

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Produtos naturais na metabolização de fármacos
quimioterápicos**

Violeta Railean

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica Médica

Dissertação orientada por:
Pedro Luís Vieira Falé

2017

Agradecimentos

Desejo expressar os meus agradecimentos:

Ao professor Pedro Luís Vieira Falé pela orientação e disponibilidade prestada, pela compreensão e paciência e também pelas sugestões na resolução de problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho.

À professora Maria Luísa Serralheiro por me ter introduzido no seu grupo de investigação.

Aos meus amigos e colegas, Asma Ressaissi, André Silva, Bruno Gonçalves, Joana Henriques e Joana Matos pelo ambiente agradável que proporcionaram no laboratório. Em especial, gostava de agradecer à Joana Catarro, Laura Guedes e Rebeca Esperança André pelo apoio, incentivo e paciência demonstrada.

E, por último, agradeço à minha família, em especial aos meus pais e ao meu irmão pelo apoio e motivação que sempre me ofereceram.

Obrigada!

Resumo

Atualmente, o cancro é uma das doenças mais frequentes no mundo, sendo a quimioterapia o tratamento mais comum. Muitos doentes, durante a quimioterapia convencional, recorrem ao tratamento suplementar com produtos naturais e suplementos alimentares considerados úteis na cura do cancro, contudo existem poucos estudos que comprovem a sua eficácia. O objetivo deste estudo é investigar produtos naturais que possam influenciar a atividade de dois fármacos comuns na quimioterapia do cancro: o tamoxifeno e a cisplatina. Sendo o tamoxifeno um pró-fármaco, torna-se também necessário estudar o efeito dos produtos naturais na sua metabolização. Para isso foram efetuados estudos de citotoxicidade dos dois fármacos na presença de produtos naturais provenientes da dieta: quercetina, rutina (forma glicosilada de quercetina) e produtos resultantes da digestão de *Spirulina platensis*. Estudou-se também a influência da albumina do soro bovino (BSA), uma proteína transportadora de solutos no soro, na citotoxicidade do tamoxifeno. Estes estudos demonstram que a atividade do tamoxifeno nas células HeLa aumenta na presença de quercetina e diminui na presença de rutina, enquanto nas células MCF-7 a sua atividade diminui na presença de produtos da digestão de *S. platensis*. Para além disso, em ambas as linhas celulares, a atividade do tamoxifeno diminui acentuadamente na presença da BSA, provavelmente devido a ligação do fármaco à proteína. No caso da cisplatina, a sua atividade diminui na presença de quercetina e de produtos da digestão de *S. platensis* nas células HeLa e diminui na presença de quercetina, rutina e produtos da digestão de *S. platensis* nas células MCF-7. Para uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à interação entre os fármacos e produtos naturais, foram efetuados estudos complementares - estudos de proliferação, de metabolização *in vitro* e de alterações na estrutura celular por espectroscopia de FTIR. Os estudos de proliferação demonstram que nas células HeLa ambos os fármacos têm efeito no mecanismo de invasão das células tumorais. A interação do tamoxifeno com a rutina e produtos da digestão de *S. platensis* e a interação da cisplatina com a quercetina e rutina têm efeito no aumento da aderência e subsequente proliferação das células HeLa. O mesmo efeito foi observado na combinação da cisplatina com a rutina nas células MCF-7. Nos estudos de metabolização *in vitro* pelos citocromos P450 e pelas células Caco-2 e HepG2, não foram detetados metabolitos do tamoxifeno, pelo que não foi possível realizar o estudo da interação dos produtos naturais na metabolização do tamoxifeno. Para além disso, quando presente em amostras biológicas, tornou-se difícil a análise do tamoxifeno por HPLC-DAD e FTIR, provavelmente devido à sua ligação à albumina presente no soro e também devido à sua hidrofobicidade. Os estudos efetuados por espectroscopia de FTIR demonstram que o efeito dos fármacos e da combinação destes com os produtos naturais leva à morte celular por apoptose, através da fragmentação do DNA e do rearranjo na composição dos lípidos membranares, sendo estes os processos necessários para a formação de corpos apoptóticos. Os mecanismos de interação mais prováveis estão associados com a capacidade dos produtos naturais interferirem nas vias de sinalização dos fármacos, atenuando ou estimulando a indução da apoptose. Em conclusão, a quercetina, a rutina e os produtos da digestão de *S. platensis* alteram a ação celular do tamoxifeno e da cisplatina em várias linhas celulares tumorais. Tendo em conta que o mecanismo de interação com o tamoxifeno pode estar relacionado com a sua metabolização, é necessário que se desenvolvam novos métodos para testar esta hipótese.

Palavras-chave

Tamoxifeno, cisplatina, quercetina, rutina, *Spirulina platensis*

Abstract

Currently, cancer is one of the most frequent disease in the world, with chemotherapy being the most common type of treatment. Many patients, during conventional chemotherapy, choose to use a supplemental treatment with natural products and dietary supplements claiming health benefits for cancer treatment, however there are few studies that prove their efficacy. The main aim of this study is to investigate several natural products that may affect the activity of two common chemotherapeutic drugs like tamoxifen and cisplatin. Since tamoxifen is a prodrug, it's also necessary to study the effect of natural products on his metabolism. For this, cytotoxicity assays of two chemotherapy drugs were performed in the presence of natural compounds derived from diet: quercetin, rutin (glycosylated form of quercetin) and the products resulting from *Spirulina platensis* digestion. The influence of bovine serum albumin (BSA), a serum solute carrier protein, on the cytotoxicity of tamoxifen was also studied. This assays showed that the activity of tamoxifen in HeLa cell line is influenced by the flavonoids, increasing the cytotoxic effect in the presence of quercetin and decreasing in the presence of rutin. While, in MCF-7 cell line the activity of tamoxifen decreases in the presence of the products resulting from *S. platensis* digestion. In addition, in both cell lines, the activity of tamoxifen declines significantly in the presence of BSA, probably due to the binding of the drug to the protein. In the case of cisplatin, the cytotoxic activity decreases in the presence of quercetin and products of *S. platensis* digestion in HeLa cell line and decreases in the presence of quercetin, rutin and products of *S. platensis* digestion in MCF-7 cell line. For a better comprehension of the mechanisms underlying the interaction between drug and natural products several studies were performed – proliferation, *in vitro* metabolism and cellular structure changes by FTIR spectroscopy. Proliferation studies demonstrate that in HeLa cell line both drugs have an effect on the invasion mechanism used by cancer cells. The interaction of tamoxifen with rutin and *S. platensis* digestion products and the interaction of cisplatin with quercetin and rutin have an effect increasing adhesion and subsequent proliferation of HeLa cell line. The same effect was observed in the combination of cisplatin with rutin in MCF-7 cell lines. In the *in vitro* metabolism studies by cytochrome P450 and Caco-2 and HepG2 cells, no metabolites of tamoxifen were detected, so it was not possible to study the interaction of natural products in its metabolism. Furthermore, when present in biological samples, tamoxifen analysis by HPLC-DAD and FTIR became difficult, probably because of its binding to BSA and also because of its hydrophobicity. Studies performed by FTIR spectroscopy revealed that the drug's effects and its combination with natural products leads to cell death by apoptosis, through DNA fragmentation and rearrangement in the membrane lipid composition, which are the processes necessary for the formation of apoptotic bodies. The most probable interaction mechanisms are associated with the ability of natural products to interfere with drug signaling pathways, attenuating or stimulating the induction of apoptosis. In conclusion, quercetin, rutin and *S. platensis* digestion products can modify cellular action of chemotherapeutic drugs like tamoxifen and cisplatin in several cancer cell lines. Taking into account that the mechanism of interaction with tamoxifen may be related to its metabolism, it is necessary to develop new methods to test this hypothesis.

Key-words

Tamoxifen, cisplatin, quercetin, rutin, *Spirulina platensis*

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Palavras-chave.....	III
Abstract	IV
Key-words	IV
Lista de figuras	VII
Lista de tabelas	X
Lista de equações	XI
Listas de abreviaturas, siglas e símbolos.....	XII
I. Introdução.....	1
I.1. Fármacos quimioterápicos.....	3
I.1.1. Tamoxifeno	3
I.1.2. Cisplatina.....	4
I.2. Produtos naturais	5
I.2.1. Flavonoides	5
I.2.1. <i>Spirulina platensis</i>	7
II. Materiais e métodos.....	8
II.1. Reagentes	9
II.2. Linhas celulares.....	9
II.3. Cultura de células.....	9
II.4. Preparação de produtos da digestão de <i>S. platensis</i>	9
II.4.1. Quantificação da C-ficocianina	9
II.5. Efeito dos produtos naturais na citotoxicidade de fármacos	9
II.5.1. Análise estatística	10
II.6. Quantificação e metabolização do tamoxifeno.....	11
II.6.1. Quantificação do tamoxifeno	11
II.6.1.1. Condições do HPLC.....	11
II.6.1.2. Análise do tamoxifeno por HPLC	11
II.6.1.3. Condições da espectroscopia de FTIR	11
II.6.1.4. Quantificação do tamoxifeno por espectroscopia de FTIR	11
II.6.2. Metabolização do tamoxifeno <i>in vitro</i> pelos citocromos P450 extraídos de fígado.....	12
II.6.2.1. Quantificação da proteína total.....	12
II.6.2.2. Detecção de metabolitos do tamoxifeno por HPLC-DAD	12

II.6.3.	Metabolização do tamoxifeno <i>in vitro</i> pelas HepG2 e Caco-2.....	13
II.7.	Efeito dos produtos naturais na ação de fármacos.....	13
II.7.1.	Estudos de proliferação	13
II.7.2.	Estudo das alterações estruturais por espectroscopia de FTIR.....	13
III.	Resultados e discussão	15
III.1.	Obtenção e quantificação da C-ficocianina presente na <i>S. platensis</i>	16
III.2.	Efeito dos produtos naturais na citotoxicidade dos fármacos.....	17
III.2.1.	HeLa	17
III.2.2.	MCF-7	21
III.3.	Estudos de proliferação	25
III.3.1.	HeLa	25
III.3.2.	MCF-7	28
III.4.	Quantificação e metabolização do tamoxifeno.....	30
III.4.1.	Análise por HPLC-DAD	30
III.4.1.1.	Reta de calibração	32
III.4.2.	Análise por FTIR.....	33
III.4.2.1.	Reta de calibração	33
III.4.2.2.	Quantificação do tamoxifeno em meio de cultura.....	33
III.4.2.3.	Efeito da albumina sobre o tamoxifeno.....	34
III.4.3.	Metabolização do tamoxifeno <i>in vitro</i> pelos citocromos P450 extraídos do fígado.....	34
III.4.4.	Metabolização do tamoxifeno <i>in vitro</i> pelas HepG2 e Caco-2.....	36
III.4.4.1.	HepG2	36
III.4.4.2.	Caco-2	37
III.5.	Ação da combinação dos fármacos com os produtos naturais a nível celular – estudos por espectroscopia de FTIR.....	39
III.5.1.	HeLa.....	40
III.5.2.	MCF-7	48
IV.	Conclusões e trabalho futuro.....	56
	Referências bibliográficas	58
	Anexos.....	64

Lista de figuras

Figura I.1 – Estrutura química do tamoxifeno.	3
Figura I.2 – Representação esquemática das estruturas químicas resultantes da metabolização do tamoxifeno pelos enzimas CYP3A4/5 e CYP2D6. Adaptado de Antunes et al. 2013.	4
Figura I.3 – Estrutura química da cisplatina.	5
Figura I.4 – Estruturas químicas da quercetina (A) e da rutina (B).	6
Figura I.5 – <i>S. platensis</i> platensis. Adaptado de http://algae-lab.com/product/S. platensis-platensis-live-algae-ml-5-liters-culture-starter/	7
Figura I.6 – Estrutura química da C-ficocianina.	7
Figura III. 1 – Curva de viabilidade (%) das células HeLa após o tratamento com tamoxifeno e da combinação deste fármaco com os produtos naturais e BSA, durante 72 horas. <i>S. platensis</i> – produtos da digestão de <i>S. platensis</i>	18
Figura III. 2 – Curva de viabilidade (%) das células HeLa após o tratamento com cisplatina e combinação deste fármaco com os produtos naturais, durante 72 horas. <i>S. platensis</i> – produtos da digestão de <i>S. platensis</i>	20
Figura III.3 – Curva de viabilidade (%) das células MCF-7 após o tratamento com tamoxifeno e combinação deste com vários compostos, durante 72 horas. <i>S. platensis</i> – produtos da digestão de <i>S. platensis</i>	21
Figura III.4 – Curva de viabilidade (%) das células MCF-7 após o tratamento com cisplatina e combinação deste com os produtos naturais. <i>S. platensis</i> – produtos da digestão de <i>S. platensis</i>	24
Figura III. 5 – Curva de viabilidade (%) das células HeLa após o tratamento com tamoxifeno e combinação deste com os produtos naturais. <i>S. platensis</i> – produtos da digestão de <i>S. platensis</i>	26
Figura III. 6 – Curva de viabilidade (%) das células HeLa após o tratamento com cisplatina e combinação deste com os produtos naturais. <i>S. platensis</i> – produtos da digestão de <i>S. platensis</i>	27
Figura III. 7 – Curva de viabilidade (%) das células MCF-7 após o tratamento com cisplatina e combinação deste com os produtos naturais. <i>S. platensis</i> – produtos da digestão de <i>S. platensis</i>	28
Figura III. 8 – Curva de viabilidade (%) das células MCF-7 após o tratamento com tamoxifeno e combinação deste com os produtos naturais. <i>S. platensis</i> – produtos da digestão de <i>S. platensis</i>	29
Figura III.9 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD de soluções padrão do tamoxifeno.	31
Figura III.10 – Espectro UV-Vis obtido por HPLC-DAD do pico correspondente ao tamoxifeno na concentração de 1000 µM.	31
Figura III.11 – Representação gráfica da reta de calibração de altura do pico em função de concentração do tamoxifeno, obtidos por HPLC-DAD.	32
Figura III.12 – Representação gráfica da reta de calibração do tamoxifeno, obtidos por FTIR.	33
Figura III.13 – Representação gráfica da absorvência em função do N° de onda para controlo (A) e tamoxifeno (B), em triplicado.	33
Figura III.14 – Espectro obtido por FTIR para o controlo que contém apenas tamoxifeno (A) e amostra que contém BSA + Tamoxifeno (B), em triplicado.	34

Figura III.15 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a amostra de sobrenadante recolhida para o ensaio de 0 horas na metabolização do tamoxifeno pelos citocromos P450. CFE – liofilizado da fração microsomal.	35
Figura III.16 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a amostra de sobrenadante recolhida para o ensaio de 1,5 horas na metabolização do tamoxifeno pelos citocromos P450. CFE – liofilizado da fração microsomal.....	35
Figura III.17 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD para as amostras do meio no ensaio da metabolização do tamoxifeno pelas células HepG2.....	37
Figura III.18 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD para as amostras de células no ensaio da metabolização do tamoxifeno pelas células HepG2.....	37
Figura III.19 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD para as amostras do meio no ensaio da metabolização do tamoxifeno pelas células Caco-2.....	38
Figura III.20 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD para as amostras de células no ensaio da metabolização do tamoxifeno pelas células Caco-2.....	39
Figura III.21 – Espetro de FTIR obtido para as células HeLa tratadas com tamoxifeno e combinação deste com os flavonoides na concentração de DMSO igual a 0,5 %. O espetro foi normalizado para a banda da amida II.	40
Figura III.22 – Espetro de FTIR obtido para as células HeLa tratadas com o tamoxifeno e combinação deste com os produtos resultantes da digestão de <i>S. platensis</i> na concentração de DMSO igual a 0,25 %. O espetro foi normalizado para a banda da amida II. <i>S. platensis</i> – produtos de digestão de <i>S. platensis</i>	41
Figura III.23 – Espetro de FTIR obtido para as células HeLa tratadas com cisplatina e combinação do fármaco com os produtos naturais na concentração de DMSO igual a 0 %. O espetro foi normalizado para a banda da amida II. <i>S. platensis</i> – produtos de digestão de <i>S. platensis</i>	41
Figura III.24 – Histograma das razões da altura dos picos de cada banda, obtidos a partir dos espetros de FTIR, para as células HeLa tratadas com o tamoxifeno e com os flavonoides, durante 24 horas. O controlo foi normalizado a 1, sendo as restantes amostras normalizadas ao controlo. As mesmas letras indicam valores que não podem ser considerados diferentes (p-value > 0,05). Concentrações usadas (DMSO 0,5 %): tamoxifeno (20,81 µM), quercetina (40 µM), tamoxifeno (13,69 µM) + quercetina (40 µM), rutina (100 µM), tamoxifeno (28,02 µM) + rutina (100 µM).....	43
Figura III.25 – Histograma das razões na altura dos picos de cada banda obtidos a partir dos espetros de FTIR para as células HeLa tratadas com tamoxifeno e com produtos da digestão de <i>S. platensis</i> , durante 24 horas. O controlo foi normalizado a 1, sendo as restantes amostras normalizadas ao controlo. As mesmas letras indicam valores que não podem ser considerados diferentes (p-value > 0,05). Concentrações usadas (DMSO 0,25 %): tamoxifeno (20,81 µM), produtos da digestão de <i>S. platensis</i> (1 mg/mL), tamoxifeno (25,18 µM) + produtos da digestão de <i>S. platensis</i> (1 mg/mL).....	45
Figura III.26 – Histograma das razões na altura dos picos de cada banda, obtidos a partir dos espetros de FTIR, para as células HeLa tratadas a cisplatina e com os produtos naturais, durante 24 horas. O controlo foi normalizado a 1, sendo as restantes amostras normalizadas ao controlo. As mesmas letras indicam valores que não podem ser considerados diferentes (p-value > 0,05) Concentrações usadas (DMSO 0 %): cisplatina (3,54 µM), quercetina (40 µM), cisplatina (5,28 µM) + quercetina (40 µM), rutina (100 µM), cisplatina (3,37 µM) + rutina (100 µM), produtos da digestão de <i>S. platensis</i> (1 mg/mL), cisplatina (4,38 µM) + produtos da digestão de <i>S. platensis</i> (1 mg/mL).....	47

- Figura III.27** – Espectro de FTIR obtido para as células MCF-7 tratadas com tamoxifeno e combinação deste com os flavonoides na concentração de DMSO igual a 0,5 %. O espectro foi normalizado para a banda da amida II. 48
- Figura III.28** – Espectro de FTIR obtido para as células MCF-7 tratadas com tamoxifeno e combinação deste com os produtos da digestão de *S. platensis* na concentração de DMSO igual a 0,25 %. O espectro foi normalizado para a banda da amida II. *S. platensis* – produtos da digestão de *S. platensis*. 49
- Figura III.29** – Espectro de FTIR obtido para as células MCF-7 tratadas com cisplatina e combinação deste com os produtos naturais na concentração de DMSO igual a 0 %. O espectro foi normalizado para a banda da amida II. *S. platensis* – produtos da digestão de *S. platensis*. 49
- Figura III. 30** – Histograma das razões na altura dos picos de cada banda, obtidos a partir dos espectros de FTIR, para as células MCF-7 tratadas com o tamoxifeno e com os flavonoides, durante 24 horas. O controlo foi normalizado a 1, sendo as restantes amostras normalizadas ao controlo. As mesmas letras indicam valores que não podem ser considerados diferentes (p-value > 0,05) Concentrações usadas (DMSO 0,5 %): tamoxifeno (20,56 µM), quercetina (80 µM), tamoxifeno (22,22 µM) + quercetina (80 µM), rutina (100 µM), tamoxifeno (17,15 µM) + rutina (100 µM). 51
- Figura III. 31** – Histograma das razões nas alturas dos picos de cada banda, obtidos a partir dos espectros de FTIR, para as células MCF-7 tratadas com o tamoxifeno e com os produtos da digestão de *S. platensis*, durante 24 horas. O controlo foi normalizado a 1, sendo as restantes amostras normalizadas ao controlo. As mesmas letras indicam valores que não podem ser considerados diferentes (p-value > 0,05). Concentrações usadas (DMSO 0,25 %): tamoxifeno (20,56 µM), produtos da digestão de *S. platensis* (1 mg/mL), tamoxifeno (23,09 µM) + produtos da digestão de *S. platensis* (1 mg/mL). 53
- Figura III.32** – Histograma das razões na altura dos picos de cada banda, obtidos a partir dos espectros de espectroscopia de FTIR, para as células MCF-7, tratadas com a cisplatina e com os produtos naturais, durante 24 horas. O controlo foi normalizado a 1, sendo as restantes amostras normalizadas ao controlo. As mesmas letras indicam valores que não podem ser considerados diferentes (p-value > 0,05). Concentrações usadas (DMSO 0 %): cisplatina (7,76 µM), quercetina (80 µM), cisplatina (8,30 µM) + quercetina (80 µM), rutina (100 µM), cisplatina (9,00 µM) + rutina (100 µM), produtos da digestão de *S. platensis* (1 mg/mL), cisplatina (8,29 µM) + produtos da digestão de *S. platensis* (1 mg/mL). 54

Lista de tabelas

Tabela II. 1 – Metabolização de tamoxifeno pelos citocromos P450 extraídos do fígado.....	12
Tabela III. 1 – Quantificação da C-ficocianina na <i>S. platensis</i>	16
Tabela III. 2 – O efeito citotóxico da interação do tamoxifeno e da cisplatina com os produtos naturais, nas células HeLa.....	18
Tabela III.3 – Efeito dos fármacos e da sua combinação com os produtos naturais na toxicidade das células MCF-7.....	22
Tabela III. 4 – Efeito da combinação dos fármacos e dos produtos naturais na aderência e proliferação das células HeLa.....	26
Tabela III. 5 - Efeito da combinação dos fármacos e dos produtos naturais na aderência e proliferação das células MCF-7.....	29
Tabela III.6 – A interpretação de algumas das bandas mais frequentemente encontradas nos espectros de FTIR para amostras biológicas.	40

Lista de equações

- Equação II.1** – Equação do cálculo da viabilidade celular, em que A_t é a absorvência da amostra testada e M_c é a média das absorvências do controlo. 10
- Equação III.1** – Equação do cálculo da quantidade de C-ficocianina. 16
- Equação III.2** – Equação do cálculo da pureza da C-ficocianina. 16

Listas de abreviaturas, siglas e símbolos

abs – absorvência

ACN – acetonitrilo

BSA – albumina do soro bovino

Caco-2 – células epiteliais do adenocarcinoma colo-retal

CFE – liofilizado da fração microsomal (“cell free extract”)

CYP – citocromo P450

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

ER – recetor de estrogénio

ER(-) – sem recetores de estrogénio

FTIR – espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

FBS – soro bovino fetal

HeLa – células epiteliais do adenocarcinoma do colo de útero

HepG2 – células epiteliais do carcinoma hepatocelular

HPLC-DAD – cromatografia líquida de alta precisão com detetor de *Diode Array* (DAD)

IC₅₀ – concentração necessária para inibir o crescimento de 50% de células

MCF-7 – células epiteliais do adenocarcinoma da glândula mamária

min – minutos

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NADPH – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

RNA – ácido ribonucleico

ROS – espécies reativas de oxigénio

RPMI – meio de cultura RPMI (“Roswell Park Memorial Institute”) 1640

S. platensis – *Spirulina platensis*

SD – desvio padrão

SW – alga *Spirulina platensis* (“seaweed”)

UV-Vis – ultravioleta-visível

v_{as} – modo vibracional assimétrico

v_s – modo vibracional simétrico

I. Introdução

Na atualidade, o cancro é uma das doenças mais frequentes em todo o mundo. O enorme avanço tecnológico na área do tratamento do cancro permitiu diminuir a mortalidade e aumentar a qualidade de vida dos pacientes. Um dos métodos mais comuns no tratamento do cancro é a quimioterapia. Contudo, existem vários problemas associados a este tipo de tratamento, incluindo efeitos secundários tóxicos e resistência celular. Atualmente, existe um enorme interesse no uso de produtos naturais como terapia complementar, devido aos seus efeitos na redução da toxicidade, no alívio de sintomas causados pelo cancro, na estimulação do sistema imunitário e também ao seu efeito antitumoral direto sobre as células (Monteiro *et al.* 2014). No entanto, alguns dos produtos naturais demonstraram ter a capacidade de introduzir alterações no mecanismo de ação dos fármacos usados na quimioterapia convencional, aumentando ou diminuindo o efeito citotóxico sobre as células tumorais (Lamson and Brignall 1999). Para além da quimioterapia convencional, a maioria dos pacientes recorre também à medicina complementar e alternativa, muitas vezes sem o conhecimento do médico. Geralmente, os pacientes procuram alternativas com base nas suas crenças adquirindo informação sobre o efeito benéfico dos produtos naturais sem terem por base evidências científicas do seu efeito na interação com os fármacos, podendo prejudicar o tratamento convencional (Gerber *et al.* 2006).

Alguns dos fármacos quimioterápicos mais usados são o tamoxifeno, para o tratamento do cancro da mama, e a cisplatina, para o tratamento de diferentes tipos de cancro, como o dos ovários, do pulmão, entre outros (Basu and Krishnamurthy 2010). Foi demonstrado que estes fármacos, quando coadministrados com alguns dos produtos naturais provenientes da dieta do paciente, podem sofrer alterações na sua função (Lamson and Brignall 1999). Para além disso, tanto o tamoxifeno como a cisplatina foram associados a vários efeitos secundários, como por exemplo a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, respetivamente (Oliveira, Genari, and Dolder 2010; Basu and Krishnamurthy 2010). Para além disso, a cisplatina foi associada também à resistência celular (Siddik 2003), pelo que é importante identificar novos agentes terapêuticos que exerçam efeitos benéficos na ação dos fármacos durante a quimioterapia do cancro.

Considera-se que uma dieta rica em frutos e legumes tem vários efeitos benéficos na saúde humana, devido à sua elevada concentração em vitaminas, minerais, fibras e fitoquímicos (Slavin and Lloyd 2012). Alguns estudos epidemiológicos associam as substâncias presentes nos frutos e legumes a um efeito protetor contra vários tipos de cancro (Steinmetz and Potter 1996). Por essa razão, os doentes acreditam que o elevado consumo destes compostos na dieta, durante a quimioterapia convencional, pode ajudar na cura do cancro. Para estudarmos o efeito de alguns compostos presentes abundantemente em frutos e legumes na ação dos fármacos quimioterápicos, foram selecionadas a quercetina e a sua forma glicosilada, a rutina. Para além disso, atualmente, existe um elevado interesse no uso de algas, especialmente a *Spirulina platensis*, como fonte de substâncias bioativas que demonstraram vários efeitos benéficos para a saúde. Deste modo, para além dos flavonoides, escolheu-se estudar o efeito dos produtos resultantes da digestão de *S. platensis*, que seriam obtidos se a alga fosse ingerida como suplemento alimentar.

