



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, CAMPUS ARARAQUARA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA**

FRANCIELE GARCIA BAVELONI

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA CORDIALINA A EM SISTEMA
NANOEMULSIONADO PARA TRATAMENTO DE LINHAGENS CELULARES DE
TUMOR CERVICAL HUMANO**

Araraquara-SP

2018

FRANCIELE GARCIA BAVELONI

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA CORDIALINA A EM SISTEMA
NANOEMULSIONADO PARA TRATAMENTO DE LINHAGENS CELULARES DE
TUMOR CERVICAL HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Christiane Pienna Soares
Coorientadores: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos
Prof^ª. Dr^ª. Valéria Valente

Araraquara-SP

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e
Documentação Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Baveloni, Franciele Garcia

B353e Estudo do potencial antitumoral da cordialina a em sistema nanoemulsionado para tratamento de linhagens celulares de tumor cervical humano / Franciele Garcia Baveloni. – Araraquara, 2018.

58 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas á Farmácia. Área de pesquisa em Bacteriologia.

Orientadora: Christiane Pienna Soares.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE CORDIALINA A EM SISTEMA NANOEMULSIONADO PARA TRATAMENTO DE LINHAGENS CELULARES DE TUMOR CERVICAL HUMANO

AUTORA: FRANCIELE GARCIA BAVELONI
ORIENTADORA: CHRISTIANE PIENNA SOARES
COORDINADORA: VALERIA VALENTE
COORDINADOR: ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área de conhecimento: CITOLOGIA E BIOLOGIA CELULAR pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. CHRISTIANE PIENNA SOARES
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Profa. Dra. RAQUEL ALVES DOS SANTOS
Núcleo de Pesquisa em Ciências Exatas e Tecnológicas / Universidade de Franca

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 25 de janeiro de 2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida, pelo amor e por me guiar aos caminhos que me levam até Ele.

Aos meus pais, Luis e Zelinda, pelo amor, educação, carinho e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

A minha irmã Maria Fernanda pelo companheirismo, amor, bom humor e apoio incondicional a todos os momentos, principalmente, aos de crise, ajudando-me a superá-los.

A minha amiga Tamíres pelo convívio, carinho, conselhos e apoio incondicional.

Aos amigos Ariane, Cristiane, Enzo e Isabela, por todo apoio e carinho.

À Chistiane, minha orientadora, por tudo. Sua calma, paciência, orientação e confiança.

Aos colegas de laboratório, pelo convívio e aprendizado para este trabalho: Felipe, Juliana, Mariana, Thaís, Renato, Geovana, Bárbara e Rodrigo.

Aos professores André, Marlus e Valéria, pelas discussões científicas e por abrirem as portas de seus laboratórios, permitindo a realização deste trabalho.

Ao técnico do laboratório Marcos por todo o apoio dado para a realização deste trabalho

A todos os funcionários da FCFAR que trabalham diariamente para tornar nosso trabalho mais fácil: às meninas da limpeza, do café, o pessoal da portaria, da administração. Especialmente às funcionárias da seção de pós-graduação: Cristina, Cláudia, Daniela, Christiane e Aniele.

À FCFAR-UNESP e CAPES, pelo apoio institucional e financeiro para a realização desse trabalho.

RESUMO

Atualmente, o câncer cervical é considerado o terceiro tumor mais frequente nas mulheres do Brasil e o seu desenvolvimento, na maioria dos casos, está relacionado com o Papilomavírus Humano (HPV). Frente ao exposto, tornam-se necessários à busca por tratamentos alternativos no combate do câncer cervical a partir dos produtos naturais, como a cordialina A, isolada da planta *Cordia verbenacea* DC. A cordialina A possui forte atividade antineoplásica, como também insolubilidade em meio aquoso. Dessa forma, os Sistemas Nanoemulsionados Lipídicos (SNL) têm sido explorados como ferramentas para aumentar a solubilidade de bioativos poucos polares em meio aquoso, como também aumentar a sua eficácia terapêutica. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a atividade antineoplásica e os mecanismos de morte celular promovidos pela cordialina A, encapsulada e não encapsulada no SNL, nas linhagens celulares de câncer de colo uterino HPV-16 (SiHa), de HPV negativo (C-33A) e de queratinócitos humanos normais (HaCaT). Para a formulação do SNL foi acrescido de colesterol, tampão fosfato e sistema tensoativo composto por polioxietileno 20-cetil éter e Fosfatidilcolina de Soja (FS). O diâmetro de partícula encontrado nas formulações foi de $159,53 \pm 8,0444$ nm e $107 \pm 0,3333$ nm, o índice de polidispersão (PDI) médio foi de $0,38 \pm 0,0466$ e $0,214 \pm 0,0126$ e o potencial zeta foi de $-16,83 \pm 3,15$ mV e $-20,16 \pm 1,68$ mV para SNL e cordialina A + SNL, respectivamente. As fotomicrografias obtidas por microscopia de força atômica (AFM) demonstraram que SNL e SNL + cordialina A apresentaram morfologia ovalada. A atividade citotóxica foi realizada pelo ensaio de Sulforrodamina B (SRB), sendo obtida a Concentração Inibitória 50% (CI₅₀) do tratamento com a cordialina A de 106,58 µM, 83,55 µM e 55,9 µM e para a cordialina A + SNL os CI₅₀ encontrados foram de 0,89 µM, 0,186 µM e 0,35 µM, para as linhagens SiHa, C-33A e HaCaT, respectivamente. O tratamento da cordialina A + SNL promoveu o tipo de morte celular por apoptose e necrose, assim como o dano ao DNA para todas as linhagens celulares por meio dos ensaios de Hoesch/Iodeto e Cometa, respectivamente. Por último, o ensaio com vesículas unilamelares (LUVs) indicou que o tratamento com cordialina A + SNL possivelmente possui pouca interação com a porção apolar da membrana plasmática. Os resultados sugerem que o sistema desenvolvido é promissor para o tratamento do câncer cervical.

Palavras Chaves: Câncer cervical. HPV. cordialina A. Nanoemulsão. Apoptose.

ABSTRACT

Currently, cervical cancer is considered the third most frequent tumor in Brazilian women and its development, in most cases, is related to Human Papillomavirus (HPV). In view of the above, they are necessary to search for alternative treatments in the fight against cervical cancer from natural products, such as cordialina A, isolated from the *Cordia verbenacea* DC plant. The cordialina A has strong antineoplastic activity, as well as insolubility in aqueous medium. Thus, Lipid Nanoemulsion Systems (SNL) have been explored as tools to increase the solubility of a few polar bioactive in aqueous medium, as well as to increase its therapeutic efficacy. The aim of the present study was to evaluate in vitro the antineoplastic activity and mechanisms of cell death promoted by cordialin A, encapsulated and non-encapsulated in the SNL, in cervical cancer cell lines HPV-16 (SiHa) of HPV negative (C-33A) and normal human keratinocytes (HaCaT). For the formulation of the SNL was added cholesterol, phosphate buffer and surfactant system composed of polyoxyethylene 20-cetyl ether and Soy Phosphatidylcholine (FS). The particle diameter found in the formulations was 159.53 ± 8.0444 nm and 107 ± 0.3333 nm, the average polydispersion index (PDI) was 0.38 ± 0.0466 and 0.214 ± 0.0126 and the zeta potential was -16.83 ± 3.15 mV and -20.16 ± 1.68 mV for SNL and A + SNL, respectively. The photomicrographs obtained by atomic force microscopy (AFM) showed that SNL and SNL + cordialin A presented oval morphology. The cytotoxic activity was performed by the Sulforhodamine B (SRB) assay, obtaining the 50% Inhibitory Concentration (IC₅₀) of the treatment with the cordialina A of 106.58 μ M, 83.55 μ M and 55.9 μ M and for the cordialin A + SNL the IC₅₀ were 0.89 μ M, 0.186 μ M and 0.35 μ M for the SiHa, C-33A and HaCaT lines, respectively. The treatment of cordialina A + SNL promoted the type of cell death by apoptosis and necrosis, as well as DNA damage for all cell lines by means of the Hoesch/Iodeto and Cometa assays, respectively. Finally, the unilamellar vesicle assay (LUVs) indicated that the treatment with cordialina A + SNL possibly has little interaction with the apolar portion of the plasma membrane. The results suggest that the developed system is promising for the treatment of cervical cancer.

Key words: Cervical cancer. HPV. cordialina A. Nanoemulsion. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do genoma do HPV.....	15
Figura 2. Imagem esquemática do ciclo viral do HPV nas células da camada basal do epitélio do hospedeiro.....	16
Figura 3. Cordia verbenacea ou “erva-baleeira”	18
Figura 4. Representação esquemática da nanoemulsão.....	21
Figura 5. Estrutura química de cordialina A	23
Figura 6. Diagrama esquemático do sistema de microscopia de força atômica	25
Figura 7. Placa de 96 poços contendo as linhagens celulares SiHa, C-33A e HaCaT coradas com SRB, após tempo de tratamento.	28
Figura 8. Representação esquemática das metodologias de preparação de vesículas multilamelares, unilamelares e pequenas.	29
Figura 9. Representação do ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos.....	31
Figura 10. Fluxograma de análise do ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos.	31
Figura 11. Representação do cometa corado com brometo de etídeo	33
Figura 12. Caracterização morfológica do SNL e do SNL + cordialina A, através da AFM .	36
Figura 13. Ensaio de citotoxicidade SRB. Avaliação da cordialina A em relação à porcentagem de células vivas das linhagens SiHa, C-33A e HaCaT no tempo de tratamento de 24 horas.	37
Figura 14. Ensaio de citotoxicidade SRB. Avaliação da cordialina A encapsulada no SNL em relação à porcentagem de células vivas das linhagens SiHa, C-33A e HaCaT no tempo de tratamento de 24 horas.....	38
Figura 15. Ensaio de citotoxicidade SRB. Comparação entre as concentrações da cordialina A encapsuladas no SNL com porcentagem de células vivas das linhagens SiHa, C-33A e HaCaT nos tempos de tratamento de 24 e 48 horas..	39
Figura 16. Avaliação em porcentagem de liberação da CF em função das concentrações da cordialina A encapsulada no SNL.	42
Figura 17. Taxa de apoptose precoce/tardia e necrose por coloração Hoechst / IP na linhagem celular SiHa	43
Figura 18. Taxa de apoptose precoce/tardia e necrose por coloração Hoechst / IP na linhagem celular C-33A.....	44
Figura 19. Taxa de apoptose precoce/tardia e necrose por coloração Hoechst / IP na linhagem celular HaCaT.....	44
Figura 20. Genotoxicidade da cordialina A + SNL representada pela % de DNA na cauda em linhagem celular SiHa, C-33A e HaCaT	47

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Valores das médias e desvio-padrão dos diâmetros de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta referentes ao SNL e cordialina A + SNL	34
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	microscopia de força atômica
ANOVA	Análise de Variância
AP	apoptose precoce
AT	apoptose tardia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
A431	células escamosas humanas
A549	carcinoma de pulmão
Bcap-37	câncer de próstata humana
CC	cromatografia em coluna
CF	carboxifluoresceína
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-Prep	cromatografia preparativa
CN	controle negativo
CP	controle positivo
CUR	curcumina
CV	controle de veículo
C-33A	célula de carcinoma cervical humana
DAF	diacetato de fluoresceína
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
DMEM	<i>dulbecco's modification of eagle's medium</i>
DOXO	doxorubicina
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
E	<i>early</i>

EJ	carcinoma de bexiga
EM	espectrometria de massas
EP	erro padrão
FA	fase aquosa
FO	fase oleosa
HaCaT	células normais de queratinócitos humanos
Hep2	carcinoma de laringe humana
HepG-2	carcinoma hepatocelular humano
HL-60	leucemia humana pró-mielogênica
HPV	human papillomavirus
HT29	adenocarcinoma colorretal humano
HO	Hoechst 33342
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC₅₀	concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular
IP	iodeto de propídio
IS	índice de seletividade
IV	espectrometria de absorção no infravermelho
K562	leucemia humana mielogênica
L	<i>late</i>
LCR	<i>long control region</i>
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LUVs	vesícula unilamelares
M4Beu	melanoma humano
MDA-468	adenocarcinoma da glândula mamária
MCF-7	carcinoma de mama

MLV	vesículas multilamelares
N	necrose
ORFs	<i>open reading frames</i>
PDI	índice de polidispersão
PB	pares de base
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
pRb	proteína do retinoblastoma
FS	fosfatidilserina
p53	proteína p53
q.s.p	quantidade suficiente para
Raji	linfoma de Burkitt
RMN	ressonância magnética nuclear
SiHa	carcinoma cervical humano imortalizadas pelo HPV-16
SFB	soro fetal bovino
SKOV3	carcinoma ovariano
SNL	sistema nanoemulsionado lípidico
SRB	sulforrodamina B
SUS	Sistema Único de Saúde
SUV	vesículas unilamelares pequenas
TAE	tumor ascítico de Ehrlich
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i>
UV	ultravioleta
U937	linfoma histiolítico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	CÂNCER DE COLO UTERINO E HPV	13
1.2.	BIOLOGIA E CICLO DE VIDA DO Papilomavírus Humano-HPV	15
1.3.	ASPECTOS GERAIS DA PLANTA <i>Cordia verbenacea</i>	18
1.4.	SISTEMA NANOEMULSIONADO LÍPIDCO - SNL.....	20
2.	OBJETIVOS.....	22
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	OBTENÇÃO DA CORDIALINA A	23
3.2	PREPARO DA FORMULAÇÃO DO SNL	24
3.3	INCORPORAÇÃO DA CORDIALINA A NO SNL.....	24
3.4	MICROSCOPIA DE FORÇA ATOMICA – AFM	25
3.5	LINHAGENS CELULARES	26
3.6	CULTURA CELULAR SiHa, C-33A e HaCaT.....	26
3.7	ENSAIO DE SULFORODAMINA B - SRB.....	27
3.8	ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE CARBOXIFLUORESCÉINA	28
3.8.1	ENSAIO DE PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS	28
3.8.2	ESTUDOS DE PERMEABILIZAÇÃO	29
3.9	MORTE CELULAR	30
3.9.1	ENSAIO CITOMORFOLÓGICO DE MARCAÇÃO COM HOECHST E IODETO DE PROPÍDEO	30
3.10	GENOTOXICIDADE.....	32
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO SNL E CORDIALINA A +SNL.....	34
4.2	MICROSCOPIA DE FORÇA ATOMICA- AFM.....	35
4.3	AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DA CORDIALINA A E DA CORDIALINA A ENCAPSULADA NO SNL.....	37
4.4	AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DA CARBOXIFLUORESCÉINA-CB	41
4.5	ENSAIO CITOMORFOLÓGICO DE VIABILIDADE CELULAR POR EXCLUSÃO COM FLUOROCROMOS: HOECHST, IODETO DE PROPÍDEO E DIACETATO DE FLUORESCÉINA	43
4.6	AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE - ENSAIO DO COMETA.....	46
5	CONCLUSÕES.....	48
6	PERSPECTIVAS	49
7	REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER DE COLO UTERINO E HPV

A palavra câncer, de origem grega, faz analogia entre o crescimento infiltrante da doença com a forma que o caranguejo, crustáceo, se prende ao solo usando suas patas. Um estudo evidenciou, através da primeira análise histopatológica de uma múmia egípcia, o diagnóstico de câncer retal, evidenciando que desde a antiguidade, os tumores sempre estiveram presentes na humanidade (DAVID; ZIMMERMAN, 2010; BROWN, ATTARDI, 2005; MEIRA, 2011).

Atualmente, o câncer é um nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, tendo como característica em comum, o crescimento celular desordenado em tecidos e órgãos, podendo migrar para outras regiões do corpo, no processo denominado, metástase (BROWN, ATTARDI, 2005; MEIRA, 2011). Dessa forma, o tumor de colo uterino é considerado a segunda causa de morte por câncer em mulheres que vivem em países em desenvolvimento, sendo no Brasil, o terceiro tumor mais frequente, com estimativas de 16.340 novos casos, atrás do câncer de mama, colorretal e a quarta causa de morte por câncer entre a população feminina (WHO, 2015; INCa, 2016).

Nesse sentido, o câncer cervical, na maioria dos casos, é uma Doença Sexualmente Transmitida (DST), ocasionado pelo Papilomavírus Humano (HPV) (INCa, 2016; PSYRRI; DIMAIO, 2008; PINTO et al., 2005). O HPV pertence à família *Papillomaviridae* do gênero *Papovavirus*, apresenta tropismo por células epiteliais, promovendo infecção no trato respiratório, digestivo superior e mucosa anogenital (DOORBAR, 2005; VAN REGENMORTEL et al., 2000). Já foram identificados mais de 200 papilomavírus, os quais apresentam incidência elevada na população feminina por fatores epidemiológicos, tais como, múltiplos parceiros sexuais, consumo de álcool e tabaco, uso de contraceptivos orais, agentes infecciosos como *Chlamídia* e *Candida*, a qual é considerada um cofator no determinismo de neoplasias cervicais quando associadas ao HPV (IARC, 2005; BERNARD et al., 2010; GEARHART et al., 2015; CHELIMO et al., 2013; MELO et al., 2003; PLATZ-CHRISTENSEN et al., 1994).

