>3</sub>

Inicialmente foram realizados ensaios de calibração por CLAE com a vitamina C não encapsulada dissolvida em água ou na fase móvel (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M / H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; EDTA 2 mM; pH 3,0). Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença significativa na detecção da concentração de vitamina C quando a mesma foi solubilizada nestes dois veículos. Na Figura 8 é apresentada a curva padrão determinada com cinco concentrações conhecidas de VC (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5  $\mu\text{g/mL}$ ) em solução aquosa. A equação de regressão calculada foi:  $y = 18,073x + 2,8795$  ( $R^2 = 0,9926$ ), onde  $y$  é a área do pico no cromatograma e  $x$  é a concentração de VC em  $\mu\text{g/ml}$ .

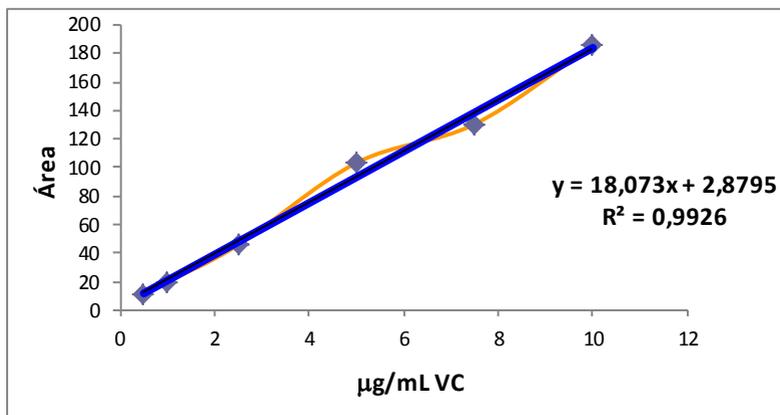


Figura 8 - Representação gráfica da curva de calibração de vitamina C não encapsulada dissolvida em água e a equação da reta. Cada medida representa a média de três repetições (linha amarela) e linha de tendência linear (linha azul).

De maneira semelhante foi feita a avaliação da liberação de vitamina C nas micropartículas de VC, VCK<sub>3</sub> encapsuladas com quitosana, em solução aquosa e fase móvel, em diferentes concentrações de micropartículas (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 µg/mL) após 30 minutos de incubação. Entretanto, se observou que vitamina C era imediatamente liberada quando dissolvida na fase móvel, desta forma todos os ensaios posteriores foram realizados em meio aquoso (Figura 9).

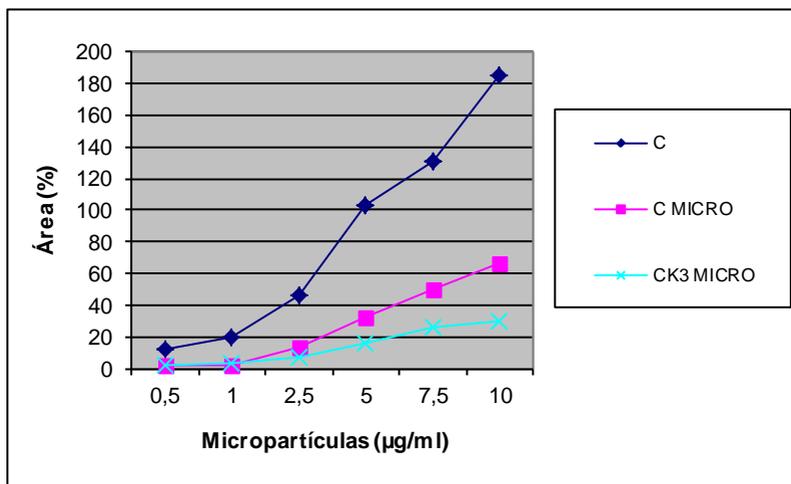


Figura 9 - Representação gráfica das curvas de calibração da vitamina C a partir da liberação desta das micropartículas de VC e VCK<sub>3</sub> encapsuladas, após 30 minutos de incubação. C = vitamina C não encapsulada; C MICRO = micropartículas de quitosana com vitamina C; CK<sub>3</sub> MICRO = micropartículas de quitosana com vitamina C e vitamina K<sub>3</sub>.

Posteriormente o perfil da liberação da vitamina C foi acompanhado durante 24 h (Figura 10). O ensaio de liberação da vitamina C foi feito com 5 µg/mL de cada uma das micropartículas (VC e VCK<sub>3</sub>). Os resultados obtidos indicam que as micropartículas de VC e VCK<sub>3</sub> encapsuladas com quitosana levaram a liberação de vitamina C por um período relativamente longo (maior que 6 h). Como pode ser observado as micropartículas de VC levaram a uma maior liberação da vitamina C quando comparada à liberação de vitamina C nas micropartículas de VCK<sub>3</sub>. Entretanto, é importante notar que o perfil de liberação de vitamina C nas micropartículas de VCK<sub>3</sub> também foi relativamente constante de 5 a 24 h o que poderia significar uma vantagem terapêutica já que se pode teoricamente atingir níveis plasmáticos constantes desta associação sugerindo uma liberação controlada por um maior período de tempo.

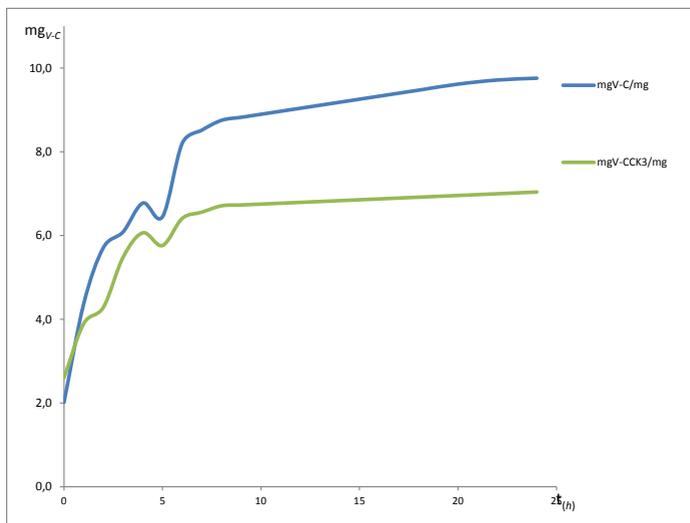


Figura 10 - Representação gráfica da liberação de vitamina C nas micropartículas de VC e VCK<sub>3</sub> durante 24 h. VC = vitamina C; VCK<sub>3</sub> = VC e VK<sub>3</sub>.

Infelizmente por uma questão de disponibilização de equipamento para análise de CLAE e de ajuste de metodologia específica para detecção da vitamina K<sub>3</sub> não foi possível fazer a análise de liberação controlada deste fármaco nas micropartículas.

Quitosana é um polissacarídeo hidrofílico, biocompatível, biodegradável e com baixa toxicidade. Por estas características as microesferas de quitosana têm sido usadas para desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (HEJAZI & AMIJI, 2003).

Desai & Park (2006) analisaram o efeito do peso molecular da quitosana sobre microesferas deste biopolímero preparadas com ligações cruzadas com tripolifosfato (TPP-quitosana) contendo vitamina C. Vários parâmetros do material obtido e também a taxa de liberação foram avaliados. Esse estudo indicou que o peso molecular da quitosana teve notável influência sobre o tamanho, eficiência de encapsulamento, potencial zeta, morfologia de superfície e taxa de liberação das microesferas. O tamanho das partículas aumentou com a elevação do peso molecular da quitosana. Por outro lado, a taxa de liberação de vitamina C diminuiu quando a concentração de quitosana aumentou de 0,5 para 1,0 % (w/v). O espaçamento é maior entre as ligações cruzadas na cadeia polimérica formada por TPP-quitosana quando é usada quitosana de maior peso molecular e o espaçamento é menor quando a

quitosana é de peso molecular menor. Assim os espaçamentos mais longos que ocorrem entre as ligações cruzadas nas microesferas podem ser considerados responsáveis pela taxa de liberação mais lenta da vitamina C das microesferas de quitosana com maior peso molecular (DESAI & PARK, 2006).

Em geral o microencapsulamento com polímeros pode ser feito por impregnação ou por coacervação (PARIZE *et al.*, 2008). As micropartículas de VC, VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> foram preparadas por coacervação, ou seja, as vitaminas foram misturadas com a quitosana (material para o encapsulamento nesse caso) e o ácido cítrico para depois serem atomizadas pelo *spray drying*.

De acordo com Villanova; Oréface; Cunha (2010) os medicamentos podem ser designados de acordo com a forma farmacêutica em três tipos: medicamento tradicional (ou convencional), sistema de liberação de fármacos, e sistema de liberação de fármacos de desempenho terapêutico avançado. Os medicamentos de desempenho terapêutico avançado são fundamentados em micro e nanotecnologia. No tratamento do câncer, por exemplo, é preferível o emprego de transportadores capazes de direcionar seletivamente o fármaco para que seja disponibilizado diretamente nos órgãos, tecidos e células afetados com menor toxicidade (SWARBRICK, 2007).

### **4.1.3 Citotoxicidade in vitro das vitaminas C e K<sub>3</sub> encapsuladas e não encapsuladas**

#### **4.1.3.1 Citotoxicidade da vitamina C microencapsulada não microencapsulada**

Os resultados obtidos com os ensaios de determinação de citotoxicidade após o tratamento das células MCF7 com VC não encapsulada (NE) e VC microencapsulada (E), em diferentes concentrações e tempos estão apresentados na Figura 11. No gráfico pode ser observado que o tratamento com a concentração de 9,6 mM de VC (NE) após 48 h foi o mais citotóxico, sendo o único tratamento que resultou em morte celular maior que 50 %. O tratamento com VC (NE) durante o tempo de 48 h apresentou diferença significativa em relação aos tratamentos com VC (E) 48 h, VC (E) 24 h e VC (NE) 24 h. Observa-se, ainda, que os tratamentos com VC (NE) nas menores concentrações usadas (1,2; 2,4; 4,8 mM) apresentaram apenas pequena diferença entre os valores de viabilidade celular. O tratamento com a concentração de 9,6 mM de VC (NE) mostrou um possível efeito

tempo-dependente, pois a viabilidade celular diminuiu à medida que os tempos de incubação foram aumentando. Os tratamentos com todas as concentrações de VC (E) durante os tempos de 12 e 48 h resultaram em viabilidade celular maior que 80 %. Relata-se ainda que os tratamentos com as concentrações de 1,2; 2,4 e 4,8 mM de VC (E) no tempo de 24 h resultaram em percentual de viabilidade celular maior que a do controle negativo (célula incubada apenas com meio de cultura).

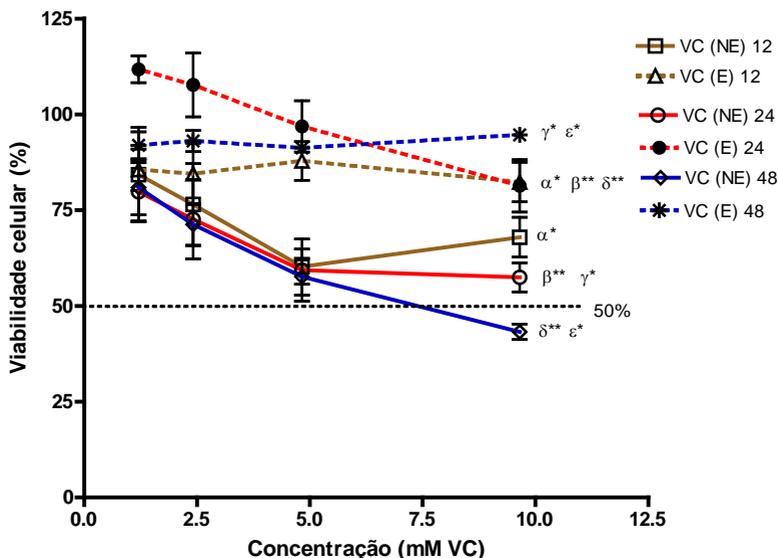


Figura 11 - Efeito sobre a viabilidade celular do tratamento com VC (NE e E) em células MCF7, nos tempos de 12, 24 e 48 h nas concentrações de 1,2 a 9,6 mM de VC. Os resultados estão expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=3. (\*) e (\*\*) representam diferença significativa em nível de  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente. ( $\alpha$ ) representa diferença estatística entre VC (NE) 12 h e VC (E) 24 h; ( $\beta$ ) representa diferença estatística entre VC (NE) 24 h e VC (E) 24 h; ( $\delta$ ) representa diferença estatística entre VC (E) 24 h e VC (NE) 48 h; ( $\gamma$ ) representa diferença estatística entre VC (NE) 24 h e VC (E) 48 h; ( $\epsilon$ ) representa diferença estatística entre VC (NE) 48 h e VC (E) 48 h.

Um resumo das CI50 obtidas com os tratamentos é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores obtidos na determinação de CI50, em células MCF7, resultantes dos tratamentos com VC não encapsuladas (NE) e encapsuladas (E) com quitosana.

<i>Tempo (h)</i>	<i>Concentração de VC (NE) (mM)</i>	<i>Concentração de VC (E) (mM)</i>
12	> 9,65*	> 9,65*
24	> 9,65*	> 9,65*
48	7,61	> 9,65*

\*significa não citotóxico (CI50 >9,65 mM para VC). CI50 determinada por análise de regressão linear, n=3.

Existem vários relatos na literatura sobre a citotoxicidade da vitamina C para células B16 de melanoma murino (tratamento com 10 mM), células leucêmicas humanas (tratamento com 0,3 mM), neuroblastomas (tratamento com 500 µg/ml = 2,53 mM), células de tumor ascítico, leucemia linfoblástica aguda e carcinoma epidermóide (BENADE *et al.*, 1969; PRASAD *et al.*, 1979; BRAM *et al.*, 1980; PARK *et al.*, 1980; LEUNG *et al.*, 1993; De LAURENZI *et al.*, 1995; KANG *et al.*, 2005).

Verrax e Calderon (2009) relataram que a exposição a diferentes concentrações (50 µM a 33 mM) de ascorbato de sódio pelo tempo de apenas 2 h, seguida de remoção da vitamina e incubação em meio de cultura pelo tempo de 48 h, apresentou citotoxicidade em células MCF7 após avaliação pelo ensaio de MTT, sendo a menor viabilidade celular observada de 20 % e a CI50 encontrada foi 4,5 mM.

Chen *et al.* (2005) também testaram o efeito de concentrações de ascorbato de sódio (0,1 a 20 mM) em células MCF7, neste caso após o tratamento as células foram lavadas com PBS e incubadas por um período de 24 h somente em meio de cultura. A viabilidade celular também foi avaliada pelo método do MTT e obteve-se CI50 para a linhagem MCF7 de 3,0 mM.

Em 2008, Chen *et al.* publicaram outro trabalho onde 43 linhagens de células tumorais e 5 de células normais foram tratadas com ascorbato de sódio por até 2 h. As CI50 foram determinadas e encontrou-se valores de CI50 menores que 10 mM para 75 % das linhagens tumorais testadas, não sendo observada citotoxicidade evidente para as células normais testadas.

A ocorrência de viabilidade celular maior que 100 % foi relatada no tratamento com vitamina C (0,1-1 mM ascorbato por 2 h) em células TLT e HepG2 por Verrax & Calderon (2009). Nossos dados também

demonstraram que alguns tratamentos com VC apresentaram valores de viabilidade celular maiores que 100 % (Figura 11). Isso ocorreu nos tratamentos com VC (E) com as concentrações de 1,2; 2,1 e 4,2 mM (tempo de 24 h) e com a concentração de 9,6 mM (tempo de 48 h).

Tomasetti *et al* (2010) demonstraram que células PC3 (câncer de próstata) foram resistentes ao tratamento durante 24 h com VC em concentrações de 0,1-3,2 mM. Nesse trabalho a CI50 calculada foi maior que 3,2 mM.

O valor de CI50 determinado pelos autores citados anteriormente é menor que o valor determinado nos experimentos relatados no presente estudo (CI50 = 7,61 mM), no entanto as diferenças entre os resultados poderiam ser justificadas pelos diferentes tipos de tratamento, ou seja, apenas 2 h de incubação com a VC no trabalho de Verrax & Calderon (2009) e Chen *et al.* (2008) enquanto que no presente trabalho os tratamentos com VC (encapsulada e não encapsulada) foram em tempos de incubação de 12, 24 e 48 h.

Comparativamente aos trabalhos anteriormente citados e realizados com ascorbato de sódio (CHEN *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2008; VERRAX & CALDERON, 2009), foi demonstrado que o microencapsulamento da vitamina C com quitosana reduziu a citotoxicidade dos tratamentos. Isso pode ter ocorrido possivelmente pela retenção da vitamina C na parede das micropartículas, não ocorrendo então o efeito pró-oxidante citotóxico esperado da vitamina C.

Tian *et al.* (2009) sintetizaram um complexo de quitosana-vitamina C com maior solubilidade em relação à quitosana sozinha e realizaram a caracterização do mesmo. Os resultados mostraram que houve eliminação do ânion superóxido pelo complexo quitosana-vitamina C e esta atividade foi maior do que com a quitosana sozinha em baixas concentrações (<0,05 mg/ml); no entanto, após o tratamento com concentração maior que 0,1 mg/ml, a eliminação do ânion superóxido foi menor do que com a vitamina C. Segundo Tao *et al.* (2004), os grupos amino e hidroxil ativos na cadeia polimérica são a origem da habilidade quelante da quitosana.

A propriedade quelante poderia também explicar o menor efeito citotóxico observado nos tratamentos com as micropartículas de VC em relação aos resultados publicados pelos autores já mencionados (CHEN *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2008; VERRAX & CALDERON, 2009), uma vez que na maior parte dos tratamentos com micropartículas de VC apenas a maior concentração usada apresentou citotoxicidade sendo, as CI50 determinadas maiores que as já relatadas nestes trabalhos.

Por outro lado, a quitosana é solúvel somente em soluções ácidas diluídas com pH abaixo de 6,0 (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). Além disso, Chen & Hwa (1996) demonstraram que as soluções de quitosana em faixas de pH superiores a 6,5 sofrem reação de precipitação e passam a se apresentar na forma de flocos gelatinosos. A formação de flocos gelatinosos e a dificuldade de solubilização também foram observadas no preparo das soluções para os tratamentos das células MCF7 com as micropartículas de VC e VCK<sub>3</sub> em nossos experimentos devido à maior quantidade de quitosana que está presente nas concentrações usadas dessas micropartículas (0,44 e 0,47 % de quitosana respectivamente nas micropartículas de VC e na associação de VCK<sub>3</sub>). Além disso, talvez por que as soluções foram preparadas diretamente em meio de cultura. A solubilidade das micropartículas com VK<sub>3</sub> foi ligeiramente melhor, pois as concentrações usadas de micropartículas de VK<sub>3</sub> foram também menores, bem como apresentam menor quantidade de quitosana (0,16 % de quitosana).

Tem sido relatado que conjugados de alguns tipos de agentes antineoplásicos com quitina e derivados de quitosana mostram bons efeitos antitumorais com uma diminuição dos efeitos secundários sobre a forma original não conjugada devido a uma distribuição predominante no tecido tumoral e uma liberação gradual do fármaco a partir dos conjugados (KATO; ONISHI; MACHIDA, 2005).

#### 4.1.3.2 Citotoxicidade da vitamina K<sub>3</sub> encapsuladas e não encapsuladas

Os gráficos de viabilidade celular obtidos após o tratamento de células MCF7 com VK<sub>3</sub> não encapsuladas (NE) e micropartículas de VK<sub>3</sub> encapsuladas (E) com quitosana, em diferentes concentrações e nos tempos estão apresentados na Figura 12. Não foi encontrada diferença estatística significativa na comparação entre os tratamentos com VK<sub>3</sub> (NE e E) durante os tempos de 12, 24 e 48 h.

Apesar dos resultados das análises estatísticas não demonstrarem diferença significativa entre os tratamentos, observou-se que a maior concentração usada (54,31 µM) nos tratamentos com VK<sub>3</sub> (NE) e com micropartículas de VK<sub>3</sub> (E) durante os tempos de 24 e 48 h causou os maiores percentuais de morte celular (> 50 %). Com a segunda maior concentração usada (26,50 µM de VK<sub>3</sub>) obteve-se como resultado da viabilidade celular o percentual menor que 50 % nos tratamentos com VK<sub>3</sub> (NE) e (E) durante o tempo de 48 h, além do tratamento com VK<sub>3</sub> (E) durante 24 h. A maior concentração de 54,31 µM usada no

tratamento com VK<sub>3</sub> (E) durante 12 h causou morte celular de 49 %, enquanto o tratamento com VK<sub>3</sub> (NE) durante 12 h causou 44,43 % de morte celular.

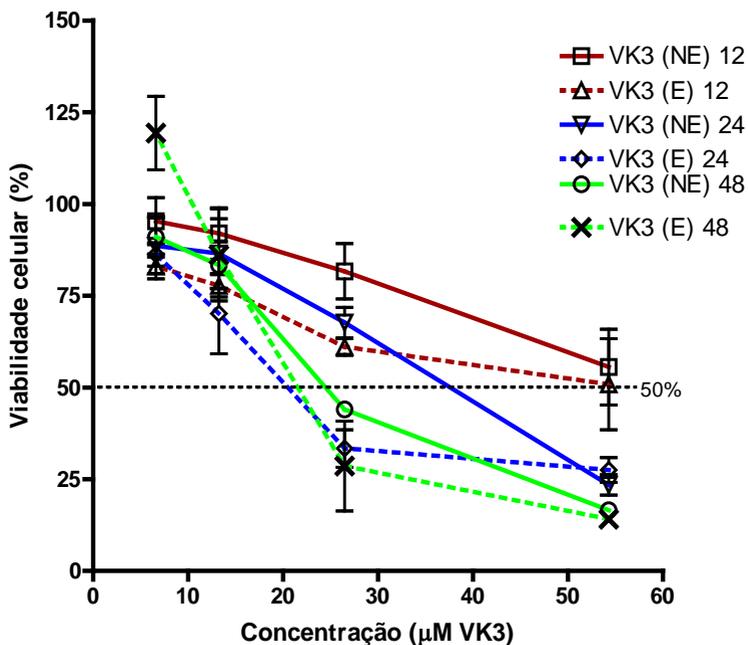


Figura 12 - Efeito sobre a viabilidade celular do tratamento com VK<sub>3</sub> (NE e E) em células MCF7, nos tempos de 12, 24 e 48 h com concentrações de 6,62 a 54,31 µM de VK<sub>3</sub>. Os valores são Média ± Desvio Padrão (n = 3).

Nos casos em que o percentual de morte celular foi menor do que 50 % os valores calculados de CI50 não puderam ser obtidos, pois foram maiores do que a maior concentração usada. É o caso dos tratamentos com a concentração de 54,31 µM durante o tempo de 12 h, nas formas microencapsuladas e não microencapsuladas, podendo-se considerar essas concentrações e esse tempo como não citotóxicos.

A observação dos resultados na Tabela 3 mostra que a CI50 do tratamento das células MCF7 com micropartículas de VK<sub>3</sub> (E) durante 24 h foi a menor CI50 observada (>18,15 µM) sendo este o tratamento mais citotóxico entre todos os tratamentos feitos. Para o tratamento com micropartículas de VK<sub>3</sub> (E) durante o tempo de 48 h encontrou-se o valor de CI50 igual a >30,91µM. A CI50 observada após o tratamento com VK<sub>3</sub> (NE) durante os tempos de 24 e 48 h foi >36,82 µM e 30,62 µM, respectivamente. A partir do exposto e pela análise da Tabela 3 é possível verificar que os tratamentos com VK<sub>3</sub> (NE) no tempo de 48 h, VK<sub>3</sub> (E) no tempo de 48 h e VK<sub>3</sub> (NE) no tempo de 24 h, causaram efeitos citotóxicos semelhantes apresentando CI50 de 30,62 µM, 30,91 µM e 36,82 µM, respectivamente.