Assim, o objetivo principal deste estudo é investigar a atividade citotóxica do tamoxifeno e da cisplatina nas células HeLa e MCF-7, na presença de produtos naturais como a quercetina, a rutina e os produtos da digestão de *S. platensis*. Para além disso, também se pretende analisar o efeito tóxico do tamoxifeno na presença da mais importante proteína transportadora de solutos no soro, a albumina. Para uma melhor compreensão do possível mecanismo de interação entre os fármacos e os produtos naturais, pretende-se efetuar estudos mais aprofundados do efeito dessa combinação, através de estudos de proliferação, de metabolização *in vitro* e de alterações na estrutura celular por espectroscopia de FTIR. Os estudos de proliferação têm como objetivo fornecer informação acerca do efeito da combinação dos compostos, no mecanismo de invasão usado pelas células tumorais durante a proliferação. Os estudos

de metabolização *in vitro* têm como intuito testar o efeito dos produtos naturais na metabolização do pró-fármaco, tamoxifeno, pelos enzimas do metabolismo de xenobióticos, através de citocromos P450 extraídos do fígado de porco, e através de células Caco-2 e HepG2. Para isso, pretende-se, em primeiro lugar, quantificar o tamoxifeno em amostras biológicas por HPLC-DAD e FTIR e detetar os seus metabolitos, sendo, posteriormente, efetuados os ensaios de metabolização na presença de produtos naturais. Por fim, irão ser efetuados estudos para verificar se existem alterações estruturais por espectroscopia de FTIR que ocorrem ao nível celular após o tratamento com a combinação de fármacos e produtos naturais.

Neste estudo foram utilizados dois fármacos quimioterápicos: o tamoxifeno, específico do cancro da mama, e a cisplatina, usada no tratamento de vários tipos de cancro.

I.1. Fármacos quimioterápicos

I.1.1. Tamoxifeno

O tamoxifeno [trans-1-(4-β-dimetilaminoetoxi-fenil)-1,2-difenilbut-1-eno] (**Figura I.1**) é um fármaco antiestrogénio sintético usado em várias fases do tratamento do cancro da mama e, também, na prevenção em pacientes com elevado risco de desenvolver esta doença (Bourassa *et al.* 2011).

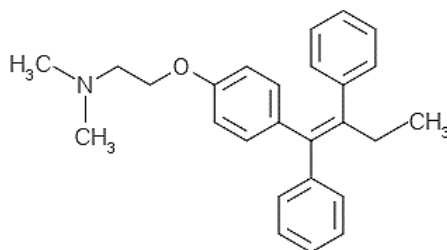


Figura I.1 – Estrutura química do tamoxifeno.

O tamoxifeno atua como um inibidor competitivo do estrogénio endógeno pela ligação ao recetor citoplasmático de estrogénio (ER). No interior da célula, a formação do complexo antiestrogénio/ER previne a transcrição de genes que normalmente são induzidos pelo estrogénio e que estão envolvidos na regulação do ciclo celular e proliferação. Deste modo, a inibição destes genes previne a síntese do DNA, impede o crescimento tumoral e diminui a produção de vários fatores envolvidos na proliferação celular (Jaiyesimi *et al.* 1995).

Embora o mecanismo mediado pelo ER seja considerado o mais importante, o tratamento com tamoxifeno demonstrou uma elevada taxa de sobrevivência em pacientes com cancro da mama ER(-), isto é, tumores desprovidos de ER (V. C. Jordan 1993). Isto indica que o tamoxifeno tem a capacidade de exercer a sua função anticancerígena por outros mecanismos não mediados pelo ER, incluindo a ligação a várias proteínas envolvidas na promoção do tumor, bloqueando a sua ativação ou inibindo a atividade dos enzimas. Para além disso, o fármaco pode estimular o aumento da produção de anticorpos e de células do sistema imunitário, que vão ter efeito na destruição das células tumorais (Jaiyesimi *et al.* 1995).

O tamoxifeno é exposto a um extenso metabolismo hepático através de hidroxilações e conjugações. O fármaco é metabolizado a N-dimetiltamoxifeno e a 4-hidroxitamoxifeno por ação dos enzimas CYP2D6 e CYP3A4/5 (**Figura I.2**), respetivamente, originando, posteriormente, o endoxifeno pela ação dos mesmos enzimas (Bourassa *et al.* 2011).

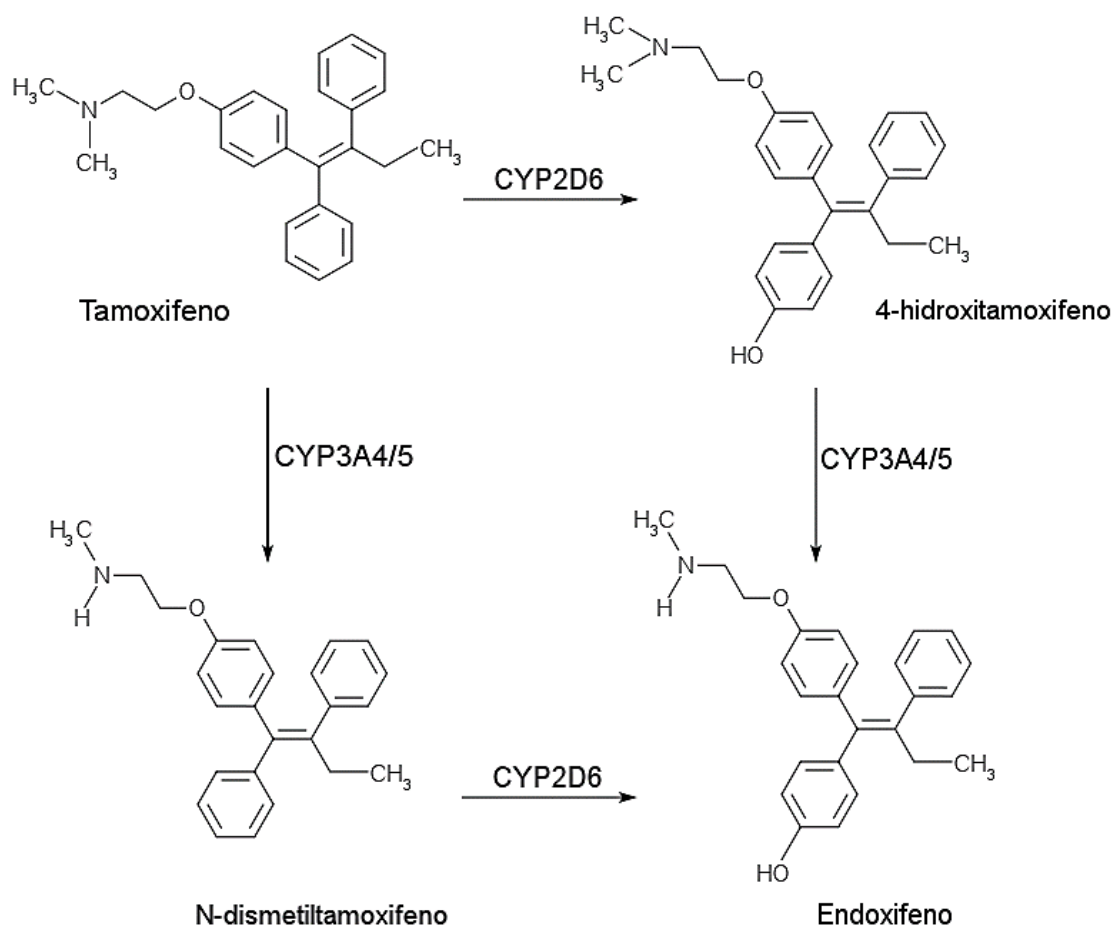


Figura I.2 – Representação esquemática das estruturas químicas resultantes da metabolização do tamoxifeno pelos enzimas CYP3A4/5 e CYP2D6. Adaptado de Antunes *et al.* 2013.

O metabolito principal é o N-dimetiltamoxifeno, sendo a sua concentração no plasma igual ou superior à do tamoxifeno e a sua afinidade de ligação comparável à do tamoxifeno. Outro metabolito, o 4-hidroxitamoxifeno, está presente em menor quantidade no plasma, no entanto, a sua afinidade de ligação ao ER é 25 a 50 vezes superior à afinidade do tamoxifeno, sugerindo que este metabolito é o que mais contribui para o efeito antiestrogénico do tamoxifeno (Jaiyesimi *et al.* 1995). Alguns compostos naturais como os flavonoides podem ter a capacidade de influenciar a atividade de enzimas do metabolismo do tamoxifeno, alterando a farmacocinética do fármaco e dos seus metabolitos (C. Li *et al.* 2011).

A eficácia terapêutica do tamoxifeno é determinada pela distribuição do fármaco entre os tecidos e pela sua disponibilidade e a dos seus metabolitos nos tecidos alvo. No soro, mais de 98 % do tamoxifeno encontra-se ligado à albumina, a proteína mais abundante no plasma humano, responsável pelo transporte de muitos compostos endógenos, inclusive fármacos, com a capacidade de alterar as suas propriedades farmacocinéticas (Bourassa *et al.* 2011).

I.1.2. Cisplatina

A cisplatina, *cis*-diaminodicloroplatina (II), é um fármaco usado no tratamento de vários tipos de cancro, incluindo cancro dos ossos, dos músculos e dos vasos sanguíneos. O fármaco é composto por um ião platina, duplamente carregado, com quatro ligandos (**Figura I.3**), dois ligandos amina, que formam uma interação forte com o ião platina, e dois ligandos de cloro, que funcionam como grupos

abandonantes, permitindo ao íon de platina formar ligações com as bases de DNA (Dasari and Bernard Tchounwou 2014).

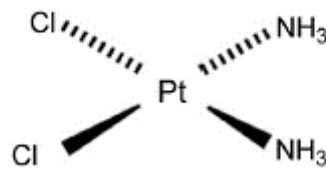


Figura I.3 – Estrutura química da cisplatina.

A cisplatina é transportada para o interior das células através de vários transportadores membranares, tornando-se imediatamente ativa. No citoplasma, os átomos de cloro são substituídos por moléculas de água, formando um forte eletrófilo que consegue reagir com qualquer nucleófilo, incluindo os grupos sulfidrilo das proteínas e os átomos doadores de azoto dos ácidos nucleicos. A ligação da cisplatina ao DNA provoca danos na sua estrutura, levando à inibição da síntese do DNA e do ciclo celular, bem como a indução da morte celular por apoptose. Para além disso, a cisplatina tem a capacidade de induzir o *stress* oxidativo através da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e da peroxidação lipídica, com a ativação das vias intrínseca e extrínseca da apoptose (Dasari and Bernard Tchounwou 2014).

I.2. Produtos naturais

I.2.1. Flavonoides

Os flavonoides são compostos polifenólicos produzidos pelas plantas como metabolitos secundários, importantes no crescimento, desenvolvimento e defesa das plantas. Estes compostos existem em elevadas quantidades em frutos, legumes, sementes, nozes, chás e ervas medicinais tradicionais (Di Carlo *et al.* 1999). De acordo com a sua estrutura química, os flavonoides podem ser classificados como: flavonas, flavanonas, flavanonois, flavonois, flavanois, isoflavonas, antocianidinas e chalconas (Jiang and Hu 2012).

Os flavonoides são conhecidos pelo seu largo espectro de atividades biológicas, incluindo antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticancerígena (Narayana *et al.* 2001). Estes compostos demonstraram ter atividade citotóxica em diferentes linhas celulares tumorais, com pouco ou nenhum efeito nas células normais, aumentando o interesse no desenvolvimento de compostos quimioterápicos derivados de flavonoides para o tratamento do cancro (Galati and O'Brien 2004). Vários estudos indicam que os flavonoides podem exercer a sua ação anticancerígena afetando os mecanismos-chave envolvidos na carcinogénese, incluindo a inibição da atividade metabólica e da proliferação e angiogénese, modulação da resistência a fármacos e indução da apoptose (Daníhelová *et al.* 2013). Considera-se que muitos dos efeitos terapêuticos dos flavonoides resultam do seu forte potencial antioxidante, especialmente, na neutralização de radicais livres. Devido à sua estrutura química, os flavonoides podem exercer tanto função antioxidante como pró-oxidante, através da produção de ROS com a indução de *stress* oxidativo (Habtemariam *et al.*, 2009). As células tumorais exibem um nível de *stress* oxidativo mais elevado quando comparado com as células normais, pelo que são mais vulneráveis à ação de alguns flavonoides que estimulam o aumento das ROS (Yuan *et al.*, 2012).

Na natureza, os flavonoides aparecem maioritariamente na forma glicosilada e menos frequentemente na forma de aglicona. A maioria dos flavonoides glicosilados sofrem primeiro uma reação de hidrólise a aglicona pelos microrganismos que residem no intestino, ou pelos enzimas da superfície, antes de serem absorvidos. Após a entrada para os enterócitos, os flavonoides sofrem uma extensa metabolização

pelos enzimas do intestino. Os flavonoides que passam pelo epitélio intestinal intactos, sofrem o metabolismo catalisado pelos enzimas do fígado (J. Chen 2002). Deste modo, os flavonoides, para além de partilharem as mesmas vias metabólicas dos fármacos, demonstraram ter a capacidade de regular a atividade de alguns dos enzimas envolvidos no metabolismo dos xenobióticos, bem como dos transportadores ativos de efluxo nas células epiteliais, que determinam a biodisponibilidade não só de flavonoides, mas também de fármacos (Gonzales *et al.* 2015). Pacientes expostos por tempos prolongados a alimentos que contenham quantidades significativas de flavonoides podem sofrer alterações no seu estado fisiológico, incluindo a expressão de enzimas do metabolismo de fármacos ou transportadores. Como consequência, a cinética dos fármacos pode sofrer alterações. Deste modo, as interações dos flavonoides com os enzimas ou transportadores de efluxo são fatores críticos que têm de ser considerados quando os flavonoides são coadministrados com os fármacos (Jiang and Hu 2012). Para além disso, muitos estudos indicam que os flavonoides têm a capacidade de se ligar facilmente à membrana das células, induzindo alterações nas atividades metabólicas celulares (Chan *et al.*, 2000), incluindo a inibição de enzimas envolvidos na transdução dos sinais, interação com os sítios de ligação dos ligandos aos recetores e modificações na expressão de determinados genes (Benavente-Garcia *et al.*, 2008).

A quercetina (**Figura I.4 A**) é o flavonoide mais abundante da dieta, glicosilado ou em aglicona, encontrado em muitos frutos e legumes, como maçãs, cítricos e cebolas (Sak 2014). A quercetina demonstrou bloquear o crescimento celular em diferentes fases do ciclo celular e também exercer um efeito pró-apoptótico direto em várias linhas celulares tumorais (Danihelová *et al.* 2013). Para além disso, dentro da classe dos flavonoides, a quercetina é considerada um forte antioxidante com capacidade de neutralizar radicais livres (Sak 2014).

A forma glicosilada da quercetina, a rutina (**Figura I.4 B**), é um flavonoide encontrado abundantemente em sementes de trigo, maçãs e frutos cítricos (You *et al.* 2010). A rutina tem propriedades antioxidantes significativas na neutralização de ROS e também na complexação de metais de transição (Afanas'ev *et al.* 1989). Para além disso, este flavonoide demonstrou ter várias atividades farmacológicas como antialérgica, antibacteriana, anti-inflamatória e antitumoral, sendo a última caracterizada pela capacidade que a rutina apresenta na inibição da proliferação celular e na remoção das ROS, que podem causar danos no DNA e levar a mutações (Sharma *et al.* 2013).

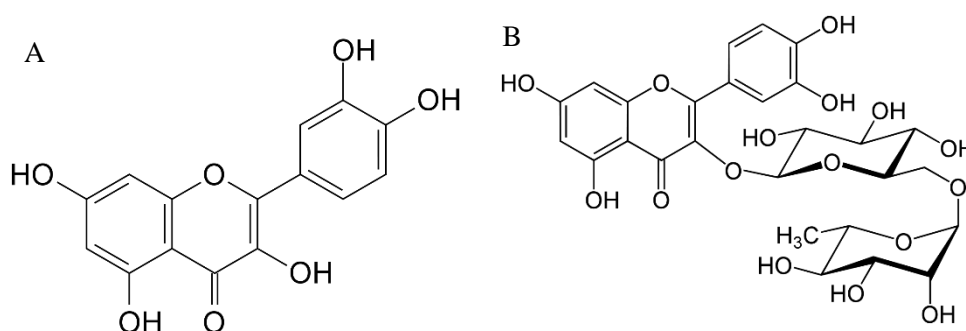


Figura I.4 – Estruturas químicas da quercetina (A) e da rutina (B).

I.2.1. *Spirulina platensis*

Spirulina platensis (*S. platensis*) é uma cianobactéria de elevado conteúdo nutricional, disponível comercialmente como suplemento alimentar. As cianobactérias são bactérias unicelulares com crescimento na forma de filamentos (**Figura I.5**), conhecidas pelo seu elevado conteúdo em carotenoides, clorofila, ficocianinas, aminoácidos, minerais e outros compostos bioativos, sendo a percentagem destes compostos dependente da região onde as bactérias se desenvolvem (Gad *et al.* 2011).



Figura I.5 – *Spirulina platensis*. Adaptado de <http://algae-lab.com/product/Spirulina-platensis-live-algae-ml-5-liters-culture-starter/>

Demonstrou-se que várias substâncias bioativas derivadas de *S. platensis* têm a capacidade de inibir o crescimento tumoral em várias linhas celulares (Ravi *et al.* 2015; Yufeng Liu *et al.* 2000; Pardhasaradhi *et al.* 2003).

A C-ficocianina (**Figura I.6**) é uma das principais ficobiliproteínas em *S. platensis*, constituindo 20 % da massa seca. As ficobiliproteínas são os pigmentos fotossintéticos mais importantes nas cianobactérias e algas vermelhas. O uso mais comum deste pigmento é como corante na indústria alimentar e cosmética. Para além disso, este pigmento tem demonstrado algumas propriedades antioxidantes (Cuellar-Bermudez *et al.* 2015), antitumorais e de estimulação do sistema imunitário (Flores Hernandez *et al.* 2017). O mecanismo associado ao efeito antitumoral pode envolver a sua interferência na síntese do DNA nas células tumorais ou indução da apoptose através da produção de ROS (Pardhasaradhi *et al.* 2003).

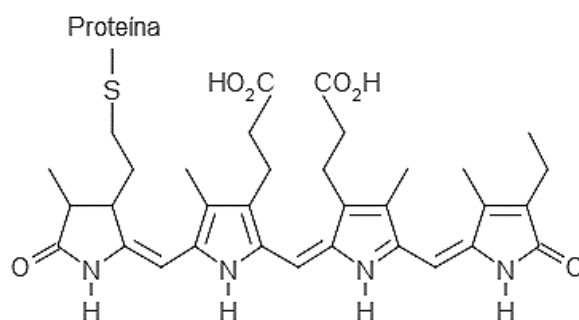


Figura I.6 – Estrutura química da C-ficocianina.

II. Materiais e métodos

II.1. Reagentes

Tamoxifeno, cisplatina, albumina de soro bovino (BSA), fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (NADPH), rutina, quercetina, dimetilsulfóxido (DMSO), pepsina e pancreatina adquiridos na Sigma; metanol, acetonitrilo, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), acetona, etanol 96 % adquiridos na VWR; ácido orto-fosfórico, hidrogenofosfato de sódio adquiridos na Panreac; dihidrogenofosfato de sódio monohidratado, 2-mercaptoetanol, hidrogenofosfato de potássio, dihidrogenofosfato de potássio e cloreto de sódio adquiridos na Merck; cloreto de magnésio adquirido na Riedel-deHaën; reagente de Bradford ('Coomassie brilliant blue' BG-250) adquirido na Bio-Rad Laboratories; meio RPMI1640, L-glutamina, soro bovino fetal (FBS), tripsina 10x, estreptomicina e penicilina adquiridos na Lonza; *S. platensis* em pó adquirido na Celeiro.

II.2. Linhas celulares

Nos estudos foram usadas as seguintes linhas celulares: MCF-7 (ATCC #HTB-22) (células epiteliais do adenocarcinoma da glândula mamária), HeLa (ATCC #CCL-2) (células epiteliais do adenocarcinoma do colo de útero), HepG2 (ATCC #HB-8065) (células epiteliais do carcinoma hepatocelular) e Caco-2 (ATCC #HTB-37) (células epiteliais do adenocarcinoma colo-retal).

II.3. Cultura de células

As linhas celulares foram cultivadas em 7 mL de meio RPMI1640, suplementado com L-glutamina, soro bovino fetal (FBS) 10 % e antibióticos 1 %: estreptomicina e penicilina, e deixadas incubar a 37 °C com CO₂ a 5 %. As células foram retiradas em sob confluência com tripsinização de 48-72 horas.

II.4. Preparação de produtos da digestão de *S. platensis*

Adicionou-se 10 mL de suco gástrico e 10 mL de água a 5 g de *S. platensis* em pó e deixou-se a incubar durante 2 horas a 37 °C. De seguida, foi adicionado à mistura reacional 20 mL de suco pancreático e deixado incubar durante 2 horas nas mesmas condições. Procedeu-se a uma diálise usando uma membrana de porosidade 14 kDa em 200 mL de água. Após 2 horas o dialisado foi recolhido, substituindo-se a água, e recolhido novamente ao fim de 18 horas. As frações foram congeladas e liofilizadas sendo posteriormente usadas nos ensaios. O processo de digestão foi realizado usando dois controlos, um deles com a *S. platensis* não digerida, sem adição de sucos, perfazendo os volumes com água, e outro sem a adição de *S. platensis*, contendo apenas os sucos gástrico e pancreático.

II.4.1. Quantificação da C-ficocianina

A quantificação do composto bioativo mais abundante na *S. platensis* foi efetuado pelo método descrito por Bennett and Bogorad (1973). Foram preparadas 3 amostras: *S. platensis* não digerida (SW), sucos gástrico e pancreático, *S. platensis* digerida (SW digerida), dissolvendo 5 mg de cada amostra em água para uma concentração final de 1 mg/mL. De seguida, leu-se a absorvência de cada uma das amostras num espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A), registando-se os valores aos 280, 620 e 652 nm, usando como referência uma solução contendo apenas água.

II.5. Efeito dos produtos naturais na citotoxicidade de fármacos

O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando o método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que se baseia no facto de as células metabolicamente ativas conseguirem reduzir o MTT pelo enzima mitocondrial succinato desidrogenase, originando a formação de cristais de formazano insolúveis (Mosmann 1983), que são solubilizados seguidamente em dimetilsulfóxido (DMSO), permitindo medir a atividade metabólica das células.

Para este ensaio foram semeadas 6000 células/poço em 100 µL de meio numa placa de 96 poços, incubando as células a 37 °C com CO₂ a 5 %. Após 48 horas, adicionou-se 100 µL da solução do composto em estudo em cada poço e incubou-se durante 72 horas. Após incubação, 5 mg de MTT foi dissolvido em 10 mL de meio e aplicados 100 µL em cada poço, onde previamente foi retirado todo o meio existente, e deixados incubar durante 2 horas para as células HeLa e 3 horas para as MCF-7. De seguida, adicionou-se em cada poço 200 µL de DMSO e o conteúdo de cada foi ressuscitado para dissolver todos os cristais formados, efetuando-se de seguida a leitura a 595 nm num espectrofotómetro (Tecan A-5082 equipado com o software RdrOle4), usando como referência o comprimento de onda de absorção das próprias células (630 nm). De seguida, foi calculada a percentagem de viabilidade das células, usando a seguinte equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (A_t \times 100) \div M_c$$

Equação II.1 – Equação do cálculo da viabilidade celular, em que A_t é a absorvência da amostra testada e M_c é a média das absorvências do controlo.

Os compostos testados foram o tamoxifeno (5 - 50 µM), a cisplatina (0.5 - 5 µM para HeLa e 1 - 9 µM para MCF-7), a rutina e a quercetina (20 - 100 µM) e os produtos resultantes da digestão da *S. platensis* (0.1 - 1.0 mg/mL), usando como controlo células incubadas apenas em meio. Para o estudo de interação dos fármacos com os produtos naturais foram usadas as mesmas concentrações de tamoxifeno e cisplatina e uma concentração constante de produtos naturais, correspondente a ~80 % de viabilidade obtida nos ensaios de citotoxicidade efetuados em separado. Para além disso, testou-se a citotoxicidade de tamoxifeno na presença de albumina de soro bovino (BSA) numa concentração semelhante à da albumina no plasma humano, 40 mg/mL (R. E. Wang, *et al.* 2012). Cada concentração de composto foi testada usando 16 replicados.

O tamoxifeno foi dissolvido em DMSO e, posteriormente, em meio de cultura com uma concentração final de DMSO igual a 0,5 %. Para os estudos da interação do tamoxifeno com os flavonoides a solução destes foi preparada da forma descrita para o tamoxifeno. Na interação do tamoxifeno com os produtos da digestão de *S. platensis*, a solução destes continha 0,25 % de DMSO. A cisplatina foi dissolvida em água e, posteriormente, em meio de cultura, pelo que, nos estudos da interação da cisplatina com os produtos naturais, estes foram preparados de forma igual à cisplatina (DMSO 0 %).

II.5.1. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através da análise de variância (ANOVA). O valor de p-value menor que 0,05 foi considerado indicar a significância.

II.6. Quantificação e metabolização do tamoxifeno

II.6.1. Quantificação do tamoxifeno

II.6.1.1. Condições do HPLC

A análise dos compostos por HPLC-DAD («Diode array detector») foi efetuada num sistema de cromatografia líquida Finnigan™ Surveyor® Plus Thermo Scientific equipado com uma coluna LiChroCART®250-4 LiChrospher® 100 RP-8 (5µm) (Merck) e com o software Xcalibur™ (ThermoScientific). A composição das soluções foi analisada injetando 25 µL e usando um gradiente (Figura II.1) com uma composição inicial e final de 80:20 v/v tampão de fosfatos 20 mM (pH 3,0): acetonitrilo, e com um fluxo de 1,0 mL/min. O método de gradiente desenvolvido consiste na variação da composição do solvente ao longo de tempo: 0 min – 80 % de Tampão de fosfatos 20 mM e 20 % ACN; 12 min – 20 % Tampão Fosfatos 20 mM e 80 % ACN; 18 min – 50 % Tampão Fosfatos 20 mM e 50 % ACN; 20 min – 80 % de Tampão de fosfatos 20 mM e 20 % ACN.

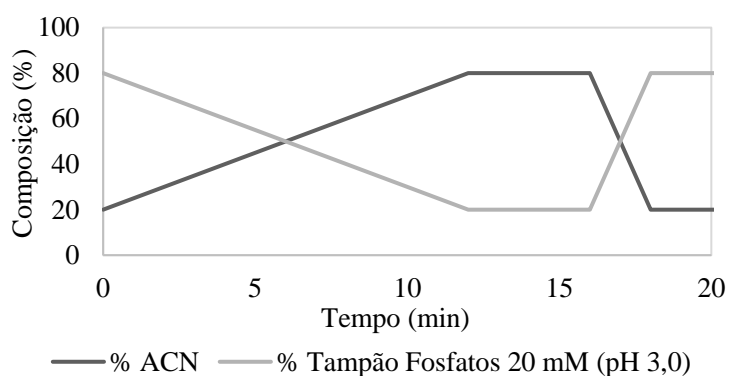


Figura II. 1 – Método de gradiente usado na análise por HPLC-DAD das soluções contendo tamoxifeno e seus metabolitos.