Os diferentes tipos de HPV, segundo *International Agency for Research on Cancer* (IARC), são classificados de acordo com o potencial de induzir a transformação celular, denominados vírus de alto e baixo risco oncogênico (BEHZADI et al., 2015; CHELIMO et

al., 2013; TOMMASINO, 2014). Os tipos de HPV de alto risco, 16 e 18, respondem, por cerca de 70% dos casos do tumor cervical, por meio de mecanismos de complexação da oncoproteína viral E6 com a proteína p53 da célula hospedeira, a qual tem função supressora de tumor, ocasionando além da sua degradação, a inibição do processo de morte celular por apoptose. Já E7 associa-se com a proteína retinoblastoma (pRb), induzindo os fatores de transcrição da E2F, sendo liberada da pRb para transcrever genes importantes no controle da divisão celular, promovendo, dessa forma, a progressão do ciclo celular, culminando no câncer cervical (TOMMASINO, 2014; GEARHART et al., 2015; BRAGAGNOLO; ELI; HAAS, 2010).

Em estágios iniciais, o câncer de colo uterino se apresenta assintomático e a descoberta se faz por meio de programas de rastreamento e detecção precoce de lesões cervicais, através do exame citopatológico do Papanicolau. Já a conduta terapêutica para lesão neoplásica se fundamenta no diagnóstico, estadiamento e prognóstico, levando em consideração a localização, tamanho, tipo histológico do tumor, além da idade e do desejo de ter filhos da mulher (CHAMBÔ FILHO et al., 2001, FRIGATO; HOGA, 2003).

Desse modo, o tratamento indicado para este tipo de câncer compreende cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A princípio, quando o tumor ainda não sofreu metástase as pacientes conseguem ser curadas através de medidas locais, como cirurgia ou radioterapia. No entanto, esses casos representam apenas um terço da população afetada, nos demais casos, a neoplasia caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, indicando a necessidade de uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada, em cerca de 60-70% dos casos, com a quimioterapia associada à cirurgia ou radioterapia. Entretanto, estes quimioterápicos afetam as células normais, principalmente as células de reprodução rápida, como as da medula óssea, da mucosa intestinal e dos folículos pilosos, provocando efeitos colaterais severos, como a mielodepressão, náuseas, vômitos severos, neuropatia periférica, ototoxicidade, nefrotoxicidade e fadiga (BONASSA, 2000; CHAMBÔ FILHO, 2001, FRIGATO; HOGA, 2003).

Mesmo com o desenvolvimento da vacina profilática quadrivalente (HPV tipos 6, 11, 16 e 18: Gardasil[®] - MSD) e a bivalente (HPV tipos 16 e 18: Cervarix[®] - GSK) licenciadas pelo FDA e ANVISA em 2006 e 2009, respectivamente, a sua maior efetividade é para pacientes que nunca entraram em contato com o HPV ou atividade sexual. Desse modo, são necessárias novas pesquisas para tratamentos alternativos contra o câncer de colo uterino, a partir de moléculas isoladas de plantas, já que existe uma grande diversidade dos produtos naturais, os quais se tornam uma fonte promissora na busca por moléculas eficazes na terapia

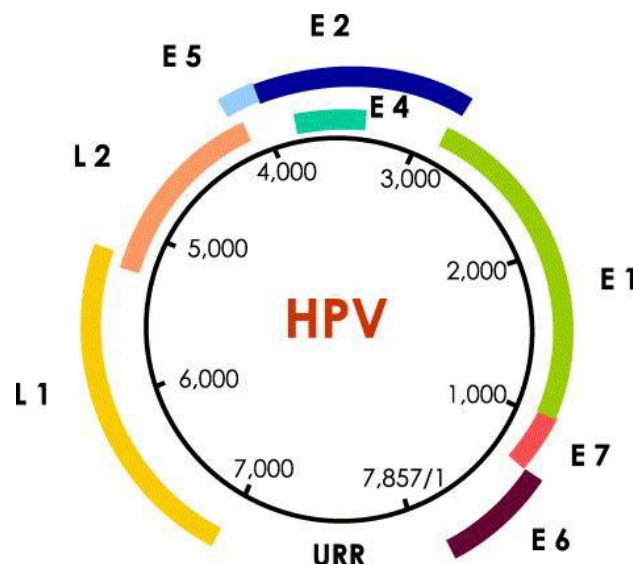
contra o câncer (LIMA, 2009; MANS et al., 2000, BONNEZ; REICHMAN, 2010, MUÑOZ et al., 2008, BARR; TAMMS, 2007; KEAM; HARPER, 2008; MONIE et al., 2008; SIDDIQUI; PERRY, 2006).

1.2. BIOLOGIA E CICLO DE VIDA DO Papilomavírus Humano-HPV

O HPV é um pequeno vírus não envelopado, de DNA de fita dupla, possuindo capsídeo proteico, composto por duas proteínas estruturais, as quais se organizam em 72 subunidades, denominados capsômeros, de padrão icosaédrico com 55 nm de diâmetro (HORVATH et al., 2010).

O genoma do HPV, Figura 1, apresenta 8.000 pares de bases, organizado em oito *Open Reading Frames* (ORFs), dividido em dois domínios (BOULET et al., 2007).

Figura 1. Representação esquemática do genoma do HPV: genes da região tardia (L), genes da região precoce (E) e a região não codificadora (LCR ou URR) (MUÑOZ et al, 2006).



O primeiro domínio é a região não codificadora, denominada *Long Control Region* (LCR) ou *Upstream Regulatory Region* (URR), localizada entre os genes L1 e a região precoce, possuindo, aproximadamente, 1.000 pares de bases (pb). O primeiro domínio, embora não tenha função codificadora proteica, contém os elementos promotores, os locais de ligação de fator de transcrição e a origem da replicação viral, representando 15% do genoma viral (SOUSA et al., 1990; CHEAH & LOOI, 1998; KANODIA et al., 2007; PSYRRI & DIMAIO, 2008; DOORBAR et al., 2005).

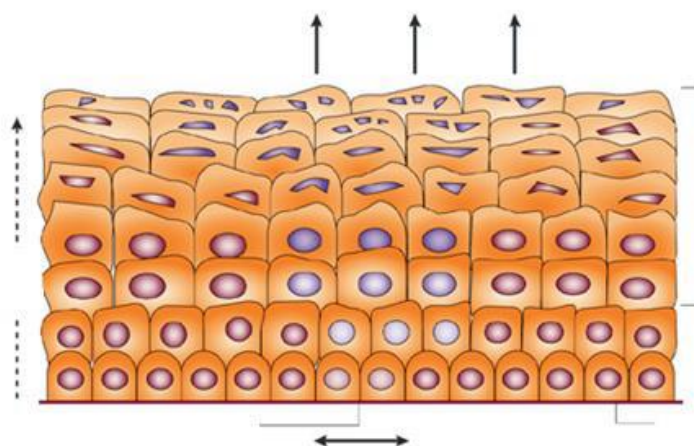
O segundo domínio, região L (*late* ou região tardia) e região E (*early* ou região precoce), codifica as proteínas virais do HPV com, aproximadamente, 3.000 e 4.000 pb, respectivamente, representando 85% do genoma do HPV (ZUR HAUSEN, 2002; PSYRRI & DIMAIO, 2008; ZUR HAUSEN, 2009; HORVATH et al., 2010).

Os genes da região tardia, L1 e L2, formam sequências altamente conservadas em todos os HPVs, codificando as proteínas do capsídeo viral, o qual é responsável pela antigenicidade, sendo a proteína L1, de 54 kDa, como principal, e a L2, de 52 kDa, como secundária (MÜNGER & HOWLEY 2002; ZUR HUNSEN 2002, 2009; ZHENG & BAKER, 2006; HORVATH et al., 2010).

Os genes precoces são responsáveis pela replicação do DNA (gene E1), pela transcrição (gene E2), pela maturação do vírus, pela alteração da matriz, pelo citoesqueleto celular (gene E4), pelo estímulo da proliferação e, por último, pela manutenção da transformação celular (genes E5, E6 e E7) (BOULET et al., 2007).

O ciclo de vida do HPV (figura 2) está diretamente ligado ao ciclo de diferenciação das células epiteliais do hospedeiro infectado e inicia-se quando o vírus do HPV entra nas células da camada basal, através de micro lesões da mucosa ou da epiderme, onde o HPV é capaz de proliferar-se de modo a criar um ambiente competente de replicação, o que permite à amplificação do genoma e acondicionamento do vírus (BOULET et al., 2007; STANLEY, 2008; DOORBAR, 2005).

Figura 2. Imagem esquemática do ciclo viral do HPV nas células da camada basal do epitélio do hospedeiro. (adaptado de ZUR HUNSEN, 2002).



No início da infecção, baixos níveis de DNA viral são sintetizados nas células infectadas da camada basal, formando aproximadamente 50 a 100 cópias de partículas

epissomais do genoma viral por célula (PETT; COLEMAN, 2007). A infecção das células basais pelo HPV leva à ativação de uma cascata de expressão de genes virais que resulta na replicação de seu genoma, no entanto, a expressão destes genes é amplamente reprimida, existindo apenas uma limitada expressão de genes virais específicos da região precoce. Os genes virais E1 e E2 e os fatores de replicação são os primeiros a serem expressos e formam um complexo que se liga à origem de replicação, atuando no recrutamento de polimerases celulares e proteínas acessórias que medeiam à replicação do DNA (KANODIA, 2007). Após a entrada nas camadas suprabasais, o genoma viral circular é então replicado e proteínas estruturais são formadas. Nas camadas superiores da epiderme ou mucosa, as partículas virais completas são montadas e liberadas, infectando assim outras células (ZUR HUNSEN, 2002).

O HPV utiliza a maquinaria celular da célula hospedeira para se replicar, e este processo ocorre no núcleo celular. Inicialmente, após a infecção, o HPV é identificado em partículas virais extracromossômicas, epissoma, replicando seu material genético concomitantemente com os cromossomos da célula hospedeira, permanecendo em uma fase latente, um processo relativamente benigno (ALBERTS, 2010). Um passo crucial, na progressão para o câncer, é a integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira. (PARFANOF, 2014). As moléculas essenciais na replicação viral para transformação maligna são E6 e E7, inativando dois importantes genes supressores de tumor da célula hospedeira. Ambas as proteínas, E6 e E7, induzem a proliferação, imortalização e transformação maligna das células infectadas (BOULET et al., 2007). A proteína E7 associa-se com pRb, um regulador negativo do ciclo celular que normalmente previne a progressão da fase G1 para a fase S, por se associar ao fator de transcrição E2F. Ao se ligar a E7, pRb é degradada liberando E2F, a qual estimulará a transcrição de genes alvos associados a replicação do DNA, resultando na proliferação celular desordenada (ZUR HAUSEN, 2002; MOTOYAMA et al., 2004; IARC, 2005).

A proteína viral E6 completa o papel da E7, prevenindo a apoptose em resposta à entrada não programada da fase S induzida por E7. A associação da proteína E6 aos tipos de HPV de alto risco, 16 e 18, com a proteína p53 da célula hospedeira resulta na degradação da p53, comprometendo a interrupção do crescimento celular e também da ativação da apoptose induzida por erros no DNA genômico. A perda do controle do ciclo celular, mediado por p53, favorece a instabilidade cromossômica e acúmulo de mutações na célula infectada (DOORBAR; CUBIE, 2005).

Sugere-se, então, que a integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira pode alterar a expressão gênica viral levando ao câncer (MADKAN et al., 2007). Os estudos

direcionados na compreensão da interação entre a célula hospedeira e o HPV mostram como a pesquisa básica pode contribuir para prevenção do câncer (ZUR HAUSEN, 2002).

1.3. ASPECTOS GERAIS DA PLANTA *Cordia verbenacea*

Popularmente conhecida como erva-baleeira (MILLER; GOTTSCHLING, 2007), o chá de folhas de *C. verbenacea* é empregado na cicatrização de feridas externas e em úlceras, inclusive em ferimentos provocados por peixes pela comunidade de pescaria local, sugerindo dessa forma, o nome popular da planta (LORENZI; MATOS, 2002; PANIZZA, 1998; VENTRELLA; MARINHO, 2008).

Essa planta, *C. verbenacea*, é encontrada em áreas tropicais e subtropicais do mundo, ocorrendo na Ásia, África, Austrália e América do Sul, podendo ser nomeada também como *Cordia salicina* DC., *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult., *Lithocardium fresenii* Kuntze, *Lithocardium salicinum* (A. DC.) Kuntze e *Lithocardium verbenaceum* Kuntze, apresenta caráter arbóreo a arbustivo, ramificado e aromático comum em formações sobre dunas e nos campos arenosos medindo entre 1,5 a 2,5 metros (Figura 3) (RAPISARDA et al., 1997; BAYEUX et al., 2002; LORENZI; MATOS, 2002, GILBERT; FAVARETO, 2013). No Brasil, essa planta é encontrada na faixa litorânea brasileira estendendo da região amazônica até o Rio Grande do Sul (BAYEUX et al, 2002).

Figura 3. *Cordia verbenacea* ou “erva-baleeira” (GILBERT; FAVARETO, 2013)



Na medicina popular, o extrato bruto das partes aéreas da erva-baleeira é amplamente utilizado através de extratos hidroetanólicos, decocções e infusões com finalidade terapêutica antimicrobiana, analgésica, de tratamento de artrite, de reumatismo e problemas de coluna (SERTIÉ et al., 2005; SILVA JR et al., 1994).

Em 2005, o laboratório Aché[®] lançou no mercado farmacêutico o primeiro medicamento fitoterápico totalmente desenvolvido no Brasil, Acheflan[®], o qual é um produto

anti-inflamatório a base de óleo essencial de *C. verbenacea*, apresentado nas formas farmacêuticas de aerosol e creme, cada uma contendo 5,0 mg do óleo essencial, padronizado em 2,3-2,9% de monoterpene e α -humuleno. Além disso, *C. verbenacea* faz parte do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; SANTOS; PINHO, 2010; BRASIL, 2010).

Em análises fitoquímicas de *C. verbenacea*, foram identificados flavonoides, ácidos graxos, monoterpene, sesquiterpene e triterpene. Nesse sentido, a cordialina A, a qual é um triterpene do tipo damarano e majoritária do extrato etanólico de folhas de *C. verbenacea*, pertence à classe dos triterpene, os quais apresentam uma ampla atividade terapêutica na literatura, tais como, anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, antidepressiva e antimicrobiana (AKISUE et al., 1983; SERTIÉ et al., 1988; SERTIÉ et al., 1990; SERTIÉ et al., 1991, MEIRA, 2011; YANG; DOU; 2010, SINGH; DUBEY, 2001, RAMACHANDRAN, PRASAD, 2008, KO et al., 2008, ZHOU et al., 2010). Por apresentarem uma grande diversidade estrutural química, os triterpene vêm despertando um grande interesse na pesquisa, porém essa classe química apresenta baixo efeito citotóxico, *in vitro*, podendo essa característica ser atribuída, devida a sua baixa solubilidade em água. Uma estratégia para solucionar este problema, de ordem galênica, pode ser a encapsulação da molécula de baixa solubilidade em sistema de liberação controlada, como as nanoemulsões, com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica da molécula para o estudo em questão (MEIRA, 2011, LASZCZYK et al., 2006, JÄGER et al., 2007, RODRIGUES, 2014).

1.4. SISTEMA NANOEMULSIONADO LÍPIDCO - SNL

Atualmente, o interesse para o desenvolvimento de sistemas nanotecnológicos direcionados principalmente na área terapêutica para o câncer vem sendo demonstrado por meio de incentivos financeiros de países como os EUA, Japão e os da Comunidade Europeia, os quais lideram o custeio para estas pesquisas, enquanto que no Brasil, o investimento ainda que modesto, tem apoiado iniciativas nacionais para a promoção dessa área (DIMER et al., 2013, SHI et al., 2010).

Em 1995, a doxorrubicina, sob a forma lipossomal peguilado, foi autorizada pelo FDA, sendo produzido pelo laboratório OrthoBiotech, de nome comercial Doxil[®]. Em comparação com o cloridrato de doxorrubicina a forma lipossomal da mesma demonstrou menos cardio e nefrotóxica em relação ao cloridrato, além de conferir benefícios nas propriedades físico-químicas do ativo, como o aumento da solubilidade aquosa, a liberação controlada e proteção frente aos diferentes compartimentos do corpo humano (TARDI, BOMAN; CULLIS, 1996, ETHERIDGE et al., 2013, TOBLER, 2014).