Tabela 3 - Valores obtidos na determinação de CI50, em células MCF7, resultantes dos tratamentos com VK<sub>3</sub> não encapsuladas (NE) e encapsuladas (E) com quitosana.

Tempo (h)	Concentração de VK <sub>3</sub> (NE) (µM)	Concentração de VK <sub>3</sub> (E) (µM)
12	> 54,31*	> 54,31*
24	> 36,82	> 18,15*
48	30,62	> 30,91*

\*significa não citotóxico (CI50 > 54,31 µM para VK<sub>3</sub>). CI50 determinada por análise de regressão linear, n=3.

Nutter *et al.* (1992) e Wu *et al.* (1993) relatam o uso de menadiona (VK<sub>3</sub>) como antitumoral e Tomasetti *et al.* (2010) mostraram que células PC3 foram sensíveis ao tratamento com VK<sub>3</sub> em concentrações de 4–5 µM após tratamento de 24 h.

Beck *et al.* (2009) trataram células MCF7 com ascorbato de sódio (1 mM) e bissulfito de menadiona (10 µM) isoladamente e em associação durante 24 h e relataram que não houve citotoxicidade após o tratamento com VK<sub>3</sub> individualmente (10 µM), pois a viabilidade celular manteve-se em 100 %. A concentração de 10 µM usada nesse trabalho foi menor que as concentrações de VK<sub>3</sub> (NE) usadas no presente trabalho (26,50 e 54,31 µM) e que resultaram em morte celular de 66,64 % e 76,56 %, respectivamente, no tempo de 24 h. Comparativamente a esses resultados, observa-se na Tabela 3 que o tratamento com VK<sub>3</sub> (E) pelo tempo de 24 h (CI50 de 18,15 µM) foi mais citotóxico em relação ao tratamento de Beck *et al.* (2009) e em

relação ao tratamento com VK<sub>3</sub> (NE). Esse tratamento resultou na menor CI50 (18,15 µM) de VK<sub>3</sub> (E) observada em nossos experimentos, sendo o tratamento mais citotóxico entre todos os tratamentos feitos.

Akiyoshi *et al.* (2009) verificaram citotoxicidade em células MCF7 após tratamento durante 24 h com VK<sub>3</sub> com avaliação da viabilidade celular pela adição de calceína-M. A VK<sub>3</sub> apresentou citotoxicidade dose-dependente e a CI50 observada foi 14,2 µM que é próxima a CI50 determinada por nós (18,5 µM).

Verificando o efeito de tratamento com VK<sub>3</sub> sobre outros tipos de células, Tomasetti *et al.* (2010) relataram que o tratamento de células PC3 com VK<sub>3</sub> resultou em citotoxicidade dose-dependente observando CI50 de 4 ± 1 µM no tempo de 24 h. A concentração determinada por Tomasetti *et al.* (2010) é menor que a CI50 encontrada com os tratamentos e a concentração de VK<sub>3</sub> (18,5 µM) que causou o maior percentual de morte celular o que caracteriza maior sensibilidade da célula PC3.

#### 4.1.3.3 Citotoxicidade da associação de vitamina C e vitamina K<sub>3</sub> encapsuladas e não encapsuladas

Os gráficos de viabilidade celular obtidos após o tratamento com a associação VCK<sub>3</sub> não encapsulada (NE) e micropartículas de VCK<sub>3</sub> encapsulada (E) com quitosana, em diferentes concentrações e nos tempos de 12, 24 e 48 h são apresentados na Figura 13. Não foi encontrada diferença estatística significativa entre nenhum dos tratamentos com VCK<sub>3</sub> (NE e E), durante os tempos de 12, 24 e 48 h pela análise ANOVA e pelo pós-teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Entretanto, a análise estatística pelo teste *t* mostrou diferença estatística significativa entre os seguintes tratamentos: VCK<sub>3</sub> (E) durante 12 h e VCK<sub>3</sub> (E) durante 48 h (\*\* $p = 0,0080$ ); VCK<sub>3</sub> (NE) durante 12 h e VCK<sub>3</sub> (E) durante 48 h (\* $p = 0,0148$ ); VCK<sub>3</sub> (NE) durante 24 h e VCK<sub>3</sub> (E) durante 48 h (\* $p = 0,0254$ ). Entre todos os demais tratamentos, a análise estatística pelo teste-*t* não mostrou diferença estatística significativa para  $p > 0,05$ .

O tratamento com a associação contendo as concentrações de 9,65 mM de VC e 54,31 µM de VK<sub>3</sub> provocou morte celular maior que 50 % nos tratamentos com VCK<sub>3</sub> (NE) e (E) durante 12 h, VCK<sub>3</sub> (NE) durante 24 h e VCK<sub>3</sub> (E) durante 48 h. O tratamento com VCK<sub>3</sub> (E) durante 24 h apresentou porcentagem de morte celular em torno de 49 %. A segunda maior concentração usada (4,8 mM de VC e 26,50 µM de

VK<sub>3</sub>) também causou morte celular maior que 50 % no caso dos tratamentos com VCK<sub>3</sub> (NE) durante 12, 24 e 48 h. Os tratamentos com as demais concentrações não diminuíram a viabilidade celular abaixo de 50 % em todos os tempos de incubação.

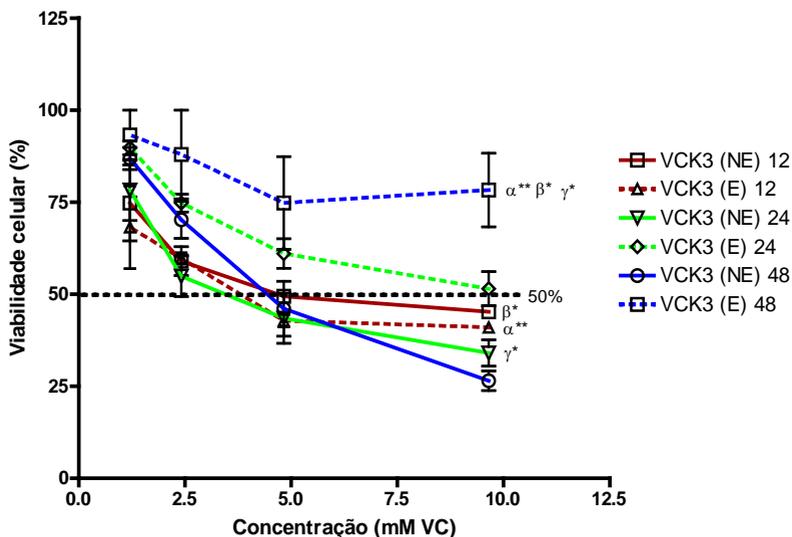


Figura 13 - Efeito sobre a viabilidade celular do tratamento com VCK<sub>3</sub> (NE e E) em células MCF7, nos tempos de 12, 24 e 48 h nas concentrações de 1,2 a 9,6 mM de VC e 6,6 a 54,31  $\mu$ M de VK<sub>3</sub>. Os valores são Média  $\pm$  Desvio Padrão (n = 3). \*P < 0,05 \*\*P < 0,01 representam diferença significativa. ( $\alpha$ ) representa diferença estatística entre VCK<sub>3</sub> (E) 12 h e VCK<sub>3</sub> (E) 48 h; ( $\beta$ ) representa diferença estatística entre VCK<sub>3</sub> (NE) 12 h e VCK<sub>3</sub> (E) 48 h; ( $\gamma$ ) representa diferença estatística entre VCK<sub>3</sub> (NE) 24 h e VCK<sub>3</sub> (E) 48 h.

Observa-se na Tabela 4 que o tratamento com a associação das vitaminas C e K<sub>3</sub> na forma encapsulada com quitosana resultou em CI50 de 5,47 mM em relação às concentrações do tratamento com VC (E) no tempo de 12 h e CI50 de 30,56  $\mu$ M com relação às concentrações de VK<sub>3</sub> (E), também no tempo de 12 h. Os tratamentos de 24 h com a associação de VC e VK<sub>3</sub> não encapsuladas apresentaram CI50 de 5,12 mM em relação à VC e 28,57  $\mu$ M em relação a VK<sub>3</sub>, sendo então mais citotóxico que o tratamento com a associação de VC e VK<sub>3</sub> encapsuladas.

Tabela 4 - Valores obtidos na determinação de CI50, em células MCF7, resultantes dos tratamentos com VCK<sub>3</sub> não encapsuladas (NE) e encapsuladas (E) com quitosana.

Tempo (h)	Vitaminas associadas (VCK <sub>3</sub> mM)			
	VC (NE)	VC (E)	VK <sub>3</sub> (NE)	VK <sub>3</sub> (E)
12	6,89	5,47	38,64	30,56
24	5,12	9,17	28,57	51,58
48	5,61	> 9,65*	31,30	> 54,31*

\*significa não citotóxico (CI50 > 9,65 mM para VC e > 54,31 μM para VK<sub>3</sub>). CI50 determinada por análise de regressão linear.

Existem vários relatos na literatura que demonstram a citotoxicidade dos tratamentos com VC, VK<sub>3</sub> e o efeito sinérgico da associação de VCK<sub>3</sub> não encapsuladas.

Taper *et al.* (1987) relataram que elevadas doses de ascorbato associado a vitamina K<sub>3</sub> resultaram em efeito antitumoral. A partir de então, o potencial terapêutico dessa associação vem sendo estudado, *in vitro* e *in vivo*.

Noto *et al.* (1989) trataram células MCF7 com ascorbato de sódio (VC) e menadiona (VK<sub>3</sub>) separadamente e também em combinação. Nesse trabalho, a administração, separadamente, da VC (10<sup>3</sup> μM) e da VK<sub>3</sub> (10<sup>5</sup> nM) resultou em inibição da proliferação celular somente em altas concentrações, no entanto, a administração combinada das duas vitaminas demonstrou uma inibição sinérgica da proliferação celular em concentrações 10 a 50 vezes mais baixas. A administração das vitaminas separadamente nessas mesmas concentrações não foram citotóxicas.

De acordo com Verrax *et al.* (2004) o tratamento após 24 h de incubação com a associação VCK<sub>3</sub> (em células TLT) nas concentrações de VC (2 mM) e VK<sub>3</sub> (20 μM) causou morte celular concentração-dependente. Da mesma forma que no trabalho de Noto *et al.* (1989), segundo Verrax *et al.* (2004), quando os compostos foram administrados separadamente, os tratamentos com as mesmas concentrações não produziram efeito citotóxico.

Kassouf *et al.* (2006) demonstraram que houve efeito antiproliferativo significativamente maior da associação VCK<sub>3</sub> (nos tratamentos com concentrações de 1,0-2,0 mM de VC e 10-20 μM de VK<sub>3</sub>) em células UC (câncer de próstata) avaliado pelo método de MTT após 48 h de tratamento quando comparado ao observado com cada uma das vitaminas sozinhas.

No trabalho de Beck *et al.* (2009), células MCF7 foram incubadas por 24 h com a combinação VCK<sub>3</sub> (1 mM de VC e 10 µM de VK<sub>3</sub>) e também individualmente com as mesmas concentrações. No ensaio com MTT a viabilidade celular foi reduzida para menos de 30 % após o tratamento com a combinação dos dois compostos (VCK<sub>3</sub>) e os autores relataram que não houve citotoxicidade quando os experimentos foram feitos com os compostos separadamente com as mesmas concentrações (viabilidade celular = 100 %).

Tomasetti *et al.* (2010) relata que o tratamento de células PC3 com a associação VC (0,1–3,2 mM) e VK<sub>3</sub> (1–30 µM) também mostrou um efeito citotóxico sinérgico.

O tratamento com associação de VCK<sub>3</sub> não encapsuladas durante 24 h apresentou CI50 de 5,12 mM em relação à VC e 28,57 µM em relação a VK<sub>3</sub> e o tratamento com a associação VCK<sub>3</sub> encapsuladas durante 12 h apresentou CI50 de 5,47 mM em relação às concentrações do tratamento com VC e 30,56 µM com relação às concentrações de VK<sub>3</sub>, sendo essas concentrações maiores que as observadas nos trabalhos de Beck *et al.* (2009) e Tomasetti *et al.* (2010).

Um dos mecanismos relatados na literatura que poderia explicar o efeito antitumoral da associação VC e VK<sub>3</sub> é a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (AKIYOSHI *et al.*, 2009), particularmente, a geração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como intermediário na formação de ânion superóxido. Esse efeito seria causado pelo ciclo redox entre a VC e VK<sub>3</sub> (VERRAX *et al.*, 2004; BECK *et al.*, 2009). Ainda foi demonstrado por Noto *et al.* (1989) que o efeito inibitório sobre o crescimento celular tumoral foi completamente suprimido após a adição de catalase ao meio de cultura contendo as vitaminas C e K<sub>3</sub>, sugerindo que uma produção excessiva de peróxido de hidrogênio poderia estar implicada no mecanismo de citotoxicidade da associação VCK<sub>3</sub>.

Dessa forma, alguns autores sugerem que a perda da homeostase redox (levando ao estresse oxidativo) induzida pela associação de vitamina C e vitamina K<sub>3</sub> causa morte celular por apoptose, dependendo da dose e do tempo de exposição ao agente oxidante e também do tipo de célula (VERRAX *et al.*, 2009; GLORIEUX, 2011). O estresse oxidativo induzido pelo ciclo redox da associação das vitaminas C e VK<sub>3</sub> supera os sistemas de defesa antioxidantes da célula tumoral levando à morte celular (Figura 3). Essa citotoxicidade é maior quando a vitamina K<sub>3</sub> (menadiona) é associada com ascorbato (VC) na relação 1/100 (VERRAX *et al.*, 2004).

#### 4.1.4 Atividade antitumoral *in vivo* das vitaminas C e K<sub>3</sub> encapsuladas e não encapsuladas

##### 4.1.4.1 Associação VCK<sub>3</sub> encapsulada e não encapsulada

##### 4.1.4.1.1 Concentração de vitaminas C e K<sub>3</sub> nas micropartículas encapsuladas e nos tratamentos realizados

Conforme descrito na metodologia, as micropartículas de VC contém teoricamente 430,1 mg de VC pura em cada 1 g do material encapsulado com VC. As micropartículas de VK<sub>3</sub> (E) contém teoricamente 370,3 mg de VK<sub>3</sub> em cada 1 g do material encapsulado, portanto 66 µg de VK<sub>3</sub> em 10 mg de micropartículas. O tratamento com VCK<sub>3</sub> (E) foi feito com 100 mg/kg de peso de micropartículas. Essa quantidade de micropartículas da associação VCK<sub>3</sub> contém teoricamente 46,66 mg VC e 0,66 mg de VK<sub>3</sub>/ 100 mg VCK<sub>3</sub> (E).

A CLAE determinou 138 mg de VC/1 g de micropartículas de VCK<sub>3</sub>, enquanto o cálculo teórico mostra que há 424,7 mg de VC em 1 g de micropartículas de VCK<sub>3</sub>.

Verrax *et al.* (2004) mostraram a potencialização da ação da vitamina K<sub>3</sub> em associação com vitamina C em uma proporção 1/10; dessa forma os tratamentos que foram administrados *in vivo* nesse trabalho estão na Tabela 5.

Tabela 5 - Relação dos tratamentos administrados para a avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em camundongos previamente inoculados com o TAE.

<i>Tratamento</i>	<i>Concentração utilizada</i>
Vitamina C (E)	100 mg/kg de micropartículas
Vitamina C (NE)	10 mg/kg de VC
Vitamina K <sub>3</sub> (E)	10 mg/kg de micropartículas
Vitamina K <sub>3</sub> (NE)	1 mg/kg de VK <sub>3</sub>
Vitamina CK <sub>3</sub> (E)	100 mg/kg de micropartículas
Vitamina CK <sub>3</sub> (NE)	10 mg/kg:1 mg/kg (VC: VK <sub>3</sub> )

#### *4.1.4.1.2 Avaliação da viabilidade das células tumorais in vivo pelo método de exclusão do corante vital azul de Tripán*

Um dos métodos tradicionais de análise de viabilidade celular é o uso da coloração com corante de exclusão azul de tripan. O método é usado para determinar o número de células viáveis presentes em uma suspensão baseado no princípio de que as células vivas possuem membranas celulares intactas que excluem certos corantes como o azul de tripan, enquanto as células mortas não o fazem, mostrando-se então coloridas.

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular com o corante azul de tripan em amostras de líquido ascítico coletadas de camundongos Balb/c inoculados com tumor ascítico de Ehrlich e tratados por nove dias com VC (E), VC (NE), VK<sub>3</sub> (E), VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (E), VCK<sub>3</sub> (NE), salina (controle negativo) e doxorubicina (1,2 mg/kg/dia, controle positivo) nas quantidades indicadas na Tabela 5.

Estes resultados indicam que todos os tratamentos apresentaram uma diminuição significativa ( $p < 0,005$ ) no volume de líquido ascítico e no número de células viáveis quando comparados com os resultados dos animais tratados com NaCl 0,9 % (controle negativo). Por outro lado, o único tratamento que resultou em aumento significativo do número de células inviáveis foi o tratamento com VK<sub>3</sub> (NE), onde se observa um aumento significativo na contagem de células tumorais mortas (inviáveis) em relação às vivas (viáveis), quando comparados ao controle negativo. Isso também está demonstrado quando se observa a proporção de células inviáveis e viáveis. Esses resultados indicam uma ação antitumoral da VK<sub>3</sub>.

Tabela 6 - Avaliação da viabilidade das células tumorais pelo método de exclusão do corante azul de tripan em tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6$  / 200  $\mu\text{L}$  / animal) inoculadas em camundongos Balb/c por via intraperitoneal e posteriormente tratados durante nove dias com: doxorrubicina (1,2 mg/kg/dia, controle positivo); salina (controle negativo); VC (E) 100 mg/kg/dia, VC (NE) 10 mg/kg/dia, VK<sub>3</sub> (E) 10 mg/kg, VK<sub>3</sub> (NE) 1 mg/kg/dia, VCK<sub>3</sub> (E) 100 mg/kg/dia e VCK<sub>3</sub> (NE) 10:1 mg/kg/dia.

<i>Tratamento</i>	<i>Vol. Líquido ascítico</i>	<i>Céls. inviáveis</i>	<i>Céls viáveis</i>	<i>Proporção I/V</i>
Controle Positivo	NA	NA	NA	NA
Controle Negativo	11,0±0,7	2,0±1,1	172,5±33,6	0,01±0,01
VC (E) (100 mg/Kg)	7,4±0,6 <sup>****</sup>	1,3±0,9	99,5±29,5 <sup>****</sup>	0,013±0,03
VC (NE) (10 mg/Kg)	5,0±2,1 <sup>****</sup>	1,5±0,5	103,6±30,5 <sup>****</sup>	0,014±0,02
VK <sub>3</sub> (E) (10 mg/kg)	6,5±1,4 <sup>****</sup>	0,6±0,1	66,8±30,6 <sup>****</sup>	0,01±0,003
VK <sub>3</sub> (NE) (1 mg/kg)	6,1±1,6 <sup>****</sup>	11,0±7,6 <sup>****</sup>	108,1±9,2 <sup>****</sup>	0,10±0,07 <sup>****</sup>
VCK <sub>3</sub> (E) (100 mg/kg)	6,3±1,2 <sup>****</sup>	3,6±2,3	96,8±10,7 <sup>****</sup>	0,04±0,03
VCK <sub>3</sub> (NE) (10:1 mg/kg)	6,9±0,5 <sup>****</sup>	0,9±0,5	86,8±11,9 <sup>****</sup>	0,01±0,01

(<sup>\*\*\*\*</sup>), (<sup>\*\*\*\*</sup>) representam diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo para  $p < 0,005$  e  $p < 0,001$ ,  $n=6$ . NA= Não se aplica.

O tratamento dos animais do grupo controle positivo com doxorrubicina (concentração de 1,2 mg/kg/dia) não permitiu o desenvolvimento de tumor, portanto os valores de volume de líquido ascítico, proporção do volume de células pelo volume de líquido ascítico, proporção de células inviáveis e células viáveis não se aplicam (NA) a esse tratamento.

O líquido ascítico é a fonte nutricional direta para as células tumorais e um aumento mais rápido no volume do líquido com o crescimento do tumor poderia ser um meio para satisfazer os requisitos nutricionais das células tumorais (PRASAD & GIRI, 1994). Dessa forma, o desenvolvimento de menor volume de líquido ascítico demonstra o provável efeito antitumoral dos tratamentos.

Para avaliação dos efeitos citotóxicos de ascorbato de sódio em linhagens celulares de neuroblastoma foi avaliada a sobrevida celular

através da contagem do número de células (CAROSIO *et al.*, 2007) pelo método de exclusão com azul de tripan. Foi observado que concentrações menores do que 2 mM causaram diminuição de 50 % na sobrevivência celular após 24 h de tratamento. Suzuki *et al.* (1998) avaliaram o crescimento celular *in vitro* do tratamento de ascorbato de sódio e menadiona (VK<sub>3</sub>) em células leucêmicas L5178Y de camundongo. A viabilidade celular foi monitorada pelo método de exclusão com azul de tripan. O efeito dessa associação foi sinérgico, mas depende da faixa de dose e relação usada entre os dois compostos.

#### 4.1.4.1.3 Avaliação do tipo de morte celular pela coloração com brometo etídeo / laranja acrinidina

A capacidade dos diferentes tratamentos *in vivo* com vitamina C e K<sub>3</sub> de induzir a morte celular foi avaliada através do estudo da morfologia das células coradas com laranja de acrinidina e brometo de etídeo. O método de coloração por brometo de etídeo/laranja de acrinidina (BE/LA) foi usado nessa avaliação de morte celular porque permite diferenciar células viáveis (coradas de verde brilhante) e células em processo de morte por apoptose (coradas de cor laranja) ou necrose (células de cor vermelha). As células são visualizadas para determinação do tipo de morte celular e quantificadas por microscopia de fluorescência (McGAHON *et al.*, 1995; GENG, ZENG & WANG, 2003). A Figura 14 mostra a coloração obtida após a análise por microscopia de fluorescência das células do carcinoma de Ehrlich após os tratamentos com: A) controle negativo (NaCl 0,9 %); B) VC (E) 100 mg/kg/dia; C) VC (NE) 10 mg/kg/dia; D) VK<sub>3</sub> (E) 10 mg/kg/dia; E) VK<sub>3</sub> (NE) 1 mg/kg/dia; F) VCK<sub>3</sub> (E) 100 mg/kg/dia; G) VCK<sub>3</sub> (NE) 10:1 mg/kg/dia. Todos os tratamentos mostraram capacidade de induzir apoptose nas células tumorais (Figura 14) em comparação com o controle negativo. As células tratadas com salina (controle negativo) apresentaram 88,00 ± 0,9 % de células viáveis. O efeito pró-apoptótico produzido foi maior após os tratamentos com VK<sub>3</sub> (NE), seguido do tratamento com a VCK<sub>3</sub> (E) e VK<sub>3</sub> (E) os quais resultaram em 52, 39 e 36 % de células apoptóticas (inviáveis) (Figura 14).