II.6.1.2. Análise do tamoxifeno por HPLC

Efetuiu-se uma análise por HPLC-DAD da composição das soluções padrão contendo tamoxifeno a 100, 200, 400, 600 e 1000 nM dissolvidos em metanol.

II.6.1.3. Condições da espectroscopia de FTIR

Os espectros de infravermelho foram obtidos através de um espectrómetro de FTIR (Nicolet 6700 FT-IR da Thermo Electron Corporation), equipado com detetor de sulfato de triglicina deuterada (DTGS TEC) e com o software OMNIC™. Os espectros de absorvência foram recolhidos num intervalo de 4000-900 cm⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹ e com o número de scans igual a 128. As amostras foram analisadas aplicando as soluções sobre janelas de CaF₂.

II.6.1.4. Quantificação do tamoxifeno por espectroscopia de FTIR

Foram analisadas soluções padrão de tamoxifeno na concentração de 40, 60, 80, 100, 150, 200 e 300 µM dissolvidos em etanol, num volume final de 50 µL. Na quantificação de tamoxifeno em meio de cultura, o tamoxifeno 0,5 µM dissolvido em 40 mL de meio de cultura foi liofilizado, ressuspendido em 100 µL de 2-propanol e analisado por espectroscopia de FTIR, usando como controlo o meio de cultura sem tamoxifeno. Na análise do efeito da BSA sobre o fármaco, o tamoxifeno 5 µM dissolvido em

20 mL de solução aquosa de BSA 4 mg/mL foi liofilizado, ressuspendido em 100 µL de 2-propanol e analisado por espectroscopia de FTIR, usando como controlo tamoxifeno dissolvido em água.

II.6.2. Metabolização do tamoxifeno in vitro pelos citocromos P450 extraídos de fígado

Cortou-se em pequenos pedaços 20 g de fígado de porco e triturou-se o tecido num homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, em 100 mL de tampão de fosfatos 100 mM (pH 7,4), contendo 2-mercaptoetanol 10 mM. O 2-mercaptoetanol é um agente redutor e inibidor de proteases. O homogenato foi centrifugado a $12000 \times g$ durante 20 minutos numa centrífuga (VWR Galaxy 7D). O sobrenadante obtido foi recolhido e congelado, sendo posteriormente liofilizado num liofilizador (Heto Power Dry LL3000) acoplado a uma bomba (Edwards Model RV3). O liofilizado manteve-se no congelador.

II.6.2.1. Quantificação da proteína total

A quantificação da proteína total foi efetuada pelo método de Bradford. Este método envolve numa primeira etapa, traçar uma curva de calibração para soluções de diferentes concentrações de BSA. Foram preparadas seis soluções de BSA de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL a partir de 10 mg/mL e introduziu-se 200 µL de reagente de Bradford num volume total de 1 mL. Recorrendo-se ao espectrofotómetro de UV-Vis (Jasco V-560) leu-se a absorvência aos 595 nm. A solução de 10 mg/mL de liofilizado da fração microsomal foi diluído 10x, sendo, posteriormente, retirado 10 µL aos quais foi adicionado 200 µL de reagente de Bradford e 790 µL de água destilada, sendo, de seguida, efetuada a leitura no espectrofotómetro.

II.6.2.2. Detecção de metabolitos do tamoxifeno por HPLC-DAD

Para os ensaios de metabolização do tamoxifeno *in vitro* pelos citocromos P450 contidos na fração microsomal extraída do fígado, prepararam-se tubos de eppendorf de 2 mL, nos quais foram introduzidos os compostos descritos na **Tabela II.1**, exceto NADPH.

Tabela II. 1 – Metabolização de tamoxifeno pelos citocromos P450 extraídos do fígado.

	CFE+Tam (µL)	CFE+H₂O (µL)	Tam+H₂O (µL)
CFE 50 mg/mL	500	500	-
Metanol 10 %	-	18,6	-
Tamoxifeno 250 µM	18,6	-	18,6
Tampão Fosfatos 0,1 M (pH 7,4) + MgCl₂	333,1	333,1	333,1
NADPH 1,0 mM	148,3	148,3	148,3

“CFE” – *Cell Free Extract* (liofilizado da fração microsomal)

O início da reação ocorre após a introdução do NADPH, sendo, de seguida, os tubos eppendorf colocados imediatamente no banho de água (Lauda E100) a 37 °C. O ensaio foi realizado em duplicado, sendo o ensaio 1 correspondente a 0 horas, em que a paragem da reação ocorreu imediatamente após a adição do NADPH sem incubação, e o ensaio 2 corresponde à adição de NADPH com incubação, seguida pela paragem de reação após 1 hora e 30 minutos. A paragem da reação efetuou-se adicionando metanol 1:1. De seguida, os tubos eppendorf foram centrifugados a $5000 \times g$ durante 5 minutos e o sobrenadante obtido analisado por HPLC-DAD.

Para os ensaios da extração da fração microsomal, o tampão de fosfatos 100 mM (pH 7,4) contém 2-mercaptoetanol 10 mM. Para os ensaios de metabolização do tamoxifeno pelos citocromos P450 extraídos do fígado o tampão contém MgCl₂ 5,0 mM.

II.6.3. Metabolização do tamoxifeno in vitro pelas HepG2 e Caco-2

As células HepG2 e Caco-2 foram semeadas (60000 células/mL) em placas de Petri de 20 mm de diâmetro, com 2 mL de meio RPMI1640 e deixadas incubar na estufa até atingir 90 % de confluência. De seguida, o meio foi retirado aplicando tamoxifeno 1 µM na placa de células, deixando incubar durante 72 horas, a 37 °C numa atmosfera com 5 % de CO₂. Como controlo foi aplicado apenas meio numa das placas com células e numa placa vazia foi adicionado apenas tamoxifeno dissolvido em meio de cultura. Passado 72 horas, o meio de cada placa foi retirado para os respetivos tubos eppendorf com adição de metanol 1:1, sendo, de seguida, centrifugados a 5000 × g durante 5 minutos, obtendo-se as amostras correspondentes à fração do meio e analisadas, de seguida, por HPLC-DAD. Ao conteúdo restante das placas de Petri foi adicionado 1 mL de água efetuando uma lavagem das células para remover completamente o meio. Posteriormente, foram introduzidas nas placas 1 mL de metanol 70 %, seguido de ultrassons, (Sonorex Bandelin TK 52H) durante 5 minutos. As células foram ressuspendidas e centrifugadas a 5000 × g, durante 5 minutos. O sobrenadante constitui a amostra de células analisada, de seguida, por HPLC-DAD.

II.7. Efeito dos produtos naturais na ação de fármacos

II.7.1. Estudos de proliferação

A proliferação celular foi determinada usando o ensaio colorimétrico referido por Mosmann 1983. As células HeLa e MCF-7 foram semeadas (6000 células por poço) em microplacas de 96 poços em simultâneo com os compostos cujo efeito se quer testar (num volume final de 100 µL por poço) e incubadas a 37 °C com CO₂ a 5 %, durante 72 horas. Após o tratamento, o meio foi retirado e adicionou-se 100 µL de MTT (5 g dissolvidos em 10 mL de meio) em cada poço, seguindo-se incubação a 37 °C, durante 2 horas para as HeLa e 3 horas para as MCF-7. Os cristais de formazano formados foram dissolvidos em 200 µL de DMSO. A absorvência foi medida no espectrofotómetro (Tecan A-5082 equipado com o software RdrOle4), realizando leituras a 595 nm e usando como referência 630 nm. A percentagem de viabilidade das células foi calculada a partir da expressão descrita em **Equação II.1**. Cada concentração de composto testada foi efetuada usando 16 replicados.

As concentrações dos compostos testados em separado foram iguais aos estudos de citotoxicidade. No estudo de interação dos fármacos com os produtos naturais foram testadas as mesmas concentrações dos fármacos na presença de uma concentração constante de produtos naturais, correspondentes a ~ 80 % viabilidade celular, dos ensaios efetuados em separado.

II.7.2. Estudo das alterações estruturais por espectroscopia de FTIR

Células HeLa e MCF-7 foram semeadas (60000 células/mL) em placas de 12 poços, contendo as janelas de CaF₂, e deixadas incubar durante 24 horas. De seguida, as células foram tratadas com os compostos cujo efeito se quer testar e deixadas novamente a incubar durante 24 horas. Após incubação o volume dos poços foi retirado efetuando a lavagem das janelas e subsequentemente liofilizadas, sendo de seguida analisadas no espectrómetro de FTIR. Os espectros obtidos foram normalizados para a banda de amida II aos ~1545cm⁻¹. Os compostos testados foram o tamoxifeno (concentração igual a IC₅₀ de

tamoxifeno), a cisplatina (concentração igual a IC_{50} de cisplatina), os produtos naturais (concentração usada nos estudos de interação com os fármacos) e a combinação dos fármacos com os produtos naturais (concentração de fármacos igual ao IC_{50} dos estudos de interação e a concentração de produtos naturais também igual aos estudos de interação). A solução *stock* de tamoxifeno foi dissolvida em DMSO e, posteriormente, em meio de cultura com concentração final de DMSO igual a 0,5 %. Para os estudos da interação do tamoxifeno com os flavonoides, estes foram igualmente dissolvidos em DMSO com uma concentração final de 0,5 %. A solução *stock* de cisplatina foi dissolvida em água e, posteriormente, em meio de cultura, sendo as soluções de produtos naturais preparadas de forma igual a cisplatina, com concentração final de DMSO igual a 0 %. Para os estudos de interação com tamoxifeno, os produtos de *S. platensis* contêm 0,25 % de DMSO. Deste modo, os resultados foram divididos em 3 partes, de acordo com as concentrações finais de DMSO.

III. Resultados e discussão

Neste estudo pretende-se analisar o efeito de três produtos naturais sobre a ação dos fármacos quimioterápicos: o tamoxifeno e a cisplatina. Os fármacos, a quercetina e a rutina estão disponíveis comercialmente como compostos isolados, no entanto, a *S. platensis* é ingerida completa pelo que se pretende estudar a fração solúvel que estará disponível após a digestão gastrointestinal.

III.1. Obtenção e quantificação da C-ficocianina presente na *S. platensis*

A *S. platensis* foi digerida com enzimas presentes no trato gastrointestinal e sujeitas a diálise (poros de 14 kDa) para se obter os péptidos que estarão disponíveis ao ingerir este suplemento alimentar. Da digestão obteve-se 621,0 mg de digerido por grama de *S. platensis*. Sem a digestão, a diálise da *S. platensis* permitiu obter apenas 265,3 mg de material por grama de alga. A diálise dos sucos digestivos sem *S. platensis* originou uma quantidade muito baixa de material, correspondendo a 69,2 mg de dialisado por grama de suco. Isto indica que para a amostra digerida se obteve uma maior quantidade de péptidos que foram libertados durante a hidrólise por enzimas do trato gastrointestinal.

O composto bioativo mais abundante na *S. platensis* é a C-ficocianina e na sua quantificação foi usada a fórmula deduzida por Bennett and Bogorad (1973) descrita na **Equação III.1**.

$$\text{Ficocianina (mg/mL)} = \frac{(A_{620} - 0,474 (A_{652}))}{5,34}$$

Equação III.1 – Equação do cálculo da quantidade de C-ficocianina.

Para avaliarmos o grau de pureza da C-ficocianina foi usada a expressão descrita na **Equação III.2** (Bennett and Bogorad 1973).

$$\text{Pureza da ficocianina} = A_{620} / A_{280}$$

Equação III.2 – Equação do cálculo da pureza da C-ficocianina.

Os resultados de absorvência obtidos para as duas amostras controlo e também para a amostra digerida foram subtraídos aos valores de absorvência da amostra que serve de referência e que contém apenas água. Os resultados obtidos constam na **Tabela III.1**.

Tabela III. 1 – Quantificação da C-ficocianina na *S. platensis*.

Amostra	Ficocianina (mg/mL)	Pureza da ficocianina	Avaliação da pureza
Sucos	0,000394	0,00696	Grau alimentar
SW	0,001064	0,00524	Grau alimentar
SW digerida	0,005173	0,02434	Grau alimentar

Sucos (controlo): sucos gástrico e pancreático; SW (controlo): *S. platensis* não digerida

SW digerida: *S. platensis* digerida

Pureza (adaptado de Walter *et al.* 2011): grau alimentar (0,7 >); grau reativo (3,9 =); grau analítico (4,0 <).

Tendo em conta que as absorvências aos comprimentos de onda acima referidas não se devem apenas à ficocianina, foi necessário subtrair os controlos à amostra de SW digerida. Assim, uma amostra de 1 mg/mL de *S. platensis* digerida contém aproximadamente 0,00371 mg/mL de C-ficocianina, sendo esta concentração 5 vezes superior relativamente à *S. platensis* não digerida, bem como 5 vezes mais

pura, sugerindo que esta ficobiliproteína é libertada durante a digestão gastrointestinal. O grau de pureza da ficocianina na amostra de SW digerida é classificado como grau alimentar, que corresponde à concentração de ficocianina adequada ao consumo humano.

Os produtos resultantes da digestão de *S. platensis* foram usados nos estudos de interação com os fármacos.

III.2. Efeito dos produtos naturais na citotoxicidade dos fármacos

A análise do efeito dos produtos naturais na ação dos fármacos foi efetuada recorrendo a estudos de citotoxicidade, nas células HeLa e MCF-7. A citotoxicidade do tamoxifeno e da cisplatina na presença dos produtos naturais foi testada através dos ensaios de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), sendo este o método mais comum na deteção da viabilidade celular após a exposição a compostos tóxicos.

Os produtos naturais selecionados foram a quercetina, a rutina e os péptidos resultantes da digestão de *S. platensis*. Para além disso, foi testada a citotoxicidade do tamoxifeno na presença da proteína mais abundante no plasma humano, a albumina. Dado que a albumina de soro humano apresenta semelhanças na estrutura e função relativamente à albumina de soro bovino (BSA) (Roy, 2016), a citotoxicidade do tamoxifeno foi testada na presença da BSA. O efeito citotóxico dos compostos nas células HeLa e MCF-7 foi expresso como valores de IC_{50} , isto é, a concentração necessária para inibir 50 % da viabilidade celular.

No cálculo da viabilidade celular, o controlo das células incubadas com os compostos sozinhos continha apenas células em meio e a respetiva concentração de DMSO para eliminar o efeito deste solvente. Na análise da interação dos produtos naturais com os fármacos, foi usado como controlo células incubadas com os produtos naturais e com a respetiva concentração de DMSO, para eliminar o efeito na toxicidade celular induzido pelos compostos e solvente.

III.2.1. HeLa

Nas células HeLa, o efeito citotóxico de ambos os fármacos quimioterápicos foi dependente da sua concentração. Os valores de IC_{50} obtidos encontram-se na **Tabela III.2**.

No caso do tamoxifeno (**Figura III.1**) observa-se uma diminuição da viabilidade celular na presença de concentrações crescentes deste fármaco, sendo o seu valor de IC_{50} igual a $24,39 \pm 0,32 \mu\text{M}$. Na presença da quercetina observa-se uma diminuição significativa da viabilidade celular, com diminuição do valor de IC_{50} do tamoxifeno. Na presença da rutina, o IC_{50} do tamoxifeno aumenta, significando uma maior viabilidade celular quando comparado com tamoxifeno sozinho. Na presença dos produtos resultantes da digestão de *S. platensis*, o valor de IC_{50} do tamoxifeno é estatisticamente semelhante ao valor de IC_{50} do tamoxifeno sozinho.

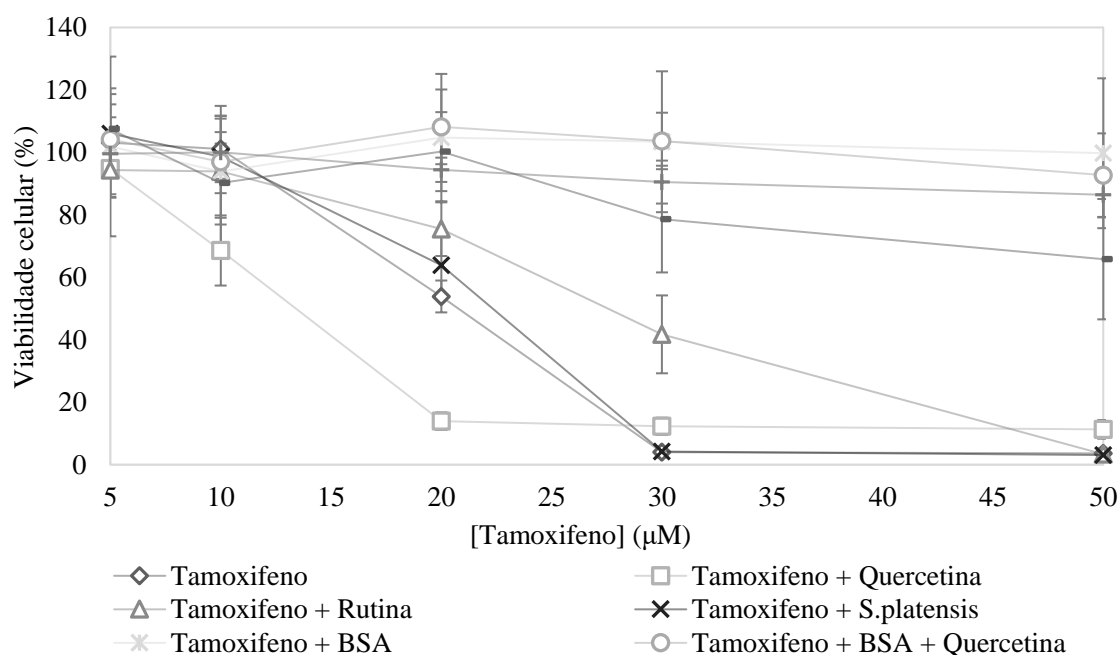


Figura III. 1 – Curva de viabilidade (%) das células HeLa após o tratamento com tamoxifeno e da combinação deste fármaco com os produtos naturais e BSA, durante 72 horas. *S. platensis* – produtos da digestão de *S. platensis*.

Tabela III. 2 – O efeito citotóxico da interação do tamoxifeno e da cisplatina com os produtos naturais, nas células HeLa.

	IC50 (µM)	Citotoxicidade
Tamoxifeno	24,39 ± 0,32 (32)	-
Quercetina	76,79 ± 3,36 (16)	-
Rutina	> 100 (16)	-
<i>S. platensis</i>	> 1,0 mg/mL (16)	-
Tamoxifeno + BSA	> 50 (16)	-
Tamoxifeno + Quercetina (40 µM)	15,5 ± 0,43 (15) *	↑
Tamoxifeno + BSA + Quercetina (40 µM)	> 50 (16)	-
Tamoxifeno + Rutina (100 µM)	28,45 ± 0,11 (15) *	↓
Tamoxifeno + BSA + Rutina (100 µM)	> 50 (16)	-
Tamoxifeno + <i>S. platensis</i> (1,0 mg/mL)	25,18 ± 0,72 (16)	-
Tamoxifeno + BSA + <i>S. platensis</i> (1,0 mg/mL)	> 50 (16)	-
Cisplatina	3,4 ± 0,25 (16)	-
Cisplatina + Quercetina (40 µM)	5,21 ± 0,33 (16) **	↓
Cisplatina + Rutina (100 µM)	3,37 ± 0,43 (16)	-
Cisplatina + <i>S. platensis</i> (1,0 mg/mL)	4,38 ± 0,46 (16) **	↓

Os resultados encontram-se expressos como valores de IC₅₀ ± SD (n = n° replicados)

S. platensis significa produtos da digestão de *S. platensis*

p-value < 0,05: significativamente diferente comparando com o IC₅₀ de tamoxifeno (*) e da cisplatina (**)

As setas indicam o aumento (↑) ou diminuição (↓) significativa da citotoxicidade e (-) indica a ausência de alterações significativas.

O estudo efetuado por Obrero *et al.* (2002) refere que nas células HeLa o tamoxifeno e os seus metabolitos conseguem induzir uma disfunção mitocondrial, possivelmente como consequência do stress oxidativo, que resulta na ativação de caspases e na indução da morte celular por apoptose. Dado que as células HeLa se encontram desprovidas de recetores de estrogénio (ER) (Kumar *et al.* 1987), o resultado obtido apoia a existência de outros mecanismos, não mediados por ER, na citotoxicidade induzida pelo tamoxifeno (V. C. Jordan 1993).

A quercetina demonstrou ter um efeito citotóxico nas células HeLa, com valor de IC₅₀ igual a $76,8 \pm 3,36 \mu\text{M}$. De acordo com Vidya Priyadarsini *et al.* (2010), este flavonoide tem a capacidade de inibir a proliferação celular através da interrupção do ciclo celular, da disrupção do potencial da membrana mitocondrial e da ativação da via intrínseca da apoptose. No estudo da interação com os fármacos, a concentração de quercetina usada foi de $40 \mu\text{M}$, correspondendo a 87 % de viabilidade celular. Na presença de quercetina, a citotoxicidade do tamoxifeno nas células HeLa aumenta, sugerindo que o flavonoide e o fármaco podem atuar de um modo sinérgico na ativação da via intrínseca da apoptose, resultando no aumento da citotoxicidade induzida pelo fármaco.

Na incubação das células com a rutina, o seu valor de IC₅₀ encontra-se acima da concentração máxima testada, indicando que este flavonoide não tem efeito tóxico nas células HeLa. De acordo com Šavikin *et al.* (2009), a rutina nas células HeLa é um agente anticancerígeno muito fraco. Considerando que a rutina é a forma glicosilada da quercetina, sugere-se que o grupo glicosídico interfere com a sua ação citotóxica nas células HeLa, quando comparado com a sua respetiva aglicona, a quercetina. Nos estudos de interação, a concentração de rutina usada foi de $100 \mu\text{M}$, que corresponde a 99 % de viabilidade celular. Na presença de rutina, a citotoxicidade do tamoxifeno nas células HeLa aumenta significativamente, em comparação com a do tamoxifeno sozinho. Tal como anteriormente referido, a rutina demonstrou ser um agente anticancerígeno fraco nas células HeLa (Šavikin *et al.* 2009), no entanto, este flavonoide é conhecido pelas suas propriedades antioxidantes (Sharma *et al.* 2013). Assim sendo, os resultados obtidos sugerem que, possivelmente, a rutina exerce uma ação antioxidante em condições de *stress* oxidativo causado pela ação do tamoxifeno, diminuindo o seu efeito citotóxico.

Na incubação das células com os produtos resultantes da digestão de *S. platensis*, o valor de IC₅₀ encontra-se acima da concentração máxima testada, significando que estes produtos não exercem efeito tóxico nas células HeLa. A concentração de produtos usada nos estudos de interação com os fármacos foi de 1 mg/mL , correspondendo a 86 % de viabilidade celular. Na presença destes produtos, o tamoxifeno manteve o seu efeito citotóxico, sugerindo que os compostos bioativos resultantes da digestão de *S. platensis* não têm efeito no mecanismo de ação do tamoxifeno.

Na análise do efeito da proteína mais abundante do soro na ação do tamoxifeno, foi testada a citotoxicidade do fármaco na presença da BSA. O valor de IC₅₀ do tamoxifeno na presença da albumina foi superior à concentração máxima do fármaco testada, indicando uma diminuição acentuada na sua citotoxicidade. O efeito da combinação dos produtos naturais com o tamoxifeno na presença da BSA demonstra um resultado semelhante, com um valor de IC₅₀ acima da concentração máxima do fármaco testada. Este resultado sugere que o tamoxifeno se liga à BSA, levando à perda da sua citotoxicidade. O estudo efetuado por Bourassa *et al.* (2011) refere que albumina sérica demonstrou ter a capacidade de alterar as propriedades farmacocinéticas de alguns fármacos, influenciando a sua biodisponibilidade nos tecidos alvo. Este resultado também é suportado pelo estudo efetuado por Khar and Ali (1987) que demonstrou que o tamoxifeno não tem efeito sobre o crescimento das células na presença de soro bovino fetal (FBS), sendo a BSA o seu componente maioritário.

No caso da cisplatina (**Figura III.2**), ao longo das concentrações testadas observa-se uma diminuição da viabilidade celular, sendo o valor de IC_{50} igual a $3,4 \pm 0,25 \mu M$. Na presença da quercetina e dos produtos da digestão de *S. platensis* observa-se um aumento estatisticamente significativo da viabilidade celular. Na presença da rutina, o valor de IC_{50} da cisplatina mantém-se semelhante, quando comparado com o efeito da cisplatina sozinha.

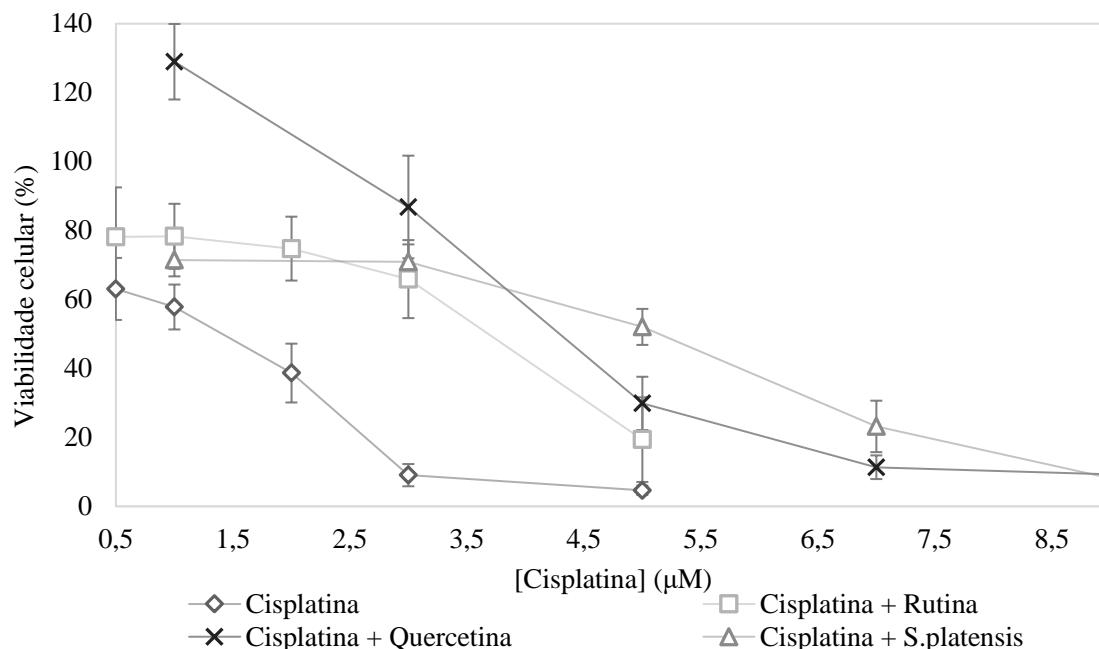


Figura III. 2 – Curva de viabilidade (%) das células HeLa após o tratamento com cisplatina e combinação deste fármaco com os produtos naturais, durante 72 horas. *S. platensis* – produtos da digestão de *S. platensis*.