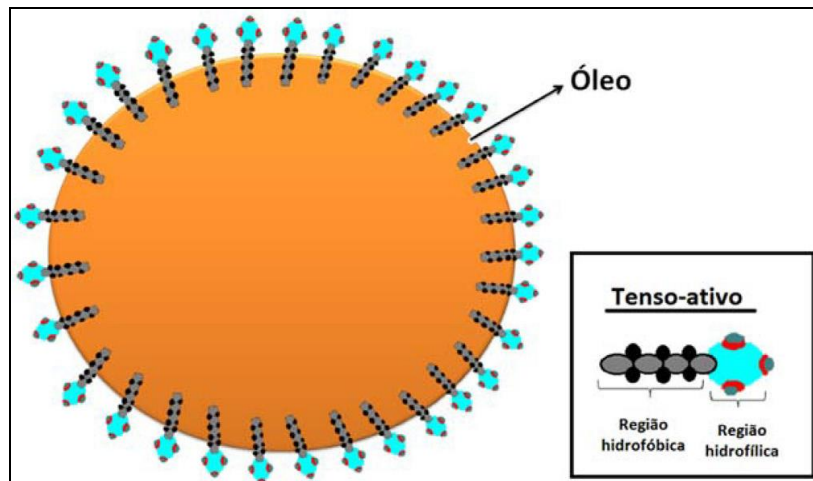
Apesar das propriedades tecnológicas interessantes, a comercialização dos medicamentos nanoestruturados ainda é escassa em relação ao cenário referente ao número crescente de pessoas acometidas pelo câncer, uma vez que os efeitos colaterais das terapias convencionais disponíveis empregadas são severos (ALLEN; CULLIS, 2004, VIEIRA; GAMARRA, 2016).

Portanto se faz necessário o desenvolvimento de novas pesquisas com bioativos de fontes naturais em sistemas nanoemulsionados, promovendo uma alternativa promissora na terapia contra o câncer (SOLOMON; LEE, 2009, VIEIRA; GAMARRA, 2016).

De forma conceitual, as nanoemulsões são sistemas coloidais de dois líquidos imiscíveis dispersos em uma fase aquosa (O-A) ou oleosa (A-O), possuindo tamanho entre 50 e 1000 nm (SHAH et al., 2010, TADROS et al., 2004, SANTOS, 2013). A estabilidade dos sistemas nanoemulsionados é adquirida através de movimentos Brownianos, apresentando boas características físicas e químicas, como transparência, espalhabilidade, boa penetração tecidual, devida à baixa tensão superficial e ao tamanho reduzido das gotículas, despertando fortes interesses da sua aplicabilidade pelas indústrias farmacêuticas (BARRY, 2001, MARUNO, 2009, TADROS et al., 2004, FERNANDEZ et al., 2004, SONNEVILLE-AUBRUN et al., 2004; SOLANS et al., 2005, RAMOS, 2014).

De forma geral, as nanoemulsões O-A (Figura 4) se apresentam com boas características de biocompatibilidade, em razão das matérias primas empregadas, como os óleos de origem natural ou semissintéticos e os fosfolipídeos, possibilitando a veiculação de diversos tipos de moléculas, principalmente com características hidrofóbicas, como o estudo de Chen e colaboradores (2005) que encapsularam o ácido ursólico e o seu isômero ácido oleanólico em sistemas nanomulsionados com aplicação hepatoprotetora. Shafiq e colaboradores (2007) empregaram estes sistemas para encapsular o anti-hipertensivo ramipril, sendo observado um aumento de 229,62% da biodisponibilidade em relação às cápsulas contendo o mesmo fármaco (OLIVEIRA, 2014, BRUXEL et al., 2012).

Figura 4. Representação esquemática da nanoemulsão O-A (PIRES; MOURA 2017)



2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudo do potencial antitumoral da cordialina A em sistema nanoemulsionado para tratamento de linhagens celulares de tumor cervical humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

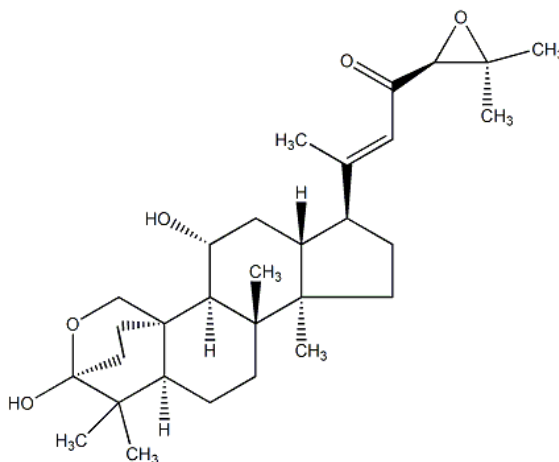
- Caracterizar os padrões de estabilidade do SNL através do diâmetro de partícula, índice de dispersão e potencial zeta;
- Caracterizar a morfologia do SNL e SNL + cordialina A, através da Microscopia de Força Atômica (AFM);
- Avaliar a citotoxicidade da cordialina A e do cordialina A + SNL, através do ensaio Sulforrodamina B (SRB) em linhagens celulares SiHa, C-33A e HaCaT;
- Avaliar a liberação de carboxifluosceína através das vesículas unilamelares-LUV's da cordialina + SNL;
- Avaliar qualitativamente e quantitativamente a apoptose e necrose celular, para diferenciação de apoptose precoce, tardia e necrose, utilizando os corantes de Hoechst e iodeto de propídio, nas linhagens celulares de carcinoma cervical SiHa, C-33A e HaCaT;
- Detectar danos precoces de DNA nas linhagens celulares de carcinoma cervical SiHa, C-33A e HaCaT, para avaliação de genotoxicidade por meio do teste do cometa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DA CORDIALINA A

A molécula cordialina A, Figura 5, foi obtida a partir do extrato etanólico de folhas de *C. verbenacea*, as quais foram coletadas no campo experimental do CPQBA-UNICAMP, no distrito de Betel em Paulínia-SP. O isolamento da substância foi realizado utilizando técnicas cromatográficas tais como, Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia em Coluna (CC), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) e Cromatografia Preparativa (CLAE-Prep). A identificação foi realizada por métodos espectrométricos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C unidimensional e bidimensional, Espectrometria de Absorção no Infravermelho (IV) e no Ultravioleta (UV), realizados pelo aluno de doutorado Juhan Augusto Scardelato Pereira do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara- UNESP.

Figura 5. Estrutura química de cordialina A (PubChem, 2018)



3.2 PREPARO DA FORMULAÇÃO DO SNL

O desenvolvimento da formulação do SNL foi adaptado da metodologia de FORMARIZ (2010) e BONIFACIO (2014). Os componentes empregados no sistema foram o colesterol, constituindo a Fase Oleosa (FO) – 8%; o tampão fosfato, Fase Aquosa (FA) – 82% e o sistema Tensoativo (T) – 10%, o qual foi formado por 66,7% de polioxietileno 20-cetil éter (Brij 58[®]) e 33,3% de Fosfatidilcolina de Soja (FS - Epikuron[®] 200).

A formulação do SNL foi preparada em um béquer transparente, sendo transferido colesterol e sistema tensoativo, na proporção 2:1. Desta forma, foi construído um diagrama de fases, fixando-se a proporção de tensoativo juntamente com a FO, procedendo a titulação com a FA, tampão-fosfato 50 mmol.L⁻¹, em pH 7,4. A mistura foi sonicada, usando sonicador de haste, Q700 da QSonica[®], utilizando os parâmetros de 700 Watts de potência, com amplitude de 17%, em modo descontínuo, por 10 minutos, com intervalo de 30 segundos a cada 2 minutos, em banho de gelo durante todo o processo. Após sonicação, o SNL foi centrifugado a 11.180 (x g) por 10 minutos, para eliminar os resíduos de titânio liberados pela haste do sonicador.

Todas as regiões do sistema foram classificadas visualmente como viscosas ou líquidas, opticamente transparentes, semitransparentes, translúcidas ou opacas, e, ainda, por separação de fases. Desse modo, foi possível delimitar as diferentes regiões no diagrama de fases e, a partir desses dados, foram selecionadas as regiões do sistema para a incorporação da cordialina A. Dessa forma, antes da incorporação da cordialina A, foram analisados os parâmetros de diâmetro de partícula, de índice de polidispersão (PDI) e do potencial zeta, utilizando o equipamento Zetasizer Nano NS – Malvern Instruments[®], a fim da verificação da estabilidade do sistema.

3.3 INCORPORAÇÃO DA CORDIALINA A NO SNL

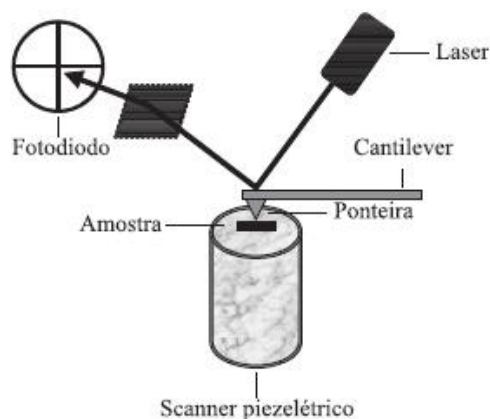
Após, realizada a formulação do SNL foi incorporada a cordialina A, adicionando 2 mg dessa molécula em 1 mL do SNL, sendo realizado a homogeneização da mistura através do sonicador, por 10 minutos, com amplitude de 17%, modo descontínuo, em banho de gelo e, por último, realizada novamente a verificação dos parâmetros de estabilidade (diâmetro de partícula, PDI e potencial zeta), obtendo uma concentração de 2 mg/mL da cordialina A incorporado ao SNL. O preparo do SNL, a incorporação da cordialina A ao SNL e a caracterização dos parâmetros de estabilidade, como diâmetro de partícula, PDI e potencial

zeta, foram realizados pela aluna de doutorado Kayla Petronila Medina Alarcon do Departamento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

3.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA – AFM

A Microscopia de Força Atômica (AFM) baseia-se na emissão de íons e elétrons, como métodos de aumento, desenvolvidos durante o século XX. Em 1990, a AFM foi uma ferramenta científica, sendo capaz de permitir a análise de superfícies de materiais em nível atômico, promovendo um aumento do seu uso em publicações nas áreas biológicas (VALERA et al., 2000, FERREIRA; YAMANAKA, 2006). O princípio do funcionamento do AFM baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal (ponteira) de alguns micras de comprimento (100 a 200 μm) com menos de vinte nanômetros de diâmetro, integrada em um cantilever flexível. A sonda, a qual é composta pela ponteira e cantilever, para alcançar resolução atômica, termina em um conjunto de átomos. A força entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o cantilever se aproxime ou se afaste, sendo essa deflexão proporcional à força de interação. Na parte superior da haste, há um espelho que reflete a luz de um feixe de laser, passando por uma lente que incide sobre um fotodetector (fotodiodo) de quatro quadrantes, medindo as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do cantilever, demonstrados na Figura 6 (HOWLAND; BENATAR, 1996, WORCESTER et al., 1988; FERREIRA; YAMANAKA, 2006).

Figura 6. Diagrama esquemático do sistema de microscopia de força atômica (FERREIRA; YAMANAKA, 2006).



À medida que a ponta varre a amostra, a mesma é deslocada sob a ponta, formando os diferentes tipos de “acidentes geográficos” encontrados sobre a superfície. As variações das interações são os fatores que provocam diferentes deflexões. Essas diferenças, captadas no detector, são armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais. A força mais comumente associada com AFM na deflexão do cantilever é a força de *van der Waals*. Em geral, os estudos com AFM podem ter aplicações topográficas com o objetivo de obter imagens de superfície da amostra para uma caracterização estrutural e dinâmica. Em sistemas biológicos incluindo células, bactérias, vírus e biomoléculas, possibilita a compreensão dos fenômenos biofísicos/químicos, sendo possível obter novas informações referentes à morfologia das partículas, como o estudo proposto para a ocasião, utilizando a cordialina A + SNL (HOWLAND; BENATAR, 1996, WORCESTER et al., 1988; FERREIRA; YAMANAKA, 2006). As imagens foram realizadas pelo equipamento *Atomic Force Microscopy* (AFM - BRUKER Dimension ICON – Santa Barbara - CA - EUA), com uma ponta de formato retangular de silício, constante de mola igual a 42N/m, oscilação livre de 330KHz e modo de contato intermitente, em colaboração com o Prof. Dr. Marcelo de Assumpção Pereira da Silva, nas dependências do Instituto de Física de São Carlos – IFSC/USP, São Carlos, SP, Brasil.

3.5 LINHAGENS CELULARES

SiHa (ATCC HTB-35): células originárias de carcinoma de células escamosas do cérvix uterino grau II, infectadas com HPV16 (1 a 2 cópias/célula), hipertriploide (69 a 72 cromossomos), com morfologia epitelial.

C-33A (ATCC HTB-31): células originárias de biópsias de carcinoma do cérvix uterino, negativas para o DNA e RNA do HPV, pseudodiploides (70% das células tem 46 cromossomos), com morfologia epitelial.

HaCaT (CLS 300493): células originárias da pele, histologicamente normal (queratinócitos), transformadas espontaneamente *in vitro*.

3.6 CULTURA CELULAR SiHa, C-33A e HaCaT

As linhagens SiHa, C-33A e HaCaT foram cultivadas em uma mistura 1:1 (v/v) DMEM e Ham's F10 (Sigma Co., St. Louis, USA) acrescido de 100 U/mL de penicilina, 100

$\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, $0,25 \mu\text{g/mL}$ de anfotericina B, $0,1 \text{ mg/mL}$ de kanamicina (Sigma) e 10% de soro fetal bovino (Cultlab, Campinas, Brasil).

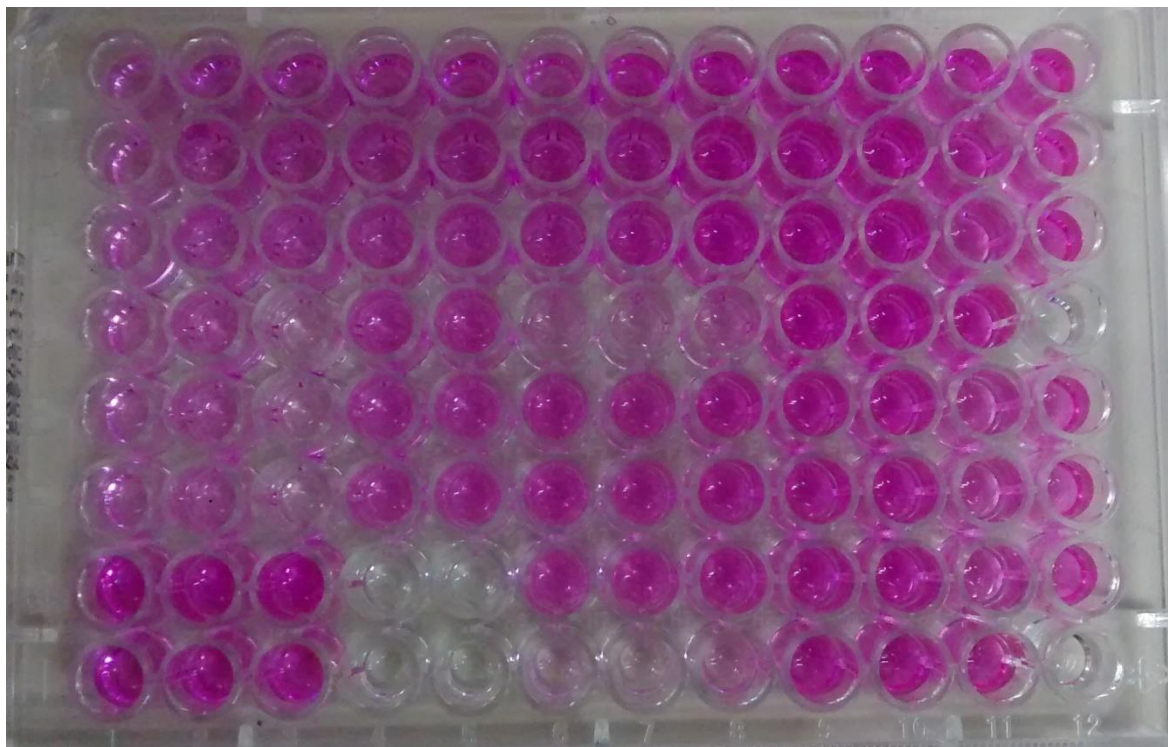
3.7 ENSAIO DE SULFORRODAMINA B - SRB

O ensaio de Sulforrodamina B (SRB) é usado para determinar a densidade celular, baseado na mensuração do conteúdo de proteína celular. A SRB é um corante catiônico que se combina eletrostaticamente às proteínas. O corante fixado, medido fotometricamente, após a solubilização, é correlacionado com a taxa de síntese proteica total e, então, com a proliferação celular. Todo protocolo técnico foi seguido conforme as recomendações do fabricante (sigma-aldrich S1402).