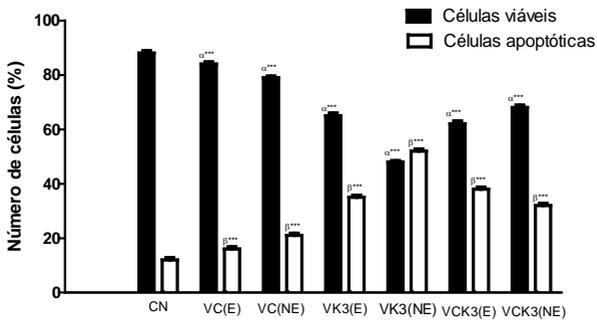
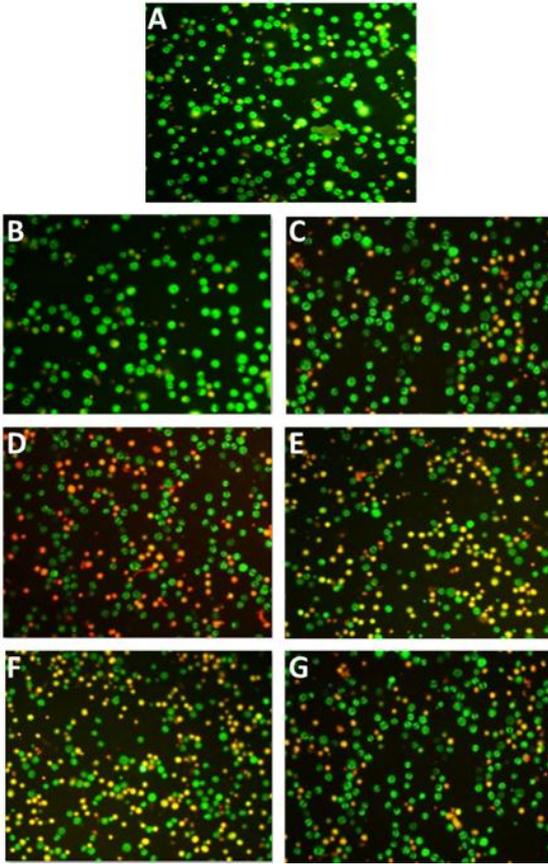


Figura 14 - Avaliação do tipo de morte celular com a coloração de brometo de etídeo/laranja acrinidina em células de tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}/\text{animal}$ ) inoculadas em camundongos Balb/c por via intraperitoneal e posteriormente tratados durante nove dias com: A) NaCl 0,9 % (controle negativo); B) VC (E) 100 mg/kg/dia; C) VC (NE) 10 mg/kg/dia; D) VK<sub>3</sub> (E) 10 mg/kg/dia; E) VK<sub>3</sub> (NE) 1 mg/kg/dia; F) VCK<sub>3</sub> (E) 100 mg/kg/dia; G) VCK<sub>3</sub> (NE) 10:1 mg/kg/dia. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Desvio padrão (n=3). Número (%) de células viáveis, apoptóticas.  $\alpha^{***}P < 0,001$  representa diferença estatística significativa no número de células viáveis em relação ao grupo controle negativo (n=6).  $\beta^{***}P < 0,001$  representa diferença estatística significativa no número de células apoptóticas em relação ao grupo controle negativo.

Vários autores demonstraram que a citotoxicidade após o tratamento com vitamina C leva à morte celular por apoptose, o que pode ocorrer através de diferentes mecanismos em diferentes tipos de células. O tratamento com 10 mM de vitamina C durante 4 h induziu apoptose em células B16 de melanoma murino (KANG *et al.*, 2005). Altas concentrações de vitamina C induziram morte celular apoptótica em varias linhagens tumorais, incluindo carcinoma escamoso oral e tumor de glândula salivar. Por outro lado, a vitamina K<sub>3</sub> também induz apoptose em vários tipos de células cultivadas pela elevação de peróxido e radicais superóxido (SAKAGAMI *et al.*, 2000). A habilidade do ascorbato para matar células tumorais através da geração de peróxido de hidrogênio tem sido confirmada em vários estudos *in vitro* (BRAM *et al.*, 1980; LEUNG *et al.*, 1993; BENADE *et al.*, 1969; RIORDAN *et al.*, 1995).

#### 4.1.4.1.4 Avaliação morfofisiológica

O efeito de inibição do crescimento do tumor foi avaliado pela medida de variação de peso corporal (g), redução na medida da circunferência abdominal (%), inibição do crescimento tumoral, tempo médio de sobrevivida em dias (TMS) e aumento de percentual de longevidade (PAL) observados após inoculação em camundongos Balb/c (n=12) com tumor ascítico de Ehrlich e tratados com VC (E), VC (NE), VK<sub>3</sub> (E), VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (E), VCK<sub>3</sub> (NE) durante nove dias, nas quantidades indicadas na Tabela 5.

Da mesma forma foram avaliados animais sem inoculação de TAE e aos quais foi administrado solução salina (controle normal), animais inoculados com TAE (n=12) e tratados somente com solução salina (controle negativo), e outro grupo (n=12) tratado com solução de

doxorrubicina (concentração de 1,2 mg/kg/dia de peso do corpo, controle positivo). Esses resultados estão apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9.

#### *4.1.4.1.4.1 Efeito sobre a variação de peso corporal*

O desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich causou um rápido desenvolvimento de ascite tumoral nos camundongos que foram inoculados com as células de TAE. Esta ascite leva a um aumento exagerado de peso no animal portador do tumor, além de aumentar também sua circunferência abdominal. Na Tabela 7 estão apresentados os valores referentes à variação de peso do corpo [peso final (g) – peso inicial (g)] e de redução na medida da variação de peso corporal (%) resultantes dos tratamentos com VC (E), VC (NE), VK<sub>3</sub> (E), VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (E), VCK<sub>3</sub> (NE) durante nove dias além, dos resultados observados com doxorrubicina (1,2 mg/kg de peso do corpo/dia) comparativamente aos valores do grupo controle negativo e dos valores referentes aos animais do grupo controle normal.

Tabela 7 - Variação de peso corporal (g) e redução na medida da variação do peso (%) em tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}/\text{animal}$ ) inoculadas em camundongos Balb/c por via intraperitoneal e posteriormente tratados durante 9 dias com: salina (controle normal, CN); (controle negativo, CNEG); doxorubicina (1,2 mg/kg/dia, controle positivo, CP); VC (E) 100 mg/kg/dia, VC (NE) 10 mg/kg/dia, VK<sub>3</sub> (E) 10 mg/kg/dia, VK<sub>3</sub> (NE) 1 mg/kg/dia, VCK<sub>3</sub> (E) 100 mg/kg/dia e VCK<sub>3</sub> (NE) 10:1 mg/kg/dia.

<i>Tratamento</i>	<i>Variação de peso do corpo (g)</i>	<i>Redução na medida da variação do peso (%)</i>
Salina (CN)	$3,3 \pm 0,9$ <sup>α***</sup>	NA
Salina (CNEG)	$11,4 \pm 2,6$	NA
Doxorrubicina (CP)	$2,2 \pm 0,8$ <sup>α***</sup>	$80,7 \pm 6,2$ <sup>β***</sup>
VC (E) (100 mg/kg)	$7,7 \pm 0,5$ <sup>α**</sup>	$32,4 \pm 4,8$ <sup>β**</sup>
VC (NE) (10 mg/kg)	$8,2 \pm 1,6$ <sup>α*</sup>	$28,2 \pm 13,6$ <sup>β**</sup>
VK <sub>3</sub> (E) (10 mg/kg)	$4,9 \pm 1,7$ <sup>α***</sup>	$56,9 \pm 14,9$ <sup>β***</sup>
VK <sub>3</sub> (NE) (1 mg/kg)	$7,0 \pm 2,1$ <sup>α***</sup>	$38,6 \pm 18,3$ <sup>β***</sup>
VCK <sub>3</sub> (E) (100 mg/kg)	$3,8 \pm 1,5$ <sup>α***</sup>	$67,0 \pm 13,5$ <sup>β***</sup>
VCK <sub>3</sub> (NE) (10:1 mg/kg)	$8,8 \pm 1,9$	$24,9 \pm 17,7$ <sup>β*</sup>

Resultados expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão, n = 6. (\*) e (\*\*\*) representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e ( $p < 0,001$ ), respectivamente.  $\alpha$  representa diferença estatística significativa em relação ao controle negativo;  $\beta$  representa diferença estatística significativa em relação ao controle positivo. NA = não se aplica.

O maior efeito antitumoral observado foi obtido com o tratamento com doxorubicina (controle positivo), que é um fármaco antitumoral padrão. Também houve diferença estatística significativa ( $p < 0,001$ ) em relação a variação de peso do corpo (em g) comparando-se os tratamentos com doxorubicina, VK<sub>3</sub> (E), VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (E) com o controle negativo (inoculados com TAE, porém tratados com salina). Os tratamentos que resultaram em menor variação do peso do corpo foram VC (NE) e VCK<sub>3</sub> (NE) comparados ao controle negativo.

Dos tratamentos testados aquele que causou o maior percentual de redução da medida de variação do peso foi o tratamento com VCK<sub>3</sub> (E) com  $66,98 \pm 13,54$  %, seguido do tratamento com VK<sub>3</sub> (E) com  $56,92 \pm 14,95$  %, e VK<sub>3</sub> (NE) com  $38,63 \pm 18,34$  %.

Observando esses resultados, conclui-se que o microencapsulamento e a associação com o tratamento com VCK<sub>3</sub> (E) mostrou maior eficiência na redução da medida de variação percentual do peso, comparando-se com o tratamento sem encapsulamento e com as vitaminas não associadas.

Com relação aos resultados obtidos com os tratamentos dos camundongos, observa-se também (Tabela 7) que houve diminuição percentual significativa no peso corporal (67,0 % e 56,9 %) dos animais tratados com VCK<sub>3</sub> (E) e VK<sub>3</sub> (E). A redução no peso do corpo pode estar relacionada à diminuição do tamanho do tumor e dessa forma pode-se sugerir a atividade antitumoral dos tratamentos.

#### *4.1.4.1.4.2 Avaliação da inibição do crescimento do tumor*

A circunferência abdominal foi usada para inferir o desenvolvimento do tumor ascítico, uma vez que está diretamente relacionada ao tamanho do tumor, tendo sido medida antes da inoculação das células tumorais, e ao final do experimento (10<sup>o</sup> dia). Na Tabela 8 estão apresentados os valores de variação da circunferência abdominal e de inibição do crescimento do tumor (%) resultantes dos tratamentos com VC (E), VC (NE), VK<sub>3</sub> (E), VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (E), VCK<sub>3</sub> (NE) durante nove dias, nas quantidades indicadas na Tabela 3, além dos resultados observados com doxorrubicina (1,2 mg/kg/dia de peso do corpo) comparativamente aos valores do grupo controle negativo e dos valores referentes aos animais do grupo controle normal.

Tabela 8 - Variação da circunferência abdominal e inibição do crescimento tumoral (%) após o tratamento com VC (E), VC (NE), VK<sub>3</sub> (E), VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (E), VCK<sub>3</sub> (NE), controle normal, controle negativo (salina), controle positivo (doxorubicina).

<i>Grupo</i>	<i>Variação da circunferência abdominal (cm)</i>	<i>Inibição do crescimento do tumor (%)</i>
Salina (CN)	0,3 ± 0,1 <sup>α***</sup>	NA
Salina (CNEG)	3,6 ± 0,7	0
Doxorrubicina (CP)	0,3 ± 0,1 <sup>α***</sup>	91,6 ± 3,9
VC (E) (100 mg/kg)	2,4 ± 0,4 <sup>α***</sup>	32,4 ± 4,8 <sup>γ***</sup>
VC (NE) (10 mg/kg)	2,2 ± 0,5 <sup>α***</sup>	28,2 ± 13,6 <sup>γ***</sup>
VK <sub>3</sub> (E) (10 mg/kg)	2,4 ± 0,7 <sup>α***</sup>	40,3 ± 3,7 <sup>γ***</sup>
VK <sub>3</sub> (NE) (1 mg/kg)	1,2 ± 0,6 <sup>α***</sup>	49,9 ± 13,4 <sup>γ***</sup>
VCK <sub>3</sub> (E) (100 mg/kg)	1,2 ± 0,6 <sup>α***</sup>	66,2 ± 11,9 <sup>γ***</sup>
VCK <sub>3</sub> (NE) (10:1 mg/kg)	2,0 ± 0,2 <sup>α***</sup>	43,7 ± 4,5 <sup>γ***</sup>

Resultados expressos em Média ± Desvio Padrão, n = 6. (\*) e (\*\*\*) representam diferença estatística significativa (p < 0,05) e (p < 0,001), respectivamente. (α) representa diferença estatística significativa em relação ao controle negativo; na redução do tumor (γ) representa diferença estatística significativa em relação ao controle positivo. NA = não se aplica.

O tratamento com doxorubicina (p < 0,001) inibiu o crescimento (0,30 ± 0,10 cm) do tumor resultando em medida de variação da circunferência semelhante a do controle normal (0,30 ± 0,10 cm), enquanto houve desenvolvimento acentuado do TAE nos animais inoculados e tratados apenas com salina (3,6 ± 0,7 cm). Comparando-se os animais tratados com micropartículas e controle negativo, verifica-se que houve redução da variação da circunferência abdominal estatisticamente significativa (p < 0,001) nos grupos tratados com VC (E), VC (NE), VK<sub>3</sub> (E), VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (E), VCK<sub>3</sub> (NE).

O tratamento que resultou em maior efeito antitumoral avaliado pela variação da circunferência abdominal foi feito com administração intraperitoneal de VCK<sub>3</sub> (E) seguido pelos tratamentos com VK<sub>3</sub> (NE),

VCK<sub>3</sub> (NE) apresentando, respectivamente em valores de  $1,23 \pm 0,60$ ;  $1,24 \pm 0,55$  e  $2,00 \pm 0,15$  cm.

A avaliação da redução na medida da variação da circunferência abdominal apresentada na Figura 15 caracteriza a inibição do crescimento tumoral (%), indicando a maior inibição no tamanho do tumor de  $66,20 \pm 11,95$  % obtido com o tratamento de VCK<sub>3</sub> (E), na quantidade de 100 mg/kg/dia, e em seguida com os tratamentos com VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (NE), VK<sub>3</sub> (E) respectivamente nas concentrações de 1 mg/kg/dia; 10:1 mg/kg/dia, 10 mg/kg/dia. Esses resultados indicam que o tratamento com as micropartículas de VCK<sub>3</sub> (E) foi o mais eficiente na inibição do crescimento do tumor.

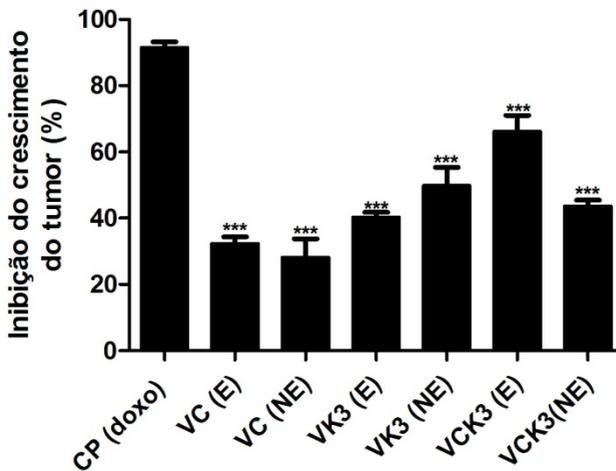


Figura 15 - Efeito na inibição do crescimento do tumor (%) após os tratamentos com VC (E), VC (NE), VK<sub>3</sub> (E), VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (E), VCK<sub>3</sub> (NE), controle positivo (doxorubicina). Resultados expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão (n=6). \*\*\* P < 0,001 representa diferença estatística significativa em relação ao tratamento com doxorubicina (controle positivo).

Assim, resumindo os dados obtidos com as análises cito morfológicas, observa-se que os animais tratados com micropartículas de VCK<sub>3</sub> (E) apresentaram o menor peso ao final do experimento, a menor medida na variação da circunferência abdominal e a maior inibição do crescimento do tumor, indicando a maior atividade antitumoral desse tratamento.

Segundo alguns autores as células tumorais apresentam uma maior atividade glicolítica e maior expressão dos transportadores GLUT, principalmente GLUT1 que também tem a capacidade de captar vitamina C; além disso, são mais suscetíveis ao estresse oxidativo do que células normais (HANAHAN & WEINBERG, 2011; VERRAX et al., 2009). Tendo em vista essas três características foi desenvolvida uma estratégia para matar células tumorais seletivamente. A abordagem é geração de estresse oxidativo induzida pela ação pró-oxidante de ascorbato para diminuir a glicólise. A redução dessa via provoca falha na produção de energia rendendo células tumorais mais sensíveis às associações contendo doses farmacológicas de ascorbato e compostos redox ativos (VERRAX *et al.*, 2009). A vitamina C captada preferencialmente pelas células tumorais reduz compostos redox ativos (VERRAX *et al.*, 2009) tais como a quinona vitamina K<sub>3</sub> levando a um ciclo redox. Esse ciclo redox aumenta a quantidade de espécies reativas de oxigênio intracelulares. As células de câncer exibem um estado redox alterado e o uso de compostos moduladores de oxido-redução pode ser uma abordagem terapêutica com a vantagem da atuação seletiva contra células tumorais (VERRAX *et al.*, 2009). Dentro dessa proposta o tratamento com as micropartículas de VCK<sub>3</sub> encaixa-se no perfil de gerador de espécies reativas de oxigênio com o intuito de matar seletivamente as células tumorais.

#### 4.1.4.1.4.3 *Efeito sobre o tempo médio de sobrevida (TMS) e percentual médio de aumento de longevidade (PAL)*

Na Tabela 9 estão apresentados os valores de tempo médio de sobrevida (dias) após o tratamento com VC (E), VC (NE), VK<sub>3</sub> (E), VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (E), VCK<sub>3</sub> (NE), controle normal, controle negativo (salina), controle positivo (doxorubicina, 1,2 mg/kg/dia de peso do corpo) comparativamente aos valores do controle negativo, além dos valores referentes aos animais do grupo controle normal. O grupo controle normal e o grupo controle positivo (tratado com doxorubicina) apresentaram o tempo médio de sobrevida de 30 dias. Observou-se que o TMS para o grupo controle negativo (CN) foi 13 dias enquanto aumentou para 16; 16; 16,5; 18,5 dias no grupo tratado com VK<sub>3</sub> (E), VCK<sub>3</sub> (NE), VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (E). Esses resultados mostram, então, que a maior atividade inibitória sobre o tumor decorreu do tratamento com doxorubicina seguido pelos tratamentos com micropartículas de VCK<sub>3</sub> (E) na quantidade de 100 mg/kg/dia.

Na Tabela 9 também estão apresentados os valores de percentual médio de aumento de longevidade (PAL, %) resultantes do tratamento com VC (E), VC (NE), VK<sub>3</sub> (E), VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (E), VCK<sub>3</sub> (NE), controle positivo (doxorubicina, 1,2 mg/kg/dia) comparativamente aos valores do controle negativo, além dos valores referentes aos animais do grupo controle normal.

Em relação aos animais inoculados com TAE e tratados somente com salina (controle negativo), o tratamento com 100 mg/kg/dia de micropartículas de VCK<sub>3</sub> (E) resultou no maior aumento percentual do tempo de sobrevida (42,30 %), seguido do tratamento com 10 mg/kg de micropartículas de VK<sub>3</sub> (NE), o qual apresentou 26,92 % de aumento e VK<sub>3</sub> (E) que também aumentou a longevidade em 23,07 %.

Tabela 9 - Tempo médio de sobrevida (TMS) e do percentual de aumento de longevidade (PAL) após o tratamento com VC (E), VC (NE), VK<sub>3</sub> (E), VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (E), VCK<sub>3</sub> (NE), controle normal, controle negativo (salina), controle positivo (doxorubicina).

<i>Grupo</i>	<i>TMS (dias)*</i>	<i>PAL (%)</i>
Controle normal (salina)	30,0	100,0
Controle negativo (salina)	13,0	0
Controle positivo (doxorubicina)	30,0	100,0
Vitamina C (E) (100 mg/kg)	11,5	3,80
Vitamina C (NE) (~10 mg/kg)	14,0	7,70
Vitamina K <sub>3</sub> (E) (10 mg/kg)	16,0	23,07
Vitamina K <sub>3</sub> (NE) (~10 mg/kg)	16,5	26,92
Vitamina CK <sub>3</sub> (E) (100 mg/kg)	18,5	42,30
Vitamina CK <sub>3</sub> (NE) (~100 mg/kg)	16,0	23,10

\*Resultados expressos em média, n=6.

Segundo Orsolic (2005) e Gupta *et al.* (2004) quando PAL (%) for maior que 25 % há um indicativo que o fármaco testado possui uma atividade antitumoral significativa. Isso pode ser observado nos tratamentos com vitamina CK<sub>3</sub> (E) e vitamina K<sub>3</sub> (NE). Desta forma pode-se admitir que o aumento de percentual de tempo de sobrevida é indicativo de um possível efeito antitumoral desses tratamentos.

De acordo com Clarkson & Burchenal (1965) o aumento do tempo de vida de animais tratados é um critério confiável para valorizar

um tratamento antitumoral, o qual pode estar relacionado à diminuição do volume do tumor.

Já foi demonstrado por Beck *et al.* (2010) e Verrax *et al.* (2006) que a associação VCK<sub>3</sub> (1 g/kg de VC:10 mg/kg de VK<sub>3</sub>) reduziu significativamente o crescimento de tumores sólidos de células K562 implantados em camundongos comparativamente aos animais tratados somente com salina (controle).

Assim, os resultados obtidos com esse trabalho mostram que a combinação de VCK<sub>3</sub> (E) teve efeito antitumoral necessitando de avaliação da inibição do crescimento de tumores também na forma sólida.

#### 4.1.4.1.5 Indicadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes

##### 4.1.4.1.5.1 Conteúdo total de tióis não proteicos (GSH) no líquido ascítico

Os dados obtidos na determinação do total de tióis não proteicos (GSH) em amostras de líquido ascítico coletadas dos animais tratados estão demonstrados na Figura 16.

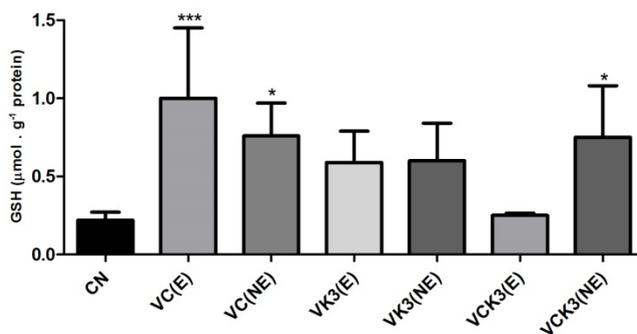


Figura 16 - Conteúdo de tióis não proteicos (GSH) em líquido ascítico de camundongos inoculados com TAE, tratados com: controle negativo (salina), VC (E) 100 mg/kg/dia, VC (NE) 10 mg/kg/dia, VK<sub>3</sub> (E) 10 mg/kg/dia, VK<sub>3</sub> (NE) 1 mg/kg/dia, VCK<sub>3</sub> (E) 100 mg/kg/dia e VCK<sub>3</sub> (NE) 10:1 mg/kg/dia por nove dias. (\*), (\*\*\*) diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo para p < 0,05 e p < 0,001, n = 6.

De acordo com os resultados obtidos, pode se inferir que os tratamentos causaram aumento dos níveis de tióis não proteicos (GSH), quando comparados ao controle negativo, sendo estatisticamente significativos nos tratamentos com VC (E), VC (NE) e VCK<sub>3</sub> (NE).