A cisplatina exerce um maior efeito citotóxico nas células HeLa quando comparado com o do tamoxifeno, pelo que esta linha celular parece ser mais sensível à ação da cisplatina. Os dados da literatura indicam que o IC_{50} da cisplatina nas células HeLa é igual a $13,3 \mu M$ (Saiful Yazan *et al.* 2014), sendo este valor superior ao valor obtido experimentalmente. De acordo com Youqing Liu *et al.* (2005) e Saiful Yazan *et al.* (2014), a cisplatina tem a capacidade de induzir o *stress* no retículo endoplasmático, o que origina uma diminuição das suas proteínas, levando à ativação da via intrínseca da apoptose. Na presença da quercetina, o IC_{50} da cisplatina vai aumentar pelo que a presença deste flavonoide parece atenuar o efeito citotóxico do fármaco. Isto sugere que, possivelmente, a quercetina tem a capacidade de interferir na via intrínseca da apoptose ativada pela cisplatina, diminuindo o seu efeito de toxicidade celular. Para além disso, a quercetina, sendo um flavonoide, pode exercer um efeito sobre os transportadores membranares (Y. Li and Paxton 2013), levando ao aumento do efluxo da cisplatina para o exterior da célula, diminuindo a citotoxicidade do fármaco.

Na presença de rutina, o valor de IC_{50} da cisplatina mantém-se semelhante, sugerindo que este flavonoide não interfere no mecanismo de ação do fármaco.

Na presença de produtos da digestão de *S. platensis*, os dados estatísticos indicam haver diferença significativa nos valores de IC_{50} quando comparado com a cisplatina sozinha, sugerindo que a presença destes produtos diminui o seu efeito. O estudo efetuado por B. Li *et al.* (2006) sugere que o componente mais abundante na *S. platensis*, a C-ficocianina, tem a capacidade de induzir a ativação dos genes pró-apoptóticos, diminuir a expressão dos genes anti-apoptóticos e facilitar a transdução dos sinais da apoptose com ativação das caspases, com consequente morte celular. Isto sugere que a C-ficocianina

tem a capacidade de interferir no mecanismo de ação da cisplatina, sendo a concentração de 1 mg/mL de produtos incapaz de inibir, por si só, a proliferação e a indução da apoptose nas células HeLa.

III.2.2. MCF-7

Ambos os fármacos testados são comuns na quimioterapia do cancro da mama, especialmente o tamoxifeno. Tanto para o tamoxifeno como para a cisplatina observa-se uma diminuição da viabilidade celular dependente da concentração do fármaco testado.

Nas células MCF-7, para o tamoxifeno (**Figura III.3**) observa-se uma diminuição da viabilidade celular ao longo das concentrações crescentes do fármaco testadas, com valor de IC_{50} igual a $20,56 \pm 0,89 \mu M$ (**Tabela III.3**). Na presença da quercetina e da rutina, os valores de IC_{50} obtidos são estatisticamente semelhantes ao valor do tamoxifeno sozinho. Na presença dos produtos da digestão de *S. platensis*, a citotoxicidade do tamoxifeno é significativamente inferior, observando-se o aumento do valor de IC_{50} .

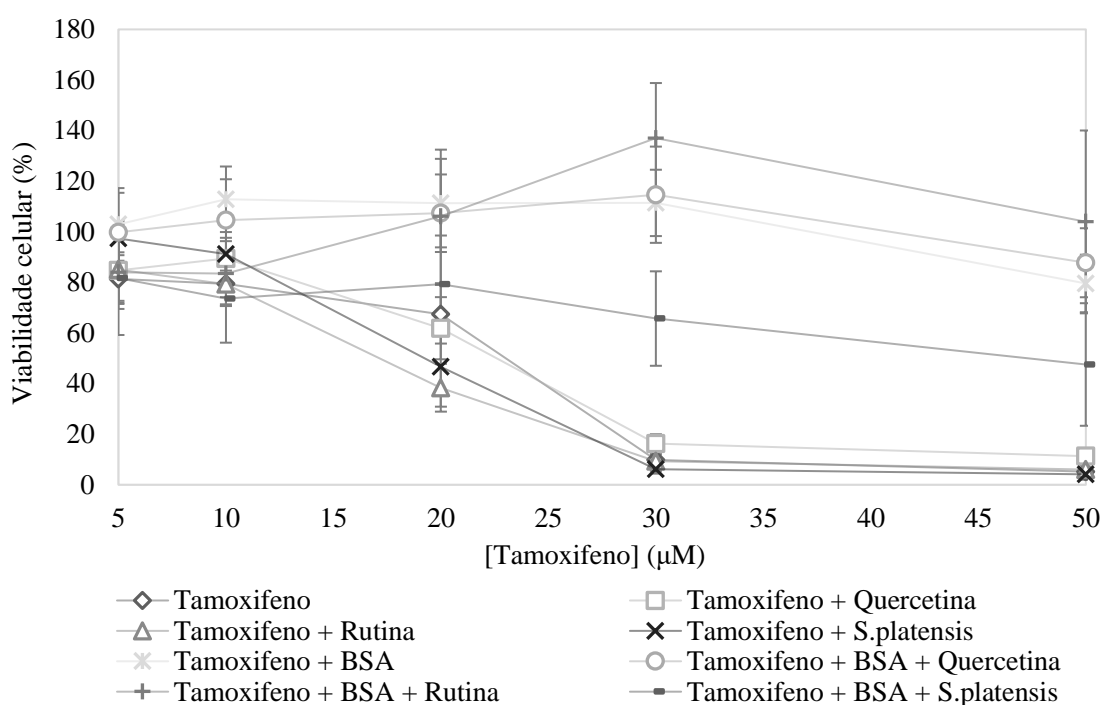


Figura III.3 – Curva de viabilidade (%) das células MCF-7 após o tratamento com tamoxifeno e combinação deste com vários compostos, durante 72 horas. *S. platensis* – produtos da digestão de *S. platensis*.

Tabela III.3 – Efeito dos fármacos e da sua combinação com os produtos naturais na toxicidade das células MCF-7.

	IC₅₀ (µM)	Citotoxicidade
Tamoxifeno	20,56 ± 0,89 (16)	-
Quercetina	> 100 (16)	-
Rutina	> 100 (16)	-
<i>S. platensis</i>	> 1,0 mg/mL (16)	-
Tamoxifeno + BSA	> 50 (16)	-
Tamoxifeno + Quercetina (80 µM)	24,38 ± 1,78 (16)	-
Tamoxifeno + BSA + Quercetina (80 µM)	> 50 (16)	-
Tamoxifeno + Rutina (100 µM)	17,15 ± 2,00 (16)	-
Tamoxifeno + BSA + Rutina (100 µM)	> 50 (16)	-
Tamoxifeno + <i>S. platensis</i> (1,0 mg/mL)	23,09 ± 1,11 (16) *	↓
Tamoxifeno + BSA + <i>S. platensis</i> (1,0 mg/mL)	> 50 (16)	-
Cisplatina	7,26 ± 0,56 (16)	-
Cisplatina + Quercetina (80 µM)	8,67 ± 0,13 (16) **	↓
Cisplatina + Rutina (100 µM)	11,95 ± 1,25(16) **	↓
Cisplatina + <i>S. platensis</i> (1,0 mg/mL)	8,42 ± 0,75 (16) **	↓

Os resultados encontram-se expressos como valores de IC₅₀ ± SD (n = nº replicados)

S. platensis significa produtos da digestão de *S. platensis*

p-value <0,05: significativamente diferente comparando com o IC₅₀ de tamoxifeno (*) e cisplatina (**)

As setas indicam o aumento (↑) ou diminuição (↓) significativa da citotoxicidade e (-) indica ausência de alterações significativas.

O tamoxifeno é o fármaco mais comum no tratamento do cancro da mama, cujos tumores apresentam recetores de estrogénio (ER), como é o caso das células MCF-7. Este fármaco demonstrou exercer uma atividade citotóxica com um valor de IC₅₀ inferior ao obtido para as células HeLa, indicando que a presença de ER tornam as MCF-7 (Furuya et al. 1989) mais sensíveis a ação do tamoxifeno. Isto sugere que o mecanismo mediado pelos ER continua a ser o mais importante. Neste tipo de células, o fármaco compete com o estrogénio pela ligação ao ER, inibindo a transcrição dos genes que normalmente são induzidos pelo estrogénio (Jaiyesimi et al. 1995). Estes genes estão envolvidos na proliferação celular, cuja inibição resulta na ativação da via intrínseca da apoptose (Lewis-Wambi and Jordan 2009).

Para a quercetina, observa-se um valor de IC₅₀ acima do valor máximo testado, indicando que nesta linha celular o flavonoide não tem efeito tóxico. Contudo, o estudo efetuado por Ranganathan *et al.* (2015) sugere que a quercetina tem a capacidade de induzir a interrupção do ciclo celular nas células MCF-7 e a apoptose, através da supressão da via das MAP cinases. Para além disso, o mesmo estudo demonstrou que na incubação das células com quercetina, durante 24 horas, o seu valor de IC₅₀ obtido foi igual a 37 µM, com efeito mais acentuado na incubação durante 48 horas, sendo o valor obtido experimentalmente superior ao observado na literatura. Para os estudos da interação com os fármacos, a concentração de quercetina utilizada foi de 80 µM, que corresponde a 96 % de viabilidade. Na presença de quercetina, a atividade citotóxica do tamoxifeno manteve-se semelhante quando comparada com a do tamoxifeno sozinho, sugerindo que o flavonoide não interfere com a ação do fármaco nas células MCF-7.

Na incubação das células com a rutina, o valor de IC₅₀ encontra-se acima da concentração máxima testada, significando que a rutina não tem efeito tóxico nas células MCF-7. A concentração de rutina usada nos estudos de interação com os fármacos foi de 100 µM, correspondendo a 100 % de viabilidade celular. Na presença de rutina, o tamoxifeno manteve seu o valor de IC₅₀, sugerindo que este flavonoide, tal como a quercetina, não exerce qualquer efeito no mecanismo de ação do tamoxifeno.

Os produtos resultantes da digestão de *S. platensis* demonstram um valor de IC₅₀ acima da concentração máxima testada, indicando que os compostos sozinhos não têm efeito tóxico nas células MCF-7. Embora os estudos efetuados por Z. Wang and Zhang (2016) (2017) referem que alguns péptidos resultantes da hidrólise de *S. platensis* podem ter um efeito na inibição do crescimento das células MCF-7. Isto sugere que a concentração dos produtos da digestão testada foi inferior ao necessário para exercer algum efeito nas células MCF-7. A concentração de produtos usada nos estudos de interação com os fármacos foi igual a 1 mg/mL, correspondendo a 88 % de viabilidade celular. Na presença destes produtos, há uma diminuição significativa na citotoxicidade do tamoxifeno, sugerindo que as substâncias bioativas de *S. platensis* podem interferir no mecanismo de ação do fármaco.

Na presença de BSA, o valor de IC₅₀ do tamoxifeno mantém-se acima da concentração máxima testada, indicando que na presença desta proteína a citotoxicidade do tamoxifeno diminui acentuadamente. O mesmo resultado foi observado para a combinação do tamoxifeno com os produtos naturais, na presença de BSA. Estes dados apoiam os resultados obtidos para as células HeLa, sugerindo que o tamoxifeno tem a capacidade de se ligar à BSA, diminuindo o seu efeito tóxico nas células.

No caso da cisplatina (**Figura III.4**), observa-se uma diminuição da viabilidade celular ao longo das concentrações testadas, com um valor de IC₅₀ igual a $7,26 \pm 0,56 \mu\text{M}$. Na presença da quercetina, da rutina e dos produtos da digestão de *S. platensis* é possível observar uma diminuição da citotoxicidade do tamoxifeno, com um aumento do seu valor de IC₅₀.

O valor de IC₅₀ da cisplatina nas células MCF-7 é inferior ao valor encontrado na literatura, $9,63 \mu\text{M}$ (Frank *et al.* 2009). Também é de notar que o valor de IC₅₀ da cisplatina nas células MCF-7 é superior ao obtido para as células HeLa, sugerindo que as células MCF-7 são mais resistentes à cisplatina. De acordo com P. Jordan *et al.* (2000), no interior das células, a cisplatina tem a capacidade de reagir com os nucleófilos presentes nas cadeias laterais de vários aminoácidos e nas bases de DNA ou RNA, sendo considerada a sua interação com o DNA a mais relevante. A formação de adutos da cisplatina com o DNA, levam a danos no DNA com ativação da via apoptótica (P. Jordan *et al.* 2000), resultando num efeito citotóxico.

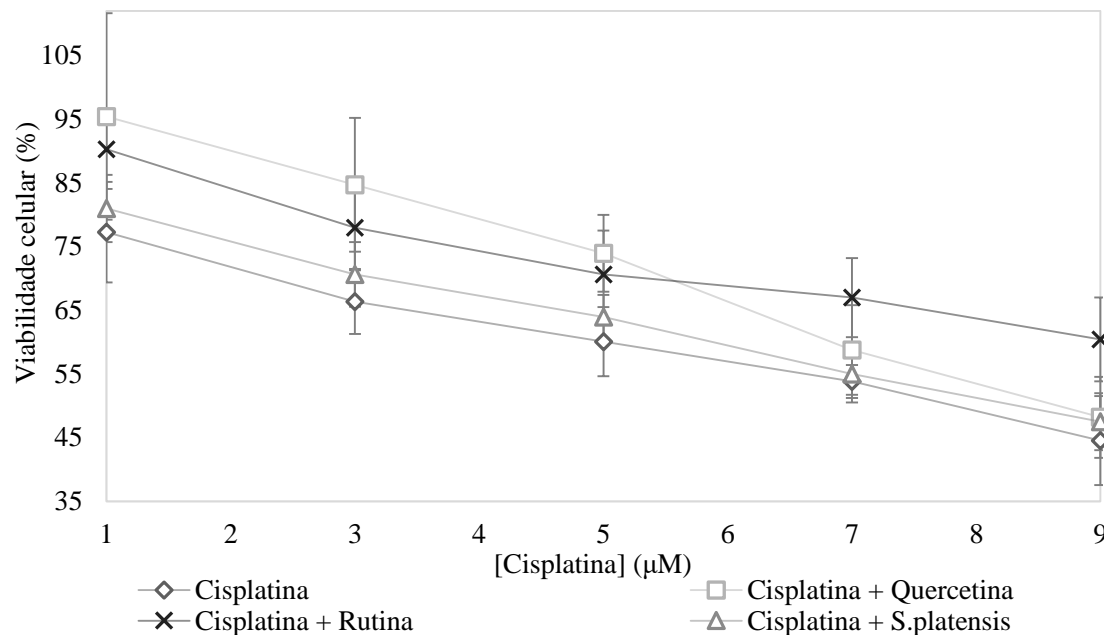


Figura III.4 – Curva de viabilidade (%) das células MCF-7 após o tratamento com cisplatina e combinação deste com os produtos naturais. *S. platensis* – produtos da digestão de *S. platensis*.

Na presença de quercetina, a citotoxicidade da cisplatina vai diminuir. É conhecido que a cisplatina tem a capacidade de formar complexos não apenas com as bases do DNA, mas também com muitas proteínas e lípidos celulares, induzindo o *stress* oxidativo através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Por sua vez, a quercetina, sendo um antioxidante, pode ter a capacidade de inibir a produção de ROS e, conseqüentemente, diminuir a ativação da via intrínseca da apoptose, induzida pela cisplatina (Akbas *et al.* 2005). Deste modo, os resultados obtidos sugerem que nas células MCF-7 a produção de ROS, com a conseqüente indução da apoptose pela via da ativação das caspases, seja um mecanismo igualmente importante na citotoxicidade induzida pela cisplatina. Assim, a quercetina consegue diminuir o efeito citotóxico da cisplatina nas células MCF-7, provavelmente, através da inibição da geração de ROS pelo fármaco. Para além disso, foi também reportado que a quercetina pode induzir a apoptose nas células MCF-7, através da ativação direta da cascata de caspases pela via mitocondrial (Chou *et al.* 2010a; Kashyap *et al.* 2016). Isto sugere que a quercetina pode também interferir com algum componente da via apoptótica induzida pela cisplatina, diminuindo o efeito do fármaco.

Na presença de rutina, observa-se uma diminuição da atividade citotóxica da cisplatina, sendo o seu efeito estatisticamente diferente do causado pela cisplatina sozinha. A rutina, tal como a quercetina, tem propriedades antioxidantes (S.-S. Chen *et al.* 2000), pelo que os resultados obtidos sugerem que ambos os flavonoides podem ter a capacidade de diminuir a produção de ROS e, conseqüentemente, atenuar a ativação da apoptose, embora o efeito seja mais pronunciado no caso da rutina.

A cisplatina na presença dos produtos da digestão de *S. platensis* demonstrou um efeito tóxico significativamente inferior à cisplatina sozinha, sugerindo que alguns dos componentes bioativos da *S. platensis* podem ter a capacidade de interferir no mecanismo de ação da cisplatina, atenuando o seu efeito nas células MCF-7.

Pode concluir-se que os produtos naturais influenciam a toxicidade dos fármacos quimioterápicos em ambas as linhas celulares tumorais. Para se conhecer melhor o mecanismo de ação dos produtos naturais responsável pelo efeito sobre a ação dos fármacos, estudou-se:

- a) O efeito dos produtos naturais sobre a ação antiproliferativa dos fármacos (estudos de proliferação);
- b) O efeito dos produtos naturais sobre a metabolização do pró-fármaco tamoxifeno na sua forma ativa;
- c) O efeito conjunto dos produtos naturais e dos fármacos nas células por espectroscopia de FTIR.

III.3. Estudos de proliferação

Os estudos de proliferação servem para testar o efeito dos fármacos e da sua interação com os produtos naturais sobre a aderência das células e a sua proliferação. Durante a adesão celular a uma superfície estática, as células tumorais sofrem alterações morfológicas conduzidas pela deformação passiva e reorganização ativa do citoesqueleto (Khalili and Ahmad 2015). Após a sedimentação, as células entram em contacto com a superfície através da adesão específica mediada pelas integrinas (Khalili and Ahmad 2015), sendo este o mecanismo de invasão usado pelas células tumorais durante a proliferação. Nesta etapa, as células tendem a ficar menos espessas, devido ao aumento de ligações recetor-ligando, resultando na diminuição do peso celular e no aumento da área de contacto com a superfície. Durante a contínua adesão, o citoesqueleto de actina sofre uma reorganização e distribuição pelas margens do corpo celular. As células alcançam o seu espalhamento máximo através da sua expansão e adesão cada vez mais forte, com formação de adesões focais (van der Flier and Sonnenberg 2001). Estas adesões estão associados às vias de transdução de sinais, que, por sua vez, regulam o crescimento, diferenciação e apoptose das células (Geiger *et al.* 2001).

Este ensaio foi efetuado de modo semelhante aos estudos de citotoxicidade, todavia as células e os compostos foram adicionados em simultâneo. Deste modo, os compostos podem interferir tanto na adesão celular, impedindo a formação de adesão focais, como no efeito antiproliferativo sobre as células já aderidas.

III.3.1. HeLa

Nas células HeLa, ao longo das concentrações testadas de tamoxifeno (**Figura III.5**) observa-se uma diminuição da viabilidade celular com um valor de IC_{50} igual a $14,46 \pm 1,22 \mu M$ (**Tabela III.4**). Na presença de quercetina, o valor de IC_{50} do tamoxifeno manteve-se semelhante. Por outro lado, na presença de rutina e dos produtos da digestão de *S. platensis*, observa-se um aumento do valor de IC_{50} do tamoxifeno, quando comparado com o do fármaco sozinho.

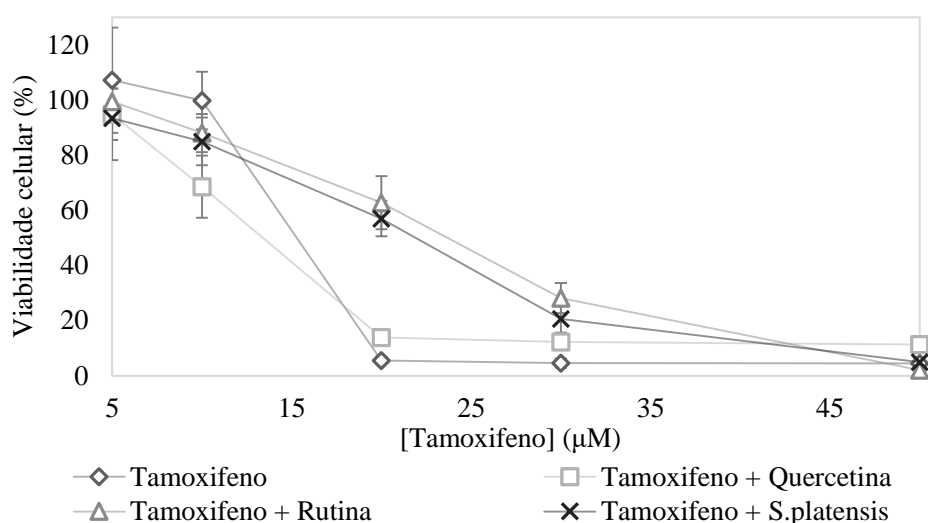


Figura III. 5 – Curva de viabilidade (%) das células HeLa após o tratamento com tamoxifeno e combinação deste com os produtos naturais. *S. platensis* – produtos da digestão de *S. platensis*.

Tabela III. 4 – Efeito da combinação dos fármacos e dos produtos naturais na aderência e proliferação das células HeLa.

	IC ₅₀ (µM)	Citotoxicidade
Tamoxifeno	14,46 ± 1,22 (16)	-
Quercetina	42,82 ± 4,29 (15)	-
Rutina	> 100 (16)	-
<i>S. platensis</i>	> 1,0 mg/mL(16)	-
Tamoxifeno + Quercetina (40 µM)	17,71 ± 0,44 (15)	-
Tamoxifeno + Rutina (100 µM)	26,13 ± 0,74 (15) *	↓
Tamoxifeno + <i>S. platensis</i> (1,0 mg/mL)	23,45 ± 0,46 (16) *	↓
Cisplatina	1,39 ± 0,23 (15)	-
Cisplatina + Quercetina (20 µM)	6,18 ± 0,29 (16) **	↓
Cisplatina + Rutina (100 µM)	4,19 ± 0,12 (16) **	↓
Cisplatina + <i>S. platensis</i> (1,0 mg/mL)	0,92 ± 0,04 (16)	-

Os resultados encontram-se expressos como valores de IC₅₀ ± SD (n = n° replicados)

S. platensis significa produtos da digestão de *S. platensis*

p-value < 0,05: significativamente diferente comparando com o IC₅₀ de tamoxifeno (*) e cisplatina (**)

As setas indicam o aumento (↑) ou diminuição (↓) significativa da citotoxicidade e (-) indica ausência de alterações significativas.

Neste estudo, o tamoxifeno apresenta um valor de IC₅₀ inferior ao obtido no estudo de citotoxicidade, sugerindo que o fármaco, para além da sua capacidade na indução da apoptose, pode ter também uma influência na adesão das células HeLa. Estas alterações morfológicas e bioquímicas induzidas pelo tamoxifeno podem tornar as células incapazes de aderirem e, conseqüentemente, proliferarem, aumentando o efeito tóxico causado pelo tamoxifeno.

Na presença da quercetina, o IC₅₀ do tamoxifeno manteve-se semelhante, quando comparado com o do tamoxifeno sozinho. Isto indica que a quercetina não afeta o mecanismo de ação do tamoxifeno na aderência e proliferação das células HeLa. No entanto, nota-se que a quercetina sozinha tem um valor de IC₅₀ inferior ao estudo de citotoxicidade, o que sugere que este flavonoide tem a capacidade, por si só, de interferir na aderência das células, influenciando a proliferação celular. Isto pode dever-se ao fato

de a quercetina ter a capacidade de modificar as vias de transdução dos sinais ou interagir com várias proteínas e recetores (Srinivasan *et al.* 2016), que podem estar relacionados com a via de sinalização durante a adesão e proliferação celular.

Na incubação das células HeLa com a rutina e com os produtos da digestão de *S. platensis* os valores de IC₅₀ mantêm-se acima da concentração máxima testada, tal como se observou nos estudos de citotoxicidade, sugerindo que estes produtos não têm efeito na aderência e proliferação das células. Na presença destes produtos naturais, os valores de IC₅₀ do tamoxifeno são significativamente superiores quando comparados com o valor obtido para o tamoxifeno sozinho. Isto sugere que a rutina e os produtos da digestão de *S. platensis* podem influenciar a atividade do tamoxifeno na adesão e conseqüente proliferação das células HeLa.

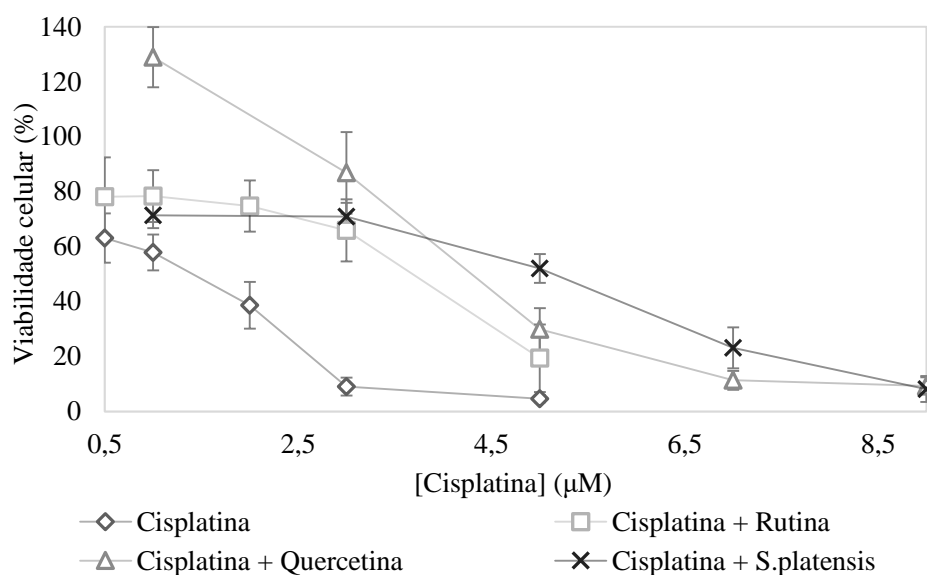


Figura III. 6 – Curva de viabilidade (%) das células HeLa após o tratamento com cisplatina e combinação deste com os produtos naturais. *S. platensis* – produtos da digestão de *S. platensis*.

No caso da cisplatina (**Figura III.6**), ao longo das concentrações testadas observa-se uma diminuição da viabilidade celular com um valor de IC₅₀ igual a $1,39 \pm 0,23 \mu\text{M}$. Na presença da quercetina e da rutina, os valores de IC₅₀ da cisplatina aumentam significativamente, indicando a diminuição da citotoxicidade induzida pelo fármaco. Na presença dos produtos da digestão de *S. platensis* o valor de IC₅₀ manteve-se semelhante.

Para a cisplatina, o valor de IC₅₀ é inferior ao obtido no estudo de citotoxicidade, sugerindo que a cisplatina, para além da sua capacidade citotóxica, pode influenciar o mecanismo de adesão das células HeLa. Na presença da quercetina e da rutina, os valores de IC₅₀ do fármaco são significativamente superiores a cisplatina sozinha, sugerindo que ambos os flavonoides podem interferir no mecanismo de ação da cisplatina no processo de aderência e proliferação celular. Na presença dos produtos da digestão de *S. platensis* o valor de IC₅₀ da cisplatina mantém-se semelhante ao valor da cisplatina sozinha, sugerindo que estes produtos não têm efeito na ação da cisplatina durante a proliferação das células HeLa.