Para determinação da citotoxicidade e seletividade sobre as linhagens, as células foram cultivadas em placas de cultura de células de 96 poços, na concentração de 1×10^5 células/mL, em estufa a 37°C , atmosfera com 5% de CO_2 , durante 24 horas, antes do tratamento. As linhagens celulares SiHa, C-33A e HaCaT foram tratadas com cordalina A e cordalina A + SNL nas concentrações que variaram de $0,4$ a $205,7 \mu\text{M}$, durante os tempos de tratamento de 24 e 48 horas para a determinação do IC_{50} . Os controles de veículos utilizados foram o DMSO 1% e 1 g/mL de SNL e, por último, o controle positivo foi a doxorrubicina, para ambos os tratamentos. Após a incubação, as células foram fixadas com ácido tricloroacético 50% (m/v) por 60 minutos a 4°C . Logo após, as placas foram lavadas com água destilada e secas em temperatura ambiente. As células foram coradas com SRB 0,4% (Figura 7), durante 20 minutos e, posteriormente, lavadas com ácido acético 1%. Após a secagem das placas, o corante ligado a proteínas das células foi solubilizado com solução Tris-base 10 mM (pH 10,5), sob agitação durante 45 segundos e, então, realizada a leitura em absorvância de 570 nm (Figura 7) (SKEHAN et al., 1990; VOIGT, 2005). A porcentagem de células vivas foi calculada em relação ao controle de veículo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, de acordo com a equação 1:

$$\text{Células Vivas (\%)} = \frac{\text{Absorvância do Teste} - \text{Absorvância do Branco}}{\text{Absorvância do controle de Veículo} - \text{Absorvância do Branco}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Figura 7. Placa de 96 poços contendo as linhagens celulares SiHa, C-33A e HaCaT coradas com SRB, após tempo de tratamento.



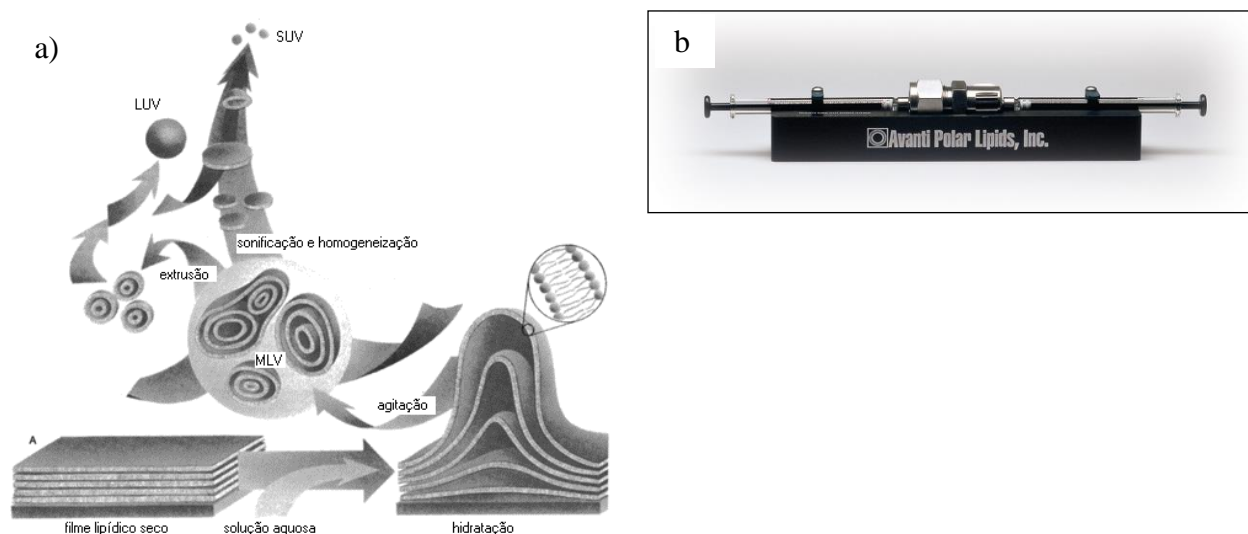
3.8 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE CARBOXIFLUORESCÉINA

3.8.1 ENSAIO DE PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS

Para elucidar o mecanismo de interação entre a molécula de interesse com a membrana celular, empregam-se modelos que a mimetizam, como o modelo de vesículas unilamelares grandes (LUV's) com aparato da espectroscopia de fluorescência. A preparação dessas vesículas foi baseada em métodos já descritos na literatura, esquematizada na Figura 8 e modificados de acordo com a composição lipídica desejada. Dessa forma, as LUVs foram preparadas, sendo 75% de POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) e 25% de POPG (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)). O filme lipídico foi pesado e diluído em uma solução contendo 4:1 clorofórmio/metanol num tubo de ensaio. O solvente foi evaporado rapidamente utilizando N_2 . O biofilme lipídico foi então colocado sob vácuo *overnight* e hidratado a $60^\circ C$ com um tampão contendo 80 mmol/L de carboxifluoresceína (CF), 10 mmol/L de Tris, pH 7,4, e 0,15 mol/L de NaCl para dar uma concentração final de lipídeo de 15 mmol/L. Esta suspensão foi submetida a extrusão 40 vezes através de dois filtros empilhados de polycarbonato Nucleopore de 200 nm de tamanho de

poro utilizando um sistema de extrusão a partir de Avanti Polar Lipids (Alabama, EUA) (Figura 8b), a aproximadamente 40°C. As vesículas foram separadas a partir da carboxifluoresceína (CF) não encapsulada por filtração em gel em Sephadex G-50, utilizando um tampão contendo 0,01 mol / L de Tris, pH 7,4, e 0,15 mol / L de NaCl para eluição.

Figura 8. a) Representação esquemática das metodologias de preparação de vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares (LUV) (SANTOS; CASTANHO, 2002). b) Imagem do extrusor (Adaptado de www.avantilipids.com).



3.8.2 ESTUDOS DE PERMEABILIZAÇÃO

A capacidade de permeação da cordialina A encapsulada no SNL foi avaliada mediante a liberação da CF das vesículas após a adição de 1,78 μM , 0,89 μM , 0,445 μM de cordialina A. Esta por sua vez, foi determinada por meio do aumento da intensidade de fluorescência em 520 nm (comprimento de onda de excitação = 490 nm) num espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse (Varian). A determinação do valor correspondente a 100% de liberação de CF (100% de permeabilização) foi realizada após a adição de 10% do detergente Triton X-100 (25 μL). O volume de vesícula colocado foi aquele que proporcionou o aumento de 4 vezes em relação ao valor inicial. Os dados obtidos foram apresentados em função da porcentagem de liberação de CF após a adição da amostra no sistema, por meio da equação: $R\% = [(F_{fin} - F_{in}) / (F_{max} - F_{in})] \times 100$ onde F_{in} e F_{fin} representam a fluorescência inicial e final antes e após à adição do peptídeo. F_{max} é a fluorescência após a adição de Triton-X. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.9 MORTE CELULAR

3.4. ENSAIOS DE APOPTOSE

3.9.1 ENSAIO CITOMORFOLÓGICO DE MARCAÇÃO COM HOECHST E IODETO DE PROPÍDEO

O ensaio citomorfológico de marcação com Hoechst 33342 (HO) e iodeto de propídeo (IP) permite a diferenciação entre apoptose precoce, tardia e necrose, utilizando o método de exclusão de fluorocromos e alterações na morfologia celular (Figura 9).

Corantes fluorescentes como o Hoechst 33342 são amplamente utilizados para determinar a concentração de DNA e para corar núcleos avaliados por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo que emite fluorescência azul quando se liga ao DNA. A bisbenzidina Hoechst 33342 é permeável nas membranas celulares e se une a ligações adenina-timina, sendo utilizada para avaliação de ciclo celular, apoptose e quantificação de células viáveis. Este corante é frequentemente incubado na presença de substâncias indutoras de apoptose, juntamente com células vivas por minutos até horas (KIECHLER; ZHANG 2003). Este corante é rapidamente absorvido pelas células durante as fases iniciais da apoptose, enquanto a membrana citoplasmática íntegra está impermeável ao IP. Fases tardias da apoptose apresentam corpos apoptóticos e são acompanhadas pelo aumento da permeabilidade da membrana celular, o que permite a entrada de IP nas células. Desta forma, a combinação do Hoechst 33342 e o IP têm sido intensamente utilizadas para a diferenciação dos estágios de apoptose precoce, apoptose tardia e necrose. Pode-se também adicionar o corante diacetato de fluoresceína (DAF) que marca células com membrana celular intacta, mesmo as apoptóticas de verde, sendo um ensaio de três espectros coloridos diferentes. Assim as células são avaliadas de acordo com a coloração e morfologia em citoplasma verde e núcleo azul intacto (células viáveis), encolhimento celular com núcleo azul condensado e descolamento do citoplasma (apoptose precoce), núcleo vermelho condensado e fragmentado (apoptose tardia) e núcleo intacto vermelho (necrose) com célula aderida ao substrato (HASHIMOTO et al., 2003, RELLO et al., 2005).

Para o ensaio, as células foram cultivadas em placas de 96 poços a uma concentração de 5×10^4 células/ml e tratadas durante 6 ou 24 horas nas concentrações de 0,2 a $6,4 \mu\text{M}$ para a linhagem SiHa, C-33A e HaCaT. Doxorrubicina foi utilizada como controle de necrose e curcumina como controle de apoptose. SNL foi utilizado como controle de veículo. Ao completar o tempo de incubação do tratamento, a placa foi centrifugada a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C , para sedimentar as células que estavam flutuando. O meio com tratamento foi removido e foi adicionado 100 μL de PBS 1X gelado a cada poço e a placa foi centrifugada novamente a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C . O PBS 1x foi removido e foi adicionada 100 μL da solução de

fluorocromos em cada poço, contendo 25% de IP em solução aquosa (1 mg/mL), 35% de diacetato de fluoresceína (DAF) em acetona (5 mg/ml), 15% de HO em solução aquosa (1 mg/mL) e 25% de PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM pH7,4). A reação foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. A placa foi centrifugada por 30 segundos a 3700 rpm (spin de 30 segundos) e as imagens foram capturadas no aparelho *IN cellAnalyser* modelo 2000, no laboratório de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp-Araraquara. A apoptose foi avaliada qualitativa e quantitativamente, através da determinação da porcentagem de células em apoptose precoce, tardia e em necrose, levando-se em consideração a morfologia e coloração celular (Figura 10).

Figura 9. Representação do ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos em SiHa. A) Células viáveis (V.) B) Células em necrose (N.); C) Células em apoptose precoce (A.P.) e em apoptose tardia (A.T.). Fotomicrografias adquiridas com o IN Cell Analyser 2000 (Aumento de 200x) (MOREIRA, 2016).

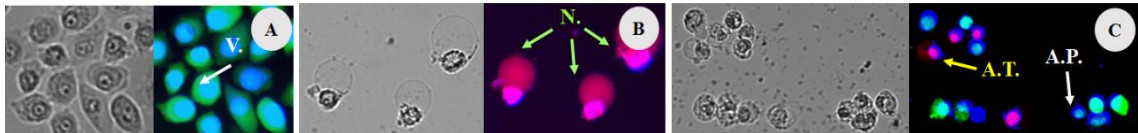
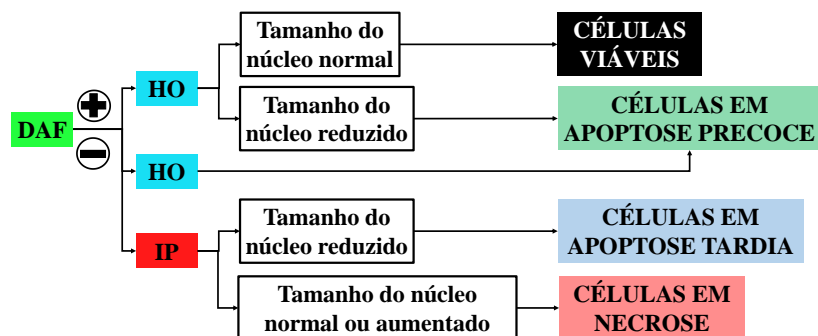


Figura 10. Fluxograma de análise do ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos. Células viáveis: coloração com DAF e HO e tamanho nuclear normal. Células em apoptose precoce: coloração com DAF e HO, com núcleo reduzido ou apenas coloração com HO. Células em apoptose tardia: coloração com IP e núcleo reduzido. Células em necrose: coloração com PI e núcleo normal ou aumentado (MOREIRA, 2016).

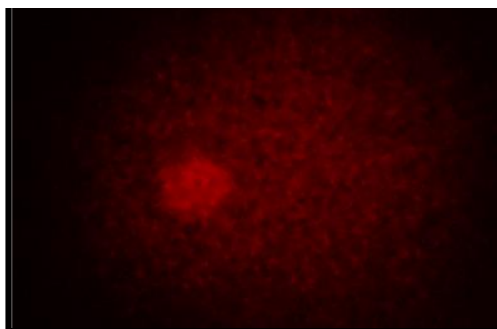


3.10 GENOTOXICIDADE

O ensaio do cometa foi realizado segundo protocolo estabelecido por Sing e colaboradores (1988). Primeiramente, foi realizado o plaqueamento das células da linhagem SiHa, C-33A e HaCaT em uma concentração de 2×10^5 células/mL em placas de 24 poços. Para a avaliação da atividade genotóxica, o tempo de tratamento realizado foi de 6 horas e as concentrações utilizadas foram não citotóxicas de 0,2, 0,4, 0,8 e 1,6 μM de cordialina A + SNL. Como controle positivo, foi utilizado o peróxido de hidrogênio 1mM, diluído em meio de cultura sem soro fetal. Após tratamento, as células foram colhidas com tripsina e suspensas em 200 μL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em PBS livre de Ca^{++} e Mg^{++} (m/v). Foram adicionados 100 μL da suspensão de células em lâminas previamente cobertas com solução de agarose ponto de fusão normal 1,5% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em PBS livre de Ca^{++} e Mg^{++} (m/v) e cobertas com lamínulas. As lâminas foram armazenadas a 4°C por 15 min e então transferidas para a solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, tampão Tris-HCl 10 mM, pH 10, Triton X-100 1% e DMSO 10%) onde foram mantidas por 12 h a 4°C. Após a lise, as lâminas foram lavadas com PBS e submetidas à eletroforese alcalina (pH > 13) por 20 min (25V, 280mA). Então, as lâminas foram neutralizadas com Tris-HCl 0,4M (pH 7,5), fixadas com etanol absoluto e armazenadas a 4°C para a análise. As lâminas foram coradas com brometo de etídio 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) e observadas com filtro de 590nm em microscópio de fluorescência Eclipse 50i (Nikon, Japão) com aumento de 400 \times . As imagens foram capturadas com câmera digital Nikon DS-Ri1-U2 (Nikon, Japão) e analisadas com software TriTek CometScoreTM v1.5 (TriTek Corporation, Sumerduck, VA, EUA). Os dados apresentados correspondem à média do *Tail Moment* (TM) de 50 nucleóides \pm erro padrão ($M \pm SE$) (SCOLASTICI et al., 2008).

$$\textit{Tail moment (TM)} = \frac{\% \text{ DNA cauda} \times \text{comprimento da cauda}}{\% \text{ DNA total}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Figura 11. Representação do cometa corado com brometo de etídeo e analisado por microscopia de fluorescência.
Fonte: arquivo pessoal



3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística de citotoxicidade pelo ensaio de SRB e a obtenção do IC_{50} , foi obtido pelo teste *One Way*ANOVA e *Two Way*ANOVA com pós-teste de Tukey e regressão linear, respectivamente. Para o ensaio de liberação da CB por vesícula unilamelar–LUVs e de morte celular por Hoesch e Iodeto as estatísticas empregadas foram *One Way*ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Por último, o ensaio do Cometa, a análise estatística foi por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Todas as análises estatísticas foram obtida pelo programa GraphPad Prism versão 5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SNL E CORDIALINA A +SNL

Logo após o preparo do SNL e da cordialina A + SNL, foram avaliados alguns parâmetros no equipamento Zetasizer Nano NS – Malvern Instruments®, a fim de caracterizar a estabilidade e viabilidade do sistema. Os dados obtidos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Valores das médias e desvio-padrão dos diâmetros de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta referentes ao SNL e cordialina A + SNL

Parâmetros	SNL	cordialina A + SNL
Diâmetro de Partículas (nm)	159,5333 ± 8,0444	107 ± 0,3333
Índice de Polidispersão	0,38 ± 0,0466	0,214 ± 0,0126
Potencial Zeta (mV)	-16,8333 ± -3,1555	-20,1666 ± -1,6888

O diâmetro de partícula nanoemulsionada está relacionado com a segurança da utilização da formulação, assim como a estabilidade do sistema, cuja desestabilização é verificada através da fusão das gotículas, resultando em sua coalescência. A partícula nanoestruturada pode apresentar-se em média entre 100 e 300 nm, dependendo da composição quanti e qualitativa das formulações, como a natureza dos óleos empregados no sistema, à viscosidade, a hidrofobicidade, a tensão interfacial das substâncias empregadas e, por último, pela metodologia empregada (SCHAFFAZICK et al., 2003, BRUXEL et al., 2012). O índice de polidispersão (PDI) é uma medida da distribuição de tamanho derivada da análise cumulativa de Espalhamento de Luz Dinâmica (*Dynamic Light Scattering – DLS*), descrevendo a qualidade da dispersão. Os valores do PDI iguais ou menores que 0,1 representam suspensão de boa qualidade, com homogeneidade elevada, e quanto mais próximo esse valor ser igual a 1, significa dizer que as suspensões são de baixa qualidade, sugerindo uma ampla distribuição de tamanho ou, mesmo, várias populações (ANTON et al., 2008, GAUMET et al., 2008, SANTOS, 2013). O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão, sendo difícil propor um valor específico para o Potencial Zeta, pois há variação do comportamento conforme a diluição, pH e salinidade. No entanto, afirma-se que valores, na maioria dos casos, mais baixos do que -10 mV são relatados com uma boa

estabilidade devido à alta energia funcionando como uma barreira entre as partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003, MORA-HUERTAS, 2010).