A glutatona reduzida (GSH) é um antioxidante endógeno e está associada com a eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Na inativação de um agente oxidante ocorre a oxidação de GSH e produção de GSSG. Em condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo que pode ser avaliado pela relação GSSG/GSH (ROVER JÚNIOR; HÖHR; VELLASCO, 2001).

Alguns autores têm relatado uma significativa redução nos níveis de GSH em animais implantados com tumor recebendo tratamento com fármacos antineoplásicos (SUZUKAKE; PETRO; VISTICA, 1982; RICHARDSON & SIEMANN, 1992). Estes autores argumentam que níveis elevados de GSH seriam necessários para sobrevivência do tumor, uma vez que este peptídeo tiólico regula a via de produção anaeróbica de ATP e que a queda na sua concentração poderia significar a morte das células tumorais. Entretanto, os resultados obtidos com o presente trabalho, ao contrário, demonstraram que os tratamentos causaram aumento dos níveis de GSH, quando comparado ao controle negativo.

Levando em conta essa observação, pode-se, então, citar Estrela *et al.* (1992), o qual defende a hipótese de que o tratamento com antineoplásicos elevaria os níveis de GSH nas células do tumor, e a concentração alta de GSH no líquido ascítico seria uma consequência do extravasamento após a morte das células tumorais. Num estudo destes autores foram avaliados os níveis de GSH em líquido de TAE de animais não tratados e se demonstrou que GSH foi consumido (ESTRELA *et al.*, 1992). Resultados diferentes desses foram encontrados por Gupta *et al.* (2004), que estudaram a relação entre atividade antitumoral e papel antioxidante no tumor ascítico de Ehrlich e que também observaram o aumento de GSH nas células de tumor, o qual foi acompanhado de regressão do câncer. Portanto, existe uma controvérsia a respeito dos níveis de GSH e o desenvolvimento ou morte tumoral.

Por outro lado, segundo Benassi *et al.* (2002) a oncoproteína c-myc regula a transcrição de  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetase ( $\gamma$ -GCS), que catalisa a velocidade da primeira etapa limitante na biossíntese de GSH e a exposição a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta a biossíntese de GSH através de c-myc- $\gamma$ -

GCS, causando assim proteção maior contra estresse oxidativo. Levando-se em conta que ocorre um ciclo-redox entre a vitamina C e vitamina K<sub>3</sub> com a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando do tratamento dos animais com a associação destas vitaminas, isso poderia ter causado a ativação de c-myc e  $\gamma$ -GCS, levando ao aumento do conteúdo de GSH nas células.

O tratamento dos animais do grupo controle positivo feito com doxorubicina (1,2 mg/kg), não permitiu o desenvolvimento de tumor, portanto a determinação de tióis não proteicos não se aplicam a este ensaio.

#### *4.1.4.1.5.2 Avaliação da peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS*

Os resultados obtidos com a avaliação dos efeitos dos tratamentos com VC (E), VC (NE), VK<sub>3</sub> (E), VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (E) e VCK<sub>3</sub> (NE) sobre os níveis ascíticos de peroxidação lipídica estão demonstrados na Figura 17.

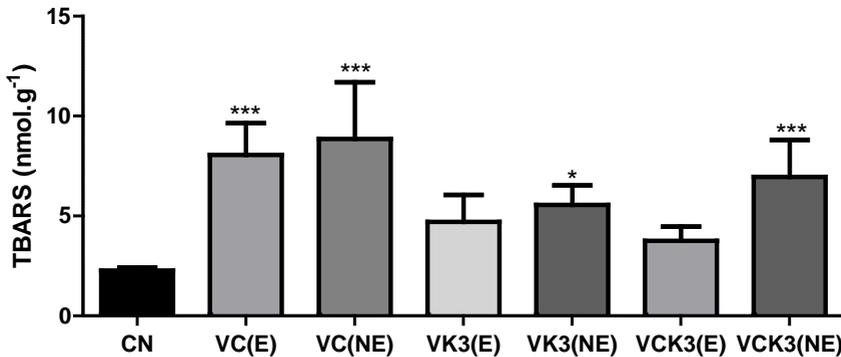


Figura 17 - Níveis de peroxidação lipídica (expressos relativamente como concentração de TBARS) em amostras de líquido ascítico de camundongos portadores de TAE e tratados com: salina (controle negativo, CN), VC (E) 100 mg/kg, VC (NE) 10 mg/kg, VK<sub>3</sub> (E) 10 mg/kg, VK<sub>3</sub> (NE) 1 mg/kg, VCK<sub>3</sub> (E) 100 mg/kg e VCK<sub>3</sub> (NE) 10:1 mg/kg. E = micropartículas encapsuladas com quitosana; NE = vitaminas não encapsuladas.

O ensaio de TBARS avalia os níveis de peroxidação lipídica, ou seja, avalia de forma quantitativa se os lipídios de uma amostra alteraram seu nível de peroxidação devido a uma maior geração de radicais livres e, conseqüentemente, estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001).

A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre lipídios insaturados das membranas celulares, gerando principalmente radicais que levam à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular. Estes eventos podem se constituir em efeitos citotóxicos primários que desencadeiam uma sequência de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas da célula, alterações do DNA e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (VACA; WILHELM; HARMS-RINGDAHL, 1988; BABER; HARRIS, 1994; BENZIE, 1996).

Curiosamente, pela análise dos dados obtidos no presente trabalho, observou-se uma maior peroxidação lipídica no líquido

ascítico de camundongos tratados com VC (E), VC (NE) e associação VCK<sub>3</sub> (NE).

Nutter *et al.* (1992) demonstraram que a vitamina K<sub>3</sub>, através da geração de ânion superóxido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode levar à lipoperoxidação. Outros autores observaram que tratamentos com a associação vitamina C e K<sub>3</sub> resultaram em citotoxicidade em vários tipos de células tumorais em concentrações 10-50 vezes menores do que cada vitamina administrada sozinha (NOTO *et al.*, 1989; TAPER *et al.*, 1987; TAPER *et al.*, 1996; TAPER; KEYEUX; ROBERFROID, 1996). A potencialização da atividade antitumoral foi atribuída à geração de peróxidos, seguida de alteração de lipídios de membrana.

O tratamento de células PC12 com ascorbato aumentou de forma importante o conteúdo de lipoperoxídios. Foi demonstrado, nesse caso, que ascorbato em meio de cultura é rapidamente oxidado a deidroascorbato, e que é transportado para dentro das células pelo transportador GLUT (SONG *et al.*, 2001).

Uma vez que os lipídios nas células são suscetíveis a modificações oxidativas, essa peroxidação lipídica pode levar à formação de radicais lipídicos e vários produtos de decomposição de baixo peso molecular tais como acroleína, malondialdeído e 4-hidroxi-2-nonenal, que são altamente reativos com proteínas, DNA e fosfolipídios (NIKI, 2009). Fosfolipídios oxidados ativam vias de sinalização, levando a respostas inflamatórias ou apoptose (FRUHWIRTH *et al.*, 2007). Através da oxidação dos lipídios celulares, as ERO poderiam induzir dano celular e também diminuir a respiração mitocondrial levando à morte celular por apoptose.

#### 4.1.4.1.5.3 Avaliação do nível de carbonilação proteica

Os resultados obtidos com a avaliação dos efeitos dos tratamentos VC (E), VC (NE), VK<sub>3</sub> (E), VK<sub>3</sub> (NE), VCK<sub>3</sub> (E) e VCK<sub>3</sub> (NE) sobre os níveis ascíticos de carbonilação proteica estão demonstrados na Figura 18.

A carbonilação de proteínas é um marcador importante para caracterização de estresse oxidativo *in vivo*, a partir da detecção da oxidação proteica. A presença de níveis elevados de proteínas oxidadas no líquido ascítico, caracterizadas pela presença de grupos carbonila, indica um estado de estresse oxidativo importante.

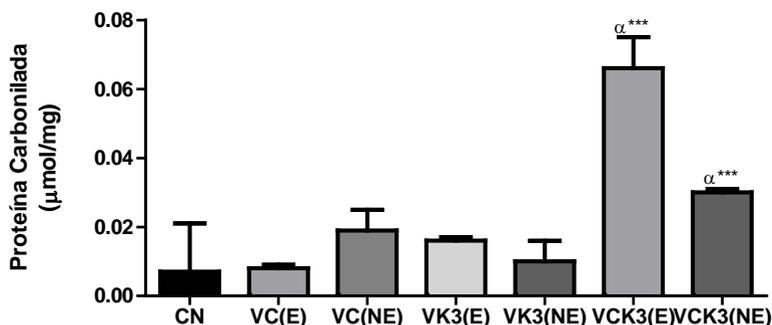


Figura 18 - Nível de carbonilação protéica em líquido ascítico de camundongos inoculados com TAE, tratados com: salina (controle negativo, CN), VC (E) 100 mg/kg/dia, VC (NE) 10 mg/kg/dia, VK<sub>3</sub> (E) 10 mg/kg/dia, VK<sub>3</sub> (NE) 1 mg/kg/dia, VCK<sub>3</sub> (E) 100 mg/kg/dia, VCK<sub>3</sub> (NE) 10:1 mg/kg/dia. Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão (n = 6). α\*\*\* P < 0,001 representa diferença significativa em relação ao controle negativo (CN).

A partir dos dados obtidos foi observado um aumento significativo na concentração de proteína carbonilada decorrente dos tratamentos dos grupos de animais com a associação de VCK<sub>3</sub> (E) e VCK<sub>3</sub> (NE) sugerindo um possível aumento do estresse oxidativo na cavidade ascítica.

Estresse oxidativo ocorre quando espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio sobrecarregam os sistemas de defesas antioxidantes. Isto acontece quando uma mudança no estado redox favorece aumento desproporcional nas espécies reativas ou uma diminuição na defesa antioxidante (STINEFELT *et al.*, 2005). Se as espécies reativas não são eliminadas podem reagir com outros componentes celulares e causar modificação de proteínas (CASTRANOVA, 1994).

A carbonilação de proteínas, a forma mais freqüente de oxidação proteica, pode alterar a estrutura e função das proteínas (DALLE-DONNE *et al.*, 2003).

A inativação de tioredoxina (TRX) e tioredoxina-redutase (TRX redutase), após carbonilação de resíduos de cisteína e selenocisteína do sítio ativo, resulta em alteração da regulação do estado redox e sinalização do estresse (FANG *et al.*, 2006). Além disso, as modificações induzidas por ERO atingem várias outras proteínas que são importantes nos eventos de sinalização celular, incluindo proteínas envolvidas na morte celular ou sobrevivência, por exemplo, Bcl-2 e

outras tais como NF $\kappa$ B, AP-1, H-Ras, MAPK, IP3 kinase, PKC- $\epsilon$ , Ras, p53, HIF-1, ASK-1, caspases, JNK, e p38 MAPK (ENGLAND et al., 2005).

Inicialmente foi estabelecido como objetivo desse trabalho a avaliação da atividade citotóxica, pró-apoptótica e antitumoral da associação das vitaminas C e K<sub>3</sub> microencapsuladas com quitosana. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento mais citotóxico *in vitro* foi o tratamento com vitamina K<sub>3</sub> (E). Os principais resultados obtidos *in vivo* mostraram que todos os tratamentos apresentaram atividade antitumoral com inibição significativa do crescimento do tumor, sendo que o tratamento com VCK<sub>3</sub> (E) resultou na maior redução da variação do peso do corporal dos animais tratados. Além disto, VCK<sub>3</sub> (E) causou o maior percentual de inibição do crescimento do tumor, apresentando também o maior percentual de aumento de longevidade. Na avaliação do estresse oxidativo também o tratamento com VCK<sub>3</sub> (E) causou aumento importante no nível de proteína carbonilada. O percentual de células apoptóticas resultante do tratamento com VCK<sub>3</sub> foi de 38 % enquanto o tratamento com VK<sub>3</sub> (NE) resultou em 52 % de células em apoptose.

Os resultados relativos aos tratamentos com vitamina C e VK<sub>3</sub> microencapsuladas com quitosana foram submetidos à publicação no periódico *BioMed Research International*, (2013) sob o título **Antitumor activity of menadione and ascorbate microencapsulate with chitosan**, tendo recebido o numero de manuscrito 371791.

#### 4.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DA ASSOCIAÇÃO DE VITAMINA C COM ORTOVANADATO DE SÓDIO

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito citotóxico e antitumoral dos tratamentos *in vitro* e *in vivo* com ortovanadato de sódio e associação de ortovanadato de sódio e vitamina C. Além disso, foi investigado preliminarmente *in vitro* e *in vivo* o papel do estresse oxidativo nos mecanismos de ação citotóxica e antitumoral dos referidos tratamentos.

##### 4.2.1 Citotoxicidade de ortovanadato de sódio e da associação de ortovanadato de sódio e vitamina C

Os resultados obtidos com os ensaios de determinação de viabilidade celular (MTT) das células T24 após o tratamento com

ortovanadato de sódio (0,5-5,0  $\mu\text{M}$ ) e com a associação de ortovanadato de sódio (0,5-5,0  $\mu\text{M}$ ) e vitamina C (100  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h estão apresentados na Tabela 10. O ortovanadato causou um aumento do potencial citotóxico para células T24 de acordo com o aumento da concentração, enquanto o tratamento com ortovanadato de sódio a vitamina C não foi citotóxico. Por outro lado, o tratamento com a associação de ortovanadato de sódio e vitamina C resultou em maior citotoxicidade do que o tratamento com ortovanadato de sódio isoladamente, e mostrou um efeito dose-dependente. Além disto, o único tratamento que resultou em morte celular maior que 50 % foi o tratamento com a associação de ortovanadato de sódio e vitamina C na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$ .

Tabela 10 - Valores obtidos na determinação de CI50 ( $\mu\text{M}$ ) em células T24 resultantes dos tratamentos com ortovanadato de sódio (OS) na concentração de 0,5-5,0  $\mu\text{M}$  e associação de ortovanadato de sódio e vitamina C (OS/VC) nas concentrações de 0,5-5,0  $\mu\text{M}$  / 100  $\mu\text{M}$ .

	OS	OS/VC
CI 50	5,8 $\mu\text{M}^*$	3,3 $\mu\text{M}$

\*significa não citotóxico (CI50 > 5,0  $\mu\text{M}$  para o tratamento com ortovanadato de sódio). CI50 determinada por análise de regressão linear, através do *software Microsoft Excel*.

Segundo Gilloteaux *et al.* (1998) a vitamina C pode ser citotóxica devido a atividade redutora de intermediários metabólicos instáveis, como por exemplo, vitamina K<sub>3</sub> (menadiona). A transferência de 1 elétron da vitamina C para um intermediário metabólico leva à redução e formação de peróxido de hidrogênio e outras espécies reativas (VERRAX *et al.*, 2009). De acordo com a proposta deste trabalho, a associação de vitamina C e ortovanadato de sódio poderiam apresentar efeitos semelhantes aos da associação anteriormente citada (vitamina C e K<sub>3</sub>), uma vez que se mantém o padrão pró-oxidante/anti-oxidante que poderia induzir a morte celular tumoral. Os resultados obtidos com o ensaio do MTT indicam uma maior citotoxicidade da associação vitamina C e ortovanadato de sódio.

Sais de vanádio apresentam citotoxicidade contra vários tipos de linhagens tumorais (BERGAMASCHI *et al.*, 1993; CORTIZO *et al.*, 2000). O efeito antitumoral de compostos de vanádio pode ser preventivo por impedir o desenvolvimento de carcinogênese química em animais, porém, além disso, vanádio inibe tirosina fosfatases, mas, no

entanto, também ativa fosforilases podendo atingir várias vias metabólicas que podem levar a morte celular através de apoptose (BISHAYEE *et al.*, 2000; EVANGELOU, 2002). Algumas evidências indicam o possível envolvimento de vanádio em reações redox associadas com geração de ERO, que resultam em parada do ciclo celular na fase G2/M e morte celular (FAURE *et al.*, 1995; SAKURAI, 1994).

Wang *et al.* (2010) observaram efeito citotóxico após 4 h de tratamento com vanadato em células de hepatoma HepG2 com inibição da proliferação celular que foi atribuída a maior geração de espécies reativas de oxigênio.

Cruz, Morgan, Min (1995) demonstraram que ortovanadato em concentrações de 5-10  $\mu\text{M}$  foi citotóxico para células aderentes de astrocitoma humano (HTB14), células hematopoiética suspensas de camundongo (MDAY-D2) e uma linhagem de célula endotelial aderente de camundongo (EOMA). A adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em associação com ortovanadato em células MDAY-D2 potenciou a citotoxicidade do ortovanadato, sugerindo que radical hidroxil ou radicais de vanádio possam estar envolvidos.

#### 4.2.2 Avaliação da proliferação celular

A Figura 19 apresenta os resultados obtidos no ensaio de formação de colônia após a administração de ortovanadato de sódio (2,5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ ) e da associação de ortovanadato de sódio e VC (2,5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  / 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente) em células T24, o que levou à redução da proliferação celular de forma dose-dependente. A proliferação de células do controle negativo começou a ficar evidente como unidades formadoras de colônia a partir do décimo dia após o tratamento. Os tratamentos feitos somente com vitamina C até 100  $\mu\text{M}$  não foram capazes de diminuir a proliferação celular. Por outro lado, os tratamentos com ortovanadato de sódio reduziram a proliferação celular (92 %) e a associação de ortovanadato e VC levou à importante inibição da proliferação celular (99 %), mostrando o aumento do efeito antiproliferativo desta associação.

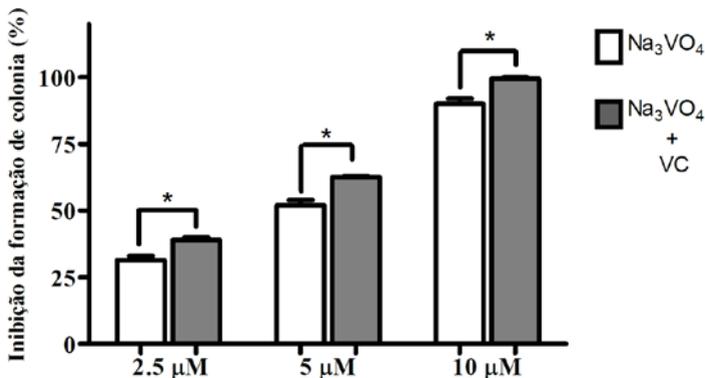


Figura 19 - Efeito do tratamento com ortovanadato de sódio (2,5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ ) e associação de ortovanadato de sódio e VC (2,5  $\mu\text{M}$ -10  $\mu\text{M}$  : 100  $\mu\text{M}$ ) sobre a proliferação de células T24 após 24 h de tratamento e incubação durante dez dias. \*  $P < 0,05$  representa diferença estatística significativa, comparando-se o tratamento com ortovanadato de sódio com relação ao tratamento com a associação entre ortovanadato de sódio e VC ( $n = 3$ ).

Relatos da literatura indicam que compostos de vanádio podem exercer efeito antiproliferativo através da parada do ciclo celular (FAURE *et al.*, 1995; SAKURAI, 1994; RAY *et al.*, 2006). Também foi relatado por Evangelou (2002) que vanádio reduz a proliferação celular e incidência de tumor.

Verrax *et al.* (2009) determinaram a toxicidade de VC 5 mM (ascorbato) em células T24, observando uma diminuição de 99 % no número de colônias. Nesse trabalho também foi demonstrada a importância da presença de metais para a toxicidade do ascorbato e a indução da produção de peróxido de hidrogênio extracelular.

A partir da possibilidade de geração de peróxido de hidrogênio como mecanismo, da citotoxicidade da associação de ortovanadato e VC, procedeu-se a análise da formação de espécies reativas de oxigênio.

#### 4.2.3 Formação de ERO

Tendo em vista o que foi anteriormente relatado por Verrax *et al.* (2009), pode-se sugerir uma hipótese para o papel do vanadato na geração de estresse oxidativo, uma vez que também foi demonstrado por

Sreedhara *et al.* (1996) que o vanadato (V) pode ser reduzido por ascorbato com formação de vanadil (IV).

Da mesma forma, nos experimentos deste trabalho observou-se, conforme indica a Figura 20, que provavelmente houve produção de  $H_2O_2$  após o tratamento com a associação de ortovanadato ( $10 \mu M$ ) e VC ( $100 \mu M$ ), avaliado pela medida do conteúdo de ERO demonstrado pelo teste com DCFH-DA.

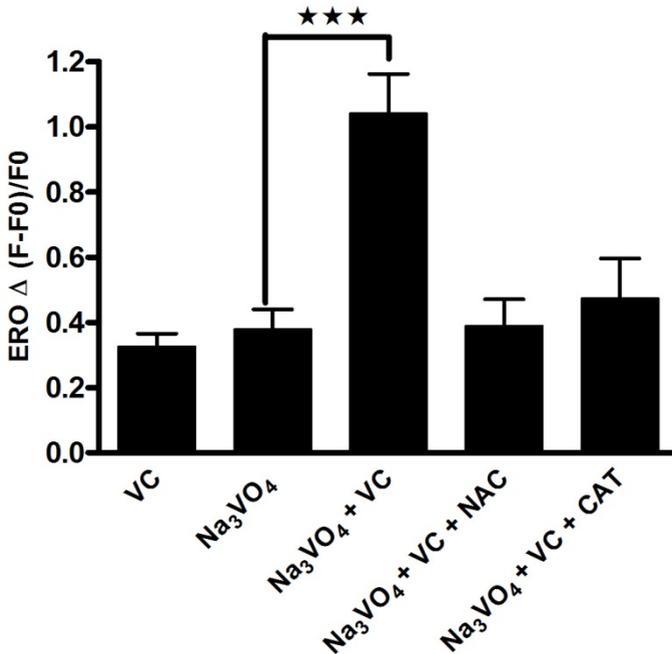


Figura 20 - Efeito do tratamento com ortovanadato de sódio ( $10 \mu M$ ) e associação de ortovanadato de sódio e VC ( $10 \mu M$  :  $100 \mu M$ ) sobre o conteúdo intracelular de ERO em células T24. NAC (N-acetilcisteína,  $3 \text{ mM}$ ) e CAT (catalase,  $100 \text{ U/mL}$ ). \*\*\*  $P < 0,001$  representa diferença estatística significativa comparando-se o tratamento com ortovanadato de sódio em relação ao tratamento com a associação entre ortovanadato de sódio e VC ( $n = 3$ ).

O mecanismo de ação de sais de vanádio pode ser muito complexo, mas algumas evidências indicam que, dentro das células, doadores de elétrons tais como ascorbato reduzem vanádio V e então

induzem geração de ERO. Na Figura 20, os dados sugerem o papel dos radicais livres na toxicidade da associação ortovanadato e VC. É possível verificar que a adição de VC às células tratadas com ortovanadato em cultura aumenta em cerca de 4 vezes o conteúdo intracelular de ERO, enquanto os antioxidantes N-acetilcisteína e catalase causaram diminuição da formação de ERO. De acordo com o relato de Cruz, Morgan, Min (1995) o ortovanadato de sódio (500 µg/camundongo/dia por nove dias) inibiu o crescimento de células tumorais MDAY-D2 e a citotoxicidade aumentou quando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionado, indicando um possível papel deste na geração de estresse oxidativo. Já Zhang *et al.* (2001) mostrou que o efeito de vanadato em células A549 levou à geração de radical hidroxil, peróxido de hidrogênio e ânion superóxido. Além desses trabalhos, o estudo de Huang *et al.* (2000) também mostrou que vanadato induziu apoptose via geração de peróxido de hidrogênio.