III.3.2. MCF-7

Nas células MCF-7, ao longo das concentrações do tamoxifeno testadas (**Figura III.7**) observa-se uma diminuição da viabilidade com um valor de IC_{50} igual a $20,31 \pm 2,59 \mu\text{M}$ (**Tabela III.5**). Na presença dos produtos naturais, os valores de IC_{50} do tamoxifeno são estatisticamente semelhantes ao valor de fármaco sozinho.

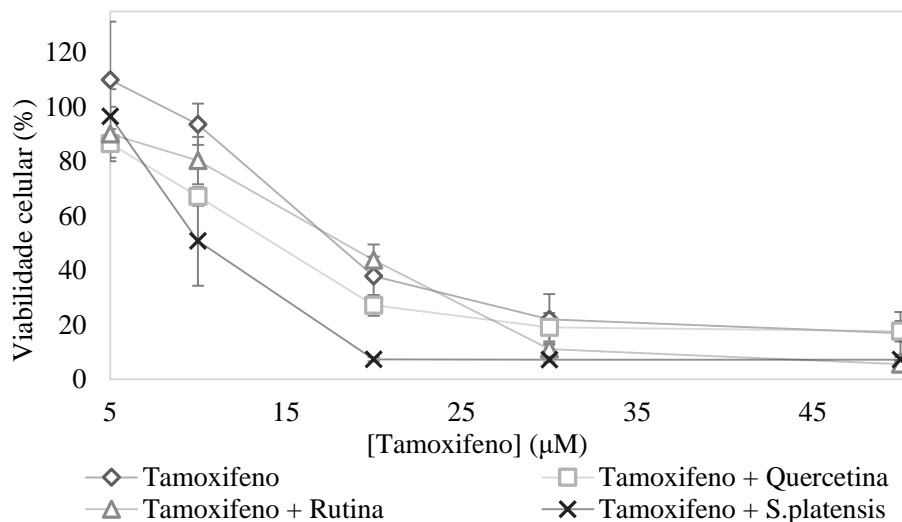


Figura III. 7 – Curva de viabilidade (%) das células MCF-7 após o tratamento com cisplatina e combinação deste com os produtos naturais. *S. platensis* – produtos da digestão de *S. platensis*

Nas células MCF-7, o valor de IC_{50} do tamoxifeno é semelhante ao que se observa nos estudos de citotoxicidade, sugerindo que nesta linha celular o tamoxifeno não tem qualquer efeito sobre o mecanismo de adesão e proliferação celular.

Na incubação das células com a quercetina e os produtos da digestão de *S. platensis* observam-se valores de IC_{50} iguais a $63,19 \pm 5,49 \mu\text{M}$ e $0,85 \pm 0,09 \text{ mg/mL}$, respectivamente, sugerindo que os compostos podem ter um papel interferente na adesão e proliferação celular, que resulta no aumento da sua citotoxicidade. Enquanto na rutina o valor de IC_{50} é semelhante aos estudos de citotoxicidade, o que sugere que este flavonoide não tem efeito na adesão e proliferação das células MCF-7.

Na presença dos produtos naturais, o valor de IC_{50} do tamoxifeno mantém-se semelhante ao do fármaco sozinho, sugerindo que estes compostos não interferem no mecanismo de ação do fármaco durante a proliferação das células MCF-7.

Tabela III. 5 - Efeito da combinação dos fármacos e dos produtos naturais na aderência e proliferação das células MCF-7.

	IC ₅₀ (µM)	Citotoxicidade
Tamoxifeno	20,31 ± 2,59 (16)	-
Quercetina	63,19 ± 5,49 (16)	-
Rutina	> 100 (16)	-
<i>S. platensis</i>	0,85 ± 0,09 mg/mL (16)	-
Tamoxifeno + Quercetina (20µM)	14,25 ± 0,002 (16)	-
Tamoxifeno + Rutina (100µM)	18,18 ± 0,70 (16)	-
Tamoxifeno + <i>S. platensis</i> (1,0mg/mL)	11,84 ± 1,30 (16)	-
Cisplatina	6,51 ± 2,07 (16)	-
Cisplatina + Quercetina (20µM)	7,01 ± 2,67 (16)	-
Cisplatina + Rutina (100µM)	13,15 ± 1,03 (16) **	↓
Cisplatina + <i>S. platensis</i>(1,0mg/mL)	0,33 ± 0,39 (16)	-

Os resultados encontram-se expressos como valores de IC₅₀ ± SD (n = n° replicados)

S. platensis significa produtos da digestão de *S. platensis*

p-value < 0,05: significativamente diferente comparando com o IC₅₀ de tamoxifeno (*) e cisplatina (**)

As setas indicam o aumento (↑) ou diminuição (↓) significativa da citotoxicidade e (-) indica ausência de alterações significativas.

O tratamento com cisplatina (**Figura III.8**) causa uma diminuição da viabilidade celular ao longo das concentrações usadas, com um valor de IC₅₀ igual a 6,51 ± 2,07 µM. Na presença de quercetina e dos produtos da digestão de *S. platensis* os valores de IC₅₀ mantêm-se semelhantes ao valor da cisplatina sozinha. Na presença de rutina observa-se uma diminuição significativa da viabilidade celular com um aumento do valor de IC₅₀ do fármaco.

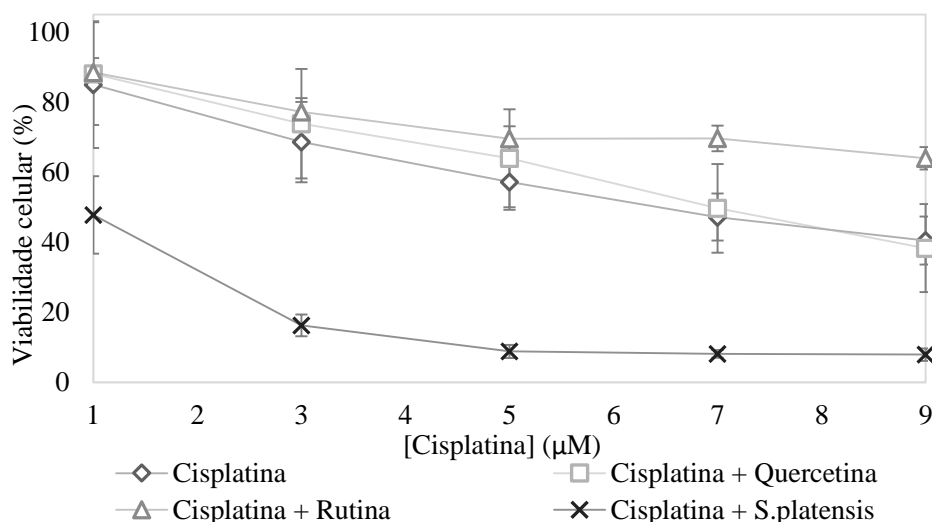


Figura III. 8 – Curva de viabilidade (%) das células MCF-7 após o tratamento com tamoxifeno e combinação deste com os produtos naturais. *S. platensis* – produtos da digestão de *S. platensis*

O tratamento das células com cisplatina, tal como para o tamoxifeno, sugere que esta não apresenta efeito na adesão e proliferação das células MCF-7. Contudo, a presença da rutina diminui a citotoxicidade induzida pela cisplatina, possivelmente devido ao papel estimulante do flavonoide na adesão e proliferação celular. Na presença dos produtos da digestão de *S. platensis* e da quercetina não se observa uma diferença significativa na citotoxicidade da cisplatina, o que sugere que estes dois produtos naturais não interferem no mecanismo de adesão e proliferação das células MCF-7.

Assim, conclui-se que os produtos naturais, para além de influenciarem a toxicidade dos fármacos, podem também influenciar a sua atividade antiproliferativa. Tendo em conta que o tamoxifeno é um pró-fármaco torna-se interessante estudar se o efeito dos produtos naturais sobre o fármaco será devido à modulação do seu metabolismo.

III.4. Quantificação e metabolização do tamoxifeno

Pretende-se analisar o efeito dos produtos naturais na metabolização do tamoxifeno *in vitro*. Para exercer a sua função citotóxica nas células tumorais, o tamoxifeno, sendo um pró-fármaco, tem que passar à sua forma ativa através de reações enzimáticas do metabolismo de xenobióticos. Para isso, em primeiro lugar, pretende-se quantificar o tamoxifeno e os seus metabolitos presentes em amostras biológicas.

III.4.1. Análise por HPLC-DAD

Na identificação do tempo de retenção do tamoxifeno e do seu espectro UV-Vis característico, foram analisadas várias concentrações de tamoxifeno por HPLC-DAD. As concentrações do tamoxifeno analisadas foram 100, 200, 400, 600 e 1000 nM dissolvidas em metanol, servindo de controlo a solução contendo apenas metanol.

De acordo com a **Figura III.9**, o tamoxifeno possui um pico característico com um tempo de retenção de 17,65 minutos.

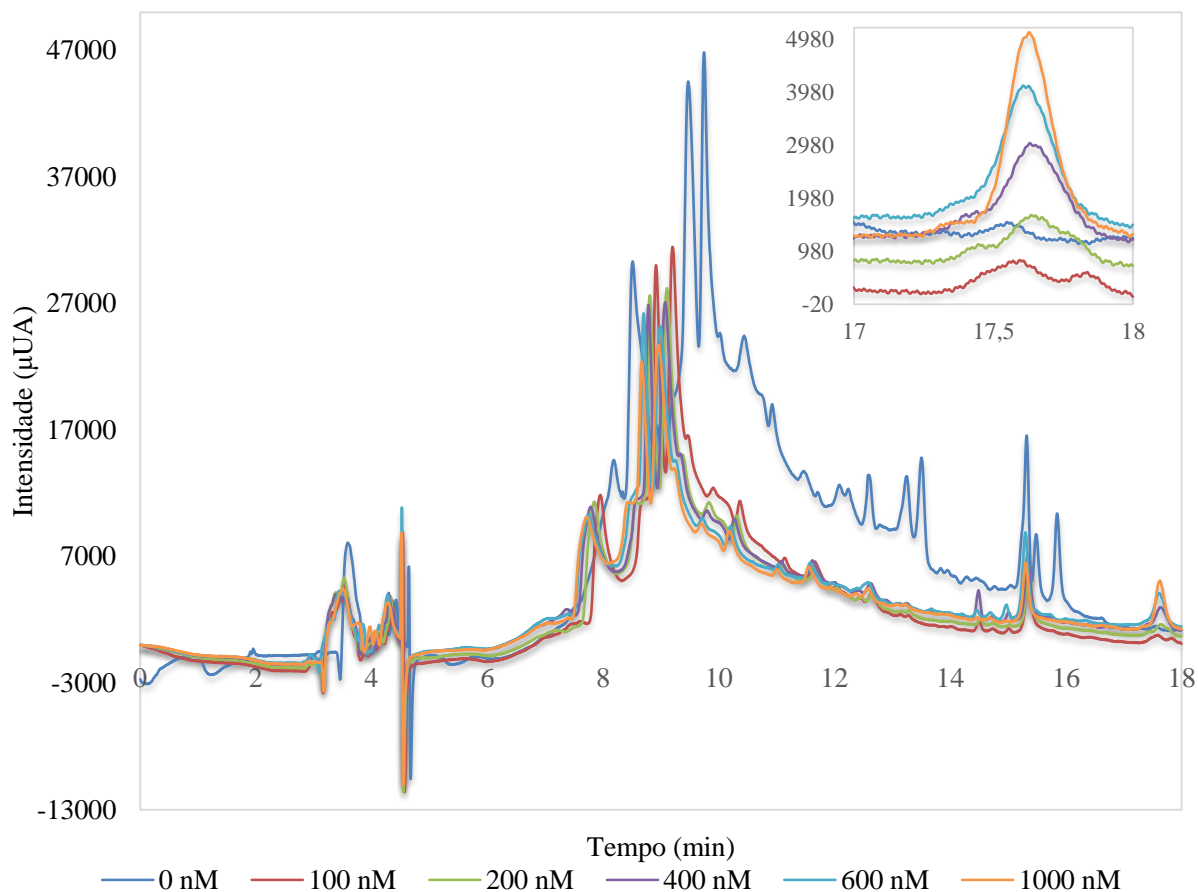


Figura III.9 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD de soluções padrão do tamoxifeno.

Para além disso, o tamoxifeno possui um espectro UV-Vis característico (**Figura III.10**) com a absorção máxima aos 235 e 274 nm, possibilitando a identificação dos metabolitos do tamoxifeno nos ensaios de metabolização do fármaco realizados posteriormente.

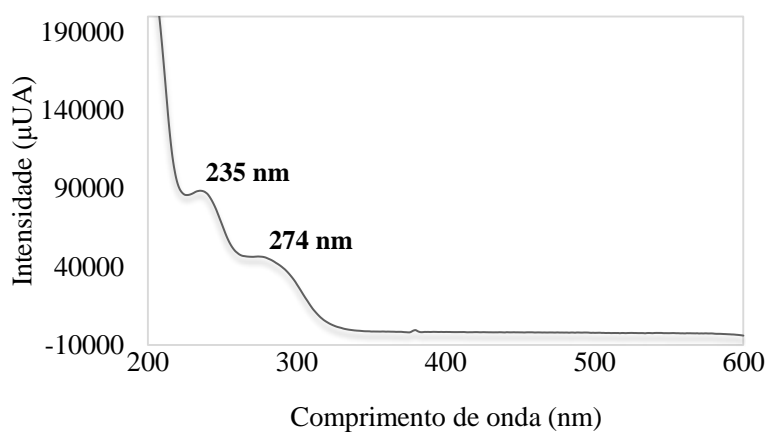


Figura III.10 – Espectro UV-Vis obtido por HPLC-DAD do pico correspondente ao tamoxifeno na concentração de 1000 µM.

III.4.1.1. Reta de calibração

Na quantificação do tamoxifeno em amostras biológicas foi traçada uma reta de calibração a partir dos cromatogramas de HPLC-DAD para diferentes concentrações de tamoxifeno padrão, representando-se a altura do pico do tamoxifeno em função da concentração do fármaco (**Figura III.11**). A equação obtida foi de $y = 3,4559x + 37,559$, em que x é a concentração do tamoxifeno em nM e y é a intensidade do pico em μUA .

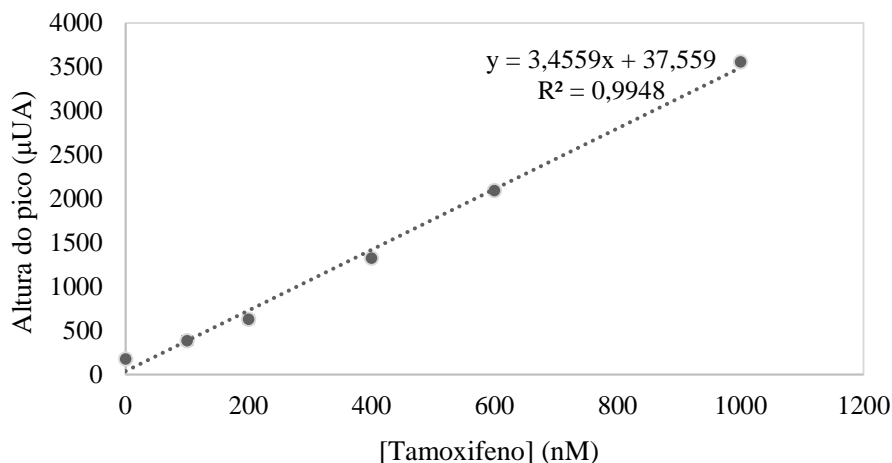


Figura III.11 – Representação gráfica da reta de calibração de altura do pico em função de concentração do tamoxifeno, obtidos por HPLC-DAD.

No entanto, na análise do tamoxifeno a 500 nM realizada nos dias seguintes, o fármaco nas mesmas condições de HPLC-DAD demonstrou um resultado diferente (**Anexo 1**), eluindo da coluna a diferentes tempos de retenção, aos 15.58, 15.75 e 17.66 minutos, significando que, possivelmente, devido à sua estrutura química, o fármaco apresenta uma elevada afinidade com os constituintes da coluna. Isto resulta na retenção do fármaco na coluna, podendo por vezes nem ser eluído na corrida, pelo que a análise do tamoxifeno por HPLC-DAD se torna difícil. Para quantificar o tamoxifeno e os seus metabolitos em amostras biológicas tentou analisar-se o tamoxifeno por técnicas alternativas, como a espectroscopia de FTIR.

III.4.2. Análise por FTIR

III.4.2.1. Reta de calibração

Foram analisados por FTIR soluções padrão do tamoxifeno nas concentrações de 40, 60, 80, 100, 150, 200 e 300 μM , obtendo-se uma reta de calibração (**Figura III.12**) a partir do cálculo da área do pico, no intervalo de 1236-1254 cm^{-1} .

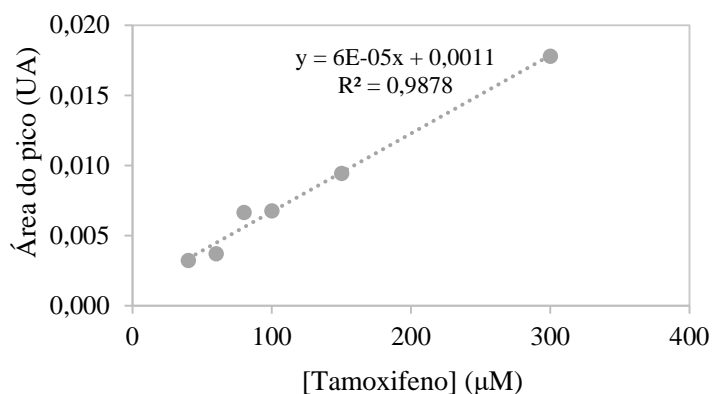


Figura III.12 – Representação gráfica da reta de calibração do tamoxifeno, obtidos por FTIR.

A reta obtida tem a equação de $y = 6\text{E-}05x + 0,0011$, sendo y a área do pico e x a concentração de tamoxifeno.

III.4.2.2. Quantificação do tamoxifeno em meio de cultura

O tamoxifeno na concentração de 0,5 μM dissolvido em meio de cultura foi analisado por FTIR, calculando-se a concentração final do tamoxifeno a partir da área do pico (**Figura III.13**), no intervalo 1236-1254 cm^{-1} . O controlo contém apenas meio de cultura.

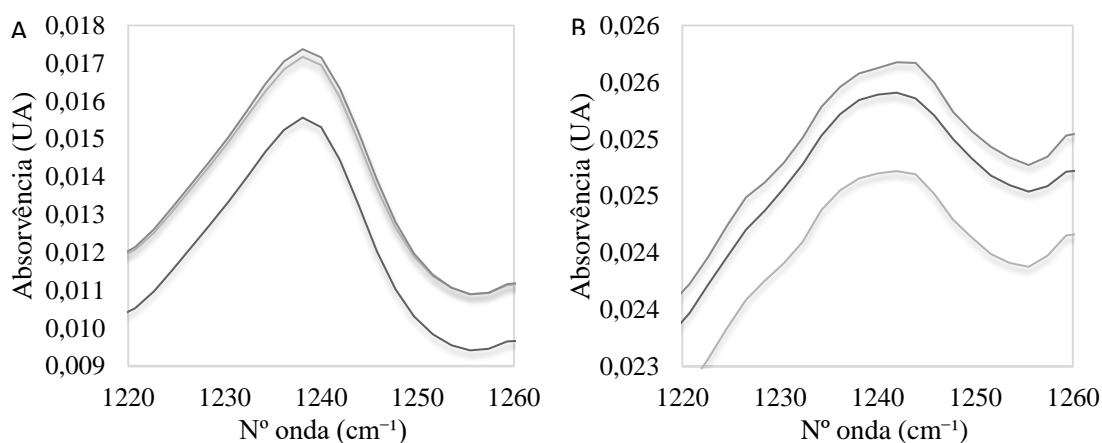


Figura III.13 – Representação gráfica da absorvência em função do N° de onda para controlo (A) e tamoxifeno (B), em triplicado.

A concentração final do tamoxifeno obtida foi de 3,26 μM com um rendimento de extração de 3,26 %. Este resultado sugere que, possivelmente, algum constituinte do meio, como por exemplo a albumina, se liga ao tamoxifeno alterando as suas propriedades químicas, que por sua vez resultam em alterações nos modos vibracionais.

III.4.2.3. Efeito da albumina sobre o tamoxifeno

Tendo em conta que albumina é a proteína mais abundante do soro, o objetivo seguinte foi estudar o seu efeito sobre o tamoxifeno. Dado que a concentração de BSA no soro é de 40 mg/mL e o meio de cultura contém 10 % de soro, o tamoxifeno na concentração de 5 μ M foi dissolvido numa solução aquosa de BSA 4 mg/mL. O tamoxifeno extraído foi quantificado por FTIR a partir da área do pico (**Figura III.14**), no intervalo de 1236-1254 cm^{-1} . O controlo contém tamoxifeno dissolvido em água.

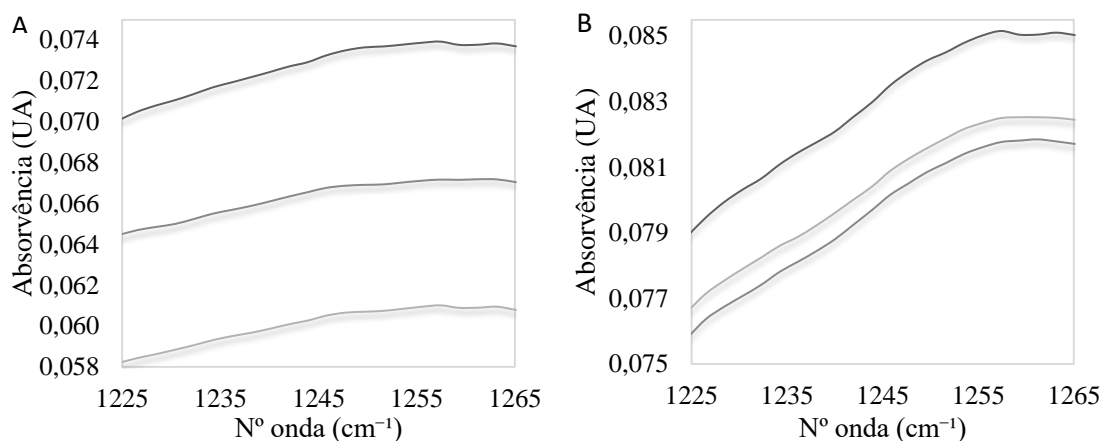


Figura III.14 – Espectro obtido por FTIR para o controlo que contém apenas tamoxifeno (A) e amostra que contém BSA + Tamoxifeno (B), em triplicado.

No controlo, que contém apenas tamoxifeno, a concentração final do tamoxifeno extraído foi de 82,95 μ M, com um rendimento de extração de 8,3 %. Enquanto para a solução de tamoxifeno e BSA se obteve 45,1 μ M, com um rendimento de extração de 4,5 %, ou seja, a ligação da BSA ao tamoxifeno baixou o rendimento para metade.

No entanto, os rendimentos obtidos são muito pequenos, indicando que o tamoxifeno é muito difícil de ser quantificado por FTIR, seja devido à sua estrutura química, à presença de água ou a perdas durante o processo de extração e secagem com azoto.

III.4.3. Metabolização do tamoxifeno *in vitro* pelos citocromos P450 extraídos do fígado

A metabolização *in vitro* do tamoxifeno pelos citocromos P450, presentes no liofilizado da fração microsomal (CFE), fornece uma estimativa qualitativa dos metabolitos que poderiam resultar do metabolismo *in vivo* do fármaco. A análise dos metabolitos foi efetuada por HPLC-DAD, sendo que foi esta técnica que demonstrou melhores resultados na deteção do tamoxifeno, quando comparado com a espectroscopia de FTIR.

A concentração da proteína total presente na fração microsomal extraída do fígado de porco foi quantificada pelo método de Bradford, obtendo-se 26,57 μ g/mL por miligrama de liofilizado e uma reta de calibração (**Anexo 2**) com uma equação igual a $y = 0,054x + 0,0305$.

O ensaio de 0 horas (**Figura III.15**) serve como controlo, em que a reação de metabolização efetuada pelos citocromos P450 foi interrompida imediatamente após a introdução do iniciador da reação, o cofator NADPH. No cromatograma obtido não se observam metabolitos, eluindo apenas tamoxifeno aos 16,3 minutos.

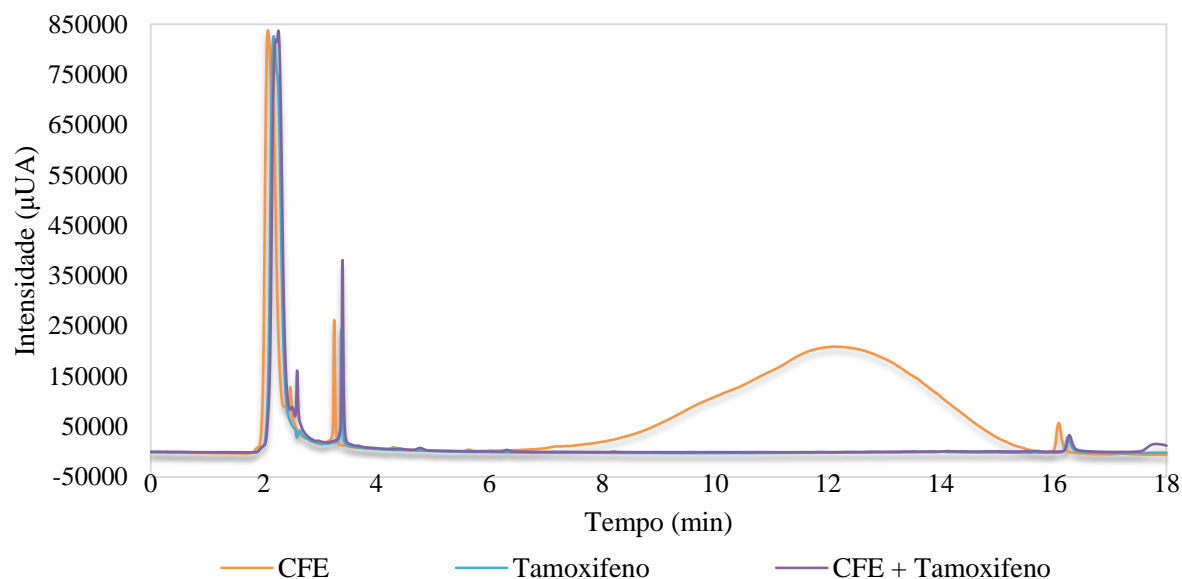


Figura III.15 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a amostra de sobrenadante recolhida para o ensaio de 0 horas na metabolização do tamoxifeno pelos citocromos P450. CFE – liofilizado da fração microsossomal.