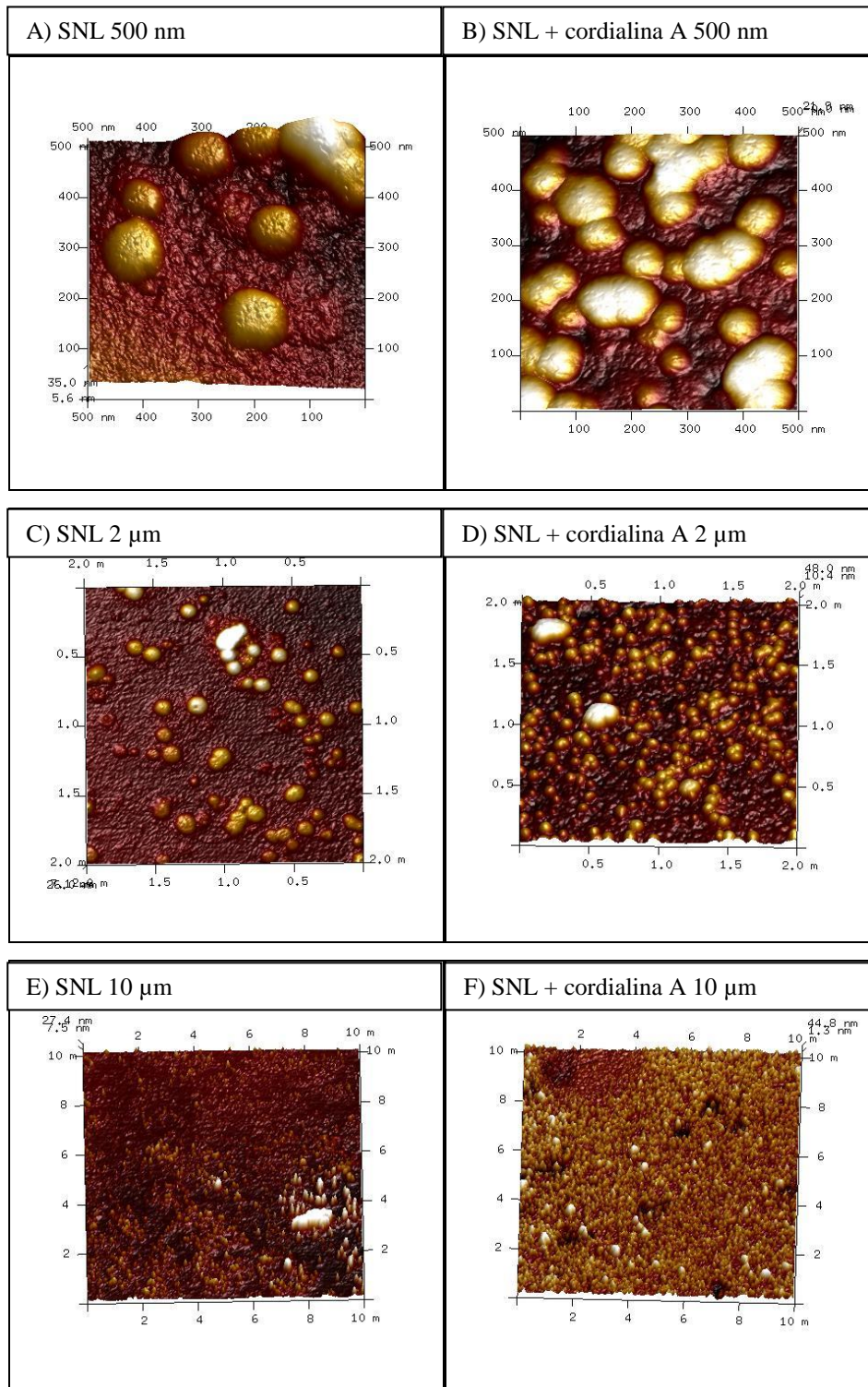
A partir dos valores obtidos, representados na Tabela 1, o comportamento do SNL e da cordialina A encapsulada no SNL, apresentou-se isotrópico, pois não ocorreram indícios de floculação ou precipitação, quando solubilizados em meio aquoso. A partir da verificação do parâmetro do diâmetro da partícula, pode-se observar uma pequena diminuição do diâmetro das gotículas no cordialina A + SNL em relação ao SNL, sendo consideradas fisicamente estáveis. O valor do potencial zeta, apresentado pelo SNL, demonstrou-se estabilizado devido aos grupamentos ésteres livre [-O-C=O]⁻ da fostatidilcolina de soja, contribuindo para a carga negativa do sistema (SILVA et al., 2017). Após a incorporação da cordialina A ao SNL, o potencial zeta apresentou ser mais negativo, sugerindo que este comportamento deve-se as interações químicas da cordialina A, quando encapsuladas no SNL, deixando a superfície da carga mais negativa, resultando em um importante aumento da estabilidade coloidal das gotículas do SNL, diminuindo a possibilidade de floculação ou coalescência em sistemas biológicos nos períodos de armazenamento em temperatura refrigerada (4°C – 8°C).

4.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA- AFM

A caracterização da morfologia do SNL e da cordialina A + SNL foi realizada por Microscopia de Força Atômica (AFM), onde as amostras foram devidamente preparadas, apresentando-se formato esférico com superfície rugosa, demonstrada na Figura 12.

A partir das imagens topográficas por AFM é possível observar que a cordialina A foi encapsulada no SNL, através do aumento da quantidade das nanogotículas, demonstradas nos aumentos de 500 nm, 2 µm e 10 µm (Figura 12). Estas imagens, junto com os parâmetros obtidos de diâmetro de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta confirmam a encapsulação da cordialina A no SNL.

Figura 12. Caracterização morfológica do SNL e do SNL + cordialina A, através da AFM - BRUKER Dimension ICON – Santa Barbara - CA - EUA. Nanogotículas apresentadas em formato esférico/elipsoidal, superfície rugosa: A e B. SNL e SNL + cordialina A, 500 nm. C e D. SNL e SNL + cordialina A, 2 μm . E e F. SNL e SNL + cordialina A, 10 μm .



4.3 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DA CORDIALINA A E DA CORDIALINA A ENCAPSULADA NO SNL

A caracterização da atividade citotoxicidade da cordialina A e da cordialina A encapsulada no SNL foram avaliadas nas concentrações de 12,8 a 205,7 μM e 0,4 a 6,4 μM , respectivamente, solubilizadas em meio de cultura nas linhagens celulares SiHa, C-33 A e HaCaT, nos tempos de tratamento de 24 e 48 horas, demonstrados nas Figuras 13, 14 e 15.

Figura 13. Ensaio de citotoxicidade SRB. Avaliação da cordialina A em relação à porcentagem de células vivas das linhagens SiHa, C-33A e HaCaT no tempo de tratamento de 24 horas. Os dados referem-se a três experimentos independentes. CN: Controle Negativo; CV: Controle de Veículo: DMSO 1%; CP: Controle Positivo, Doxorrubicina, 91,9 μM . Análise estatística: ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

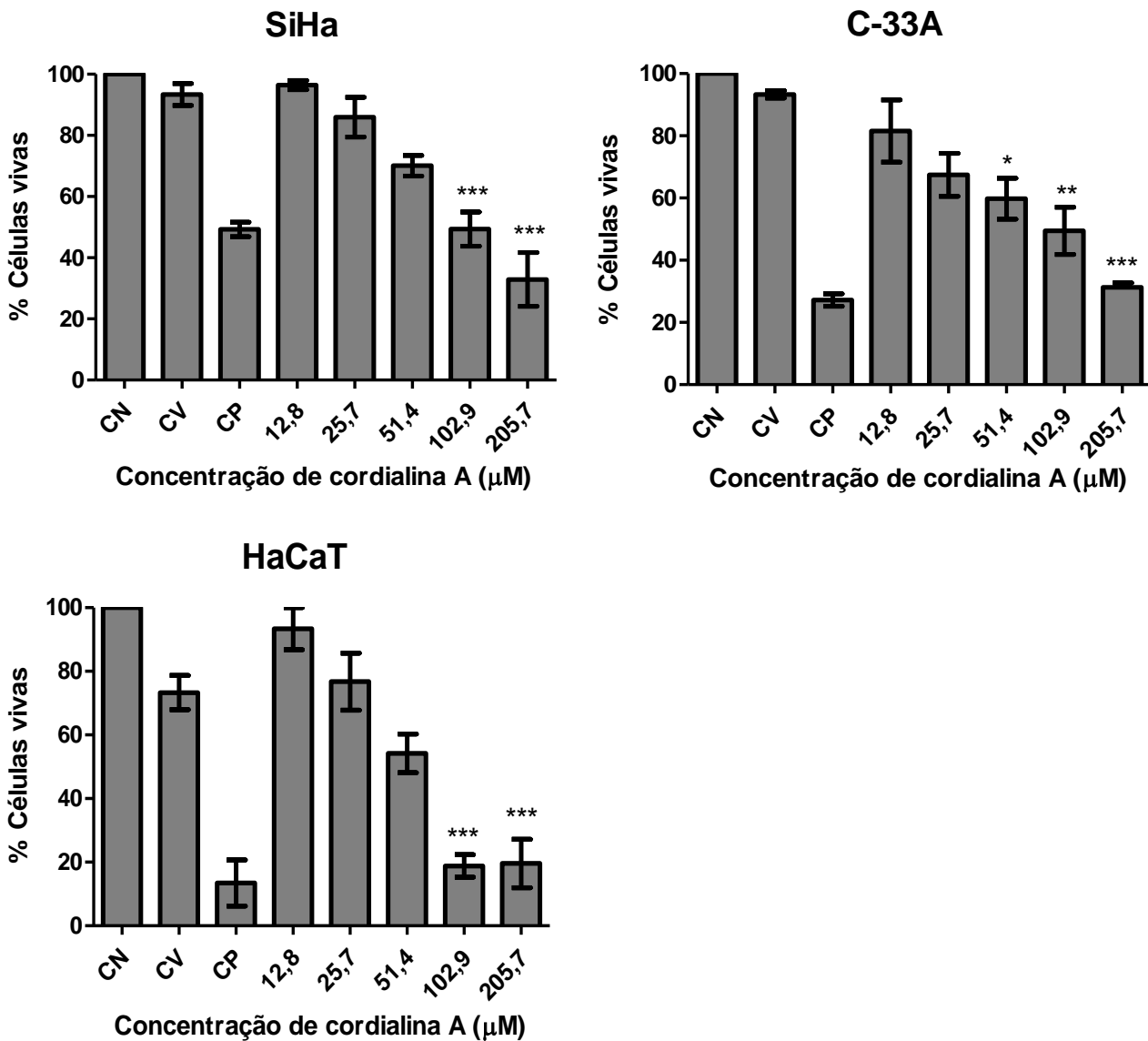


Figura 14. Ensaio de citotoxicidade SRB. Avaliação da cordialina A encapsulada no SNL em relação à porcentagem de células vivas das linhagens SiHa, C-33A e HaCaT no tempo de tratamento de 24 horas. Os dados referem-se a três experimentos independentes. CN: Controle Negativo; CV: Controle de Veículo; SNL; CP: Controle Positivo, Doxorrubicina 91,9 μM . Análise estatística: ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

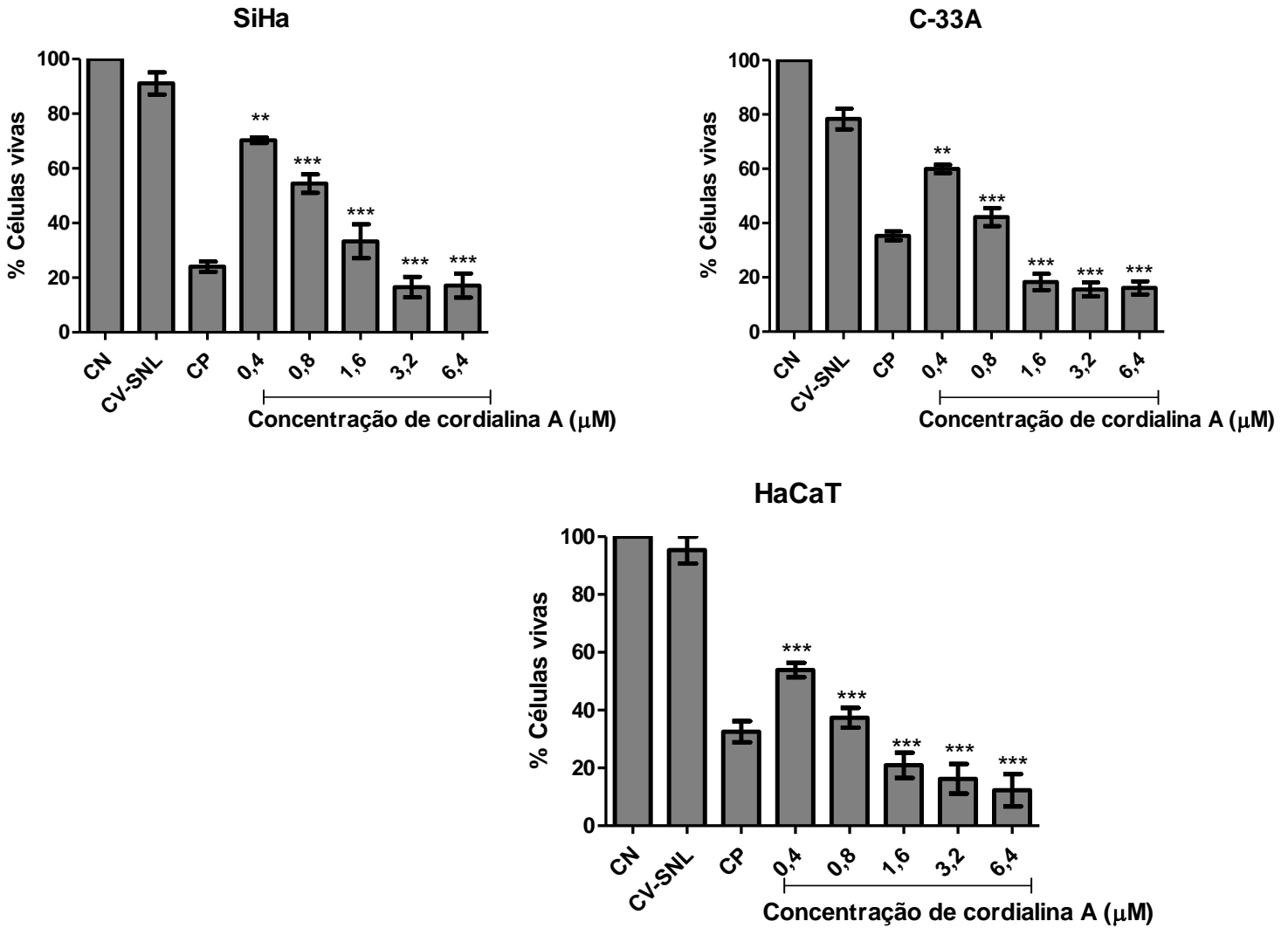
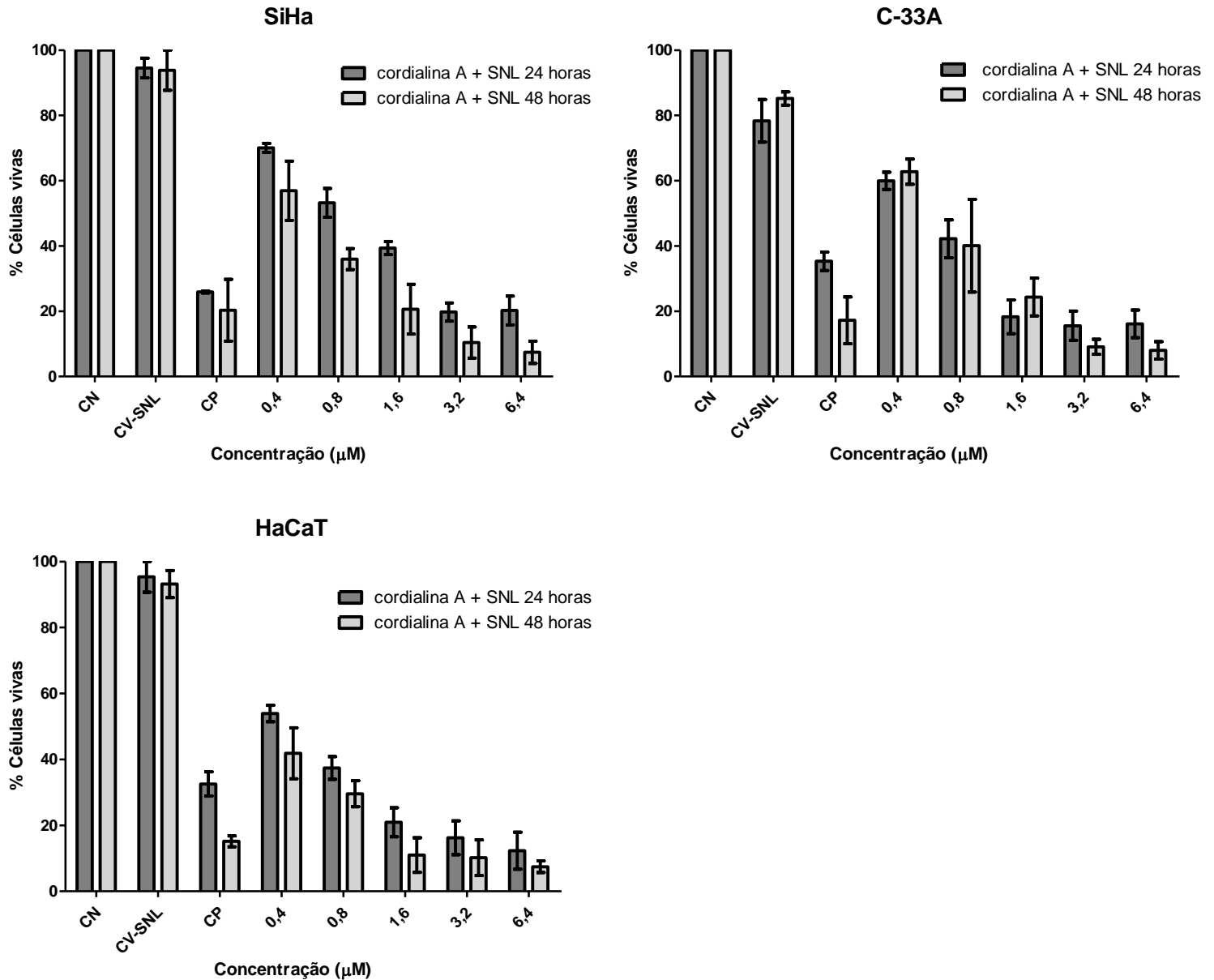