#### 4.2.4 Fragmentação do DNA plasmidial

A Figura 21 apresenta os resultados da avaliação da clivagem de DNA plasmidial com base na mobilidade eletroforética deste ácido nucleico e seus fragmentos. A forma intacta FI (barra de cor preta) é predominante no DNA de controle negativo, enquanto que o DNA do controle positivo tratado com EcoRI foi fortemente clivado, apresentando mobilidade alterada e aumentando as formas de FII e FIII (barras de cor branca e cinza, respectivamente). Os dados obtidos indicam que ortovanadato não causou dano ao DNA plasmidial. Não foi observado diferenças no DNA tratado com ortovanadato em comparação com o dos controles negativos. A análise dos resultados indica que considerando este efeito não houve sinergismo entre ortovanadato e ascorbato, porque o efeito de clivagem de DNA dos produtos administrados em conjunto não foi maior do que os efeitos dos produtos administrados separadamente (Figura 21).

Um estudo realizado por Sakurai (1994) indicou que compostos de vanádio induzem clivagem de DNA sem reagir diretamente com o DNA, mas atuando através da maior geração de ERO.

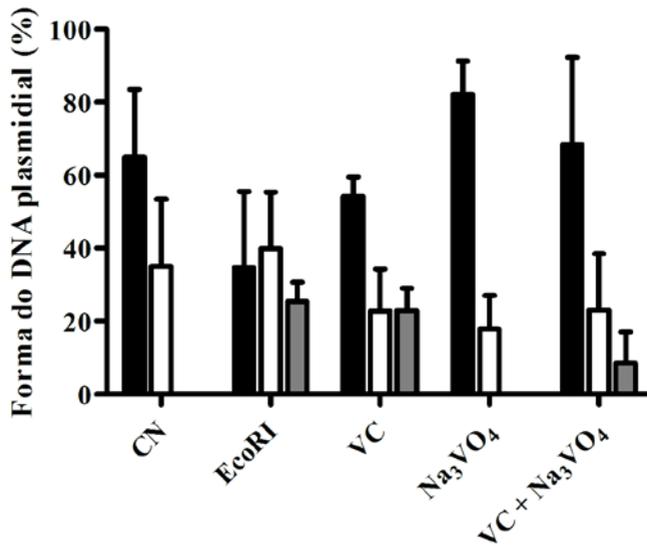


Figura 21 - Efeito de VC (100  $\mu$ M), ortovanadato de sódio (10  $\mu$ M) e da associação de ortovanadato de sódio e VC (10:100  $\mu$ M) sobre o DNA plasmidial após 16 hs de incubação a 50 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN = controle negativo (DNA tratado apenas com o veículo de diluição). EcoRI = controle positivo (DNA tratado como veículo de diluição e enzima de restrição EcoRI 50 kU). Barra de cor preta = FI (forma intacta, não clivada); barra de cor branca = FII (quebra simples); Barra cinza = FIII (quebra dupla).

#### 4.2.5 Expressão de proteínas relacionadas à apoptose

Os genes Bcl-2 e p53 controlam o processo de morte celular por apoptose. A proteína Bcl-2 regula a apoptose na membrana mitocondrial e retículo endoplasmático e também pode atuar sobre canais de cálcio. Proteínas Bcl-2 e Bcl-xL são anti-apoptóticas, enquanto a proteína Bcl-2 associada à proteína X, por exemplo, Bax, Bak ou Bcl-xS são pró-apoptóticas (TAN *et al.*, 2009).

Morita *et al.* (2006) demonstraram que a apoptose mediada por p53 pode ser inibida por ortovanadato de sódio em células SaSO-2 (sarcoma osteogênico) submetidas à radioterapia na tentativa de

minimizar efeitos colaterais graves, demonstrando que atua, nesse caso, como um potente agente rádio protetor. Nesse estudo, o ortovanadato de sódio suprimiu eventos apoptóticos associados a p53 na mitocôndria, incluindo perda do potencial de membrana mitocondrial, mudança conformacional de Bax e Bak, translocação de p53 e interação de p53 com Bcl-2.

No entanto, os nossos resultados demonstraram que ortovanadato induziu apoptose, a qual foi potencializada pela adição de VC, provavelmente por um mecanismo independente de p53. Na Figura 23 pode-se confirmar que p53 não foi alterada pelos tratamentos com VC e ortovanadato. Além disso, também parece claro que o mecanismo de apoptose induzido pelo tratamento com a associação de ortovanadato e VC também não inclui ação sobre o ciclo celular, uma vez que aparentemente as Cdks avaliadas não foram atingidas. Observa-se na Figura 22 que as bandas correspondentes a CDK2 das células tratadas com ortovanadato e/ou ascorbato não mostraram diferenças em relação ao controle.

As quinases dependentes de ciclinas (Cdks, do inglês cyclin-dependent kinases) são um grupo de proteínas chave no controle do ciclo celular, cuja atividade depende da associação com uma subunidade regulatória não catalítica chamada ciclina. O complexo Cdk-ciclina possui uma subunidade catalítica (Cdk) que fosforila proteínas específicas nos resíduos de serina e treonina, e as ciclinas que são as subunidades reguladoras (SATYANARAYANA & KALDIS, 2009; LEE; KIM; JEONG, 2011). O complexo CDK2/Ciclina E é necessário para a progressão da fase G1 a S (MALUMBRES & BARBACID, 2009). O complexo CDK2/Ciclina A mostra importante função imediatamente antes da síntese de DNA (fase S do ciclo celular), fosforilando proteínas específicas envolvidas na replicação do DNA (NEGANOVA *et al.*, 2011). Recentemente, verificou-se que CDK2 também é necessária para o controle do checkpoint G2/M p53-independente (LO; LEE; SUKUMAR, 2012).

Contrariamente aos dados apresentados no presente trabalho, Zhang *et al.* (2002) observaram parada do ciclo celular dependente de p53 para linhagem de células epiteliais humanas de pulmão (A549) com o uso de vanadato através da ativação de p21.

Já o tratamento com a associação ortovanadato e ascorbato claramente inibiu Bcl-xL e ativou Bax (Figura 22). Confirmando nossos resultados, Liu *et al.* (2002) também encontrou diminuição da expressão de Bcl-2 com aumento da apoptose após tratamento com ortovanadato de sódio na linhagem de células linfoblásticas Raji.

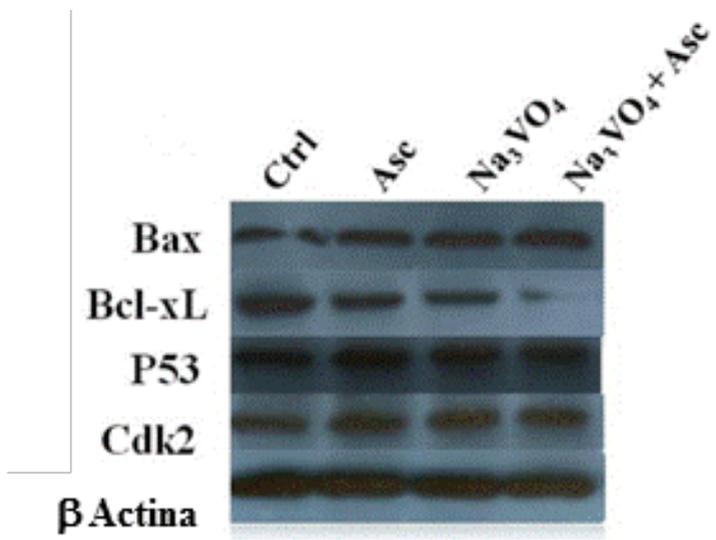


Figura 22 - Efeito do tratamento de células MCF7 durante 6 h com ortovanadato de sódio (5  $\mu$ M) e associação de ortovanadato de sódio (5  $\mu$ M) e VC (1 mM) na expressão das proteínas Bax, Bcl-xL, p53, CDK2 após análise por Western blot.  $\beta$ -actina foi usada como controle para cada linha.

#### 4.2.6 Atividade antitumoral *in vivo*

##### 4.2.6.1 Avaliação morfofisiológica

Na Tabela 11 são apresentados os dados da avaliação morfofisiológica: variação de peso corporal, variação da circunferência abdominal, volume de líquido ascítico, número de células tumorais (células compactadas) obtidos após os tratamentos com ortovanadato de sódio, ascorbato de sódio, associação de ortovanadato de sódio e ascorbato de sódio, controle positivo (doxorrubicina) e controle negativo (salina).

O efeito de inibição sobre o crescimento do tumor foi avaliado e os resultados obtidos mostraram que os tratamentos com ortovanadato de sódio e associação de ortovanadato de sódio e vitamina C reduziram, significativamente, as medidas de variação de peso corporal, variação da circunferência abdominal e volume de líquido ascítico, quando comparados aos animais do grupo controle negativo. Além disso,

quando os resultados foram comparados com o controle negativo, o tratamento com a associação de ortovanadato de sódio e vitamina C também resultou, significativamente, na diminuição do volume de células compactadas do TAE, porém não houve redução significativa após o tratamento com ortovanadato de sódio.

Tabela 11 - Resultados da avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em camundongos Balb/c previamente inoculados por via intraperitoneal com células de tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}/\text{animal}$ ) e posteriormente tratados durante nove dias com: salina (controle negativo); doxorrubicina (1,2 mg/kg/dia, controle positivo); ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia); associação de ortovanadato de sódio e VC (18,75:187,50 mg/kg/dia); VC (187,50 mg/kg/dia).

	<i>Controle negativo</i>	<i>Controle positivo</i>	$\text{Na}_3\text{VO}_4$	$\text{Na}_3\text{VO}_4/\text{VC}$	VC
Varição de peso (g)	11,4 ± 2,6	2,2 ±0,8***	5,7 ±1,2***	4,7 ±0,4***	8,8 ±3,4*
Varição da circunferência abdominal (cm)	3,6 ± 0,7	0,3 ±0,1***	1,6 ±0,4***	0,9 ±0,5***	2,9 ±0,7
Vol. líquido ascítico (mL)	10,9 ± 1,9	NA	7,2 ±0,5***	3,3 ±1,8***	4,5 ±3,1*
Células compactadas (cm <sup>3</sup> )	2,2 ± 0,5	NA	2,3 ±0,5	1,2 ±0,7**	1,9 ±1,3

Os resultados foram expressos em Média ± Desvio padrão (n = 6). \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  representam diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo (teste *t* e ANOVA *one way* complementada pelo teste de Tukey-Kramer). NA = não se aplica.

Nos camundongos inoculados e não tratados (controle negativo), o tumor de Ehrlich (TAE) causou um rápido desenvolvimento de ascite tumoral. Esta ascite causou nos animais portadores de tumor um importante aumento de seu peso e de sua circunferência abdominal (Tabela 11).

O tratamento dos animais do grupo controle positivo feito com doxorrubicina (1,2 mg/kg), não permitiu o desenvolvimento de tumor, portanto os valores de volume de líquido ascítico e células compactadas não se aplicam a este tratamento.

De acordo com Prasad & Giri (1994), o líquido ascítico é fonte nutricional direta para as células do tumor e a observação de um aumento rápido do volume deste líquido, acompanhado pelo crescimento do tumor (volume de células compactadas) pode ser usada como uma ferramenta para avaliar a requisição nutricional das células tumorais.

A redução significativa observada nas medidas de variação de peso do corpo e da variação da circunferência abdominal resultantes da diminuição do volume de líquido ascítico permite, então, sugerir um possível efeito antitumoral do tratamento com ortovanadato de sódio o qual foi potencializado no tratamento com a associação de ortovanadato e ascorbato de sódio.

A Figura 23 demonstra que os tratamentos realizados com ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia), vitamina C (187,50 mg/kg/dia) e associação de ortovanadato de sódio e vitamina C (18,75 :187,50 mg/kg/dia) resultaram em aumento significativo na inibição do crescimento do tumor nos animais portadores de TAE em relação ao controle negativo (considerado como 100 % de tamanho de tumor).

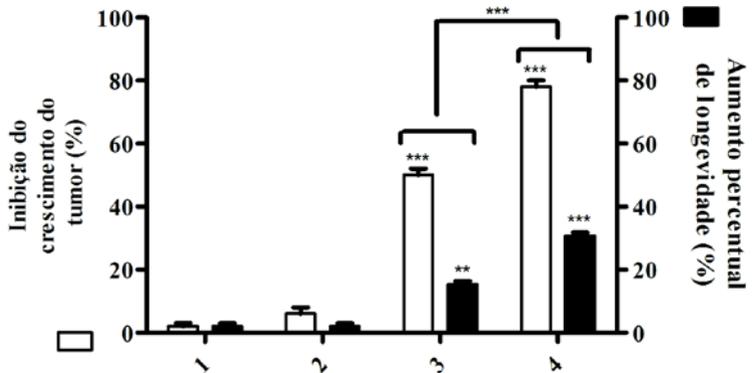


Figura 23 - Resultados da inibição do crescimento do tumor e aumento percentual de longevidade em camundongos Balb/c previamente inoculados por via intraperitoneal com células de tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6/200$   $\mu$ L/animal) e posteriormente tratados durante nove dias com: 1) salina (controle negativo); 2) VC (187,50 mg/kg/dia); 3) ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia); 4) associação de ortovanadato de sódio e VC (18,75:187,50 mg/kg/dia). Barras claras = Inibição do crescimento do tumor; Barras escuras = Aumento do percentual de longevidade (%). Resultados expressos em Média  $\pm$  Desvio padrão (n = 6). \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  representam diferença

estatística significativa em relação ao grupo controle negativo ou entre os tratamentos indicados (teste *t* e ANOVA *one way* complementada pelo teste de Tukey-Kramer).

A partir da observação desses dados, pode-se sugerir que o tratamento com ortovanadato de sódio na concentração de 18,75mg/kg/dia resultou em importante atividade antitumoral, quando comparado ao controle negativo (salina). É importante notar que a adição de VC ao ortovanadato de sódio (187,50:18,75 mg/kg/dia) potencializou o efeito antitumoral quando comparado ao tratamento realizado somente com ortovanadato de sódio.

Os tratamentos com ortovanadato de sódio e associação de ortovanadato de sódio e VC em camundongos com TAE (Figura 23) aumentaram o percentual de longevidade (PAL) comparando-se com os resultados do grupo controle negativo e com o grupo tratado com VC, indicando que esse tratamento resultou em resposta antitumoral efetiva. O maior aumento no tempo de sobrevida ocorreu com o tratamento com a associação ortovanadato de sódio e VC. O aumento do tempo de sobrevida de animais tratados com antitumorais tem sido mencionado como um critério confiável para julgar a atividade de fármacos antitumorais (CLARKSON & BURCHENAL, 1965). O tratamento com a associação ortovanadato de sódio e VC resultou na maior inibição do crescimento do tumor e, por isso, possivelmente levou um maior aumento de tempo de sobrevida (30 %). De acordo com Geran *et al.* (1972), um aumento de tempo de sobrevida maior que 25 % pode ser considerado como resposta efetiva ao tratamento antitumoral. Assim, pode-se inferir levando em conta os resultados obtidos com diminuição do volume de líquido ascítico e inibição do crescimento do tumor causados pelo tratamento com ortovanadato de sódio que estes efeitos podem ter causado o aumento no tempo de sobrevida dos animais, por fim, caracterizando que os tratamentos com a associação ortovanadato e VC, juntamente com o tratamento com ortovanadato de sódio exerceram efeito antitumoral. Os resultados obtidos por Dinget *al.* (1994) mostraram que vanádio (V) pode ser reduzido por ascorbato a vanádio (IV) gerando espécies reativas. Estas espécies reativas podem estar envolvidas na toxicidade celular induzida pelo ortovanadato.

#### 4.2.6.1.1 Avaliação da viabilidade das células tumorais *in vivo* pelo método de exclusão do corante vital azul de Tripán

Os dados apresentados na Tabela 12 indicam que houve aumento no número de células inviáveis nos animais tratados com ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia) e diminuição do número de células viáveis no tratamento com associação de ortovanadato de sódio e vitamina C (18,75:187,50 mg/kg/dia); além disso, observou-se um aumento da relação entre células tumorais mortas (inviáveis) e vivas (viáveis) quando comparados ao controle negativo. Esses resultados também indicam para a possível ação antitumoral do ortovanadato de sódio. Mais uma vez é importante notar que a adição do VC potencializou o efeito antitumoral do ortovanadato de sódio, uma vez que reduziu de forma significativa o número de células viáveis.

Esses resultados confirmam aqueles encontrados por El Naggar et al. (1998), onde o tratamento com vanádio em camundongos com TAE também resultou em diminuição significativa do volume do tumor e da viabilidade celular.

O tratamento dos animais com doxorrubicina (controle positivo) na concentração de 1,2 mg/kg/dia não permitiu o desenvolvimento de tumor, portanto os valores de volume de líquido ascítico, células compactadas, proporção do volume de células pelo volume de líquido ascítico, proporção de células inviáveis em relação às células viáveis não se aplicam (NA) a esse tratamento.

Tabela 12 - Avaliação da viabilidade das células tumorais pelo método de exclusão do azul de tripan em camundongos Balb/c previamente inoculados por via intraperitoneal com células de tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}/\text{animal}$ ) e posteriormente tratados durante nove dias com: salina (controle negativo); doxorrubicina (1,2 mg/kg/dia, controle positivo); ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia); ortovanadato de sódio/VC (18,75:187,50 mg/kg/dia); VC (187,50 mg/kg/dia).

	<i>Controle negativo</i>	<i>Controle positivo</i>	$\text{Na}_3\text{VO}_4$	$\text{Na}_3\text{VO}_4/\text{VC}$	VC
Vol. Cél/Vol. Liq	0,2±0,03	---(NA)	0,3±0,0***	0,4±0,1***	0,4±0,1
CélS inviáveis (x $10^6/\text{mL}$ )	2,0±1,1	---(NA)	15,7±2,8***	1,1±0,6	0,2±0,8
CélS viáveis (x $10^6/\text{mL}$ )	172,5±33,6	---(NA)	485,0±12,7***	83,7±12,8***	156±32,5
Proporção céls I/V	0,01±0,01	---(NA)	0,03±0,02	0,02±0,01	0,01±0,02

Os resultados foram expressos em Média ± Desvio padrão (n = 6). \*\*\*  $P < 0,001$  representa diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo (teste *t* e ANOVA *one way* complementada pelo teste de Tukey-Kramer). NA = não se aplica ao tratamento.

#### 4.2.6.1.2 Avaliação do tipo de morte celular pela coloração com brometo etídeo / laranja acrinidina

Para avaliação do tipo de morte celular foi feita a coloração com brometo de etídeo/ acrinidina laranja. Os resultados da Figura 24 mostram que as células do controle negativo apresentaram o maior percentual de células viáveis (97,67 %), enquanto os tratamentos com VC, ortovanadato de sódio, e associação de ortovanadato de sódio e VC mostraram diminuição do número de células viáveis (96,38; 82,27; 61,22 %). Por outro lado, o número de células apoptóticas foi 3,6; 17,7; 38,7 % respectivamente, após os tratamentos com VC, ortovanadato de sódio, e associação de ortovanadato de sódio e VC. O maior percentual de morte celular por apoptose ocorreu após o tratamento com a associação de ortovanadato de sódio e VC, seguido do tratamento com ortovanadato de sódio. Dessa maneira pode-se sugerir, a partir da Figura 24, que o principal tipo de morte celular induzido pelos tratamentos com a associação ortovanadato e VC e também com ortovanadato individualmente é a apoptose.

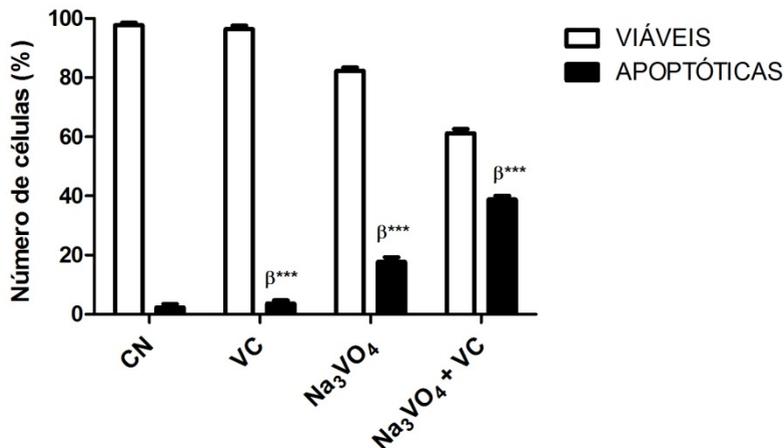


Figura 24 - Tipo de morte celular: número (%) de células viáveis e apoptóticas induzida em células de tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6 / 200 \mu\text{L}/\text{animal}$ ) inoculadas em camundongos Balb/c por via intraperitoneal e posteriormente tratados durante nove dias com: salina (controle negativo); VC (187,50 mg/kg/dia); ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia); associação de ortovanadato de sódio e VC (18,75:187,50 mg/kg/dia). Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Desvio padrão ( $n = 3$ ). \*\*\*  $P < 0,001$  representam diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo.

Tem sido sugerido em vários trabalhos que compostos de vanádio tem a capacidade de induzir morte celular e, dessa forma, tem um potencial promissor para serem usados como agentes antitumorais (EVANGELOU, 2002). Por outro lado, também já foi demonstrado que compostos de vanádio em alguns modelos experimentais inibem apoptose (MORITA *et al.*, 2006; OHI *et al.*, 2006).

#### *4.2.6.1.3 Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo e incorporação de anexina V – FITC e iodeto de propídio*

Para confirmar os dados obtidos no ensaio anteriormente apresentados sobre o tipo de morte celular induzida pelos tratamentos com ortovanadato de sódio, VC, e associação de ortovanadato de sódio e VC nas células do TAE foi feita a análise por citometria de fluxo com anexina V-FITC e iodeto de propídio. Quando as células são marcadas (fluorescência verde) somente com anexina V – FITC (anexina V+) indica apoptose inicial (externalização da fosfatidilserina da membrana celular) e quando as células são marcadas (fluorescência vermelha) com o iodeto de propídio (perda da integridade da membrana celular) indica morte celular por necrose (IP+); além disso, quando as células são marcadas com os dois corantes, temos as células nos estágios finais da apoptose e necrose (anexina V+, IP+). A Figura 25-A mostra o gráfico de pontos obtido após os respectivos tratamentos com a distribuição do percentual das células nos respectivos quadrantes indicativos de viabilidade e do tipo de morte celular (apoptose inicial, apoptose tardia, necrose). Pela análise dos resultados obtidos, pode-se perceber que o tratamento com a associação ortovanadato e VC mostrou maior capacidade de induzir apoptose nas células tumorais, tendo resultado em 41,18 % de células apoptóticas, enquanto o controle negativo, VC e ortovanadato individualmente resultaram em 0,30; 1,31 e 25,36 % de células apoptóticas, respectivamente (Figura 25-B). Portanto, confirmando a indicação do tipo de morte celular mostrada na Figura 24 pode-se, novamente, sugerir que o principal tipo de morte celular induzida pelos tratamentos com a associação ortovanadato e VC e também com ortovanadato individualmente é apoptose.