Analisando a **Figura III.16** para o ensaio de 1,5 horas, observam-se alguns picos para a amostra contendo CFE e tamoxifeno, que por sua vez diferem das amostras controlo. Neste caso, o tamoxifeno eluiu da coluna aos 16,2 minutos e antes deste não se observam picos diferentes das amostras controlo. De acordo com Fried and Wainer (1994), os metabolitos do tamoxifeno têm um tempo de retenção inferior a molécula original, indicando que para a amostra de CFE e tamoxifeno incubados durante 1,5 horas nenhum dos metabolitos foi detetado. Isto pode dever-se às limitações do uso dos extratos celulares na metabolização dos compostos *in vitro*, pelo que a ausência de outros enzimas e cofatores citosólicos, presentes em células intatas, limitam as reações metabólicas (Fasinu *et al.* 2012). Para além disso, os enzimas da fração microsossomal poderiam ter perdido a sua atividade devido à alteração na sua conformação durante o processo de preparação do CFE.

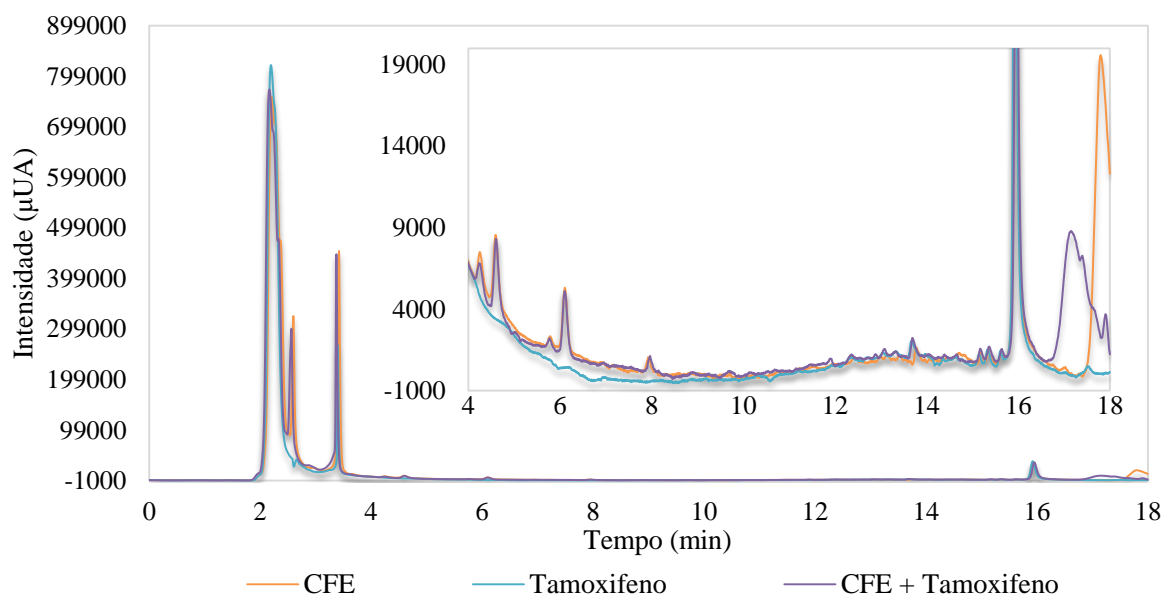


Figura III.16 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a amostra de sobrenadante recolhida para o ensaio de 1,5 horas na metabolização do tamoxifeno pelos citocromos P450. CFE – liofilizado da fração microsossomal.

III.4.4. *Metabolização do tamoxifeno in vitro pelas HepG2 e Caco-2*

Com o objetivo de se obter metabolitos do tamoxifeno, recorreu-se à metabolização *in vitro*, utilizando duas linhas celulares HepG2 e Caco-2, conhecidas por terem citocromos P450 e outras estruturas capazes de metabolizarem os fármacos.

III.4.4.1. HepG2

As HepG2 são células epiteliais humanas do carcinoma hepatocelular, caracterizadas por reterem muitas das características dos hepatócitos humanos normais, incluindo as atividades do metabolismo de xenobióticos, devido à presença de citocromos P450 monooxigenases e de outras enzimas envolvidos nas reações de fase II (Yoshitomi *et al.* 2001). Deste modo, o uso desta linha celular é útil na previsão do metabolismo do tamoxifeno que seria efetuado pelo fígado humano *in vivo*.

Na análise da amostra do meio (**Figura III.17**), onde as células HepG2 cresceram na presença do tamoxifeno, foram efetuados dois controlos, um deles contendo meio onde as células cresceram na ausência de tamoxifeno e outro contendo meio com tamoxifeno na ausência de células. Analisando os espectros observa-se que os picos obtidos para a amostra contendo células e tamoxifeno não são diferentes dos obtidos nos controlos, indicando que não foram detetados metabolitos.

Na análise da amostra de células (**Figura III.18**) que cresceram na presença do tamoxifeno, foi efetuado um controlo com as células que cresceram na ausência do fármaco. Analisando os espectros, a amostra contendo células e tamoxifeno não apresenta picos diferentes do controlo, indicando que não foram detetados metabolitos do fármaco.

O estudo efetuado por Duthie *et al.* (1995) refere que o tamoxifeno na concentração de 1 μM não exerce efeito tóxico nas células HepG2, eliminando a possibilidade dos metabolitos não serem detetados devido à morte das células. Deste modo, a explicação para ausência dos metabolitos nos espectros obtidos deve-se, possivelmente, à associação do tamoxifeno e dos seus metabolitos a proteínas presentes nas amostras biológicas.

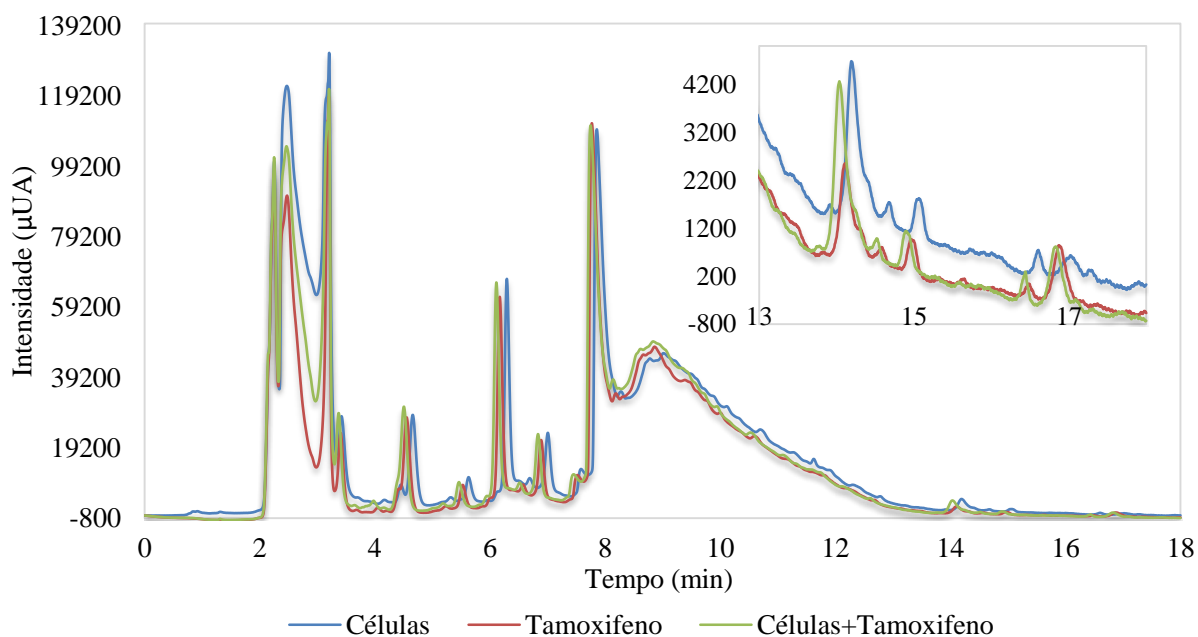


Figura III.17 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD para as amostras do meio no ensaio da metabolização do tamoxifeno pelas células HepG2.

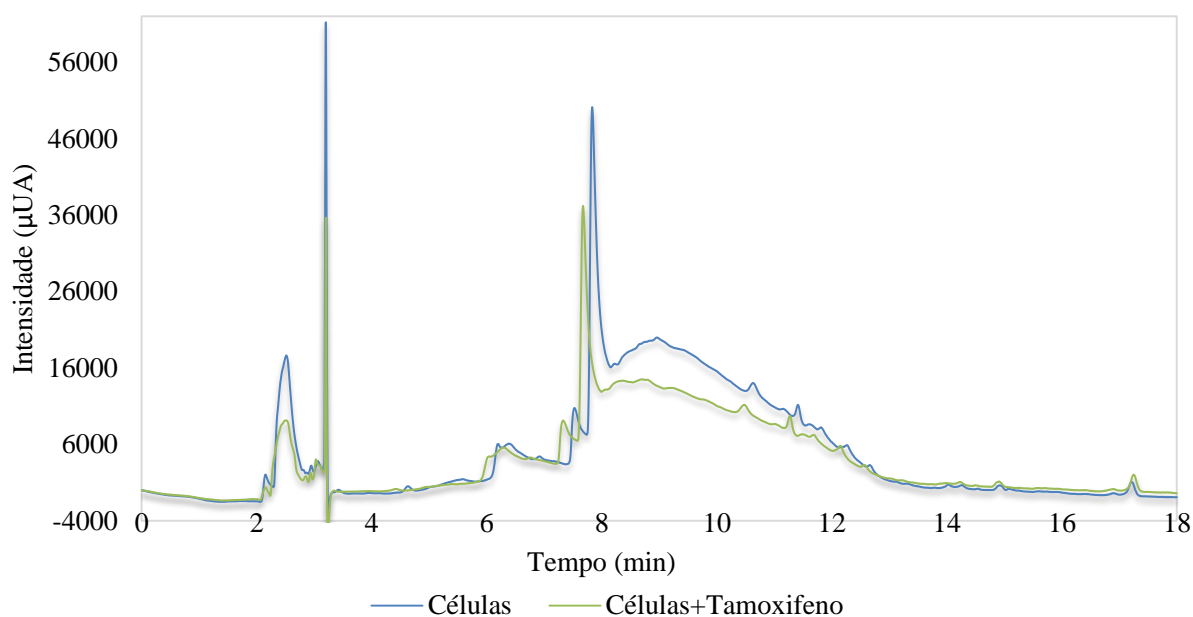


Figura III.18 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD para as amostras de células no ensaio da metabolização do tamoxifeno pelas células HepG2.

III.4.4.2. Caco-2

As Caco-2 são células tumorais humanas do adenocarcinoma colo-retal, caracterizadas por expressarem certos enzimas do metabolismo de xenobióticos, incluindo CYP monooxigenases e enzimas de fase II (Borlak and Zwadlo 2003). O uso desta linha celular no estudo da metabolização do tamoxifeno pode possibilitar a obtenção dos metabolitos que seriam obtidos através do metabolismo de xenobióticos *in vivo*.

Na análise da amostra do meio, onde as células Caco-2 cresceram na presença do tamoxifeno, foram efetuados dois controlos, um deles contendo meio onde as células cresceram na ausência do tamoxifeno e outro contendo meio com tamoxifeno na ausência de células. Analisando a **Figura III.19** é possível observar que para a amostra contendo células e tamoxifeno não existem picos diferentes do controlo, que contém apenas tamoxifeno. Pode observar-se uma elevada variabilidade nos perfis cromatográficos das amostras, no entanto, as diferenças correspondem a picos com espectros de UV-Vis característico de proteínas. Estas diferenças são bastante pequenas, uma vez que a intensidade é bastante baixa, como se pode observar na escala do eixo da **Figura III.19**. Isto indica que não foram detetados metabolitos do tamoxifeno.

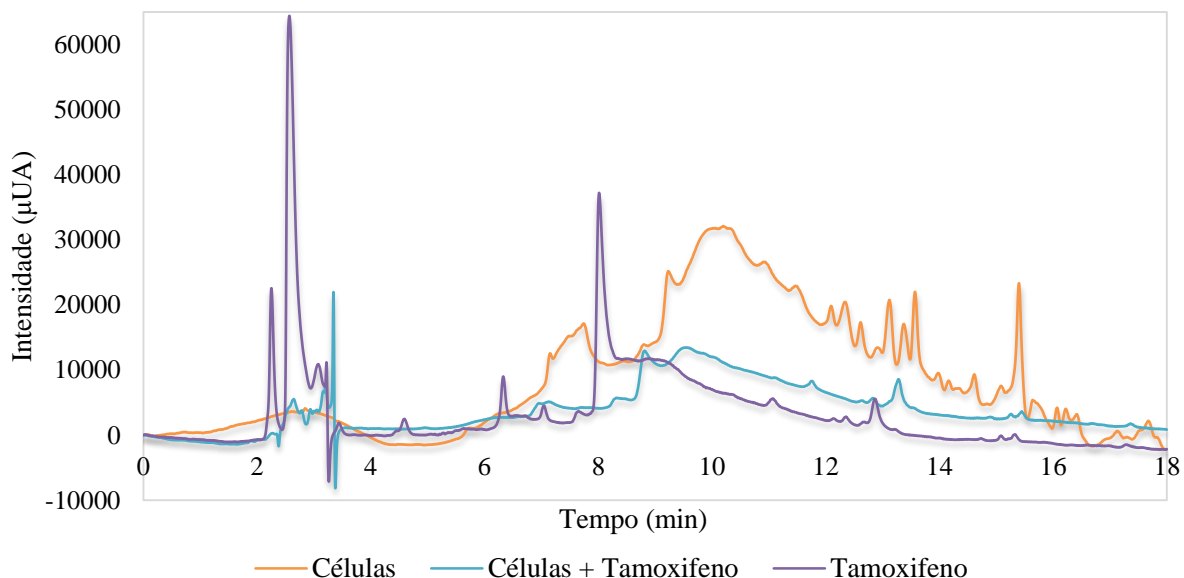


Figura III.19 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD para as amostras do meio no ensaio da metabolização do tamoxifeno pelas células Caco-2.

Na análise da amostra de células e tamoxifeno foi efetuado um controlo contendo apenas células na ausência do tamoxifeno. Analisando a **Figura III.20** para a amostra contendo células e tamoxifeno não se observaram picos diferentes do controlo, indicando que não foram detetados metabolitos do tamoxifeno.

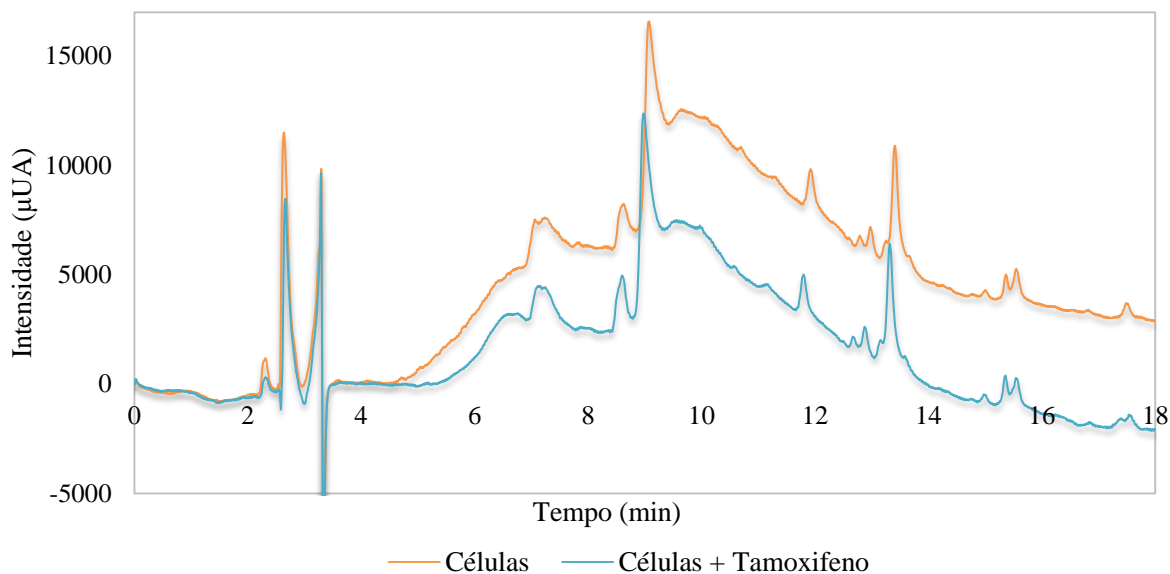


Figura III.20 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD para as amostras de células no ensaio da metabolização do tamoxifeno pelas células Caco-2.

Conclui-se, então, que, devido à hidrofobicidade do tamoxifeno e à sua forte ligação a proteínas presentes nas amostras biológicas, não foi possível quantificar o fármaco ou os seus metabolitos. Assim, prosseguiu-se para os estudos da análise das alterações estruturais, por espectroscopia de FTIR, resultantes da combinação dos fármacos e dos produtos naturais.

III.5. Ação da combinação dos fármacos com os produtos naturais a nível celular – estudos por espectroscopia de FTIR

Para avaliarmos as alterações estruturais que ocorrem ao nível dos constituintes das células tratadas com fármacos combinados com produtos naturais, as células intactas foram analisadas por espectroscopia de FTIR.

As células são constituídas por diferentes lípidos, proteínas, glúcidos e ácidos nucleicos, possíveis de serem detetados nos espectros de FTIR, devido aos seus modos vibracionais característicos. Deste modo, os espectros de FTIR representam a composição molecular global das células em estudo. Algumas das bandas mais frequentemente estudadas por vários autores (Bambery *et al.* 2006; Zelig *et al.* 2009) na caracterização das alterações estruturais em amostras biológicas encontram-se na **Tabela III.6**.

Na interpretação dos dados contidos nos espectros de FTIR recorreu-se à análise das razões entre as bandas. As modificações na estrutura das células tratadas com os diferentes compostos foram analisadas comparando-as com o controlo, que contém apenas células e a respetiva concentração de DMSO. Dado que a solução *stock* do tamoxifeno foi dissolvida em DMSO e a cisplatina em água, os espectros foram divididos de acordo com a concentração final de DMSO.

Tabela III.6 – A interpretação de algumas das bandas mais frequentemente encontradas nos espectros de FTIR para amostras biológicas.

Nº de onda (cm ⁻¹)	Modos vibracionais
~1084	Estiramento simétrico de P=O do grupo PO ₂ ⁻ (ácidos nucleicos)
~1545	Banda da amida II (proteínas)
~1655	Banda da amida I (proteínas)
~1740	Estiramento simétrico de C=O de ésteres (fosfolípidos)
~2851	Estiramento simétrico de C-H dos grupos CH ₂ (cadeias de ácidos gordos)
~2872	Estiramento simétrico de C-H dos grupos CH ₃
~2920	Estiramento assimétrico de C-H dos grupos CH ₂
~2957	Estiramento assimétrico de C-H dos grupos CH ₃ (cadeias de ácidos gordos)

Adaptado de Bellisola and Sorio 2012

III.5.1. HeLa

Os espectros obtidos para as células HeLa encontram-se nas **Figuras III.21, III.22 e III.23**.

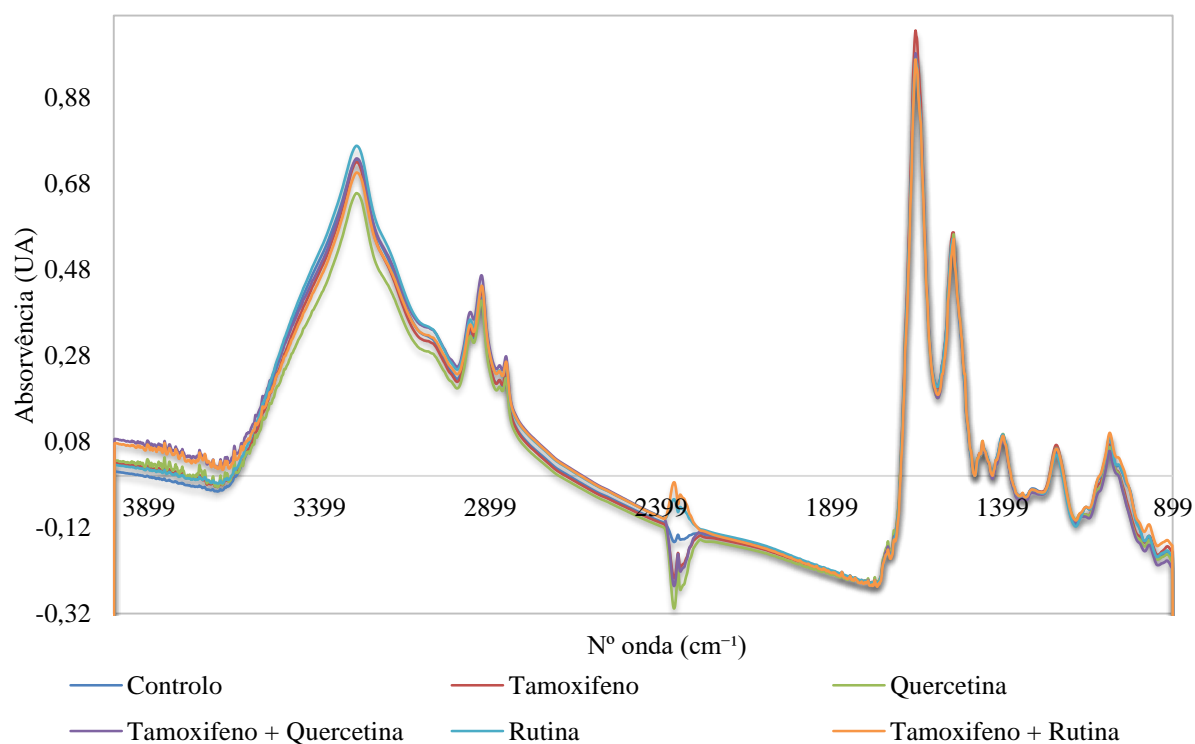


Figura III.21 – Espectro de FTIR obtido para as células HeLa tratadas com tamoxifeno e combinação deste com os flavonoides na concentração de DMSO igual a 0,5 %. O espectro foi normalizado para a banda da amida II.

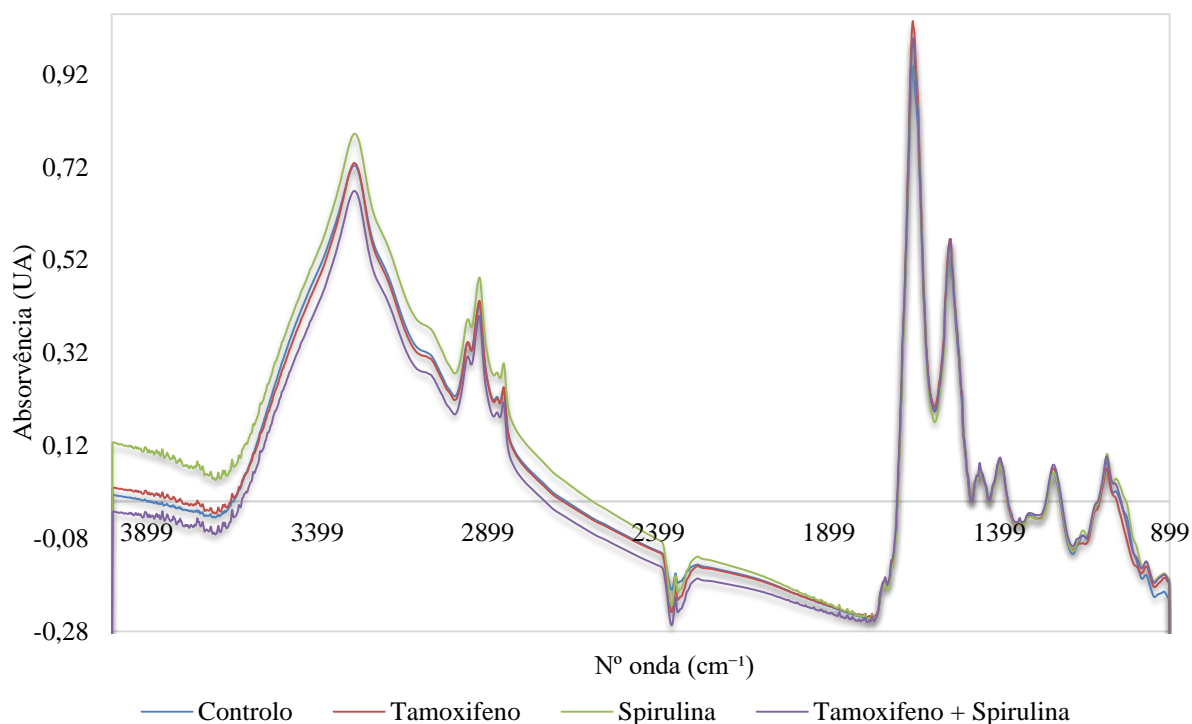


Figura III.22 – Espectro de FTIR obtido para as células HeLa tratadas com o tamoxifeno e combinação deste com os produtos resultantes da digestão de *S. platensis* na concentração de DMSO igual a 0,25 %. O espectro foi normalizado para a banda da amida II. *Spirulina* – produtos de digestão de *S. platensis*.

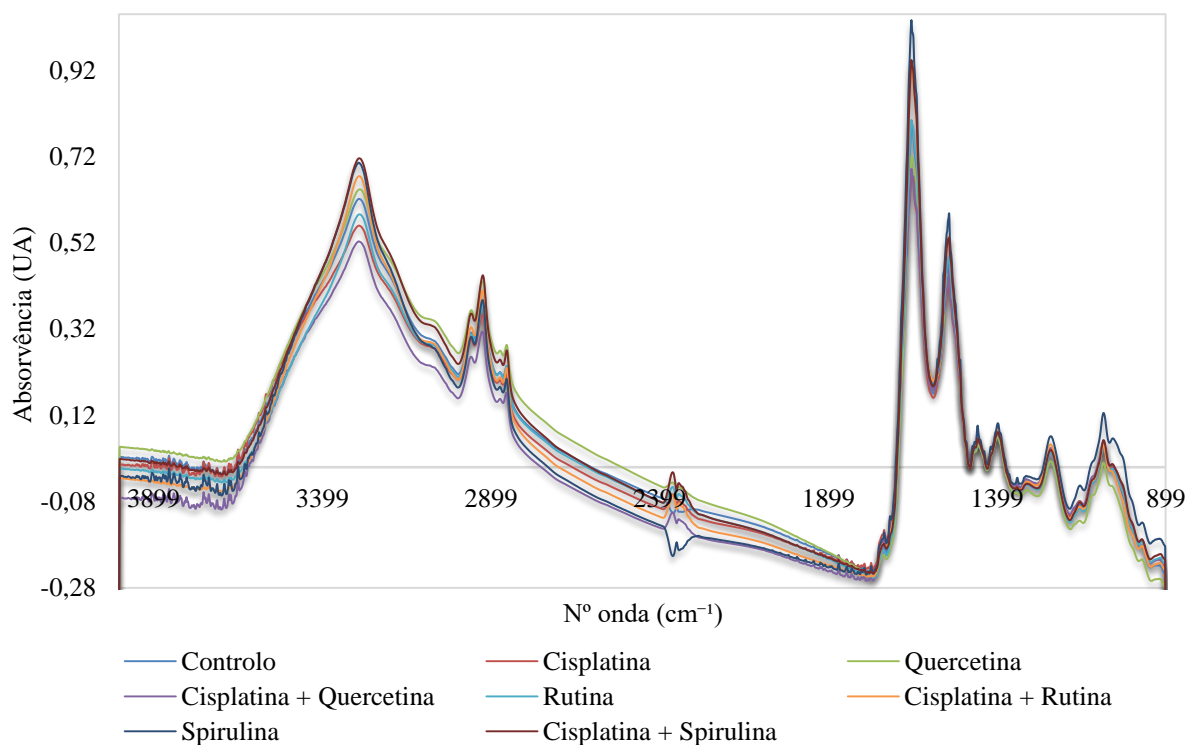


Figura III.23 – Espectro de FTIR obtido para as células HeLa tratadas com cisplatina e combinação do fármaco com os produtos naturais na concentração de DMSO igual a 0 %. O espectro foi normalizado para a banda da amida II. *Spirulina* – produtos de digestão de *S. platensis*.