Figura 15. Ensaio de citotoxicidade SRB. Comparação entre as concentrações da cordalina A encapsuladas no SNL com porcentagem de células vivas das linhagens SiHa, C-33A e HaCaT nos tempos de tratamento de 24 e 48 horas. Os dados referem-se a três experimentos independentes. CN: Controle Negativo; CV: Controle de Veículo: SNL; CP: Controle Positivo, doxorrubicina 91,9 μM . Análise estatística: ANOVA two-way, com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.



A partir dos dados apresentados da Figura 13, foram observados através do ensaio de viabilidade celular, SRB, que no tempo de tratamento de 24 horas, realizado apenas com a cordialina A, nas concentrações entre 12,8 á 205,7 μM , a ocorrência da atividade citotóxica a partir de 102,9 μM ($p < 0,001$) para SiHa e HaCaT. Já para a linhagem C-33A, ocorreu morte celular a partir da concentração de 51,4 μM ($p < 0,05$). Nas menores concentrações testadas, não foram observados morte celular significativa ($p > 0,05$). As concentrações capazes de reduzir em 50% a viabilidade celular (IC_{50}) foram de 106,58 μM , 83,55 μM e 55,9 μM nas linhagens SiHa, C-33A e HaCaT, respectivamente. Os Índice de Seletividade (IS) obtidos do tratamento somente com a cordialina A frente as linhagens de câncer de colo uterino, SiHa e C-33A, foram de 1,9 e 1,49, respectivamente, indicando uma baixa seletividade ($\text{IS} < 3$), quando comparadas com a linhagem de células normais HaCaT.

Na Figura 14, é possível observar o perfil citotóxico da cordialina A encapsulada no SNL, no tempo de tratamento de 24 horas, nas concentrações testadas de 0,4 a 6,4 μM , indicando que todas as concentrações testadas, resultaram na atividade citotóxica ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) para todas as linhagens celulares estudadas. Os IC_{50} obtidos foram de 0,89 μM , 0,186 μM e 0,35 μM para SiHa, C-33A e HaCaT, respectivamente. Os valores encontrados para IS foram de 2,54 e 0,53 para SiHa e C-33A, respectivamente, indicando um leve aumento da seletividade para SiHa e uma baixa seletividade para C-33A, quando comparado com os valores do IS obtidos do tratamento com apenas a cordialina A.

O perfil citotóxico apresentado para o tratamento da cordialina A (Figura 13), quando comparado com o do tratamento do cordialina A, quando encapsulada no SNL (Figura 14), no tempo de tratamento de 24 horas, demonstrou significativa diferença nas concentrações testadas para gerar a atividade de morte celular nas linhagens celulares estudadas, pois no tratamento da cordialina A + SNL ocorreu morte celular a partir da menor concentração testada, 0,4 μM ($p < 0,01$) para SiHa e C-33A e ($p < 0,001$) para HaCaT. Já para o tratamento com apenas a cordialina A, as concentrações que apresentaram a atividade citotóxica foram 102,4 μM ($p < 0,001$) para SiHa e HaCaT e 51,4 μM ($p < 0,05$) para a linhagem C-33A, sugerindo, dessa forma, que o efeito citotóxico gerado pela cordialina A é otimizado, quando encapsulado no SNL. Dessa forma, foi calculado a partir das concentrações do IC_{50} , que a cordialina A + SNL demonstrou ser 119,45 vezes mais potente para SiHa, 449,19 vezes para C-33A e 238,71 para a HaCaT, quando comparado ao tratamento somente com a cordialina A.

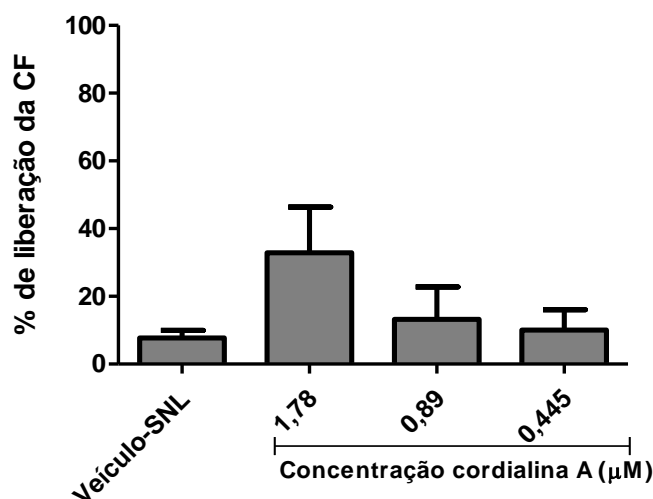
Por último, a Figura 15 representa o perfil citotóxico comparativo da cordialina A + SNL entre os tempos de tratamento de 24 e 48 horas, a fim de investigar a liberação controlada da cordialina A pelo SNL dependente do tempo. Para ambos os tratamentos, 24 e 48 horas, o perfil citotóxico demonstrou-se semelhante com elevada taxa de morte celular ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) para as concentrações testadas nas linhagens celulares estudadas, evidenciando, dessa forma, que a atividade citotóxica apresentada pela cordialina A + SNL não apresentou muitas variações ($p > 0,05$), podendo concluir que a cordialina A incorporada ao SNL não teve aumento da liberação controlada em relação à taxa de morte celular entre os tempos de 24 e 48 horas, nas linhagens celulares SiHa, C-33A e HaCaT.

Diante destes resultados expostos (Figura 13, 14 e 15), mesmo não sendo encontrado na literatura nenhum dado antitumoral, especificamente, com a cordialina A, existem outros estudos com moléculas pertencentes à classe dos triterpenos que corroboram com tais resultados em questão, como o estudo de morte celular realizado por Wu e colaboradores (2016), o qual demonstrou que as moléculas actina e 26-deoxiacteína, triterpeno tetracíclico, promoveram citotoxicidade para as linhagens tumorais K562, HL-60, HepG-2, EJ, Raji, Hep2, Bcap-37, A431, U937, SKOV3, A549. Em 2009, Xi e colaboradores, encapsulou o ácido ursólico, triterpeno pentacíclico, em sistema auto-emulsionante, otimizando seu potencial terapêutico na terapia contra o câncer de mama e de próstata. Por último, não menos importante, Parisotto et al (2010) verificou que o extrato bruto da *Cordia verbenacea* induziu a morte celular, através do método do MTT, para as linhagens TAE e MCF-7.

4.4 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DA CARBOXIFLUROSCEÍNA-CB

A partir da concentração inibitória obtida do ensaio de citotoxicidade da linhagem celular SiHa (IC_{50} 0,85 μ M), a qual é enfoque desse estudo, foi estabelecido uma faixa de concentrações da cordialina A encapsulada no SNL, para realização do ensaio com vesícula unilamelares (LUVs), indicado na Figura 16.

Figura 16. Avaliação em porcentagem de liberação da CF em função das concentrações da cordialina A encapsulada no SNL. Resultados expressos das médias dos valores da liberação da CF em relação ao veículo. Análise estatística por One-Way ANOVA com pós-teste de Bonf Bonferroni (tratados vs CV). CV: Controle de Veículo/SNL.



A partir dos resultados obtidos da liberação da CF, após tratamento com a cordialina A encapsulada no SNL, indicaram pouca interação com a porção hidrofóbica desse sistema representativo de membrana celular ($p > 0,05$), muito embora seja observado um efeito de concentração resposta ao tratamento, sugerindo interações eletrostáticas entre as cargas do tratamento com as cargas dos Luvs (Figura 16). Outra possibilidade seria o emprego do colesterol da fase oleosa do SNL, direcionar o tratamento para os receptores de colesterol na membrana, os quais são mais expressos em células tumorais, verificados pelos estudos de Kader et al., 1998 e Chu et al., 2001, quando encapsularam o antineoplásico doxorrubicina em colesterol, para tratamento de células tumorais. Por último, as interações químicas hidrofóbicas entre os componentes empregados nas vesículas, fosfatidilglicerol e fosfatidilcolina (item 3.9.1) com os do SNL, colesterol e fosfatidilcolina (item 3.2), não devem ser desconsideradas, podendo influenciar a ação que a cordialina A + SNL exerce para este modelo de membrana, já que existem estudos que utilizam LUV's como sistema de liberação de moléculas apolares, como o estudo de Alves et al. (2007) que utilizou vesículas unilamelares para encapsular isotretinoína.

Desse modo, devido a grande complexidade da membrana citoplasmática, são necessários ensaios mais precisos para elucidar quais outras interações que cordialina A + SNL possa exercer na membrana celular (CORDEIRO, 2009).

4.5 ENSAIO CITOMORFOLÓGICO DE VIABILIDADE CELULAR POR EXCLUSÃO COM FLUOROCROMOS: HOECHST, IODETO DE PROPÍDEO E DIACETATO DE FLUORESCEÍNA

A avaliação do tipo de morte celular promovida pela cordialina A foi avaliada nas concentrações de 0,2 a 6,4 μM para a linhagem SiHa, C-33A e HaCaT, nos tempos de tratamento de 6 e 24 horas. A curcumina e doxorrubicina foram utilizados como controle de apoptose e necrose, respectivamente, em concentração de $1,0 \times 10^5$ células/poço por tratamento, sendo classificadas em células em apoptose precoce, apoptose tardia e necrose. A figura 17, 18 e 19 apresenta os gráficos com a quantificação das células que foram classificadas em apoptose precoce, apoptose tardia e necrose das linhagens celulares em questão.

Figura 17. Taxa de apoptose precoce/tardia e necrose por coloração Hoechst / IP na linhagem celular SiHa. Tempo de tratamento: a) 6 horas e b) 24 horas. Resultados expressos pela média de três experimentos independentes. CN: Controle Negativo; CV: Controle de Veículo/SNL; Doxorrubicina: 91,9 μM . Curcumina: 37,5 mM. Análise estatística *one-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni (tratados vs CV)* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

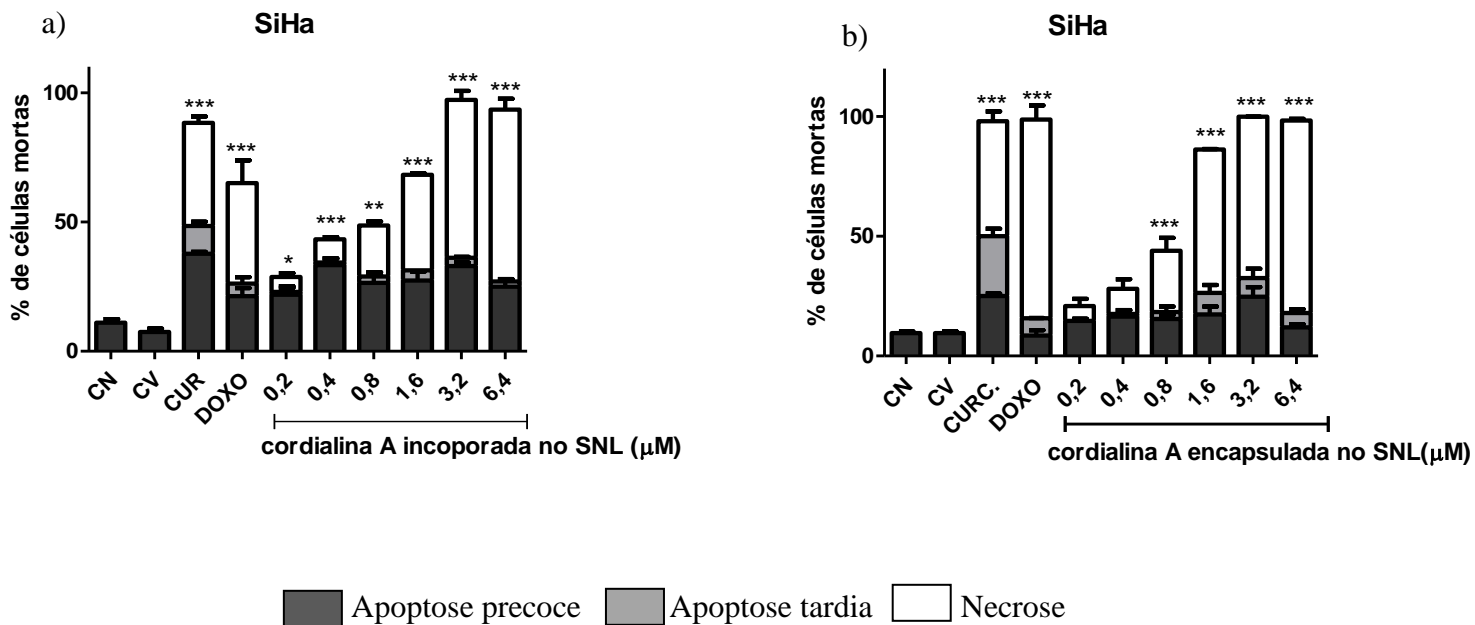


Figura 18. Taxa de apoptose precoce/tardia e necrose por coloração Hoechst / IP na linhagem celular C-33A. Tempo de tratamento: a) 6 horas e b) 24 horas. Resultados expressos pela média de três experimentos independentes. CN: Controle Negativo; CV: Controle de Veiculo/SNL; Doxorubicina: 91,9 μ M. Curcumina: 37,5 mM. Análise estatística one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni (tratados vs CV) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