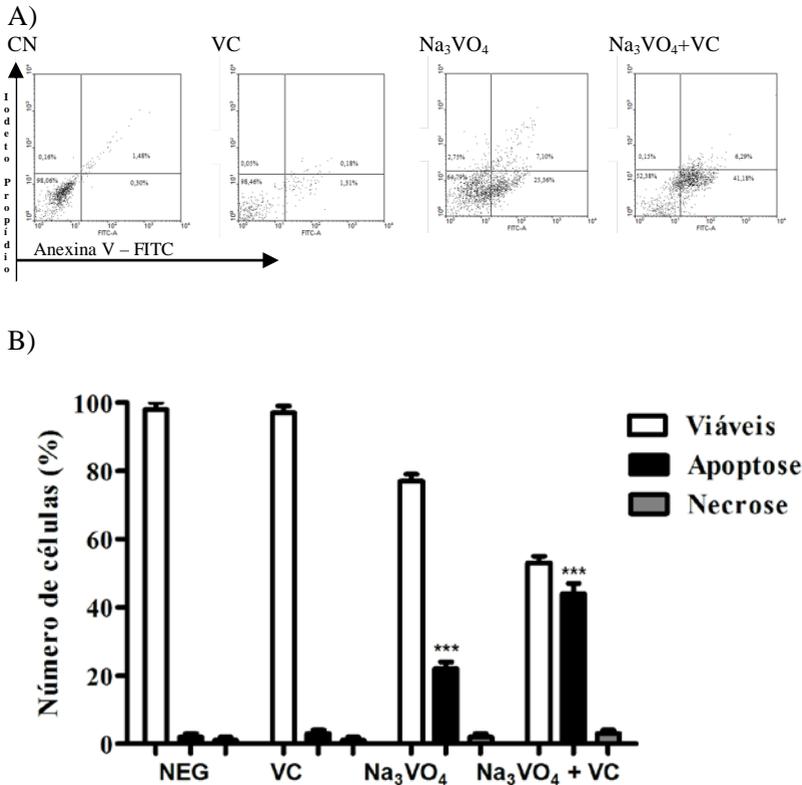


Figura 25 - (A) Gráfico de pontos da avaliação por citometria de fluxo após incorporação de anexina V – FITC e iodeto de propídio do tipo de morte celular induzida em células de tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6/200 \mu\text{L}/\text{animal}$ ) inoculadas em camundongos Balb/c por via intraperitoneal e posteriormente tratados durante 9 dias com: salina (controle negativo); VC (187,50 mg/kg/dia); ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia); associação de ortovanadato de sódio/VC (18,75:187,50 mg/kg/dia). Os quadrantes representam: quadrante superior esquerdo – células mortas (Anexina V-, IP+); quadrante superior direito – células em estágio de apoptose tardia e/ou necrose (Anexina V+, IP+); quadrante inferior esquerdo – células não apoptóticas ou viáveis (Anexina V-, IP-); quadrante inferior direito – células em estágios iniciais de apoptose (Anexina V+, IP-). B) Número (%) de células viáveis, apoptóticas e necróticas. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  Desvio padrão ( $n = 3$ ). \*\*\*  $P < 0,001$  representam diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo.

Ortovanadato de sódio é um inibidor de proteína tirosina fosfatase e para algumas linhagens celulares ele inibe a apoptose (DZIERZEWICZ *et al.*, 2004). Entretanto, alguns estudos têm apontado sua habilidade de inibir a proliferação celular e apoptose (CRUZ, MORGAN; MIN, 1995; YE *et al.*, 1999; CHOI *et al.*, 2003).

Segundo Choi *et al.* (2003), tratamento com epigalocatequina-3-galato (EGCG) induz apoptose em células U937; no entanto, quando o tratamento é feito com associação com vanadato durante 24 h ocorre aumento do efeito sobre a apoptose nessas células. Os estudos sugeriram mecanismos de ação através da indução da atividade da caspase 3, clivagem de fosfolipase- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1) e liberação de citocromo c. Além disso, o vanadato potencializou a apoptose induzida pelo EGCG também pela via de sinalização da proteína cinase ativada por mitogênio (MAPK), o que foi demonstrado pelo aumento da atividade de ERK.

#### 4.2.6.2 Efeito do ortovanadato de sódio e associação de ortovanadato de sódio/ascorbato de sódio sobre as defesas antioxidantes e estresse oxidativo

##### 4.2.6.2.1 Conteúdo de tióis não proteicos (GSH)

Na Figura 26 observa-se que o tratamento com ortovanadato de sódio causou aumento significativo no conteúdo de tióis não proteicos (GSH) determinado no líquido ascítico dos animais submetidos a esse tratamento, quando comparado com o controle negativo (CN). Porém, não houve diferença significativa nos resultados obtidos após o tratamento com associação de ortovanadato de sódio e VC se comparados os dois tratamentos. No entanto, ao comparar os resultados dos dois tratamentos com ortovanadato de sódio e com a associação de ortovanadato de sódio e VC observou-se diferença significativa entre os dois tratamentos.

Com relação aos animais tratados com doxorrubicina (1,2 mg/kg/dia), não foi determinado o conteúdo de GSH, pois os animais não desenvolveram o tumor intraperitoneal devido ao efeito antitumoral do referido tratamento.

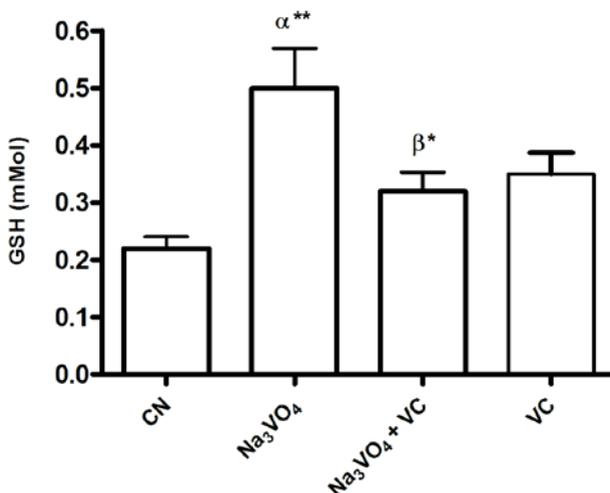


Figura 26 - Conteúdo de glutatona reduzida (GSH) em líquido ascítico de camundongos Balb/c previamente inoculados por via intraperitoneal com células de tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6 / 200 \mu\text{L}/\text{animal}$ ) e posteriormente tratados durante 9 dias com: salina (controle negativo, CN); ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia); associação de ortovanadato de sódio/VC (18,75:187,50 mg/kg/dia); VC (187,50 mg/kg/dia). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão ( $n = 6$ ).  $\alpha^{**}$  representa diferença estatística em relação ao CN ( $P < 0,01$ ).  $\beta^*$  representa diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ). CN = controle negativo; SO = ortovanadato de sódio; SO/VC = associação vitamina C e ortovanadato de sódio; VC = vitamina C.

GSH regula a via de produção anaeróbica de ATP e a queda de sua concentração poderia levar à morte das células tumorais. Níveis elevados de GSH por outro lado, seriam necessários para a sobrevivência do tumor. Foi relatada uma significativa redução nos níveis de GSH em animais implantados com tumor recebendo tratamento com fármacos antineoplásicos (SUZUKAKE; PETRO; VISTICA, 1982; RICHARDSON & SIEMANN, 1992). No entanto Estrela *et al.* (1992) argumentam que o tratamento com antineoplásicos elevaria os níveis de GSH, pois a morte das células tumorais que detém concentração alta de GSH causaria elevação deste composto no líquido ascítico por extravasamento do conteúdo intracelular.

De maneira semelhante, os resultados obtidos no nosso trabalho mostram na Figura 26 que o tratamento com ortovanadato de sódio também causou significativo aumento dos níveis de GSH, quando comparado ao controle negativo, podendo-se assumir que houve aumento da morte celular nos grupos tratados se considerarmos como correta a hipótese levantada por Estrela *et al.*(1992).

#### 4.2.6.2.2 Avaliação da peroxidação lipídica

Os resultados obtidos com a avaliação dos efeitos dos tratamentos com ortovanadato de sódio e associação de ortovanadato de sódio e VC sobre os níveis ascíticos de peroxidação lipídica são apresentados na Figura 27. Somente o tratamento com a associação de ortovanadato de sódio e VC causou aumento significativo no nível de peroxidação lipídica em relação ao controle negativo (CN), caracterizando dano celular.

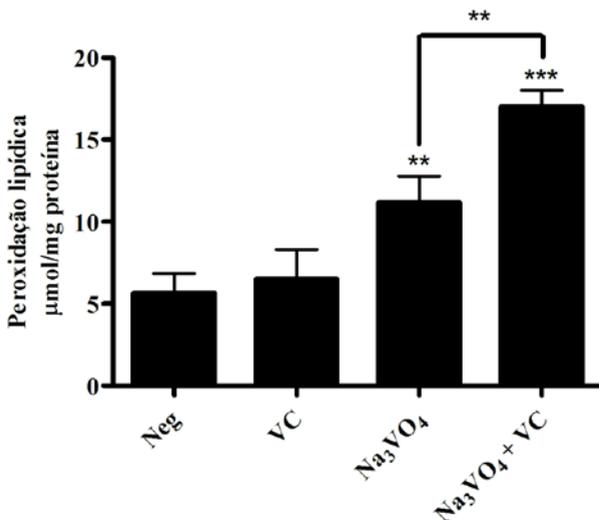


Figura 27 - Níveis de peroxidação lipídica (TBARS) em líquido ascítico de camundongos Balb/c previamente inoculados por via intraperitoneal com células de tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6 / 200 \mu\text{L}/\text{animal}$ ) e posteriormente tratados durante nove dias com: salina (controle negativo, CN); VC (187,50 mg/kg/dia); ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia); associação de ortovanadato de sódio/VC (18,75:187,50 mg/kg/dia). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (n = 6). \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001 representam diferença significativa entre os tratamentos.

Byczkowski *et al.* (1996) demonstraram que vanádio (IV) inicia peroxidação de lipídios devido à ativação do ciclo redox e formação de complexo vanadil-peroxil reativo com superóxido (BYCZKOWSKI *et al.*, 1988). O processo leva ao consumo de O<sub>2</sub>, depleção de NAD(P)H, destruição de lipídios, e representa uma fonte de espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo induzido por vanádio também causou a lipoperoxidação segundo Comporti *et al.* (1985) e causou apoptose (CORCORAN *et al.*, 1994).

#### 4.2.6.2.3 Avaliação do nível de carbonilação proteica

Os resultados obtidos com a avaliação dos efeitos dos tratamentos com ortovanadato de sódio e associação de ortovanadato de sódio e vitamina C sobre os níveis ascíticos de carbonilação proteica estão demonstrados na Figura 28.

Confirmando os dados obtidos com peroxidação lipídica, foi observado o aumento significativo na concentração de proteína carbonilada decorrente dos tratamentos dos grupos de animais com ortovanadato de sódio e associação de ortovanadato de sódio e vitamina C, sugerindo um possível aumento do estresse oxidativo na cavidade ascítica.

Alguns trabalhos explicam a atividade do ortovanadato de sódio pela sua propriedade de inibir proteínas tirosina fosfatase, o que causa um aumento de resíduos de tirosina fosforiladas em proteínas nas células. Estudos com varias linhagens celulares revelaram que essa atividade do vanádio está relacionada a efeito antitumoral. No entanto, o vanádio também é conhecido por ativar proteínas tirosina fosforilases. Esses dois efeitos ativam vias de transdução de sinal que levam à apoptose e/ou ativação de genes supressores tumorais. Compostos de vanádio também podem induzir parada do ciclo celular e/ou efeitos citotóxicos causando quebra do DNA (EL NAGGAR *et al.*, 1998; EVANGELOU, 2002).

Por outro lado, alguns estudos *in vitro* sugerem que talvez muitos efeitos biológicos e tóxicos do vanádio podem ser mediados mais por reações oxidativas do mesmo ou de complexos com biomoléculas fisiologicamente relevantes do que por modulação bioquímica direta das atividades enzimáticas, tais como catalase, glutatona peroxidase e superóxido dismutase (SERRA *et al.*, 1992; APPELA; GONZALES; BARAN, 1998).

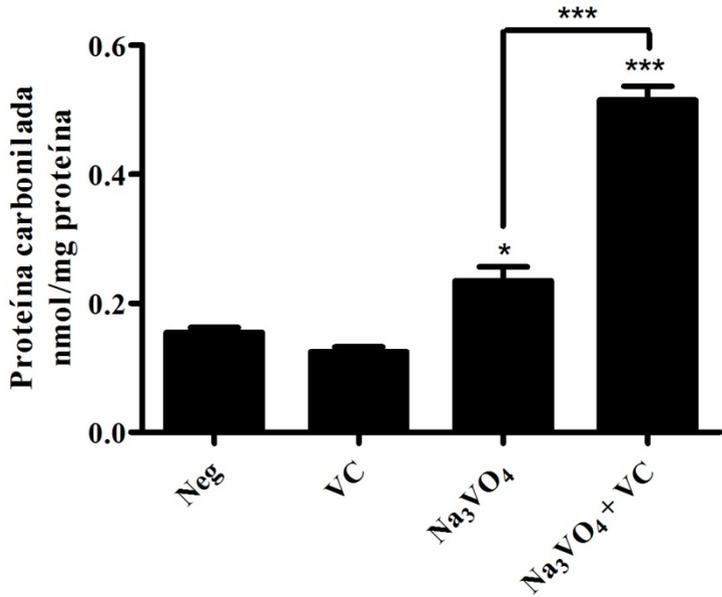


Figura 28 - Níveis de carbonilação proteica em líquido ascítico de camundongos Balb/c previamente inoculados por via intraperitoneal com células de tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6$  / 200  $\mu$ L/animal) e posteriormente tratados durante nove dias com: salina (controle negativo, CN); VC (187,50 mg/kg de peso); ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg de peso); associação de ortovanadato / VC (18,75:187,50 mg/kg). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (n = 6). \* P < 0,05 e \*\*\* P < 0,001 representam diferença estatística significativa comparando-se os tratamentos em relação ao controle negativo (Neg) ou entre os tratamentos, respectivamente.

#### 4.2.6.2.4 Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase

Em nosso estudo, as atividades de catalase e SOD foram determinadas como medidas de estresse oxidativo. Os resultados apresentados na Figura 29 e 30 referem-se aos efeitos do ortovanadato ou de sua associação com VC sobre as enzimas antioxidantes avaliadas em amostras de líquido ascítico de tumor obtidas dos camundongos submetidos aos tratamentos. Observa-se, nas Figuras 29 e 30, aumento

na atividade da catalase e superóxido dismutase. Isto permite sugerir a hipótese de que, *in vivo*, o estresse oxidativo está relacionado a sua atividade antitumoral. Observa-se que a adição de VC ao ortovanadato resultou num aumento de 2-3 vezes em média, em comparação com as amostras obtidas de camundongos tratados apenas com ortovanadato na atividade da SOD.

As células apresentam mecanismos enzimáticos antioxidantes que tem importante papel na eliminação de radicais livres. SOD e CAT estão envolvidas na eliminação do ânion superóxido e na degradação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), respectivamente (GUPTA *et al.*, 2004).

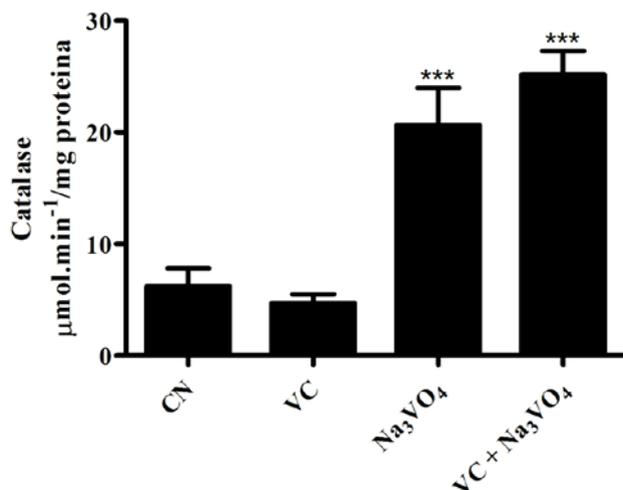


Figura 29 - Atividade da enzima catalase (CAT) em líquido ascítico de camundongos inoculados com TAE e tratados durante nove dias com VC (187,50 mg/kg/dia), ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia) e associação de ortovanadato com VC (18,75:187,50 mg/kg/dia). CN = controle negativo (tratado com salina). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (n = 6). \*\*\* P < 0,001 representa diferença estatística significativa comparando-se os tratamentos ao controle negativo (CN).

Foi relatada uma diminuição da atividade de SOD (MARKLUND *et al.*, 1982) e também da catalase (SUN *et al.*, 1989) em fígado de camundongos com TAE não tratados. No entanto, Mohamad *et al.* (2011) relatam que a diminuição significativa observada na atividade de catalase em tecido tumoral em camundongos portadores de TAE foi aumentada após tratamento com extrato metanólico de

*Foeniculum vulgare* (funcho). De maneira semelhante isso foi observado, no nosso trabalho, após os tratamentos com ortovanadato e associação de ortovanadato de sódio e VC. Em vista da produção de ERO que foi observada nos resultados das nossas avaliações, sugere-se justificar o efeito antitumoral pelo aumento da produção de espécies reativas.

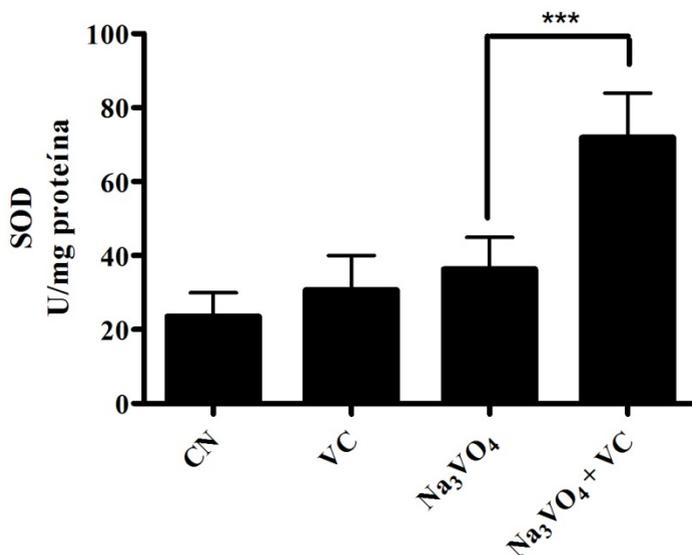


Figura 30 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em líquido ascítico de camundongos inoculados com TAE e tratados durante nove dias com VC (187,50 mg/kg/dia), ortovanadato de sódio (18,75 mg/kg/dia) e associação de ortovanadato com VC (18,75:187,50 mg/kg/dia). CN = controle negativo (tratado com salina). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão (n = 6). \*\*\* P < 0,001 representa diferença estatística significativa comparando-se os tratamentos feitos com ortovanadato de sódio e com a associação de ortovanadato de sódio e VC.

Os resultados dos tratamentos com ortovanadato de sódio associado ao ascorbato de sódio apresentados nessa tese foram publicados no periódico *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.430, p.883–888, 2013, sob o título **Sodium orthovanadate associated with pharmacological doses of ascorbate causes an increased generation of ROS in tumor cells that inhibits proliferation and triggers apoptosis.** doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.061>.

## 5 CONCLUSÃO

Com base nos objetivos propostos e nos resultados obtidos com o presente trabalho, pode-se concluir que:

### **Associação de vitamina C com vitamina K<sub>3</sub> microencapsuladas**

- A liberação da VC (E) com quitosana mostrou ser sustentada por mais de seis horas;

- O tratamento com VK<sub>3</sub> (E) com quitosana foi o mais citotóxico de todos os tratamentos avaliados *in vitro*;

- Os tratamentos com VC (E) e VCK<sub>3</sub> (E) não tiveram as respectivas citotoxicidades aumentadas após microencapsulamento;

- O tratamento com VK<sub>3</sub> (E) com quitosana resultou em maior citotoxicidade do que com VK<sub>3</sub> (NE) enquanto nos demais tratamentos não foram observadas maiores citotoxicidades após microencapsulamento;

- Todos os tratamentos em células de tumor ascítico de Ehrlich implantadas em camundongos isogênicos Balb/c feito com todas as micropartículas apresentaram efeito antitumoral;

- O tratamento com VCK<sub>3</sub> (E) apresentou o melhor efeito antitumoral *in vivo* com a maior redução da variação do peso do corpo, inibição do crescimento tumoral, aumento de tempo médio de sobrevivência e percentual de longevidade;

- O tratamento com VCK<sub>3</sub> (E) resultou no maior aumento de dano oxidativo nas proteínas indicando como possível mecanismo de ação o estresse oxidativo;

- O tratamento com VK<sub>3</sub> (NE) causou o maior percentual de morte celular por apoptose, seguido do tratamento com VCK<sub>3</sub> (E);

## **Associação de ortovanadato de sódio com vitamina C**

- A citotoxicidade do tratamento com ortovanadato de sódio foi potencializada pela associação com VC, da mesma forma que aumentou a inibição da proliferação celular e geração de ERO;

- Os tratamentos com ortovanadato e associação de ortovanadato e VC mostraram efeito antitumoral, pois reduziram as medidas de variação de peso do corpo, variação da circunferência abdominal e volume de líquido ascítico;

- O tratamento com a associação de ortovanadato e VC promoveu a inibição do crescimento do tumor e aumentou a longevidade dos animais;

- O tratamento com ortovanadato e associação de ortovanadato e VC resultou em aumento da atividade de catalase;

- Apenas o tratamento com a associação de ortovanadato e VC resultou em aumento da atividade de SOD;

- A associação de ortovanadato e VC causou o maior dano oxidativo em proteínas e aumentou o nível de peroxidação lipídica, sugerindo como provável mecanismo de ação o estresse oxidativo;

- O tratamento com a associação de ortovanadato e VC causou o maior percentual de morte celular por apoptose;

- A morte celular causada pelo tratamento com a associação de ortovanadato e VC está relacionada à inibição de Bcl-xL e ativação de Bax;

A partir desses resultados, pode-se sugerir que a associação de VCK<sub>3</sub> microencapsuladas com quitosana e a associação de ortovanadato e VC apresentaram efeitos citotóxicos, pró-apoptóticos e antitumorais relacionados ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio nas linhagens celulares testadas e nos ensaios com camundongos Balb/c inoculados com tumor ascítico de Ehrlich.

## PERSPECTIVAS

O desenvolvimento desse trabalho abre novas propostas de estudos que podem servir de complementação a partir dos resultados obtidos ou, até mesmo, abrir novas possibilidades a serem realizadas através do uso de metodologias e técnicas como CLAE, avaliação da atividade de enzimas, citometria de fluxo, e análise da expressão de proteínas por *Western Blot*, tais como:

- Realizar a cinética de liberação da VK<sub>3</sub> a partir das micropartículas de VK<sub>3</sub> e VCK<sub>3</sub> encapsuladas com quitosana;
- Avaliação da atividade citotóxica da associação de ortovanadato de sódio e VC ou da associação de VCK<sub>3</sub> microencapsuladas em quitosana em outras linhagens de células tumorais e também em células normais para determinação da especificidade de ação dos compostos, através da execução do ensaio do MTT;
- Realizar experimentos *in vivo* com tumor sólido para avaliação histológica.
- Investigar o papel da geração de espécies reativas de oxigênio no mecanismo de ação das micropartículas de VCK<sub>3</sub>, através de medidas da atividade enzimática de catalase, glutatona peroxidase, superóxido dismutase;
- Caracterização da fase do ciclo celular, por citometria de fluxo, e da expressão de proteínas envolvidas no bloqueio do ciclo celular, através de *Western Blot*, em diferentes células tumorais tratadas com a associação de ortovanadato de sódio

e VC ou com associação de VCK<sub>3</sub> microencapsuladas em quitosana;

- Investigar *in vitro* o mecanismo de morte celular induzido pelos tratamentos com a associação de ortovanadato de sódio e VC ou com associação de VCK<sub>3</sub> microencapsuladas em quitosana, através da avaliação da atividade de caspase-3 (na presença e ausência de inibidor de caspase-3);
- Investigar *in vitro* o mecanismo de morte celular induzido pelos tratamentos com a associação de ortovanadato de sódio e VC ou com associação de VCK<sub>3</sub> microencapsuladas em quitosana, através da análise da expressão de outros marcadores de apoptose, tais como p53 e citocromo c.
- Investigar a expressão de genes e a ativação de intermediários das vias de sinalização das cinases ativadas por mitogênio, fosfoinositol-3-cinase-Akt-mTOR e JAK-STAT.
- Investigar o estresse de retículo endoplasmático através da medida da fosforilação do fator iniciador eucariótico eIF2.