Na incubação das células HeLa com tamoxifeno (**Figura III.24**) observa-se uma diferença significativa na razão $v_{as}(CH_2)/Amida\ II$ quando comparada com a do controlo, sugerindo uma alteração ao nível dos lípidos. Esta alteração ocorreu devido ao aumento do número de ligações CH_2 dos lípidos,

traduzindo-se no aumento do tamanho das cadeias dos ácidos gordos, sendo o último indicado pela diferença na razão $v_{as}(CH_2)/v_{as}(CH_3)$. Para identificarmos se ocorreu alguma alteração ao nível da quantidade de lípidos, para além do seu tamanho, recorreu-se também à razão $v_{as}(CH_3)/\text{Amida II}$ para a qual não se observa qualquer diferença quando comparada com a do controlo. Para analisarmos se estas alterações nos lípidos se devem aos fosfolípidos constituintes da membrana recorre-se à razão $v_s(C=O)/\text{Amida II}$, que indica não haver alteração ao nível da quantidade de carbonilos no sistema celular. No entanto, existe uma diminuição da quantidade de carbonilos relativamente às estruturas totais de lípidos, indicada pela razão $v_s(C=O)/v_{as}(CH_2)$, sugerindo que não houve alterações ao nível da quantidade dos fosfolípidos, mas sim na sua composição através do aumento do tamanho das cadeias dos ácidos gordos. Os fosfolípidos são os lípidos estruturais mais abundantes na membrana das células animais, distribuídos de uma forma assimétrica. A assimetria normal da membrana celular é perturbada nas fases iniciais da apoptose, sendo este um processo fisiológico coordenado que envolve uma série de eventos bioquímicos, que resultam na morte celular programada e na sua posterior eliminação (Chaurio *et al.* 2009). Durante a fase inicial da apoptose, ocorre a translocação de um tipo de fosfolípido - fosfatidilserina (PS), da superfície interna para a superfície externa da membrana, sendo este o mecanismo fundamental pelo qual os macrófagos fagocíticos reconhecem os corpos apoptóticos (Tyurina *et al.* 2000). Deste modo, o rearranjo dos fosfolípidos, que se observa nas células tratadas com o tamoxifeno, pode dever-se à formação de vesículas chamadas de corpos apoptóticos, durante a apoptose. Todavia, existem estudos que demonstram que o tamoxifeno tem a capacidade de interagir diretamente com os lípidos membranares, induzindo modificações na sua dinâmica (Bilge *et al.* 2013; Khadka *et al.* 2015). Por sua vez, a diferença na razão $v_s(PO_2^-)/\text{Amida II}$, relativamente ao controlo, sugere uma alteração ao nível dos ácidos nucleicos, existindo uma diminuição dos seus grupos fosfato associados. Esta alteração indica que, possivelmente, o DNA, por ação dos endonucleases (Elmore 2007), sofre uma fragmentação com a consequente perda dos grupos fosfato, sendo este processo uma das características da apoptose. Estas observações são suportadas por Majumdar *et al.* (2001), que refere que o tamoxifeno nas células HeLa induz a morte celular por apoptose, através do rearranjo das estruturas membranares para a formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA.

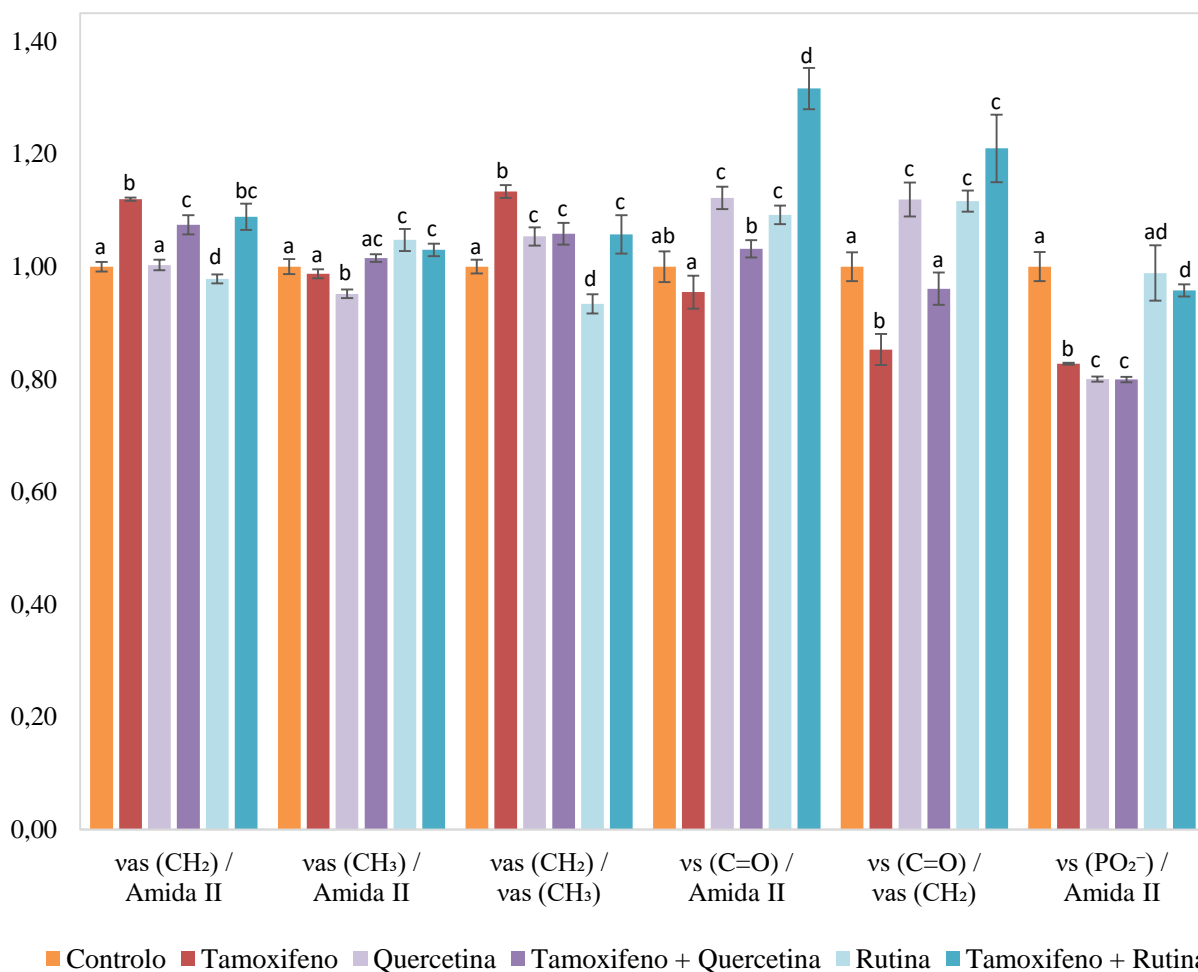


Figura III.24 – Histograma das razões da altura dos picos de cada banda, obtidos a partir dos espectros de FTIR, para as células HeLa tratadas com o tamoxifeno e com os flavonoides, durante 24 horas. O controlo foi normalizado a 1, sendo as restantes amostras normalizadas ao controlo. As mesmas letras indicam valores que não podem ser considerados diferentes (p -value > 0,05). Concentrações usadas (DMSO 0,5 %): tamoxifeno (20,81 μ M), quercetina (40 μ M), tamoxifeno (13,69 μ M) + quercetina (40 μ M), rutina (100 μ M), tamoxifeno (28,02 μ M) + rutina (100 μ M).

Quando as células HeLa foram incubadas com quercetina, na concentração de DMSO igual a 0,5 %, observou-se uma alteração ao nível da estrutura dos lípidos, devido ao aumento do tamanho das cadeias dos ácidos gordos, indicado pelas diferenças nas razões $v_{as}(CH_2)/v_{as}(CH_3)$ e $v_{as}(CH_3)/Amida II$, relativamente ao controlo. As diferenças nas razões $v_s(C=O)/Amida II$ e $v_s(C=O)/v_{as}(CH_2)$ indicam que houve um aumento significativo do número de carbonilos relativamente ao conteúdo proteico e também relativamente às estruturas totais dos lípidos. Tendo em conta que o número total de lípidos indicado pela razão $v_{as}(CH_2)/Amida II$ se manteve semelhante ao controlo, os resultados indicam que existem mais lípidos na forma de ésteres, isto é, na forma de fosfolípidos. O estudo efetuado por Saija *et al.* (1995) refere que alguns flavonoides, como a quercetina, têm a capacidade de interatuar e atravessar a membrana celular, causando variações na sua estrutura e fluidez, pelo que as alterações observadas nos lípidos podem dever-se ao efeito direto do flavonoide sobre a membrana. Quanto às alterações ao nível dos ácidos nucleicos observa-se uma diminuição do número de ligações dos fosfatos associados, sugerindo a ocorrência da fragmentação do DNA. Esta fragmentação e as alterações na composição dos lípidos são os processos que caracterizam a morte celular por apoptose (Gasparri and Muzio 2003). Os resultados observados suportam as evidências da indução de apoptose pela quercetina nas células HeLa (Vidya Priyadarsini *et al.* 2010).

Quando as células foram incubadas com a combinação do tamoxifeno e da quercetina, observa-se um aumento da razão $v_{as}(CH_2)/Amida\ II$, relativamente ao controlo, indicando o aumento do número de ligações CH_2 dos lípidos. Este efeito parece ter tendência a aumentar com o tamoxifeno, dado que o efeito da quercetina sozinha é semelhante ao do controlo. O aumento das ligações CH_2 deve-se ao aumento do tamanho das cadeias dos ácidos gordos, que é um efeito semelhante ao observado para a quercetina sozinha. Para esta combinação observa-se também uma diminuição do número de fosfatos associados aos ácidos nucleicos possivelmente devido à fragmentação do DNA, que juntamente com a alteração observada na composição dos lípidos sugerem a ocorrência de apoptose (Gasparri *et al.* 2003).

A incubação das células com a rutina, na concentração de DMSO igual a 0,5 %, demonstra diminuir o número de estruturas totais de lípidos na célula. Esta diminuição caracteriza-se pela diminuição do tamanho das cadeias dos ácidos gordos. O aumento do número de carbonilos relativamente ao conteúdo proteico e às estruturas totais de lípidos indica que existem mais lípidos na forma de fosfolípidos. Os níveis dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos diminuem relativamente ao controlo, sugerindo que a rutina não tem qualquer efeito sobre a sua estrutura. Estes resultados sugerem que as alterações ao nível dos lípidos podem dever-se à formação dos exossomas durante o processo de reciclagem dos resíduos celulares (Akers *et al.* 2013). Tendo em conta os resultados obtidos, a rutina, tal como demonstrado nos estudos de citotoxicidade, parece não exercer, por si só, algum papel antitumoral nas células HeLa.

Na incubação das células HeLa com a combinação do tamoxifeno e da rutina observa-se um aumento do número de ligações CH_2 dos lípidos, devido ao aumento na quantidade e no tamanho das cadeias dos ácidos gordos. O aumento das ligações CH_2 parece ter tendência a aumentar com tamoxifeno, sendo esta alteração semelhante ao tamoxifeno sozinhos. O aumento do tamanho das cadeias dos lípidos parece ter tendência a aumentar com o tamoxifeno e o aumento na quantidade de lípidos parece dever-se à rutina, sendo o efeito resultante comparável à rutina sozinhos. Para além disso, observa-se um aumento na quantidade dos fosfolípidos relativamente aos lípidos totais, indicando que existem mais lípidos na forma de fosfolípidos. A existência de mais fosfolípidos parece dever-se à interação da rutina com o tamoxifeno, dado que o efeito é significativamente maior quando comparado com o tamoxifeno e a rutina sozinhos. Estas alterações ao nível da composição e da quantidade dos lípidos sugerem que possivelmente ocorre a produção de membranas necessárias a formação dos corpos apoptóticos (Elmore 2007). Para esta combinação também se observa uma diminuição dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos, sendo o efeito comparável ao da rutina sozinhos. Sugere-se que esta diminuição é devida à fragmentação do DNA que, juntamente com as alterações nos lípidos, caracterizam a morte celular por apoptose (Nagata *et al.* 2003).

A incubação das células com o tamoxifeno na concentração final de DMSO igual a 0,25 % (**Figura III.25**) demonstra os mesmos efeitos quando incubadas com o mesmo fármaco na concentração de DMSO igual a 0,5 %.

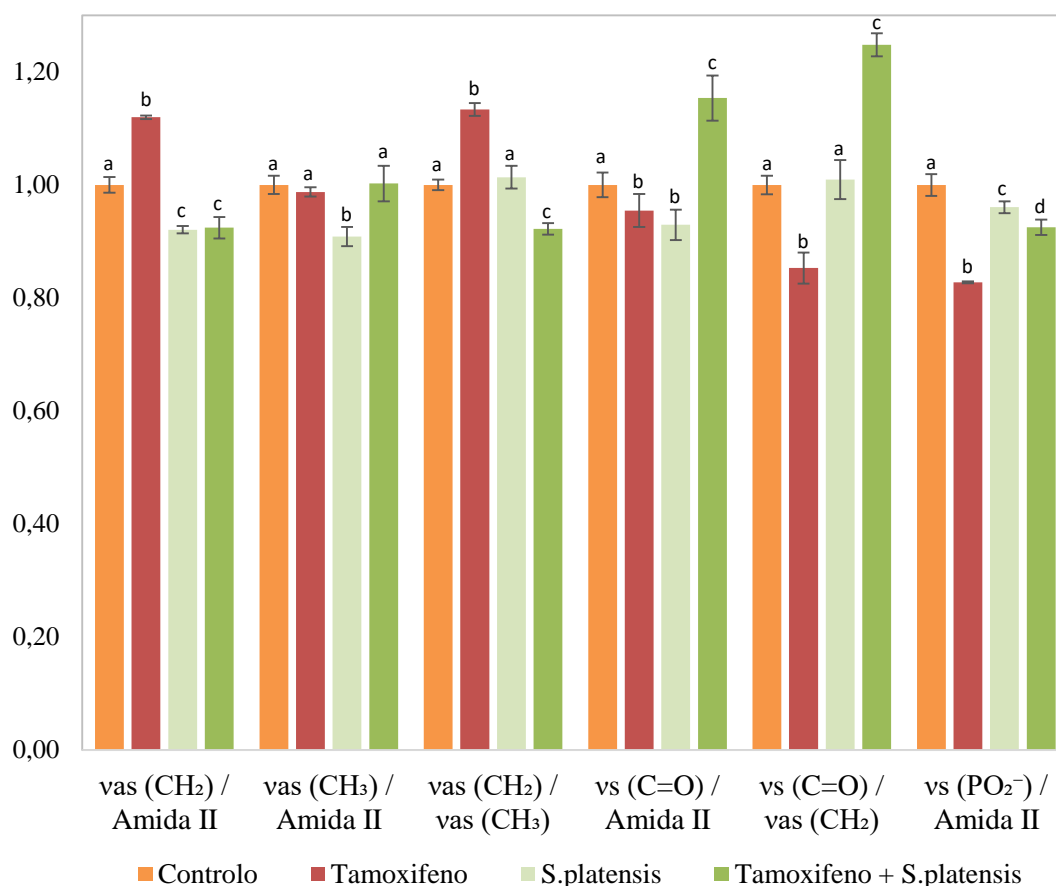


Figura III.25 – Histograma das razões na altura dos picos de cada banda obtidos a partir dos espectros de FTIR para as células HeLa tratadas com tamoxifeno e com produtos da digestão de *S. platensis*, durante 24 horas. O controlo foi normalizado a 1, sendo as restantes amostras normalizadas ao controlo. As mesmas letras indicam valores que não podem ser considerados diferentes (p -value > 0,05). Concentrações usadas (DMSO 0,25 %): tamoxifeno (20,81 μ M), produtos da digestão de *S. platensis* (1 mg/mL), tamoxifeno (25,18 μ M) + produtos da digestão de *S. platensis* (1 mg/mL).

Quando as células foram incubadas com os produtos da digestão de *S. platensis*, na concentração de DMSO igual a 0,25 %, observa-se uma diminuição ao nível das ligações CH₂ associados aos lípidos devido a diminuição na sua quantidade. Para além disso observa-se uma diminuição na quantidade dos carbonilos no sistema, existindo menos lípidos na forma de fosfolípidos. O nível de fosfatos é significativamente inferior ao controlo, no entanto está próximo, indicando que possivelmente o nível de replicação do DNA é inferior ao controlo. Estes resultados sugerem que possivelmente que os produtos podem ter uma capacidade antiproliferativa sobre as células HeLa, levando a interrupção do ciclo celular e inibição da síntese de novas membranas. O estudo efetuado por B. Li *et al.* (2006) demonstra que nas células HeLa, a C-ficocianina tem a capacidade de interferir no ciclo da divisão celular, levando a sua interrupção, com a consequente indução de apoptose. Deste modo, as alterações observadas sugerem que os produtos da digestão de *S. platensis* podem ter um efeito citostático nas células HeLa. Estas observações são consistentes com os estudos de citotoxicidade, em que a concentração de 1 mg/mL de produtos digeridos corresponde a 86 % de viabilidade celular.

Na presença do tamoxifeno juntamente com os produtos da digestão de *S. platensis*, observa-se uma diminuição de número de ligações CH₂ dos lípidos, devido a diminuição do tamanho das cadeias dos ácidos gordos. Esta alteração no tamanho das cadeias parece dever-se a interação do tamoxifeno com os produtos da digestão de *S. platensis*, dado que o efeito resultante é significativamente inferior ao apresentado pelos compostos testados em separado. A diferença na razão $v_s(C=O)/Amida II$

relativamente ao controlo, indica que existem mais lípidos na forma de fosfolípidos e este efeito parece resultar da interação dos compostos. Os níveis dos fosfato associados aos ácidos nucleicos é inferior ao controlo, sugerindo a ocorrência de fragmentação do DNA, sendo este processo característico da apoptose. Também é possível observar que os níveis dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos têm a tendência de diminuir na presença do tamoxifeno. A diminuição dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos sugere-se der devido a fragmentação do DNA que juntamente com o aumento dos fosfolípidos, caracterizam a morte celular por apoptose (Nagata *et al.* 2003)

Quando as células foram incubadas com a cisplatina (**Figura III.26**), observa-se uma alteração ao nível dos lípidos, quando comparado com o controlo, sendo esta alteração devido a diminuição do tamanho das cadeias acilo e aumento da quantidade de lípidos. Para além disso, observa-se o aumento do nível de carbonilos no sistema, indicando a existência de mais lípidos na forma de fosfolípidos. Isto sugere que ocorreu um rearranjo na estrutura dos lípidos membranares, possivelmente devido a ocorrência de apoptose. A razão $v_s(\text{PO}_2^-)/\text{Amida II}$ indica que a cisplatina não tem efeito sobre os ácidos nucleicos, dado que os nível dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos é comparável ao controlo. As alterações observadas ao nível do lípidos sugerem ocorreu o rearranjo das estruturas membranares para posterior formação dos corpos apoptóticos, no entanto nesta fase ainda não se consegue observar a fragmentação do DNA. Este resultado é suportado por estudos que demonstram a cisplatina induzir nas células HeLa a morte celular por apoptose, através da indução do *stress* do reticulo endoplasmático (Saiful Yazan *et al.* 2014).

Na incubação das células HeLa com a combinação da cisplatina e da quercetina, observa-se a diminuição do tamanho das cadeias dos ácidos gordos e o aumento na sua quantidade. Estas alterações parecem dever-se a cisplatina, dado que o efeito resultante é comparável a cisplatina sozinha. Também é possível observar o aumento dos níveis dos carbonilos no sistema celular, indicando a existência de mais lípidos na forma de fosfolípidos. Este efeito parece dever-se a cisplatina, dado que o aumento de fosfolípidos observado é comparável a cisplatina sozinha. Os níveis dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos observa-se ser semelhante ao controlo, sendo efeito comparável ao apresentado pela cisplatina sozinha. As alterações observadas nos lípidos sugere que possivelmente as células encontram-se na fase inicial da apoptose, com modificações na composição dos lípidos para formação de corpos apoptóticos, no entanto ainda não se observa a fragmentação do DNA.

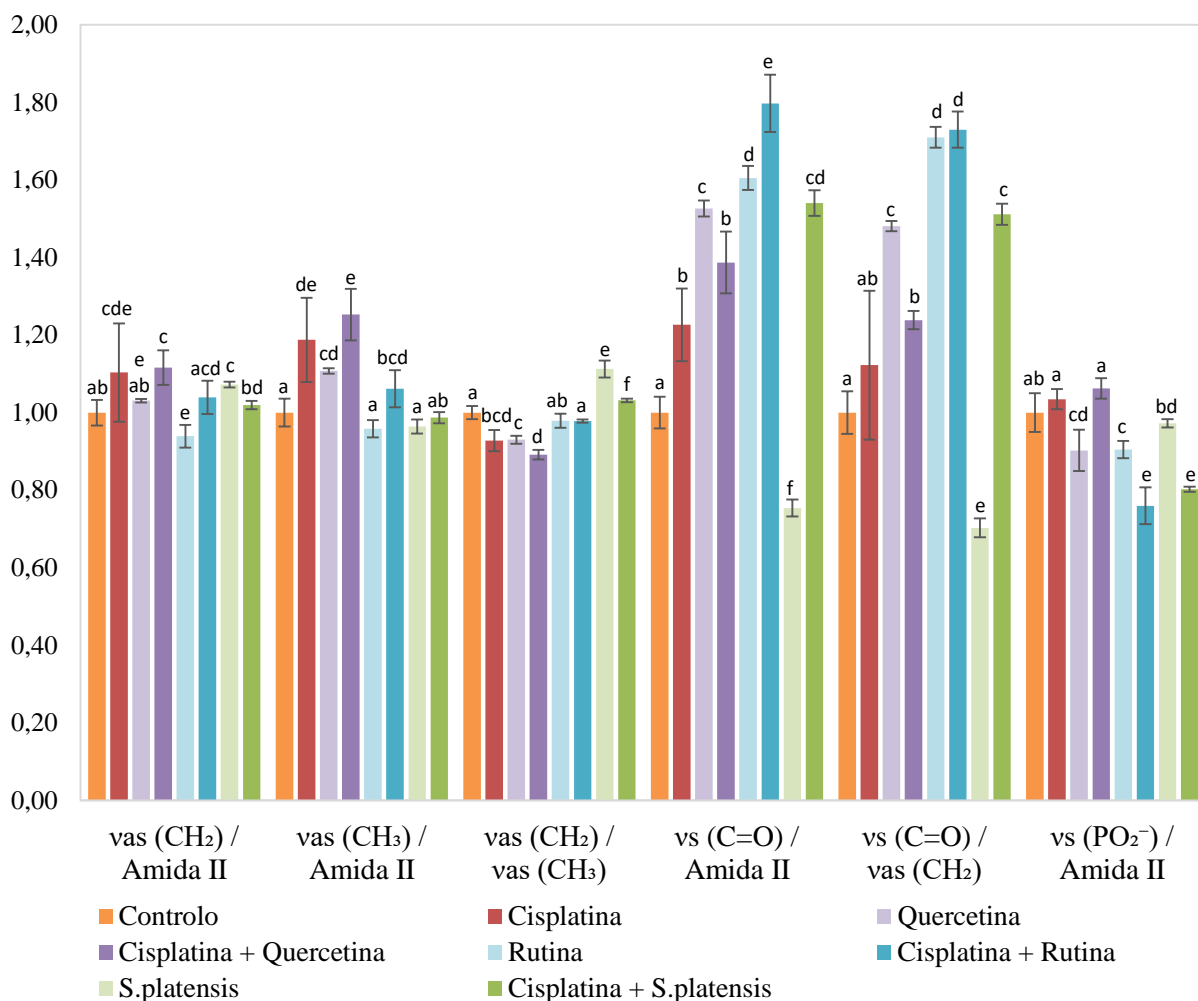


Figura III.26 – Histograma das razões na altura dos picos de cada banda, obtidos a partir dos espetros de FTIR, para as células HeLa tratadas a cisplatina e com os produtos naturais, durante 24 horas. O controlo foi normalizado a 1, sendo as restantes amostras normalizadas ao controlo. As mesmas letras indicam valores que não podem ser considerados diferentes (p -value > 0,05) Concentrações usadas (DMSO 0 %): cisplatina (3,54 μ M), quercetina (40 μ M), cisplatina (5,28 μ M) + quercetina (40 μ M), rutina (100 μ M), cisplatina (3,37 μ M) + rutina (100 μ M), produtos da digestão de *S. platensis* (1 mg/mL), cisplatina (4,38 μ M) + produtos da digestão de *S. platensis* (1 mg/mL).

Na incubação das células HeLa com a rutina na concentração de DMSO igual a 0 %, observam-se alterações estruturais diferentes dos obtidos para rutina com DMSO igual a 0,5 %, indicando que este solvente pode interferir no mecanismo da ação da rutina. No tratamento das células com rutina (DMSO 0 %) observa-se uma diminuição do tamanho das cadeias acilo e a existência de mais lípidos na forma de fosfolípidos. Para além disso, observa-se uma diminuição dos níveis dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos. As alterações na composição dos lípidos e diminuição dos fosfatos dos ácidos nucleicos, devido a fragmentação de DNA, sugerem que as células encontram-se na fase de apoptose.

Na incubação das células HeLa com a combinação da cisplatina e da rutina, observa-se o aumento da razão $v_s(C=O)/Amida II$, indicando a existência mais lípidos na forma de fosfolípidos, e este efeito parece ser devido a interação da cisplatina com a rutina. Quanto as alterações nos ácidos nucleicos observa-se uma diminuição dos níveis dos seus fosfatos associados, sendo este efeito resultante da interação do fármaco com o flavonoide. As alterações na composição dos lípidos e nos níveis dos fosfatos dos ácidos nucleicos sugerem que ocorreu um aumento dos fosfolípidos, através da sua exposição da membrana interior para a exterior, e também uma fragmentação do DNA, sendo ambos os processos característicos de morte celular por apoptose (Gasparri *et al.* 2003).