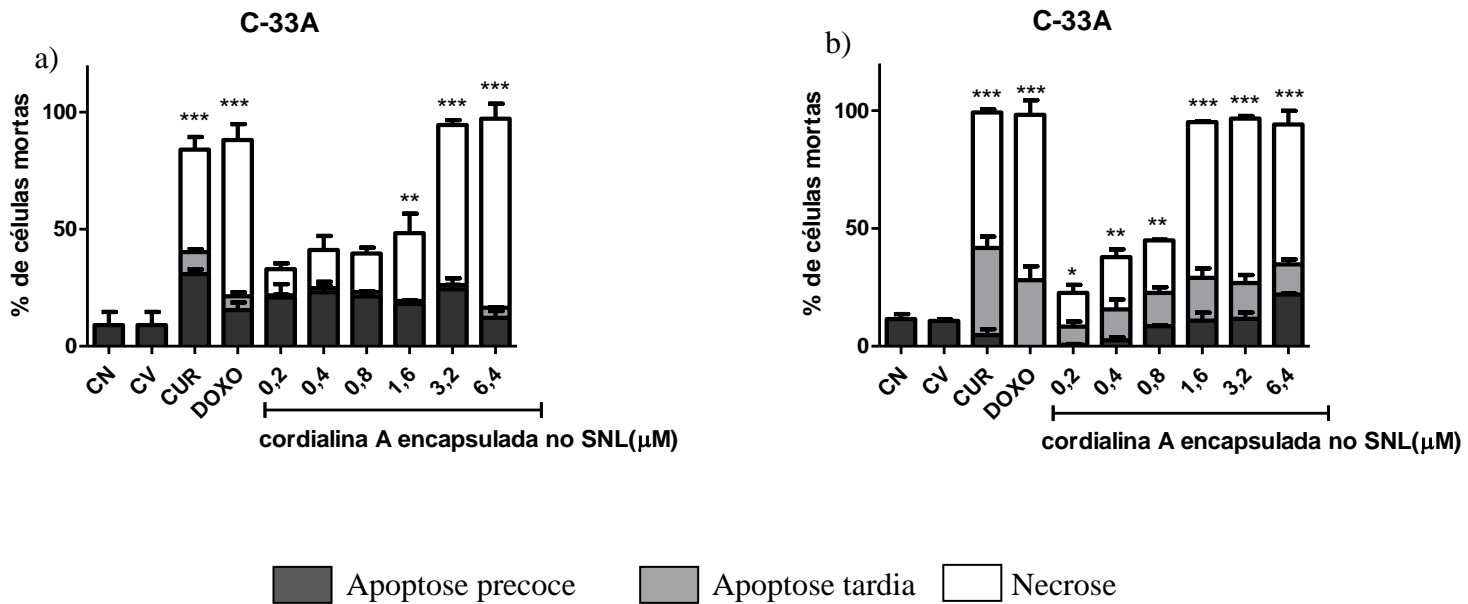
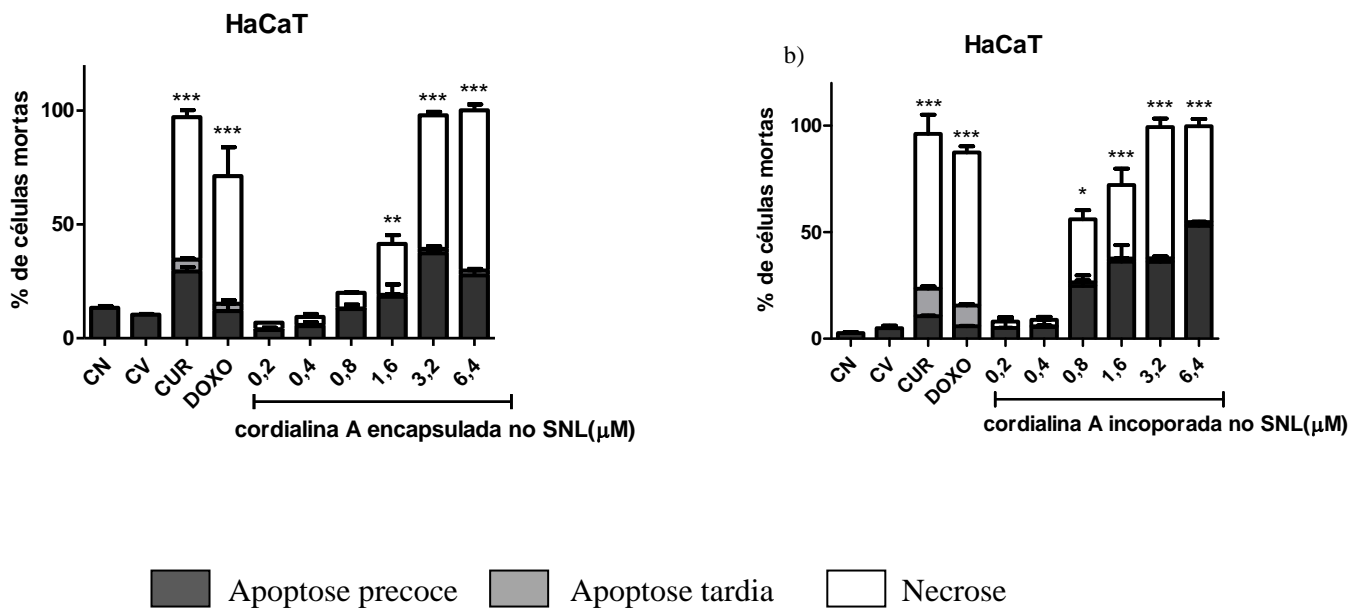


Figura 19. Taxa de apoptose precoce/tardia e necrose por coloração Hoechst / IP na linhagem celular HaCaT. Tempo de tratamento: a) 6 horas e b) 24 horas. Resultados expressos pela média de três experimentos independentes. CN: Controle Negativo; CV: Controle de Veiculo/SNL; Doxorubicina: 91,9 μ M. Curcumina: 37,5 mM. Análise estatística *one-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni (tratados vs CV) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



A partir dos gráficos referentes aos tempos de tratamento de 6 e 24 horas indicados na Figura 17, é possível descrever que a morte da linhagem SiHa, quando exposto no menor tempo de tratamento (Figura 17a), ocorre por apoptose precoce nas menores concentrações de 0,2 e 0,4 μM ($p < 0,05$ e $p < 0,001$), respectivamente. A partir da concentração de 0,8 μM , a morte celular acontece de forma mista, por apoptose precoce ($p < 0,01$) e necrose ($p < 0,001$), sendo possível, também observar, um efeito de concentração resposta do tratamento para a atividade necrótica (Figura 17a). Já para o tempo de 24 horas, verificou-se que o mesmo tratamento resultou em uma morte, majoritariamente, por necrose a partir da concentração de 0,8 μM ($p < 0,001$) (Figura 17b).

Já para a linhagem celular C-33A, o perfil de morte celular ao tratamento nos tempos de 6 e 24 horas (Figura 18), apresentou-se, predominantemente, por necrose em ambos tempos. No tempo de 6 horas (Figura 18a) foi possível observar essa atividade a partir da concentração 1,6 μM ($p < 0,01$) com efeito concentração resposta para os demais tratamentos ($p < 0,001$). Já para o tempo de tratamento de 24 horas (Figura 18b), a atividade necrótica é verificada em todas as células tratadas, sendo mais expressivas nas maiores concentrações testadas ($p < 0,001$). Nesse mesmo tempo (Figura 18b), nota-se a manifestação da atividade apoptótica precoce e tardia, porém sem significância estatística ($p > 0,05$).

Por último, as células saudáveis de queratinócitos humanos, HaCaT, após tratamento com a cordialina A + SNL, apresentou um perfil de morte semelhante de apoptose precoce e necrose em ambos tratamentos, 6 e 24 horas (Figura 19). No menor tempo de tratamento, 6 horas (Figura 19a), é verificado o início da atividade de morte celular a partir da concentração de 1,6 μM por apoptose precoce ($p < 0,01$) e necrose ($p < 0,05$), sendo observado ainda, um efeito concentração resposta para atividade necrótica e aumento da taxa de apoptose nas maiores concentrações. Para o tratamento de 24 horas (Figura 19b), a atividade apoptótica ($p < 0,05$) e necrótica ($p < 0,001$), se inicia a partir da concentração 0,8 μM .

De um modo geral, o perfil de morte das três linhagens de estudo, quando comparadas, demonstrou-se semelhante, com uma observação para as menores concentrações testadas de 0,2 μM e 0,4 μM que promoveu a morte apenas das linhagens tumorais.

Para os resultados de apoptose obtidos da cordialina A, não foi encontrado nenhum estudo descrevendo o mecanismo de morte celular na literatura, entretanto outros trabalhos com triterpenos são bem descritos como o estudo de LIU e ZHONG (2011) que verificou a indução da atividade apoptótica na linhagem celular de câncer uterino (Hela), após tratamento com os triterpenos ácidos ganodéricos (GA-Mf) e ácido ganodérico S (GA-S), isolados da *Ganoderma lucidum*, nas concentrações de 0,39 μM e 97,7 μM , respectivamente, no tempo de tratamento de 12 horas, induziram perda do potencial de membrana mitocondrial, ocorrendo a

liberação do citocromo c para o citosol e a ativação da caspase-9 e -3. Sugerindo, dessa forma, que a apoptose induzida pelos ácidos ganodéricos envolvem a regulação das proteínas mitocondriais Bax, para cima, e Bcl-2, para baixo. Outra molécula triterpênica, como o ácido lucidênico B, induziu o mesmo mecanismo promovidos pelos ácidos ganodéricos (Hsu et al., 2008).

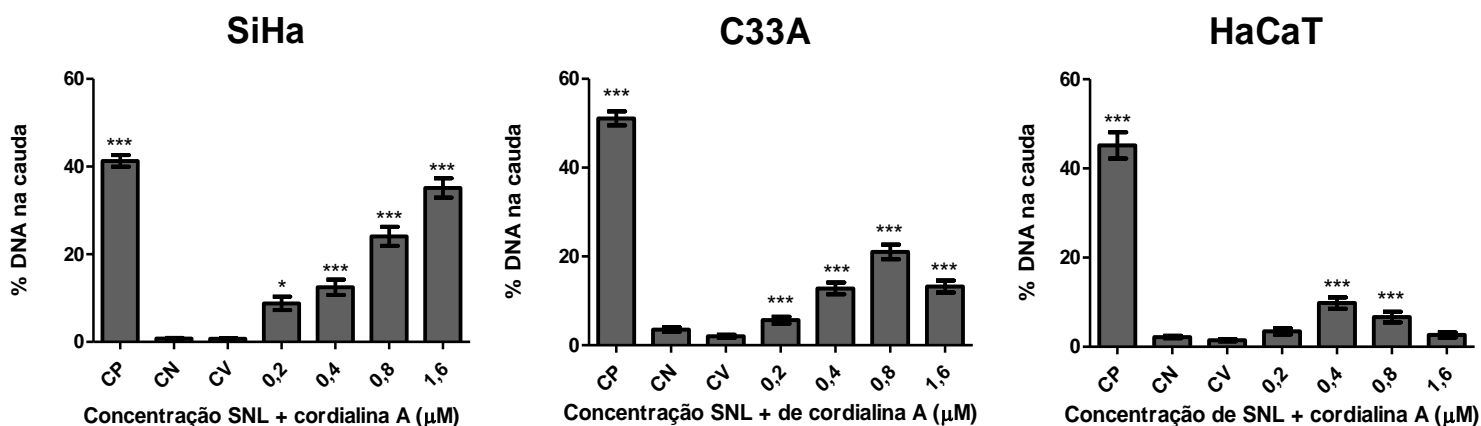
Já o estudo de BYUN et al (2009) demonstrou que o tratamento com o triterpeno pristimerina nas concentrações de 0,85 a 1,7 μ M para as linhagens celulares de carcinoma cervical humano (HeLa, CaSki e SiHa) induziu a morte celular mitocondrial através da ativação dependente de ROS de JNK1 e PARP-1. Em resumo, acumulação de ROS intracelular, em resposta ao tratamento, ativação da maquinaria da morte celular através da JNK 1 e PARP 1. A ativação de JNK1 é necessária para a ativação de Bax e perda de potencial mitocondrial, por último, a PARP-1 também está envolvido na perda de potencial de membrana mitocondrial.

Dessa forma, pode-se dizer que os dados encontrados na literatura, podem sugerir mecanismos de morte celular mais complexos, quando expostas ao tratamento com a cordialina A para este estudo.

4.6 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE - ENSAIO DO COMETA

Os resultados do ensaio do Cometa tiveram como objetivo a avaliação da genotoxicidade, por meio da medida da fragmentação do DNA, demonstrados na Figura 21. Foram utilizadas as linhagens celulares SiHa e C-33A e HaCaT tratadas com 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 μ M de cordialina A + SNL. Para a realização do experimento, as células foram tratadas por 6 horas. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão ($M \pm EP$) da porcentagem de DNA na cauda. As análises estatísticas de variância foram feitas pelo teste Kruskal Wallis com pós-teste de Dunns (Tratados vs CV). Sendo a significância representada por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 20. Genotoxicidade da cordialina A + SNL representada pela % de DNA na cauda em linhagem celular SiHa, C-33A e HaCaT tratadas com 0,2 μM , 0,4 μM , 0,8 μM e 1,6 μM por 6 h. Resultados são expressos como a média da % de DNA na cauda de 150 células por concentração e controles analisados por Kruskal-Wallis test com pós-teste de Dunn's (tratados vs CV). CP: 1mM de peróxido de hidrogênio por 10 minutos, CV: controle de veículo-SNL. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.



Na análise da genotoxicidade frente ao tratamento com cordialina A + SNL na linhagem celular SiHa, foi apresentado efeito concentração-resposta nas concentrações testadas (* $p < 0,05$) e (***) $p < 0,001$) quando comparadas ao controle de veículo, que demonstrou significância em relação ao controle de veículo. Já para a linhagem C-33A é possível observar uma forte atividade genotóxica em todas as concentrações testadas (***) $p < 0,001$) e, por último, a linhagem HaCaT, demonstrou tal atividade nas concentrações 0,4 e 0,8 μM (Figura 20).

Com o estudo de BYUN et al (2009), foi possível verificar que pelo ensaio genotóxico H₂AX, a pristimerina induziu um grau significativo de dano do DNA nas linhagens de câncer cervical HeLa, CaSki e SiHa, sugerindo para tal resultado, que a ativação da PARP-1 pode ter ocasionado danos ao DNA. Dessa forma, para este trabalho sugere mecanismos para ação genotóxica da cordialina A frente as linhagens de tumor de colo uterino.

5 CONCLUSÕES

- A partir dos parâmetros obtidos do SNL e cordialina A + SNL, como tamanho de partícula, potencial zeta e índice de dispersão, pode-se concluir que o sistema nanoemulsionado, apresentou-se estável para aplicação em ensaios biológicos propostos para o estudo em questão;
- A molécula cordialina A encapsulada no SNL demonstrou maior eficácia na atividade citotóxica, em comparação ao tratamento com apenas a cordialina A, frente às linhagens SiHa, C-33A e HaCaT;
- Diante do ensaio de liberação de CB, tanto o SNL, quanto a cordialina A, demonstrou pouca interação com a parte apolar do sistema de mimetização de membrana celular;
- A morte celular demonstrou ser mista através de apoptose precoce e necrose frente ao tratamento da cordialina A + SNL nos tempos de tratamento de 6 e 24 horas, para as linhagens SiHa, C-33A e HaCaT;
- A avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do Cometa, demonstrou que o tratamento com cordialina A + SNL ocasionou danos genotóxicos nas linhagens de carcinoma cervical imortalizadas pelo HPV-16 (SiHa) e não imortalizadas (C-33A) e HaCaT no tempo de tratamento de 6 horas;
- O tratamento antitumoral com a cordialina A, quando encapsuladas no SNL demonstrou ser eficaz contra as linhagens tumorais de câncer de colo uterino infectado e não infectado pelo vírus do HPV.

6 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, pode-se dizer que a pesquisa por meio de produtos naturais, quando encapsulados em sistemas nanoemulsionados, demonstrou-se promissora em relação à eficácia terapêutica no tratamento contra o câncer de colo uterino. De modo geral, os resultados não demonstraram seletividade somente para as células neoplásicas, estimulando ainda mais, à busca pela diminuição dos efeitos tóxicos em células normais, através do respaldo das ferramentas oferecidas pela pesquisa, uma vez que já existem no mercado medicamentos antitumorais com essas propriedades, incentivando, portanto, o propósito de melhorar a qualidade de vida de pacientes afetados pelo câncer, através de pesquisas por medicamentos que proporcionem o seu bem estar.

REFERÊNCIAS

- AKISUE, M. K.; OLIVEIRA, F.; MORAES, M. S.; AKISUE, G.; MANCINI, B. Caracterização farmacognóstica da droga e da tintura de *Cordia verbenacea* A. DC.- BORAGINACEAE. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.5, p.69-82, 1983.
- ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. Tradução Ana Letícia Vanz, et al. 5ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396p.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1818-1822, 2004.
- ALVES, Carina Pimentel Itapema. Estudo da encapsulação da isotretinoína em lipossomas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n.1, 2007.
- ANTON, N.; BENOIT, J-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185-199, 2008.
- BARR, E.; TAMMS, G. Quadrivalent human papillomavirus vaccine. **Clinical Infectious Diseases**, v.45, n.5, p. 609-617, 2007.
- BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.14, p.101-114, 2001.
- BAYEUX, M. C.; FERNANDES, A. T.; FOFLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Evaluation of the anti-inflammatory activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p.1229-1232, 2002.
- BEHZADI, P.; BEHZADI, E.; RANJBAR, R.; SABERFAR, E. Vaginal cancers and human papilloma virus. **Oncolog-Hematologo**, v.30, n.1, p.14-18, 2015.
- BERNARD, H. U.; BURK, R. D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K.; ZUR HAUSEN, H., & DE VILLIERS, E. M. Classificação de papilomavírus (PVs) com base em 189 tipos de PV e proposta de alterações taxonômicas. **Virology**, v.401, n.1, p.70 – 79, 2010.
- BONASSA, E. M. A. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2000.
- BONIFACIO, V.D. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2014.
- BONNEZ, W.; REICHMAN, R. C. Papillomaviruses. In: MANDELL GL, BENNETT JE, DOLIN R, editors. **Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases**.7th. ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier, 2010. v. 2, p. 2035–2049.
- BOULET, G.; HORVATH, C.; BROECK. D.V.; SAHEBALI, S.; BOGERS, J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p. 2006-2011, 2007.
- BRAGAGNOLO, A.; ELI, D.; HAAS, P. Papiloma Vírus Humano (HPV). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.42, n.2, p.91-96, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução ANVISA RDC n. 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 mar. 2010a. Seção 1, p. 52.