**REFERÊNCIAS**

ADAMS, J. M. & CORY, S.. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. **Science**, v.281, p. 1322- 1326, 1998.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzimology**, v.105, p.121-126., 1984.

AGUS, D. B.; VERA, J. C.; GOLDE, D. W.. Stromal cell oxidation: a mechanism by which tumors obtain vitamin C. **Cancer Research**, v.59, p.4555-4558, 1999.

AKIYOSHI, T.; MATZNO, S.; SAKAI, M.; OKAMURA, N.; MATSUYAMA, K.. The potential of vitamin K3 as an anticancer agent against breast cancer that acts via the mitochondria-related apoptotic pathway. **Cancer Chemotherapy & Pharmacology**, v.65, p.143–150, 2009.

ALMEIDA, R. D.; MANADAS, B. J.; CARVALHO, A. P. ; DUARTE, C. B.. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy (Review). **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1704, p.59 – 86, 2004.

ALMEIDA, V. L. de; LEITÃO, A.; REINA, L. del C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P.. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, n.1, p.118-129, 2005.

ANAL, A. K.; SINGH, H.. Recent advances in microencapsulation of pro- biotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.240–251, 2007.

APPELA, M. C.; GONZALES, S. N.; BARAN, E. J.. The inhibitory effect of vanadium oxyanions on the activity of copper–zinc superoxide dismutase. **Biological Trace Element Research**, v.18, p.123–30, 1998.

ASANO, K.; SATOH, K.; HOSAKA, M.; ARAKAWA, H.; INAGAKI, M.; HISAMITSU, T.; MAEDA, M.; KOCHI, M.; SAKAGAMI, H. Production of hydrogen peroxide in cancerous tissue by intravenous administration of sodium 5,6-benzylidene-L-ascorbate. **Anticancer Research**, v.19, n.1A, p.229-236, 1999.

ASSIMAKOPOULOS, D.; KOLETTAS, E.; ZAGORIANAKOU, N.; EVANGELOU, A.; SKEVAS, A.; AGNANTIS, N. Prognostic significance of p53 in the cancer of the larynx. **Anticancer Research**, v. 20, pp.3555–64, 2000.

AUGUSTIN, M.A. & SANGUANSRI, L.. Encapsulation of Bioactives. IN: Food Materials Science, Chapter 24, 3, p.577-601, 2008. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/q3p1160212r65232/>. Acesso em: quarta-feira, 9 de junho de 2010.

BABER, A.D., HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **American Pharmaceutical Review**, v.34, n.9, p.26-35, 1994.

BECK, R.; PEDROSA, R. C.; DEJEANS, N.; GLORIEUX, C.; LEVÊQUE, P.; GALLEZ, B.; TAPER, H.; EECKHOUDT, S.; KNOOPS, L.; CALDERON, P. B.; VERRAX, J.. Ascorbate/menadione-induced oxidative stress kills cancer cells that express normal or mutated forms of the oncogenic protein Bcr-Abl. An in vitro and in vivo mechanistic study. **Investigational New Drugs**, 2010. DOI 10.1007/s10637-010-9441-3.

BECK, R.; VERRAX, J.; DEJEANS, N.; TAPER, H.; CALDERON, P. B.. Menadione reduction by pharmacological doses of ascorbate induces an oxidative stress that kills breast cancer cells. **International Journal of Toxicology**, v.28, p.33–42, 2009.

BENADE, L.; HOWARD, T.; BURK, D.. Synergistic killing of Ehrlich ascites carcinoma cells by ascorbate and 3-amino-1,2,4,-triazole. **Oncology**, v.23, n.1, p. 33–43, 1969.

BENASSI, B.; FANCIULLI, M.; FIORENTINO, F.; PORRELLO, A.; CHIORINO, G.; LODA, M.; ZUPI, G.; BIROCCIO, A. c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress. **Molecular Cell**, v.21, p.509–519, 2006.

BENZIE, I. F. F.. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences & Nutrition**, v.47, p.233-261, 1996.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L; STRYER, L. **Bioquímica. 6. ed.** Rio de Janeiro: Guanabara, (2008). 1059 p.

BERGAMASHI, G.; ROSTI, V.; DANAVA, M.; PONCHIO, L.; LUCOTTI, C.; CAZZOLA, M. Inhibitors of tyrosine phosphorylation induce apoptosis in human leukemic cell lines. **Leukemia**, v.7, p.2012–2018, 1993.

BEUTLER, E.; DURAN, O.; KELLY, B. M.; Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.61, p.882-890, 1963.

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v.90, p.105-110, 1984.

BIRNBAUM, M. J., HASPEL, H. C., AND ROSEN, O. M. Transformation of rat fibroblasts by FSV rapidly increases glucose transporter gene transcription. **Science**, v.235, p.1495–1498, 1987.

BISHAYEE A, OINAM S, BASU M, CHATTERJEE M. Vanadium chemoprevention of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary carcinogenesis: probable involvement of representative hepatic phase I and II xenobiotic metabolizing enzymes. **Breast Cancer Research and Treatment.**, v.63, n2, p.133-45, 2000.

BOSCH, F.; HATZOGLU, M.; PARK, E.A.; HANSON, B.W. Vanadate inhibits expression of the gene phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in rat hepatoma cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.23, p.13677-13682, 1990.

BOUTROS, R., DOZIER, C. & DUCOMMUN, B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. **Current Opinion Cell Biology**, v.18, p.185-191, 2006.

BOUTROS, R.; LOBJOIS, V.; DUCOMMUN, B.. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? **Nature Reviews – Cancer**, v.7, p.495-507, 2007.

BOVERIS, A.; FRAGA, C. G.; VARSAVSKY, A. I.; KOCH, O. R.. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.227, p.534-538, 1983.

BRADFORD, M. M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAM, S.; FROUSSARD, P.; GUICHARD, M., et al. Vitamin C preferential toxicity for malignant melanoma cells. **Nature**, v.284, p.629-631, 1980.

BYCZKOWSKI, J.Z. ; CD. FLEMMING. 1996. Computer-aided dose-response characteristics of chemically initiated oxidative stress in vitro. **Toxicologist** v.30, n.240, p.1227, 1996.

BYCZKOWSKI, J.Z.; T. GESSNER. Biological role of Superoxide ion-radical. **International Journal of Biochemistry**, v.20, p.569-580, 1988.

BYCZKOWSKI, J. Z.; KULKARNI, A. P. Oxidative stress and pro-oxidant biological effects of vanadium. (ed) Vanadium in the environment. **Part 2: Health effects, 1998, John Wiley & Sons, Inc. New York**, p.181–219.

CAGNOL, S. and CHAMBARD, J. C.. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death – apoptosis, autophagy and senescence. **FEBS Journal**, v.277, p.2–21, 2009.

CALDERON, P. B.; CADROBBI, J.; MARQUES, C.; HONG-NGOC, N. ; JAMISON, J.M.; GILLOTEAUX, J.; SUMMERS, J.L.; TAPER, H.S.. Potential therapeutic application of the association of vitamins C and K3 in cancer treatment. **Current Medicinal Chemistry**, v.9, p.2271-2285, 2002.

CAMPOS, A. M. de; SANCHEZ, A.; ALONSO, M. J.. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. **International Journal of Pharmaceutics**, v.224, p.159–168, 2001.

CAROSIO, R.; ZUCCARI, G.; ORIENTI, I.; SALVATORE M.; MONTALDO, P. G.. Sodium Ascorbate induces apoptosis in neuroblastoma cell lines by interfering with iron uptake. **Molecular Cancer**, v.6, p.55, 2007

CASTRANOVA V. Generation of oxygen radicals and mechanisms of injury prevention. **Environmental Health Perspectives**, v.102, :S65–68, 1994.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, p.323–333, 2000.

CHEN, F.; DEMERS, L. M.; VALLYATHAN, V.; DING, M.; LU, Y.; CASTRANOVA, V.; SHI, X.. Vanadate Induction of NF- $\kappa$ B Involves I $\kappa$ B Kinase  $\beta$  and SAPK/ERK Kinase 1 in Macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.29, p.20307–20312, 1999.

CHEN, Q.; ESPEY, M. G.; KRISHNA, M. C.; MITCHELL, J. B.; CORPE, C. P.; BUETTNER, G. R.; SHACTER, E.; LEVINE, M.. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, n.38, p.13604-13609, 2005.

CHEN, Q.; ESPEY, M. G.; SUN, A. Y.; POOPUT, C.; KIRK, K. L.; KRISHNA, M. C.; KHOSH, D. B.; DRISKO, J.; LEVINE, M.. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, n.32, p.11105-11109, 2008.

CHEN, R. H.; HWA, H. D. Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. **Carbohydrate Polymers**, v.29, n.4, p.353-358, 1996.

CHOI, Y. J.; LIM, S.Y.; WOO, J.H.; KIM, Y.H.; KWON, Y.K.; SUH, S.I.; LEE, S.H.; CHOI, W.Y.; KIM, J.G.; LEE, I.S.; PARK, J.W.; KWON, T.K.. Sodium orthovanadate potentiates EGCG-induced

apoptosis that is dependent on the ERK pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.305, p.176–185, 2003.

CLARKE, P. R.; ALLAN, L. A.. Cell-cycle control in the face of damage – a matter of life or death. **Trends in Cell Biology**, v.19, n.3, p.89-98, 2009.

CLARKSON, B. D.; BURCHENAL, J. H. Preliminary screening of antineoplastic drugs. **Program Clinical Cancer Research**, v.1, p.625-629, 1965.

CLÉMENT, M. V.; RAMALINGAM, J.; LONG, L. H.; HALLIWELL, B.. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.3, n.1, p.157-164, 2001.

COLLINS, K.; JACKS, T.; PAVLETICH, N. P.. The cell cycle and cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, n.7, p.2776-2778, 1997.

COMPORTI, M.. Biology of disease, lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. **Laboratory Investigation - Nature**. v.53, p.599-623, 1985.

CORCORAN, G.B., L. FIX, D.P. JONES, M.T. MOSLEN, P. NICOTERA, F.Z. OBERHAIMMER, AND R. BUTTYAN.. Apoptosis: molecular control point in toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**., v. 128, p169-181, 1994.

CORTIZO, A.M.; MOLINUEVO, S.; ETCHEVERRY, S.B.. A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR 106 osteosarcoma cell lines. **Toxicology**, v.147, p.89–99, 2000.

CRANS, D. C.; SMEE, J. J.; GAIDAMAUSKAS, E.; YANG, L.. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. **Chemical Reviews**, v.104, p.849–902, 2004.

CRUZ, T. F.; MORGAN, A.; MIN, W.. In vitro and in vivo antineoplastic effects of orthovanadate. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.153, p.161–166, 1995.

DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, 9, 169–176, 2003.

D'CRUZ, O. J.; UCKUM, F. M. Vanadocene mediated in vivo male germ cell apoptosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.166, p.186–195, 2000.

DEJEANS, N.; TAJEDDINE, N.; BECK, R.; VERRAX, J.; TAPER, H.; GAILLY, P.; CALDERON, P.B.. Endoplasmic reticulum calcium release potentiates the ER stress and cell death caused by an oxidative stress in MCF-7 cells. **Biochemical Pharmacology**, v.79, p.1221-1230, 2010. DOI: 10.1016/j.bcp.2009.12.009.

De LAURENZI, V.; MELINO, G.; SAVINI, I.; ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M.; FINAZZI-AGRO, A.; AVIGLIANO, L.. Cell death by oxidative stress and ascorbic acid regeneration in human neuroectodermal cell lines. **European Journal of Cancer**, v.31, p.463-466, 1995.

DESAI, K. G. & PARK, H. J.. Effect of manufacturing parameters on the characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres prepared by spray-drying. **Journal of Microencapsulation**, v.23, n.1, p.91-103, 2006.

DING, M.; GANNETT, P.M.; ROJANASAKUL, Y.; LIU K.J.; SHI, X.L. One electron reduction of vanadate by ascorbate and related free radical generation at physiological pH. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.55, p.101–112, 1994.

DJORDJEVITZ, C. & WAMPLER, G. L. Antitumor activity of peroxo heteroligand vanadates (V) in relation to biochemistry of vanadium. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.25, p.51–55, 1985.

DUPREZ, L.; WIRAWAN, E.; BERGHE, T. V.; VANDENABEELE, P.. Major cell death pathways at a glance. **Microbes and Infection**, v.11, p.1050-1062, 2009.

DZIERZEWICZ, Z.; ORCHEL, A.; SWIERCZEK-ZIEBA, G.; WEGLARZ, L.; STOJKO, J.; WILCZOK, T.. Sodium orthovanadate inhibits apoptosis of rat colonocytes in primary culture. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v.61, p.86–87, 2004.

EL-NAGGAR, M. M.; EL-WASEEF, A. M.; EL-HALAFAWY, K. M.; EL-SAYED, I. H.. Antitumor activities of vanadium (IV), manganese (IV), iron (III), cobalt (II) and copper (II) complexes of 2-methylaminopyridine. **Cancer Letters**, v.133, p.71–76, 1998.

ENGLAND, K.; COTTER, T.G. Direct oxidative modifications of signaling proteins in mammalian cells and their effects on apoptosis. **Redox Report**, v.10, p.237–245, 2005.

ESTRELA, J. M.; HERNANDEZ, R.; TERRADEZ, P.; ASENSI, M. PUERTES, I. R.; VINA, J.. Regulation of glutathione metabolism in Ehrlich ascites tumor cell. **Biochemical Journal**, v.286, p.257-262, 1992.

EVANGELOU, A.. Vanadium in cancer treatment. **Criticals Reviews on Oncology-Hematology**, v.42, n.3, p.249-265, 2002.

FANG, J.; HOLMGREN, A. Inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase by 4-hydroxy-2-nonenal in vitro and in vivo. **Journal of the American Chemical Society**, v.128, p.1879–1885, 2006.

FAURE, R.; VINCENT, M.; DUFOUR, M.; SHAVER, A.; POSNER, B.I. Arrest of the G2/M transition of the cell cycle by protein tyrosine phosphatase inhibition: studies on a neuronal and a glial cell line. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.58, p.389–401, 1995.

FESTJENS, N.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P.. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1757, p.1371–1387, 2006.

FRANKEN, N.A.P. ; H. M. RODERMOND; J. STAP; J. HAVEMAN; C. VAN BREE. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v.1, p.2315-2319, 2006.

FRESHNEY, R. I. Freshney's Culture of animal cell - a multimedia guide. **New York, 1999. CD-ROM.**

FRUHWIRTH, G.O.; LOIDL, A.; HERMETTER, A. Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1772, p.718–736, 2007.

FUENTES-PRIOR, P.; SALVESEN, G. S.. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. **Biochemistry Journal**, v.384, p.201–232, 2004.

GARCIA, G. B.. El vanadio, un elemento ambiguo. **Acta Toxicológica Argentina**, v.14, n.2, p.32-36, 2006.

GENG, C.X.; ZENG, Z. C.; WANG, J.Y. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. **World Journal of Gastroenterology**, v.9, p.696-700, 2003.

GERAN, R. I.; GREENBERG, N. H.; MAC DONALD, M. M.; SCHUMACHER, A. M.; ABBOT, B. J.. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. **Cancer Chemotherapy Reports**, v.3, p.1-103, 1972.

GILLOTEAUX, J.; JAMISON, J. M.; ARNOLD, D.; TAPER, H. S.; SUMMERS, J. L. Ultrastructural aspects of autophagy: a new cancer cell death induced by the synergistic action of ascorbate/menadione on human bladder carcinoma cells. **Ultrastructural Pathology**, v.25, p.183-192, 2001.

GLORIEUX, C.; DEJEANS, N.; SID, B.; BECK, R.; CALDERON, P. B.; VERRAX, J.. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, v.82, p.1384-1390, 2011.

GOLSTEIN, P. and KROEMER, G.. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v.32, p.37-43, 2007.

GONÇALVES, A. P.; VIDEIRA, A.; SOARES, P.; MÁXIMO, V.. Orthovanadate-induced cell death in RET/PTC1-harboring cancer cells involves the activation of caspases and altered signaling through PI3K/Akt/mTOR. **Life Sciences**, v.89, p.371-377, 2011.

GONZÁLEZ, M. J.; MORA, E.; RIORDAN, N. H.; RIORDAN, H. D.; MOJICA, P. Rethinking vitamin C and cancer: an update on nutritional oncology. **Cancer Prevention International**, v.3, p.215-224, 1998.

GRAD, J. M.; BAHLIS, N. J.; REIS, I.; OSHIRO, M. M.; DALTON, W. S.; BOISE, L. H. Ascorbic acid enhances arsenic trioxide-induced cytotoxicity in multiple myeloma cells. **Blood**, v.98, p.805-813, 2001.

GREEN, D. R. & Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v.281, p.1309–12, 1998.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; RATH, N.; MUKHOPADHYAY, D. K.. Antitumor activity of methanolic extract of *Cassia fistula* L. seed against Ehrlich Ascites Carcinoma. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, p.151–156, 2000.

GUYTON, K. Z. & KENSLER, T. W.. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. **British Medical Bulletin**. v.49, n.3, p.523-544, 1993.

HALLIWELL, B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? **Free Radicals Research**, v.25, p.439-454, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3. ed. New York: Oxford University Press, 2001. 936 p.

HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A.. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, p.646-674, 2011

HANNUN, Y. A. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. **Blood**, v.89, p.845–53, 1997.

HARTWELL, L.. Rediscovering Biology - Cell Biology and Cancer. Disponível em:  
<[http://www.learner.org/courses/biology/support/8\\_cancer.pdf](http://www.learner.org/courses/biology/support/8_cancer.pdf)>. Acesso em: 06/04/2013.

HEJAZI, R.; AMIJI, M.. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v.89, p.151–165, 2003.

HENGARTNER, M. O.. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.770–776, 2000.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L.. Chitosan microspheres prepared by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v.187, p.53-65, 1999.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. **Free Radicals Biology Medicine**, v.19, p.271-280, 1995.

HIRANO, S.; SEINO, H.; AKIYAMA, Y.; NONAKA, I. Biocompatibility of chitosan by oral and intravenous administration. **Polymer Engineering & Science**, v.59, p.897–901, 1989.

HUANG, C.; ZHANG, Z.; DING, M.. Vanadate induces P53 activation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.32516–32522, 2000.

HUYER, G.; LIU, S.; KELLY, J.; MOFFAT, J.; PAYETTE, P.; KENNEDY, B.; TSAPRAILIS, G.; GRESSER, M.; RAMACHANDRAN, C.. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.843-851, 1997.

INCA. Disponível em:

<[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em 15 de junho de 2012.

IONESCU, J. & POLJSAK, B.. **International Journal of Cancer Prevention**, v.3, n.3, p.149-174, 2010.

ITKES, A. V.; IMAMOVA, L. R.; ALEXANDROVA, N. M.; FAVOROVA, O. O.; KISSELEV, L. L. Expression of c-myc gene in human ovary carcinoma cells treated with vanadate. **Experimental Cell Research**, v.188, p.169–1, 1990.

JANES, K. A.; FRESNEAU, M. P.; MARAZUELA, A.; FABRA, A.; ALONSO, M. J.. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. **Journal of Controlled Release**, v.73, p.255–267, 2001.

JASPERS, I.; SAMET, J. M.; ERZURUM, S.; REED, W. Vanadium-induced kB dependent transcription depends upon peroxide-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.23, p.95–102, 2000.

JYOTHI, N.; PRASANNA, P.; SAKARKAR, S.; PRABHA, K.; RAMAIAH, P.; SRAWAN, G.. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, vol.27, no.3, pp.187-197, 2010.

KANG, J. S. ; CHO, D.; KIM, Y.-I.; HAHM, E.; KIM, Y. S.; JIN, S. N.; KIM, H. N.; KIM, D.; HUR, D.; PARK, H.; HWANG, Y. I.; LEE, W. J.. Sodium Ascorbate (Vitamin C) Induces Apoptosis in Melanoma Cells via the Down-Regulation of Transferrin Receptor Dependent Iron Uptake. **Journal of Cellular Physiology**, v.204, p.192–197, 2005.

KARLSEN, A.; BLOMHOFF, R. AU; GUNDERSEN, T. E. Stability of whole blood and plasma ascorbic acid. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.61, n.10, p.1233-1236, 2007.

KASSOUF, W.; HIGHSHAW, R.; NELKIN, G. M.; DINNEY, C. P.; KAMAT, A. M. Vitamins C and K3 sensitize human urothelial tumors to gemcitabine. **The Journal of Urology**, v.176, p.1642-1647, 2006.

KATO, Y.; ONISHI, H. & MACHIDA, Y.. Contribution of chitosan and its derivatives to cancer chemotherapy. **In Vivo**, v.19, p.301-310, 2005.

KELLY, P. N. & STRASSER, A.. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. **Cell Death and Differentiation**, v.18, p.1414–1424, 2011.

KERR, J. F.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V.. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v.73, p.2013–26, 1994.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R.. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v.26, p.239, 1972.

KIRBY, C. S.. Microencapsulation and controlled delivery of food ingredients. **Food Science and Technology Today**, v.5, p.74–77, 1991.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. A.. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, v.38, p.96-109, 2010.

KÖPF-MAIER, P.. Complexes of metals other than platinum as antitumour agents. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.47, n.1, p.1-16, 1994.

KRADY, M-M.; FREYERMUTH, S.; ROGUE, P.; MALVIYA, A.N. Pervanadate elicits proliferation and mediates mitogen-activated protein (MAP). **FEBS Letters**, v. 412, p.420– 424, 1997.

KRESJA, C. M.; NADLER, S. G.; ESSELSTYN, J. M.; KAVANAGH, J. T.; LEDBETTER, J. A.; SCIEVEN, G. L.. Role of oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.11541–11549, 1997.

KUO, Y. L.; LIU, A. H.; MARKS, T. J. Metallocene interactions with DNA and DNA-processing enzymes. In: Siegel H, Siegel A, editors. Metal ions in biological systems. **New York: Marcel Dekker**, p.53–85, 1995.

LANGER, R. New methods of drug delivery. **Science**, v.249, p.1527-1533, 1990.

LEE, J.; KIM, K.-H.; JEONG, S.. Discovery of a novel class of 2-aminopyrimidines as CDK1 and CDK2 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.21, p.4203–4205, 2011.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th. ed. New York: W. H. Freeman, [2008]. xxix, 1158, [100]p. ISBN 9780716771081.

LEUNG, P.Y.; MIYASHITA, K.; YOUNG, M.; TSAO, C.S. Cytotoxic effect of ascorbate and its derivatives on cultured malignant and nonmalignant cell lines. **Anticancer Research**, v.13, p.475-480, 1993.

LIASKO, R.; KARKABOUNAS, S.; KABANOS, T. H.. Antitumor effects of a vanadium complex with cysteine on malignant cell lines and tumor-bearing Wistar rats. **Metal Ions in Biology and Medicine**, v.6, p.577–579, 2000.