BROWN, J. M.; ATTARDI, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 3, p. 231-237, 2005.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

BYUN, J. Y.; KIM, M. J.; EUM, D. Y.; YOON, C. H.; SEO, W. D.; PARK, K. H.; LEE, S. J. Reactive oxygen species-dependent activation of Bax and poly (ADP-ribose) polymerase-1 is required for mitochondrial cell death induced by triterpenoid pristimerin in human cervical cancer cells. **Molecular Pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 734-744, 2009.

CHAMBÔ FILHO, A.; COHEN, M. C. P. M.; CARDOSO, P. S.. Câncer de colo-Estadio IB Alternativas de tratamento. **Femina**, v. 29, n. 9, p. 631-633, 2001.

CHEAH, P. L.; LOOI, L. M. Biology and pathological associations of the human papillomaviruses: A review. **Malaysian Journal of Pathology**, v. 20, p. 1-10, 1998.

CHELIMO, C.; WOULDES, T. A.; CAMERON, L. D.; ELWOOD, J. M. Risk factors for and prevention of human papilloma viruses (HPV), genital warts and cervical cancer. **Journal of Infection**, v.66, n.3, p.207-217, 2013.

CHEN, Y.; LIU, J.; YANG, X.; ZHAO, X.; XU, H.; Oleanolic acid nanosuspensions: preparation, in vitro characterization and enhanced hepatoprotective effect. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.57, p.259 – 264. 2005.

CHU, A. C.; TSANG, S. Y.; LO, E. H.; FUNG, K. P. Low density lipoprotein as a targeted carrier for doxorubicin in nude mice bearing human hepatoma HepG2 cells. **Life sciences**, v. 70, n. 5, p. 591-601, 2001.

CORDEIRO, A. M. H. **Estudos biofísicos em sistemas modelo da membrana plasmática da levedura**. 2009. 114p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Médica) Faculdade de Ciências, Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Portugal.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, n.3, p.241-256, 2009.

DAVID, A. R.; ZIMMERMAN, M. R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between?. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 10, p. 728-733, 2010.

BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. **Química nova**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

DOORBAR, John. The papillomavirus life cycle. **Journal of clinical virology**, v. 32, p. 7-15, 2005.

DOORBAR, J.; CUBIE, H. Molecular Basis for Advances in Cervical Screening. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v.9, n.3, p.129-142, 2005.

ETHERIDGE, M. L.; CAMPBELL, S. A.; ERDMAN, A. G.; HAYNES, C. L.; WOLF, S. M.; MCCULLOUGH, J. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved

nanomedicine products. **Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2013.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHNLE, A. Nanoemulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.251, p.53-58, 2004.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137, 2006.

FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; EGITO, E. S. T.; TERRUGI, C. H. B.; FRANZINI, C. M.; SARMENTO, V. H. V.; OLIVEIRA, A. G. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces - Journal - Elsevier**, v.77, n.1, p. 47-53, 2010.

FRIGATO, S.; HOGA, Luiza, A. Assistência à mulher com câncer de colo uterino: o papel da enfermagem. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 4, p. 209-14, 2003.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GEARHART, P. A.; RANDALL, T. C.; BUCKLEY, R. M.; HIGGINS, R. V. Human Papilloma vírus. **MedScape**, 2015.

GILBERT, B.; FAVORETO, R. Cordia verbenacea DC Boraginaceae. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 7, n. 01, 2013.

HASHIMOTO, Y.; SHIMADA, Y.; ITAMI, A.; ITO, T.; KAWAMURA, J.; KAWABE, A.; KAGANOI, J.; MAEDA, M.; WATANABE, G.; IMAMURA, M. Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer**, v.39, p.2239-2246, 2003.

HOWLAND, R.; BENATAR, L. **A Practical Guide: to Scanning Probe Microscopy**. Sunnyvale, CA: Park Scientific Instruments, 1996.

HORVATH, C. A. J.; BOULET, G. A. V.; RENOUX, V. M.; DELVENNE, P. O.; BOGERS, J. J. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. **Virology Journal**, v.7, p.1-7, 2010.

IARC Handbooks of Cancer Prevention. Cervix Cancer Screening, ano 2005. Disponível em internet: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/prev/handbook10/handbook10-chap1.pdf>. Acesso em: 19 jan. 2016.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativas e incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2016. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home++/colo_uterio/definicao>. Acesso em: 03 jan. 2016.

JÄGER, S.; WINKLER, K.; PFÜLLER, U.; SCHEFFELER, A. Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L. **Planta Medica**; v.73, p. 157- 162, 2007.

KADER, A.; DAVIS, P. J.; KARA, M.; LIU, H. Drug targeting using low density lipoprotein (LDL): physicochemical factors affecting drug loading into LDL particles. **Journal of controlled release**, v. 55, n. 2, p. 231-243, 1998.

KANODIA, S.; FAHEY, L.M.; KAST, W.M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Current Cancer Drug Targets**, v.7, p. 79-89, 2007.

KEAM, S. J.; HARPER, D. M. Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]. **Drugs**, v.68, n.3, p.359-372, 2008.

KIECHLER, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, p. 27-45, 2003.

KO, H. H.; HUNG, C. F.; WANG, J. P.; LIN, C. N. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 234-239, 2008.

KRETZER, Iara Fabricia. **Terapia antitumoral combinada de derivados do paclitaxel e etoposídeo associados à nanoemulsão lipídica rica em colesterol-LDE**. 2007. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo.

LASZCZYK, M.; JÄGER, S.; SIMON-HAARHAUS, B.; SCHEFFLER, A.; SCHEMPP, C. M. Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (*betulae córtex*). **Planta Medica**; v. 72; p1389-1395, 2006.

LIMA, S. M. R. R. 2ª edição. Fitomedicamentos na prática ginecológica e obstétrica. São Paulo: Atheneu, 2ª edição, p. 376, 2009.

LIU, R. M.; ZHONG, J. J. Ganoderic acid Mf and S induce mitochondria mediated apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells. **Phytomedicine**, v. 18, n. 5, p. 349-355, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2002.

MADKAN, V.K.; COOK-NORRIS, R.H.; STEADMAN, M.C.; ARORA, A.; MENDOZA, N.; TYRING, S.K. The oncogenic potential of human papillomaviruses: a review on the role of host genetics and environmental cofactors. **British Journal of Dermatology**, v. 157, p. 228-241, 2007.

MANS, D. R. A.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **The Oncologist**, v.5, p.185-198, 2000.

MARUNO, M. **Desenvolvimento da nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele**. 2009.158p. Tese (Doutorado em ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Riberão Preto. 2009.

MEIRA, A. S. **Estudo do potencial citotóxico de novos ésteres sintéticos derivados da mistura triterpenoidica α -/ β - amirina em modelos experimentais in vitro**. (Tese de Mestrado em Farmacologia). 2011. 124f. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-Ce. 2011.

MELO, V. H.; ARAÚJO, A. C. L.; RIO, S. M. P.; CASTRO, L. P. F.; AZEVEDO, A. A.; CASTRO, M. M. Problemas ginecológicos mais frequentes em mulheres soropositivas para o HIV. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.25, n.9, p.661-666, 2003.

MILLER, J. S.; GOTTSCHLING, M. Generic classification in the Cordiaceae (Boraginales): resurrection of the genus *Varronia* P. Br. **Táxon**, v.56, p.163-169, 2007.

MONIE, A.; HUNG, C. F.; RODEN, R.; WU, T. C. Cervarix: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. **Biologics**, v.2, n.1, p.97-105, 2008.

MOTOYAMA, S.; LADINES-LLAVE, C. A.; VILLANUEVA, S. L.; MARUO, T. The Role of Human Papilloma Virus in Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. **Kobe Journal of Medical Sciences**, v.50, n.1, p.9-19, 2004.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 385, n. 1, p. 113-142, 2010.

MOREIRA, T. F. **Perfil antioxidante e efeito dos extratos, frações e das antraquinonas crisofanol, emodina e fisciona de Rhamnus sphaerosperma var. pubescens sobre a viabilidade celular e estresse oxidativo em células de tumorais de colo uterino e carcinoma oral**. 2016. 122f . Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 2016.

MÜNGER, K.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Research**, v. 2, p. 213-228, 2002.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZÁLEZ, A.B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**. v.24, Suppl 3, S3/1–10. 2006. View Article: Google Scholar, 2006.

MUÑOZ, N.; FRANCO, E. L.; HERRERO, R.; ANDRUS, J. K.; DE QUADROS, C.; GOLDIE, S. J.; BOSCH, F. X. Recommendations for cervical cancer prevention in Latin America and the Caribbean. **Vaccine**, v. 26, p. 96-107, 2008.

OLIVEIRA, E. C. V. **Desenvolvimento de nanoemulsões contendo ácido ursólico para otimização do tratamento da doença de Chagas**. 2014. Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo.

PANIZZA, S. **Plantas que Curam-Cheiro de Mato**. São Paulo: Ibrasa, 1998. ISBN 85-3480067-7.

PARFANOF, M. et al. Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.111, n.43, p. 15544–15549, 2014.

PARISOTTO, E. B.; MICHIELIN, E. M.; BISCARO, F.; FERREIRA, S. R.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R. C. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 101-107, 2012.

PETT, M.; COLEMAN, N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? **Journal of Pathology**, v. 212, p. 356–367, 2007.

PINTO, A. P.; BAGGIO, H. C. C.; GUEDES, G. B. Sexually transmitted viral diseases in women: clinical and epidemiological aspects and advances in laboratory diagnosis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.9, n.3, p.241-250, 2005.

PIRES, V. G A; MOURA, M. R. Preparation of new nanocomposites containing nanoemulsions of melaleuca, copaíba and lemon oil for application as biomaterial. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 1-5, 2017.

PLATZ-CHRISTENSEN, J. J.; SUNDSTROM, E.; LARSSOM, P. G. Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v.73, n.7, p.586-588,1994.

PubChem.Data deposited in or computed by PubChem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 12/03/2018.

PSYRRI, A.; DIMAIO, D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. **Nature Clinical Practice Oncology**, v.1, n.5, p.24-31, 2008.

RAMACHANDRAN, S.; PRASAD, N. R. Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. **Chemico-biological interactions**, v. 176, n. 2, p. 99-107, 2008.

RAMOS, K. L. V. **Avaliação da citotoxicidade da terapia fotodinâmica mediada por nanoemulsão à base de óleo de açaí contra câncer de pele não-melanoma**. 2014. 97f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade de Brasília/UnB. Brasília- DF.

RAPISARDA, A.; LAUK, L.; RAGUSA, S. Micromorphological study on leaves of some Cordia (Boraginaceae) species used in traditional medicine. **Economic Botanic**, v.51, n.4, p.385-391, 1997.

RELLO, S.; STOCKERT, J.C.; MORENO, V.; GÁMES, A.; PACHECO, M.; JUARRANZ, M.CÁNETE, M.; VILLANUEVA, A. Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. **Apoptosis**, v.10, p. 201-208, 2005.

RODRIGUES, I. V. **Desenvolvimento e validação de um método bionalítico para avaliação farmacocinética de uma mistura binária de triterpenos pentacíclicos e de seus metabólitos in vivo**. 2014. 122f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP. Ribeirão Preto- SP. 2014.

SANTOS, M. C. B. G.; PINHO, M. S. Estratégias tecnológicas em transformação: um estudo da indústria farmacêutica brasileira. In: 30°. ENEGEP: Encontro Nacional de Engenharia de Produção, 2010. p.1-15.

SANTOS, M. S. C. D. **Citotoxicidade induzida por nanoemulsões de selol em células de adenocarcinoma de pulmão humano**. 2013. 79f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília/UnB. Brasília- DF. 2013.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. Liposomes: has the magic bullet hit the target?. **Química nova**, v. 25, n. 6B, p. 1181-1185, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. D. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHI, J. engineering: from discovery to applications. **Nano letters**, v. 10, n. 9, p. 3223-3230, 2010.

SERTIÉ, J. A. A.; BASILE, A. C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A. K.; ZELNIK, R. Pharmacological assay of Cordia verbenacea. Anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extracts of the leaves. **Planta medica**, v.54, n.1, p.7-10, 1988.

SERTIÉ, J. A. A.; BASILE, A. C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A. K.; ZELNIK, R. Antiinflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta medica**, v.56, n.11, p.36-40, 1990.

SERTIÉ, J. A. A.; BASILE, A. C.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. P.; PENNA, S. C. Pharmacological assay of Cordia verbenacea III: oral and topical anti-inflammatory activity and gastrotoxicity of a crude leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.31, p.239-247, 1991.

SERTIÉ, J. A. A.; WOISKY, R. G.; WIEZEL, G.; RODRIGUES, M. Pharmacological assay of Cordia verbenacea V: oral and tropical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**, v.12, n.5, p. 338-344, 2005.

SHAFIQ, S.; SHAKEEL, F.; TALEGAONKAR, S.; AHMAD, F.J.; KHAR, R.K.; ALI, M. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.66, p.227–243, 2007.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: a pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 24, 2010.

SIDDIQUI, M. A.; PERRY, C. M. Human papillomavirus quadrivalent (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine (Gardasil). **Drugs**, v.66, n.9, p.1263-1271, 2006.

SILVA JR., A. A.; VIZZOTO, V. J.; GIORGI, E. Plantas medicinais, caracterização e cultivo. Boletim Tecnico-Empresa de Pesquisa Agropecuaria e Difusao de Tecnologia de Santa Catarina SA (Brazil). no. 68, 1994.

SILVA, P. B. D.; FREM, R. C. G.; NETTO, A. V. D. G.; MAURO, A. E.; FERREIRA, A. M. D. C.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; CHORILLI, M. Processo de obtenção de nanoestruturas lipídicas, nanoestruturas lipídicas obtidas e uso das mesmas. 2017. Patente: INPI-BR102015018285-6.pdf.

SINGH, B.; DUBEY, M. M. Estimation of triterpenoids from *Heliotropium marifolium* Koen. ex Retz. in vivo and in vitro. I. Antimicrobial screening. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 231-234, 2001.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 1990.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nanoemulsions. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 10, n. 3, p. 102-110, 2005.

SOLOMON, V. R.; LEE, H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. **European journal of pharmacology**, v. 625, n. 1, p. 220-233, 2009.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.-T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in colloid and interface science**, v. 108, p. 145-149, 2004.

SOUSA, R.; DOSTATNI, N.; YANIV, M. Control of papillomaviruse gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, v. 1032, p. 19, 1990.

STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecologic Oncology**, v. 109, S15-S21, 2008.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Advances in colloid and interface science**, v. 108, p. 303-318, 2004.

TARDI, P.; BOMAN, N.; CULLIS, P. Liposomal Doxorubicin. **J. Drug Target**. v. 4, n. 3, p. 129-140, 1996.

TOMMASINO, M. The human papilloma virus family and its role in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, v.26, p.13-21, 2014.

TOBLER, J. P. **Bases regulatórias para a avaliação da segurança de medicamentos oncológicos à base de nanotecnologia**. 2014. Tese de Doutorado.

VALERA, M. C.; ANBINDER, A. L.; LEONARDO, M. R.; PARIZOTO, N. A.; KLEINKE, M. U. Cimentos endodônticos: análise morfológica imediata e após seis meses utilizando microscopia de força atômica. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 199-204, 2000.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRONGLE, C. R.; WICKNER, R. B. (Editors). **Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. The Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, CA: Academic Press, 2000.

VENTRELLA, M. C.; MARINHO, C. R. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) leaves. **Revista Brasileira Botânica**, v.31, n.3, p.457-467, 2008.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Avanços na utilização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de câncer. 2016.

VOIGT, W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. **Methods in Molecular Medicine**, v. 110, p. 39-48, 2005.

WHO World Health Organization Cancer. 2015. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 19 de janeiro 2016.

XI, J. et al. Formulation Development and Bioavailability. Evaluation of a Self- Nanoemulsified Drug Delivery System of Oleanolic Acid. **AAPS PharmSciTech**, v.10, p.172-182, 2009.

WORCESTER, D. L.; MILLER, R. G.; BRYANT, P. J. Atomic force microscopy of purple membranes. **Journal of microscopy**, v. 152, n. 3, p. 817-821, 1988.

WU, Desong et al. The in Vitro and in Vivo Antitumor Activities of Tetracyclic Triterpenoids Compounds Actein and 26-Deoxyactein Isolated from Rhizome of *Cimicifuga foetida* L. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1001, 2016.

YANG, H.; DOU, Q. P. Targeting apoptosis pathway with natural terpenoids: implications for treatment of breast and prostate câncer . **Current Drugs Targets**, v. 1, n.11, p. 733-744, 2010.

ZHENG, Z. M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post- transcriptional regulation. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 11, p. 2286-2302, 2006.

ZHOU, D.; JIN, H.; LIN, H. B.; YANG, X. M.; CHENG, Y. F.; DENG, F. J.; XU, J. P. Antidepressant effect of the extracts from *Fructus Akebiae*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, n. 3, p. 488-495, 2010.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 342-350, 2002.

ZUR HAUSSEN, H. Papillomviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. **Virology**, v.384, p.260-265, 2009.