LIMOLI, C. L.; HARTMANN, A.; SHEPHARD, L.; YANG, C.; BOOTHMAN, D. A.; BARTHOLOMEW, J.; MORGAN, W. F.. Apoptosis, reproductive failure and oxidative stress in chinese hamster

ovary cells with compromised genomic integrity, **Cancer Research**, v. 58, p.3712-3718, 1998.

LIOCHEV, S. I.; FRIDOVICH, I. Vanadate-stimulated oxidation of NAD(P)H in the presence of biological membranes and other sources of  $O_2^-$ . **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 279, p.1-7, 1990.

LIU, T.; RAETZ, E.; MOOS, P.J.; PERKINS, S.L.; BRUGGERS, C.S.; SMITH, F. Diversity of the apoptotic response to chemotherapy in childhood leukemia. **Leukemia**, v. 16, p.223-32, 2002.

LO, P.-K.; LEE, J. S.; SUKUMAR, S.. The p53-p21<sup>WAF1</sup> checkpoint pathway plays a protective role in preventing DNA rereplication induced by abrogation of FOXF1 function. **Cellular Signalling**, v. 24, p.316-324, 2012.

LUZ, P. P.; PIRES, A. M.; SERRA, O. A.. A low-cost ultrasonic spray dryer to produce spherical microparticles from polymeric matrices. **Química Nova**, v.30, n.7, p.1744-1746, 2007.

LYKKESFELDT, J.. Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Biological Samples by High-Performance Liquid Chromatography Using Subtraction Methods: Reliable Reduction with Tris[2-carboxyethyl]phosphine Hydrochloride. **Analytical Biochemistry**, v.282, p.89-93, 2000.

McGAHON, A. J.; MARTIN, S. M.; BISSONNETTE, R. P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R. J.; NISHIOKA, W. K.; GREEN, D. R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods in Cell Biology**, v.46, p.153-185, 1995.

MACHADO, A. E. D.. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v.23, n.2, p.237-243, 2000.

MACHEDA, M. L.; ROGERS, S.; BEST, J. D.. Molecular and Cellular Regulation of Glucose Transporter (GLUT) Proteins in Cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v.202, p.654–662, 2005.

MAJNO, G.; and JORIS, I.. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American Journal of Pathology**, v.146, p.3–15, 1995.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M.. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews – Cancer**, v.9, p.153-166, 2009.

MANCIN, F.; SCRIMIN, P.; TECILLA, P.; TONELLATO, U.. Artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, p.2540–2548, 2005.

MANNA, S. K.; ZHANG, H. J.; YAN, T.; OBERLEY, L. W.; AGGARWAL, B. B.. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor- $\kappa$ B and activated protein-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p.13245-13254, 1998.

MARKLUND, S. L.; WESTMAN, N. G., LUNDGREN, E.; ROOS, G.. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. **Cancer Research**, v. 42, p.1955–1961, 1982.

MATZNO, S.; YAMAGUCHI, Y.; AKIYOSHI, T.; NAKABAYASHI, T.; MATSUYAMA, K.. An Attempt to Evaluate the Effect of Vitamin K3 Using as an Enhancer of Anticancer Agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.6, p.1270-1273, 2008.

MAZUMDER, U. K.; GUPTA, M.; KARKI, S. S.; BHATTACHARYA, S.; RATHINASAMY, S.; THANGAVEL, S.. Synthesis, Anticancer and

Antibacterial Activity of Some Novel Mononuclear Ru(II) Complexes. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.52, n.2, p178-185, 2004.

MILLS, E.M.; TAKEDA, K.; YU, Z.X.; FERRANS, V.; KATAGIRI, Y.; JIANG, H.; LAVIGNE, M.C.; LETO, T.L.; GURO, G. Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.22165- 22168, 1998.

MISRA, H. P. & FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.246, n.22, p.6886–6890, 1971.

MOLINUEVO, M. S.; BARRIO, D. A.; CORTIZO, A. M.; ETCHEVERRY, S. B.. Antitumoral properties of two new vanadyl (IV) complexes in osteoblasts in culture: role of apoptosis and oxidative stress. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.53, p.163–172, 2004.

MOHAMAD, R. H.; EL-BASTAWESY, A. M.; ABDEL-MONEM, M. G.; NOOR, A. M.; AL-MEHDAR, H. A. R; SHARAWY, S. M.; EL-MERZABANI, M. M.. Antioxidant and Anticarcinogenic Effects of Methanolic Extract and Volatile Oil of Fennel Seeds (*Foeniculum vulgare*). **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.9, p.986–1001, 2011.

MONTERO, M.R.; GUERRI, C.; GRISOLIA, S. Vanadate, alcohol or both increase passive membrane permeability of neuro-2a cells; lesser sensitivity of Hep-2 cells. **Life Sciences**, v. 28, p.641–6, 1981.

MORITA, A.; ZHU, J.; SUZUKI, N.; ENOMOTO, A.; MATSUMOTO, Y.; TOMITA, M.; et al. Sodium orthovanadate suppresses DNA damage-induced caspase activation and apoptosis by inactivating p53. **Cell Death & Differentiation**, v.13, n.3, p.499–511, 2006.

MOSMANN, T.. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55–63, 1983.

MUNDARGI, R. C.; BABU, V. R.; RANGASWAMY, V.; PATEL, P.; AMINABHAVI, T. M.. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. **Journal of Controlled Release**, v.125, n.3, p.193–209, 2008.

MUSONDA, C. A. & CHIPMAN, J. K.. Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced NFκB DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. **Carcinogenesis**, v. 19, p.1583-1589, 1998.

NAKAGAWA, Y.; AKAO, Y.; MORIKAWA, H.; HIRATA, I.; KATSU, K.; NAOE, T.; OHISHI, N.; YAGI, K.. Arsenic trioxide-induced apoptosis through oxidative stress in cells of colon cancer cell lines. **Life Sciences**, v.70, p.2253–2269, 2002.

NATURE BIOTECHNOLOGY. Cancer multidrug resistance. **Nature Biotechnology**, v.18, IT18 - IT20, Supplement, 2000.

NEGANOVA, I.; VILELLA, F.; ATKINSON, S. P.; LLORET, M.; PASSOS, J. F.; VON ZGLINICKI, T.; O'CONNOR, J. E.; BURKS, D.; JONES, R.; ARMSTRONG, L.; LAKO, M.. **Stem Cells**, v.29, n.4, p.651-9, 2011. doi: 10.1002/STEM.620.

NIKI, E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. **Free Radicals Biology and Medicine**, 47, 469–484, 2009.

NOTO, V.; TAPER, H. S.; JIANG, Y. H.; JANSSENS, J.; BONT, J.; De LOECKER, W.. Effects of sodium ascorbate (vitamin C) and 2-methyl-1,4-naphtoquinone (vitamin K3) treatment on human tumor cell growth *in vitro*. I. Synergism of combined vitamin C and K3 action. **Cancer**, v.63, p.901-906, 1989.

NUTTER, L. M.; NGO, E. O.; FISHER, G. R.; GUTIERREZ, P. L.. DNA strand scission and free radical production in menadione treated

cells. Correlation with cytotoxicity and role of NADPH quinone acceptor oxidoreductase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.4, p.2474-2479, 1992.

OHI, N.; NISHIKAWA, Y.; TOKAIRIN, T.; YAMAMOTO, Y.; DOI, Y.; OMORI, Y.. Maintenance of Bad phosphorylation prevents apoptosis of rat hepatic sinusoidal endothelial cells in vitro and in vivo. **American Journal of Pathology**, v.168, n.4, p.1097-106, 2006.

OLIVEIRA, B. F.; SANTANA, M. H. A.; RÉ, M. I. Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with D, L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.22, n.03, p.353-360, 2005.

ORSOLIC, N.; KOSALEC, I.; BASIC, I. Synergistic Antitumor Effect of Polyphenolic Components of Water Soluble Derivative of Propolis against Ehrlich Ascites Tumour. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.4, p.694-700, 2005.

PARIZE, A. L.; SOUZA, T. C. R. DE; BRIGHENTE, I. M. DA C.. Obtenção e caracterização de microesferas de quitosana contendo o corante urucum. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2, n.1, p.15-18, 2008.

PARK, C.H.; AMARE, M.; SAVIN, M.A.; HOOGSTRATEN, B.. Growth suppression of human leukemic cells in vitro by L-ascorbic acid. **Cancer Research**, v.40, p.1062-1065, 1980.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P.. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v.34, p.641-678, 2009.

PRASAD, K.N.; SINHA, P.K.; RAMANUJAM, M.; SAKAMOTO, A. Sodium ascorbate potentiates the growth inhibitory effect of certain agents on neuroblastoma cells in culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.76, n.2, p.829-832, 1979.

PRASAD, S. B.; GIRI, A. Antitumor effect of cisplatin against murine ascites Dalton's lymphoma. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.32, p.155-162, 1994.

KUMAR, M. N. V. R.. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v.46, p.1-27, 2000.

RAY, R. S.; RANA, B.; SWAMI, B.; VENU, V.; CHATTERJEE, M.. Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF7 cell line. **Chemico-Biological Interactions**, v.163, p.239-247, 2006.

REBELLO, J. Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas, 2004, 112f. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

REZNICK, A. Z. & PACKER, L.. Carbonyl Assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v.233, p.357-363, 1994.

RICCI, J. E.; GOTTLIEB, R. A.; GREEN, D. R.. Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. **Journal of Cell Biology**, v.160, p.65-75, 2003.

RICHARDSON, M. A.; SANDERS, T.; PALMER, J. L.; GREISINGER, A.; SINGLETARY, S. E.. Complementary/alternative medicine use in comprehensive cancer center and the implications oncology. **Journal of Clinical Oncology**, v.18, p.2505-2514, 2000.

RICHARDSON, M. E.; SIEMANN, D.W. Thiol manipulation as a means of overcoming drug resistance in a novel cyclophosphamide induced resistant cell line. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v.22, n.4, p.781-784, 1992.

RIORDAN, N. H.; RIORDAN, H. D.; MENG, X.; Li, Y.; JACKSON, J. A.. Intravenous Ascorbate as a Tumor Cytotoxic Chemotherapeutic Agent. **Medical Hypotheses**, v.44, p.207-213, 1995.

ROKKA, S. & RANTAMÄKI, P.. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. **European Food Research and Technology**, v.231, p.1-12, 2010.

ROVER JUNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, p.112-119, 2001.

SCARPELLINI, M.; NEVES, A.; HÖRNER, R.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICS, B.; ZUCCO, C.; SILVA R. A. N.; DRAGO, V.; MANGRICH, A. S.; ORTIZ, W. A.; PASSOS, W. A.; DE OLIVEIRA, M.C.; TERENCE, H. Phosphate diester hydrolysis and DNA damage promoted by new cis-aqua/hydroxyl copper(II) complexes containing tridentate imidazole-rich ligands. **Inorganic Chemistry**, v.42, n.25, p.8353-8365. 2003.

SAKAGAMI H, SATOH K, HAKEDA Y, KUMEGAWA M. Apoptosis-inducing activity of vitamin C and vitamin K. **Cell and Molecular Biology**. v.46, n.1, p.129-43, 2000.

SAKURAI, H..Vanadium distribution in rats and DNA cleavage by vanadyl complex: implication for vanadium toxicity and biological effects. **Environmental Health Perspectives**, v.3, p.35-36, 1994.

SAKURAI, H.; TAMURA, H.; OKATANI, K.. Mechanism for a new antitumor vanadium complex: hydroxyl radical dependent DNA

cleavage by 1,10-phenanthroline-vanadyl complex in the presence of hydrogen peroxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.206, p.113–137, 1995.

SANTOS, J. E. DOS; SOARES, J. DA P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, E. T. G.. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.13, n.4, p.242-249, 2003.

SATYANARAYANA, A. & KALDIS, P.. A dual role of Cdk2 in DNA damage response. **Cell Division**, v.4, p.9, 2009. doi:10.1186/1747-1028-4-9.

SCHWARTZ, J. L.. The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumor cell growth. **Journal of Nutrition**, v.126, 1221S–1227S, 1996.

SERRA, M. A.; PINTA, R. A.; CASELLA, L.; SABBIONI, E.. Vanadium effects on the activity of horseradish peroxidase, catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in vitro. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.46, p.161–74, 1992.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q.. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, p.501–547, 1993.

SONG, J. H.; SHIN, S. H.; WANG, W.; ROSS, G. M.. Involvement of Oxidative Stress in Ascorbate-Induced Proapoptotic Death of PC12 Cells. **Experimental Neurology**, v.169, n.2 p.425–437, 2001.

SREEDHARA, A.; COWAN J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 4, p. 337-347. 2001.

SREEDHARA, A.; SUSA, N. ; PATWARDHAN, A.; RAO, P.. One Electron Reduction of Vanadate(V) to Oxovanadium(IV) by Low-Molecular-Weight Biocomponents Like Saccharides and Ascorbic Acid: Effect of Oxovanadium(IV) Complexes on pUC18 DNA and on Lipid Peroxidation in Isolated Rat Hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, p.115–120, 1996.

STINEFELT, B.; STEPHEN S. LEONARD; KENNETH P. BLEMINGS; XIANGLIN SHI; HILLAR KLANDORF. Free Radical Scavenging, DNA Protection, and Inhibition of Lipid Peroxidation Mediated by Uric Acid. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v.35, n.1, p.37-45, 2005.

STROBER, W.. Common immunologic techniques: Trypan blue exclusion test of cell viability. In: COLIGAN, J.E., KRUISBEEK, A.M., MARGULIES, D.H., SHEVACH, E.M., STROBER, W. (Eds.), **Current Protocols in Immunology**, vol.3, 1996. John Wiley, New York, A.3B.1–2.

SUDARSHAN, N. R.; HOOVER, D. G.; KNORR, D.. Antibacterial action of chitosan. **Food Biotechnology**, v.6, n.3, p.257-272, 1992.

SUN, Y.; OBERLEY, L. W.; ELWELL, J. H. ; SIERRA RIVERA, E.. Antioxidant enzyme activities in normal and transformed mice liver cells. **International Journal Cancer**, v. 44, p.1028–33, 1989.

SUZUKAKE, K.; PETRO, B. J.; VISTICA, D.T.. Reduction in glutathione content of L-PAM resistant L1210 cells confers drug sensitivity. **Biochemical Pharmacology**, v.31, n.1, p.121-124, 1982.  
SUZUKI T.; EZURE, T.; ISHIDA, M.. Biochemistry: Synergistic Effects of Some Pairs of Antioxidants and Related Agents on Mouse Leukaemia L5178Y Cell Growth In-vitro. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.50, n.10, p.1173–1177, 1998.

SVOBODA, P.; TEISINGER, J.; VYSKOCIL, F.. Vanadyl (VO<sub>2</sub><sup>+</sup>) induced lipoperoxidation in the brain microsomal fraction is not related to VO<sub>2</sub><sup>+</sup> inhibition of Na,K-ATPase. **Biochemistry Pharmacology**, v.33, n.15, p.2493-2497, 1984.

SWARBRICK, J.. "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", Informa Healthcare, England (2007) IN Villanova, J. C. O.; Oréfice, R. L.; Cunha, A.S.. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n.1, p.51-64, 2010.

TAN, M. L.; OOI, J. P.; ISMAIL, N.; MOAD, A. I. H.; MUKUMAD, T. S. T.. Programmed cell death pathways and current antitumor targets. **Pharmacological research**, v.26, n.7, p.1547-1560, 2009.

TAO, S. N.; XIE, W. M.; XU, P. X.. Superoxide anion scavenging activity of graft CS derivatives. **Carbohydrate Polymer**, v.58, p.379-82, 2004.

TAPER, H. S.. Reversibility of acid and alkaline deoxyribonuclease deficiency in malignant tumor cells. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.29, p.1053-1060, 1981.

TAPER, H. S.; BRUCHER, J. M.; FORT, L.. Alkaline and acid nucleases activity in the tumors of the human central nervous system (histochemical study). **Cancer**, v.28, p.482-490, 1971.

TAPER, H. S.; DECKERS, C. O.; DECKERS-PASSAU, L. O.. Increase in nuclease activity as a possible means for detecting tumor cell sensitivity to anticancer agents. **Cancer**, v.47, p.523-529, 1981.

TAPER, H. S.; GERLACHE, J. de; LANS, M.; ROBERFROID, M.. Non-toxic potentiation of cancer chemotherapy by combined C and K3 vitamin pretreatment. **International Journal of Cancer**, v.40, p575-579, 1987.

TAPER, H. S.; KEYEUX, A.; ROBERFROID, M. Potentiation of radiotherapy by nontoxic pretreatment with combined vitamins C and K3 in mice bearing solid transplantable tumor. **Anticancer Research**, v.16, p.499-04, 1996.

TIAN, X. L.; TIAN, D. F.; WANG, Z. Y.; MO, F. K.. Synthesis and evaluation of chitosan-Vitamin C complex. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.71, p.371-376, 2009.

TOMASETTI, M.; STRAFELLA, E .; STAFFOLANI, S .; SANTARELLI, L.; NEUZIL, J.; GUERRIERI, R.  $\alpha$ -Tocopheryl succinate promotes selective cell death induced by vitamin K3 in combination with ascorbate. **British Journal of Cancer**, v.102, n.8, p.1224-1234, 2010.

TRUMP, B. F., BEREZESKY, I. K., CHANG, S. H., AND PHELPS, P. C. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. **Toxicologic Pathology**, v.25, p.82–8, 1997.

TRUSH, M. A. & KENSLER, T. W.. An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.10, n.3-4, p. 201-209, 1991.

TSANG, W.P.; CHAU, S.P.; KONG, S.K.; FUNG, K.P.; KWOK, T.T. Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53- independent apoptosis. **Life Sciences**, v.73, p. 2047-2058, 2003.

TSUKAGUCHI, H.; TOKUI, T.; MACKENZIE, B.; BERGER, U. V.; CHEN, X.-Z.; WANG, Y.; BRUBAKER, R. F.; HEDIGER, M. A.. A family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporters. **Nature**, v.399, p.70–75, 1999.

VACA, C.E.; WILHEM, J.; HARMS-RINGDAHL, M.. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. **Mutation Research**, v.195, p.137-149, 1988.

VERA, J. C., RIVAS, C. I., ZHANG, R. H., FARBER, C. M., GOLDE, D. W.. Human HL-60 myeloid leukemia cells transport dehydroascorbic acid via the glucose transporters and accumulate reduced ascorbic acid. **Blood**, v.84, p.1628–1634, 1994.

VERRAX, J.; CADROBBI, J.; MARQUES, C.; TAPER, H.; HABRAKEN, Y. PIETTE, J.; CALDERON, P. B. Ascorbate potentiates the cytotoxicity of menadione leading to an oxidative stress that kills cancer cells by a non-apoptotic caspase-3 independent form of cell death. **Apoptosis**, v.9, p.223-233, 2004.

VERRAX, J.; CALDERON, P.B.. Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects. **Free Radical Biology and Medicine**, v.47, p.32–40, 2009.

VERRAX, J.; DELVAUX, M.; BEGHEIN, N.; TAPER, H.; GALLEZ, B.; BUC CALDERON, P.. Enhancement of quinone redox cycling by ascorbate induces a caspase-3 independent cell death in human leukaemia cells. An in vitro comparative study. **Free Radical Research**, v.39, n.6, p.649-657, 2005.

VERRAX, J. & CALDERON, P. B.. The controversial place of vitamin C in cancer treatment. **Biochemical Pharmacology**, v.76, p.1644–52, 2008.

VERRAX, J.; STOCKIS, J.; TISON, A.; TAPER, H. S.; CALDERON, P. B.. Oxidative stress by ascorbate/menadione association kills K562 human chronic myelogenous leukaemia cells and inhibits its tumour growth in nude mice. **Biochemical Pharmacology**, v.72, p.671–680, 2006.

VERRAX, J.; PEDROSA, R. C.; BECK, R.; DEJEANS, N.; TAPER, H.; CALDERON, P. B.. In Situ Modulation of Oxidative Stress: A Novel and Efficient Strategy to Kill Cancer Cells. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, p.1821-1830, 2009.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, RODRIGO L., CUNHA, ARMANDO S.. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.20, n.1, p.51-64, 2010.

ZHAO, Y.; YE, L.; LIU, H.; XIA, Q.; ZHANG, Y.; YANG, X.; WANG, K.. Vanadium compounds induced mitochondria permeability transition pore (PTP) opening related to oxidative stress. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.104, p.371–378, 2010.

ZHANG, Z.; HUANG, C.; LI, J.; SHI, X.. Vanadate-induced cell growth arrest is p53-dependent through activation of p21 in C141 cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.89, p.142–148, 2002.

WALKER, N.I.; HARMON, B. V.; GOBÉ, G. C.; KERR, J. F.. Patterns of cell death. **Methods and achievements in experimental pathology**, v.18, p.54, 1988. Citado em:  
<<http://www.utm.utoronto.ca/~w3bio380/picts/lectures/lecture3/Apoptotic%20Cells%2006%201.jpg>>. Acesso em: terça-feira, 28 de setembro de 2010.

WANG, Q.; LIU, T. T.; FU, Y.; WANG, K.; YANG, X. G.. Vanadium compounds discriminate hepatoma and normal hepatic cells by differential regulation of reactive oxygen species. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.15, p.1087–1097, 2010.

WANG, Z.; WANG, M.; FINN, F.; CARR, B. I. The growth inhibitory effects of vitamins K and their actions on gene expression. **Hepatology**, v.22, n.3, p.876-82, 1995.

WARBURG, O. H.. On the origin of cancer cells. **Science**, v.123, p.309–314, 1956a.

WARBURG, O. H.. On respiratory impairment in cancer cells. **Science**, v.124, p.269-270, 1956b.

WEINBERG, R. How cancer arises: an explosion of research in uncovering the long-hidden molecular underpinnings of cancer and suggesting new therapies. **Scientific American**, p.32-40, 1996.

WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 10 de outubro de 2012.

WRONA, M.; PATEL, K.; WARDMAN, P.. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. **Free Radical Biology and Medicine**, v.38, n.2, p.262-270, 2005.

WU, F. Y. H.; CHANG, N. T.; CHEN, W. J.; JUAN, C. C. Vitamin K3-induced cell cycle arrest and apoptotic cell death are accompanied by altered expression of c-fos and c-myc in nasopharyngeal carcinoma cells. **Oncogene**, v.8, p.2237-2244, 1993.

WU, F. Y. H. & SUN, T. P. Vitamin K3 induces cell cycle arrest and cell death by inhibiting Cdc25 phosphatase. **European Journal of Cancer**, v.35, n.9, p.1388-1393, 1999.

YAMAMOTO, K.; TAKAHASHI, M.; NIKI, E. Role of iron and ascorbic acid in the oxidation of methyl linoleate micelles. **Chemical Letters**, v.1, p.49-52, 1987.

YE, J.; DING, M.; LEONARD, S. S.; ROBINSON, V. A.; MILLECCHIA, L.; ZHANG, X.; CASTRANOVA, V.; VALLVATHAN, V.; SHI, X.. Vanadate induces apoptosis in epidermal JB6P+ cells via hydrogen peroxide-mediated reactions, **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.202, p.9-17, 1999.

YI, H.; WU, L-Q.; BENTLEY, W. E.; GHODSSI, R.; RUBLOFF, G. W.; CULVER, J. N.; PAYNE, G. F.. Biofabrication with chitosan. **Biomacromolecules**, v.6, n.6, p.2881-2894, 2005.

YOUNES, M. & STRUBELT, O.. Vanadate-induced toxicity towards isolated perfused rat livers: the role of lipid peroxidation. **Toxicology**, v.66, p.63-74, 1991.