Quando as células foram incubadas com a combinação da cisplatina e dos produtos da digestão de *S. platensis* é possível observar alterações ao nível do tamanho das cadeias dos ácidos gordos, com tendência a aumentar na presença dos produtos da digestão. Para além disso, observa-se o aumento na razão $\nu_s(\text{C=O})/\text{Amida II}$, indicando a existência de mais lípidos na forma de fosfolípidos, sendo este efeito resultante da interação entre os compostos, dado que o valor da razão é significativamente superior a cisplatina e aos produtos testados em separado. Quanto aos ácidos nucleicos, observa-se uma diminuição dos seus fosfatos associados, sendo este efeito resultante da ação de ambos os compostos testados. Esta diminuição dos níveis ds fosfatos, possivelmente devido a fragmentação de DNA, juntamente com o aumento dos fosfolípidos sugerem a ocorrência da apoptose (Gasparri *et al.* 2003).

III.5.2. MCF-7

Os espectros obtidos por FTIR para as células MCF-7 encontram-se nas **Figura III.27, III.28 e III.29**.

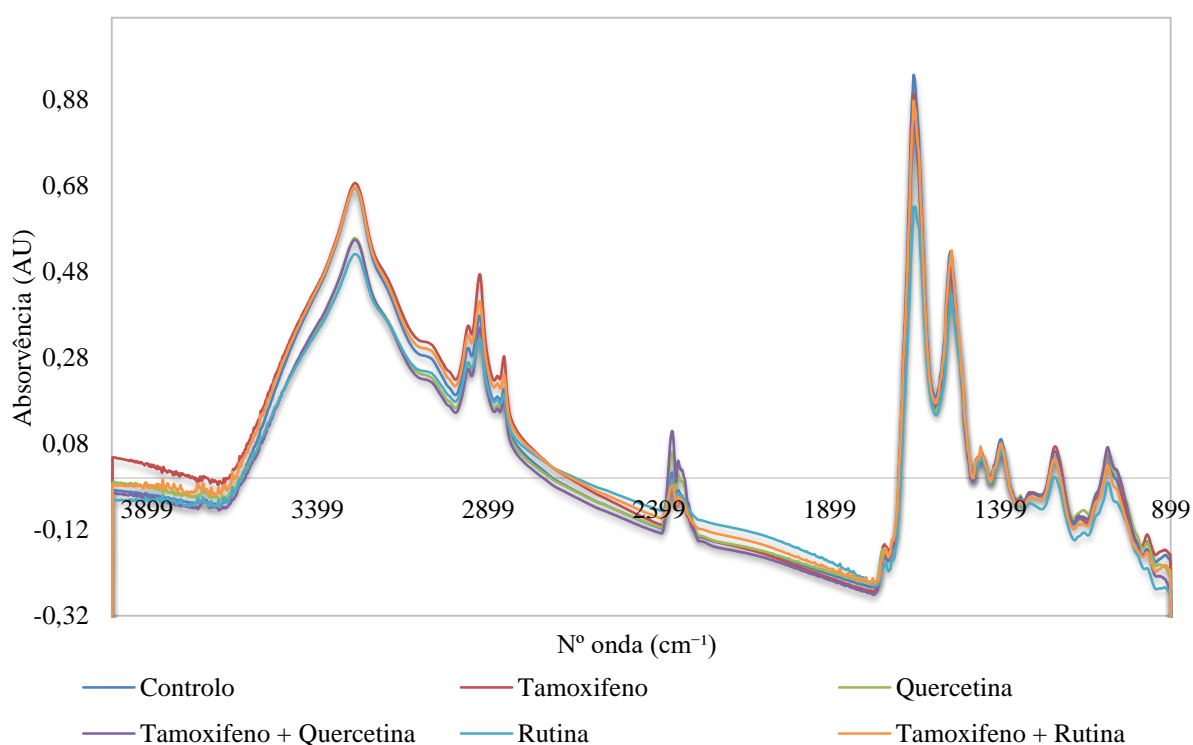


Figura III.27 – Espectro de FTIR obtido para as células MCF-7 tratadas com tamoxifeno e combinação deste com os flavonoides na concentração de DMSO igual a 0,5 %. O espectro foi normalizado para a banda da amida II.

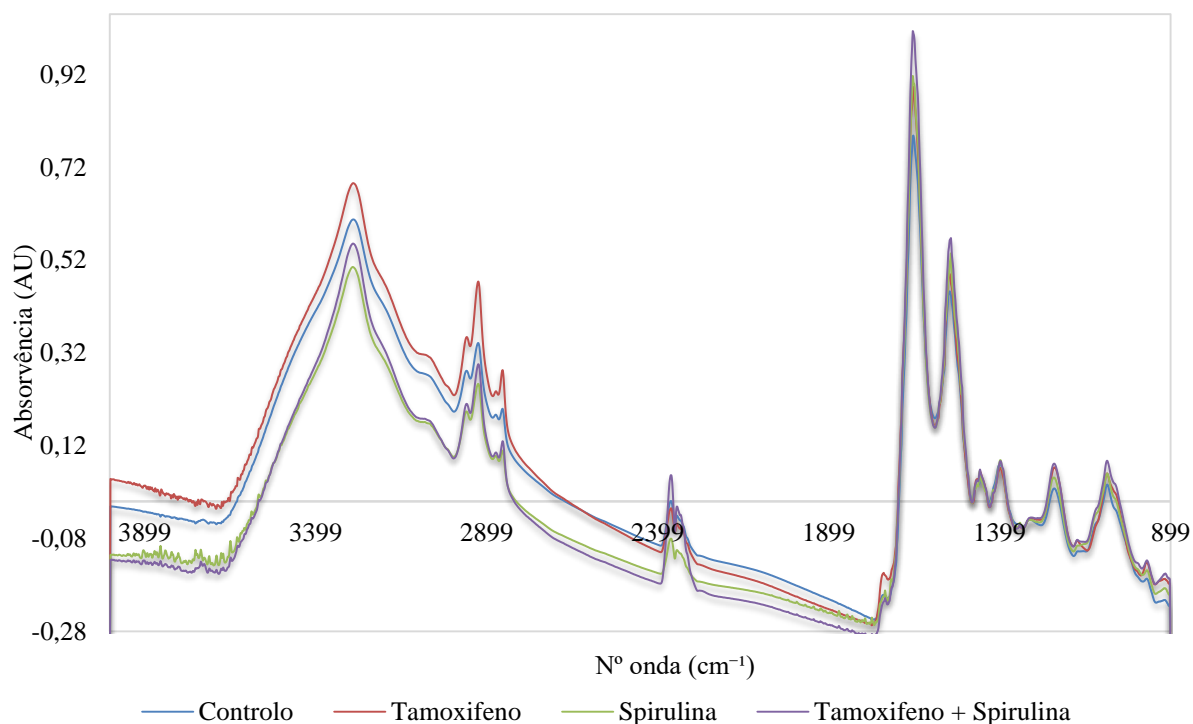


Figura III.28 – Espectro de FTIR obtido para as células MCF-7 tratadas com tamoxifeno e combinação deste com os produtos da digestão de *S. platensis* na concentração de DMSO igual a 0,25 %. O espectro foi normalizado para a banda da amida II. *Spirulina* – produtos da digestão de *S. platensis*.

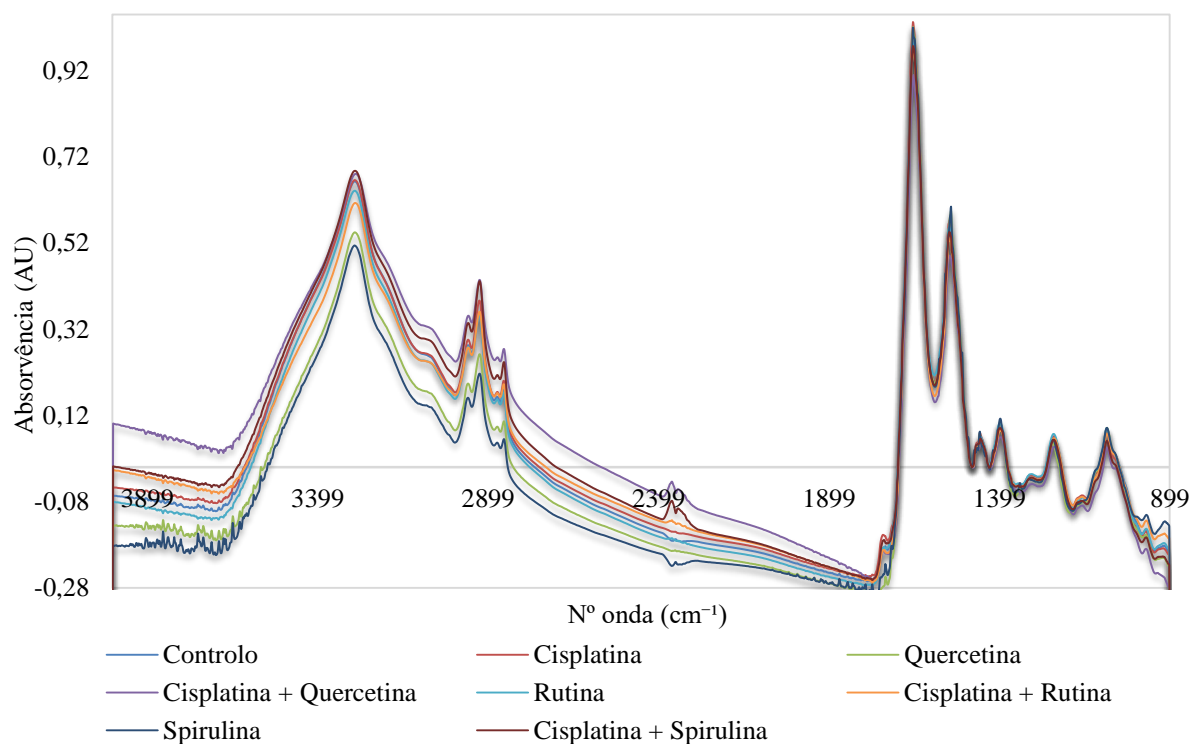


Figura III.29 – Espectro de FTIR obtido para as células MCF-7 tratadas com cisplatina e combinação deste com os produtos naturais na concentração de DMSO igual a 0 %. O espectro foi normalizado para a banda da amida II. *Spirulina* – produtos da digestão de *S. platensis*.

Na incubação das células MCF-7 com o tamoxifeno (**Figura III.30**), observa-se o aumento da razão $v_{as}(CH_2)/Amida\ II$ relativamente ao controlo, indicando uma alteração ao nível dos lípidos devido ao aumento das ligações CH_2 . O aumento das razões $v_{as}(CH_2)/v_{as}(CH_3)$ e $v_{as}(CH_3)/Amida\ II$, relativamente ao controlo, sugere que a alteração nos lípidos ocorreu devido ao aumento das cadeias acilo e da quantidade de lípidos, respetivamente. Para além disso, também é possível observar o aumento do número de carbonilos no sistema, indicado pela razão $v_s(C=O)/Amida\ II$, sugerindo a existência de mais lípidos na forma de fosfolípidos. O estudo efetuado por Luxo *et al.* (2001) refere que devido ao seu carácter lipofílico, o tamoxifeno é fortemente incorporado nas membranas, exercendo uma alteração ao nível da estrutura membranar. Deste modo, as alterações ao nível de lípidos podem dever-se a ação direta do tamoxifeno sobre as membranas. Na presença do tamoxifeno também observa-se o aumento dos níveis dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos. Isto indica a existência de uma maior quantidade de material genético, sugerindo que ocorreu um aumento na síntese do DNA ou na síntese do RNA durante a expressão dos genes em resposta ao tratamento com tamoxifeno. O estudo realizado por Zhang *et al.* (1999) refere que o tamoxifeno exerce uma ação citotóxica nas células MCF-7 com ativação da via intrínseca da apoptose. Isto indica que o tamoxifeno tem a capacidade de induzir a fragmentação do DNA, que por sua vez deveria levar a diminuição dos seus fosfatos associados. Se considerarmos o valor obtido para a razão $v_s(PO_2^-)/Amida\ II$ sem significado, o aumento significativo no tamanho das cadeias e na quantidade de lípidos, também como a existência de mais fosfolípidos, pode ser indicativo da proliferação das membranas para formação de corpos apoptóticos durante a morte celular por apoptose (Bailey *et al.* 2009).

Na incubação das células MCF-7 com a quercetina, na concentração de DMSO igual a 0,5 %, observa-se o aumento do número de ligações CH_2 , relativamente ao controlo, traduzindo-se no aumento das cadeias dos ácidos gordos, sem haver alteração ao nível da sua quantidade. O aumento da razão $v_s(C=O)/Amida\ II$ indica o aumento do nível dos carbonilos no sistema, sugerindo a existência de mais lípidos na forma de fosfolípidos. De acordo com os estudos efetuados por Saija *et al.* (1995) e Pawlikowska-Pawlęga *et al.* (2007) em modelos membranares, a quercetina demonstrou ter a capacidade de interatuar e atravessar a membrana lipídica, causando variações na sua estrutura e fluidez. Deste modo, as alterações observadas ao nível dos lípidos podem dever-se a ação direta da quercetina sobre a membrana das células. Na presença de quercetina, os níveis dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos são comparáveis ao controlo, sugerindo que a quercetina não tem efeito sobre a estrutura dos ácidos nucleicos. Os estudos efetuados por Choi *et al.* (2001) e Chou *et al.* (2010b) indicam a quercetina ter um efeito citotóxico nas células MCF-7, devido a interrupção do ciclo celular e indução da apoptose. No entanto, é de notar que as concentrações da quercetina usadas nestes ensaios correspondem a valores sub-tóxicos, pelo que a sua atividade citotóxica é pouco pronunciada.

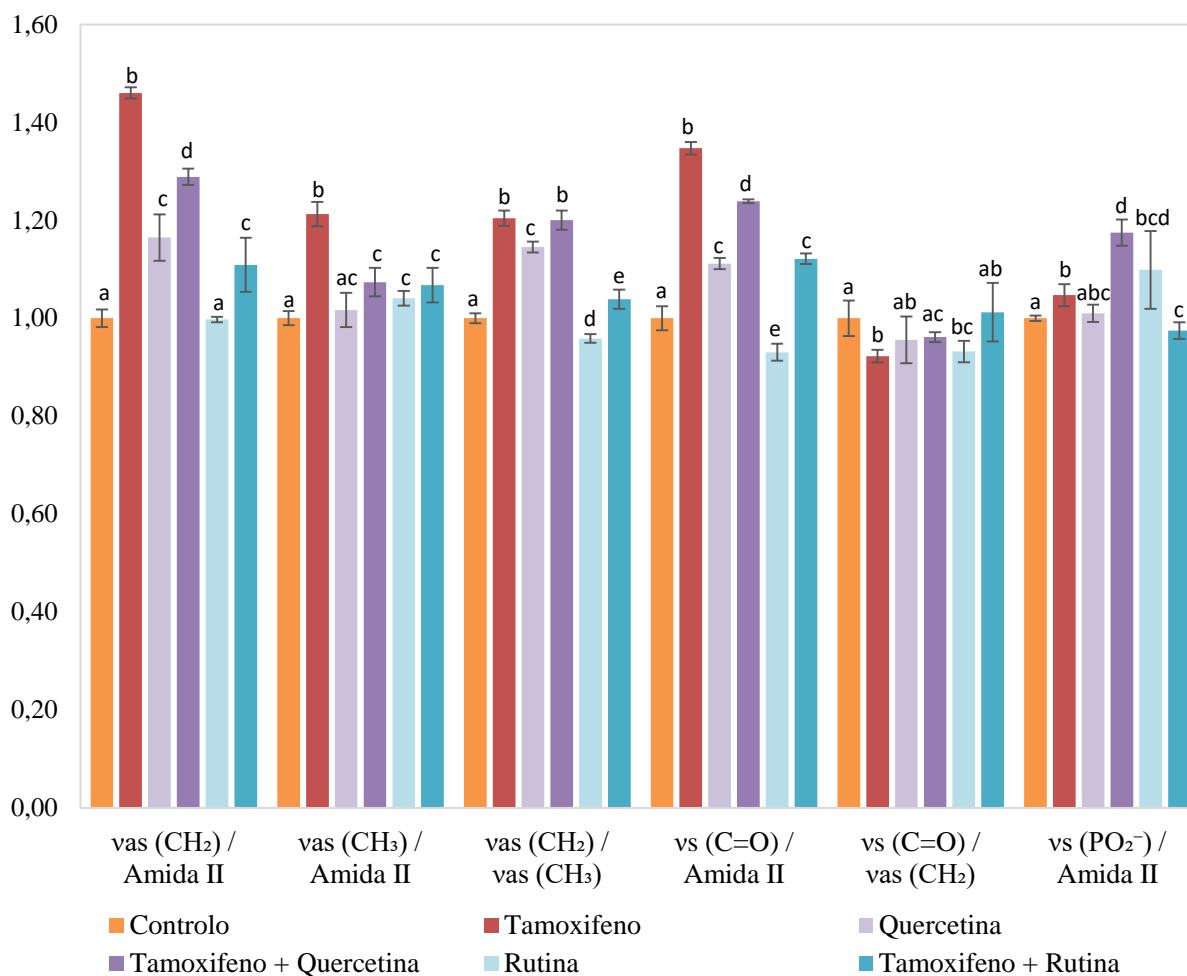


Figura III. 30 – Histograma das razões na altura dos picos de cada banda, obtidos a partir dos espetros de FTIR, para as células MCF-7 tratadas com o tamoxifeno e com os flavonoides, durante 24 horas. O controlo foi normalizado a 1, sendo as restantes amostras normalizadas ao controlo. As mesmas letras indicam valores que não podem ser considerados diferentes (p -value > 0,05) Concentrações usadas (DMSO 0,5 %): tamoxifeno (20,56 μ M), quercetina (80 μ M), tamoxifeno (22,22 μ M) + quercetina (80 μ M), rutina (100 μ M), tamoxifeno (17,15 μ M) + rutina (100 μ M).

Na incubação das células MCF-7 com a combinação do tamoxifeno e da quercetina, observa-se o aumento do número de ligações CH₂ dos lípidos, indicado pela diferença na razão $v_{as}(CH_2)/Amida II$ relativamente ao controlo. Este efeito é significativamente inferior ao tamoxifeno sozinho e superior a quercetina sozinha, sugerindo que o número de ligações CH₂ tende a aumentar na presença do fármaco. A diferença na razão $v_{as}(CH_2)/v_{as}(CH_3)$ indica haver um aumento no tamanho das cadeias dos ácidos gordos, sendo esta alteração comparável ao tamoxifeno sozinho. Para além da alteração observada ao nível do tamanho das cadeias, observa-se o aumento da quantidade de lípidos, sendo esta alteração comparável a quercetina sozinha. Também é possível observar um aumento do número de carbonilos no sistema, indicando um aumento ao nível de fosfolípidos, pelo que este efeito parece ter a tendência a aumentar com o tamoxifeno. A diferença na razão $v_s(PO_2^-)/Amida II$, relativamente ao controlo, indica o aumento dos níveis dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos. Dado que a diferença na razão $v_s(PO_2^-)/Amida II$ é significativamente superior aos compostos testados em separado, sugere-se que o efeito resultante deve-se a interação entre os compostos. O aumento dos níveis dos fosfatos indicam a existência de mais DNA ou RNA, possivelmente devido ao aumento da síntese do DNA durante a proliferação celular ou aumento da síntese do RNA durante a expressão dos genes induzidos pela presença dos compostos.

Nas células MCF-7 incubadas com rutina, na concentração de DMSO igual a 0,5 % observa-se uma diminuição do tamanho das cadeias dos ácidos gordos, caracterizado pelo aumento de $v_{as}(CH_3)/Amida\ II$ e diminuição de $v_{as}(CH_2)/v_{as}(CH_3)$. Para além disso observa-se uma diminuição na quantidade de carbonilos, existindo menos lípidos na forma de fosfolípidos. Estas alterações ao nível dos lípidos podem dever-se aos processos bioquímicos que normalmente ocorrem nos lípidos, como a formação de vesículas no processo de reciclagem de resíduos celulares. O aumento dos fosfatos dos ácidos nucleicos é indicativo de que existe mais DNA ou RNA, sugerindo que possivelmente ocorreu um aumento na síntese do DNA durante a proliferação celular ou do RNA devido a expressão dos genes induzidos pela rutina. Este resultado apoia os dados obtidos nos ensaios de citotoxicidade pelo que a rutina parece não ter efeito tóxico sobre as células MCF-7.

Na incubação das células MCF-7 com a combinação do tamoxifeno e da rutina, observa-se o aumento do número de ligações CH_2 dos lípidos, com tendência a aumentar na presença do fármaco. Esta alteração deve-se ao aumento do tamanho das cadeias dos ácidos gordos, que parece ter a tendência a aumentar com o tamoxifeno e também ao aumento na sua quantidade, sendo esta última alteração comparável a apresentada pela rutina sozinha. Também observa-se um aumento na quantidade de carbonilos no sistema, significando a existência de mais lípidos na forma de fosfolípidos, com tendência a aumentar na presença do tamoxifeno. A diferença na razão $v_s(PO_2^-)/Amida\ II$ relativamente ao controlo, indica haver uma diminuição dos níveis dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos. Deste modo, a diminuição dos fosfatos, devido a fragmentação do DNA e o aumento de fosfolípidos pode ser indicativo de ocorrência de apoptose (Nagata *et al.* 2003).

A incubação das células com tamoxifeno cuja concentração final de DMSO é igual a 0,25 % (**Figura III.31**) demonstra os mesmos efeitos quando incubadas com o fármaco na presença de 0,5 % de DMSO.

Quando as células foram incubadas com os produtos da digestão de *S. platensis*, observa-se uma alteração ao nível dos lípidos nomeadamente a diminuição na sua quantidade e também no aumento das cadeias acilo, existindo mais lípidos na forma de fosfolípidos. Para além disso, também observa-se uma diminuição na quantidade dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos. Estas observações sugerem, que a diminuição dos fosfatos deve-se a fragmentação do DNA, que juntamente com as alterações nos lípidos caracterizam a morte celular por apoptose. Este resultado é consistente com os estudos de citotoxicidade, observando-se para a mesma concentração de produtos uma viabilidade celular igual a 88 %. Quando as células foram incubadas com a combinação do tamoxifeno e dos produtos da digestão de *S. platensis*, observa-se o aumento das ligações CH_2 dos lípidos, com tendência a aumentar na presença do tamoxifeno. Este aumento deu-se devido ao aumento das cadeias dos ácidos gordos e à diminuição da quantidade de lípidos, sendo que estas alterações têm a tendência a aumentar com o tamoxifeno. Também observa-se um aumento da quantidade de carbonilos pelo que o aumento na quantidade é traduzido na formação de mais fosfolípidos, sendo este efeito causado pelos produtos resultantes da digestão. Quanto aos fosfatos existe um maior nível dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos, provavelmente, devido ao aumento da síntese de DNA, durante a proliferação celular ou da síntese do RNA, durante a expressão dos genes induzidos pela ação dos produtos nas células MCF-7.

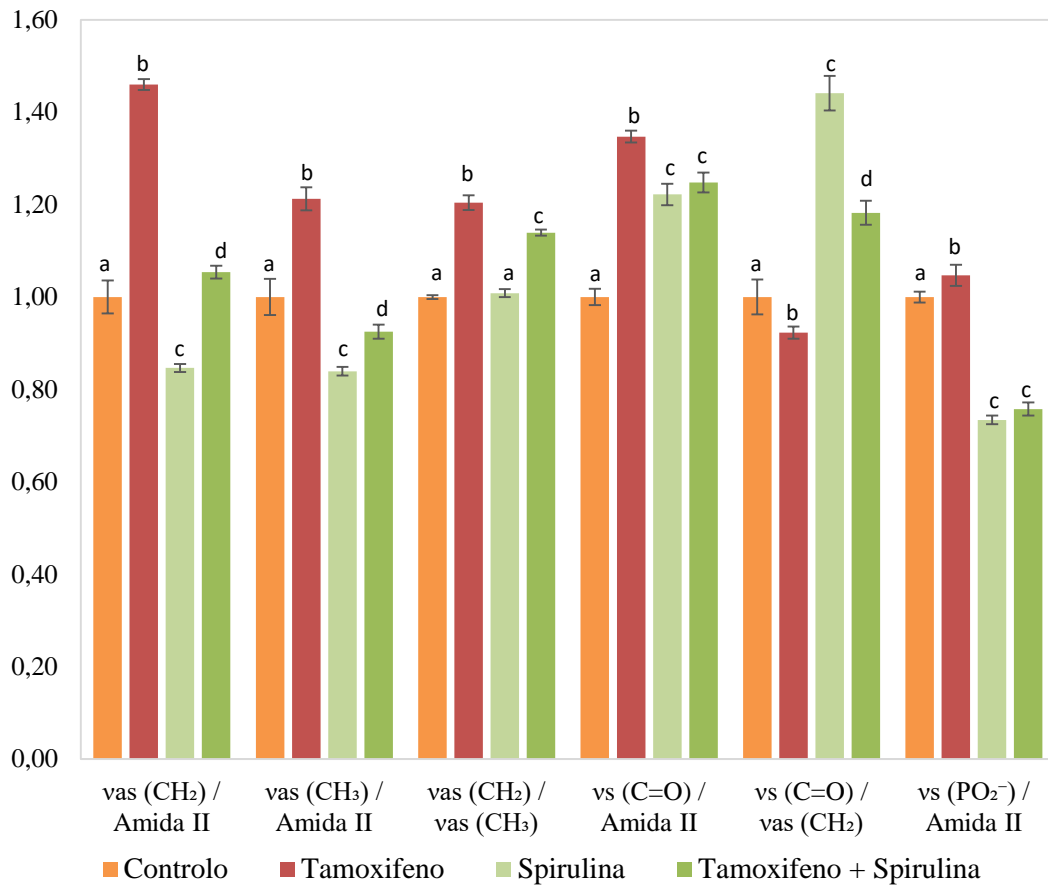


Figura III. 31 – Histograma das razões nas alturas dos picos de cada banda, obtidos a partir dos espectros de FTIR, para as células MCF-7 tratadas com o tamoxifeno e com os produtos da digestão de *S. platensis*, durante 24 horas. O controlo foi normalizado a 1, sendo as restantes amostras normalizadas ao controlo. As mesmas letras indicam valores que não podem ser considerados diferentes (p -value > 0,05). Concentrações usadas (DMSO 0,25 %): tamoxifeno (20,56 μ M), produtos da digestão de *S. platensis* (1 mg/mL), tamoxifeno (23,09 μ M) + produtos da digestão de *S. platensis* (1 mg/mL).

No caso de cisplatina (**Figura III.32**) observa-se uma diferença na razão $v_{as}(CH_2)/Amida\ II$ relativamente ao controlo, indicando uma diminuição ao nível de ligações CH_2 dos lípidos. Esta alteração deve-se ao aumento das cadeias dos ácidos gordos e também à diminuição na sua quantidade. Para além disso, observa-se uma diminuição do número de carbonilos no sistema, significando a existência de menos lípidos na forma de fosfolípidos. A diferença na razão $v_s(PO_2^-)/Amida\ II$ indica uma diminuição dos níveis dos associados aos ácidos nucleicos. De acordo com Yde and Issinger (2006), a cisplatina tem a capacidade de formar adutos com a estrutura de DNA, levando a sua destruição e, conseqüentemente, a ativação das vias apoptóticas. Deste modo, os resultados obtidos sugerem que a diminuição dos níveis dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos deve-se à sua fragmentação, com o rearranjo na composição dos lípidos membranares para formação de corpos apoptóticos (Elmore 2007).

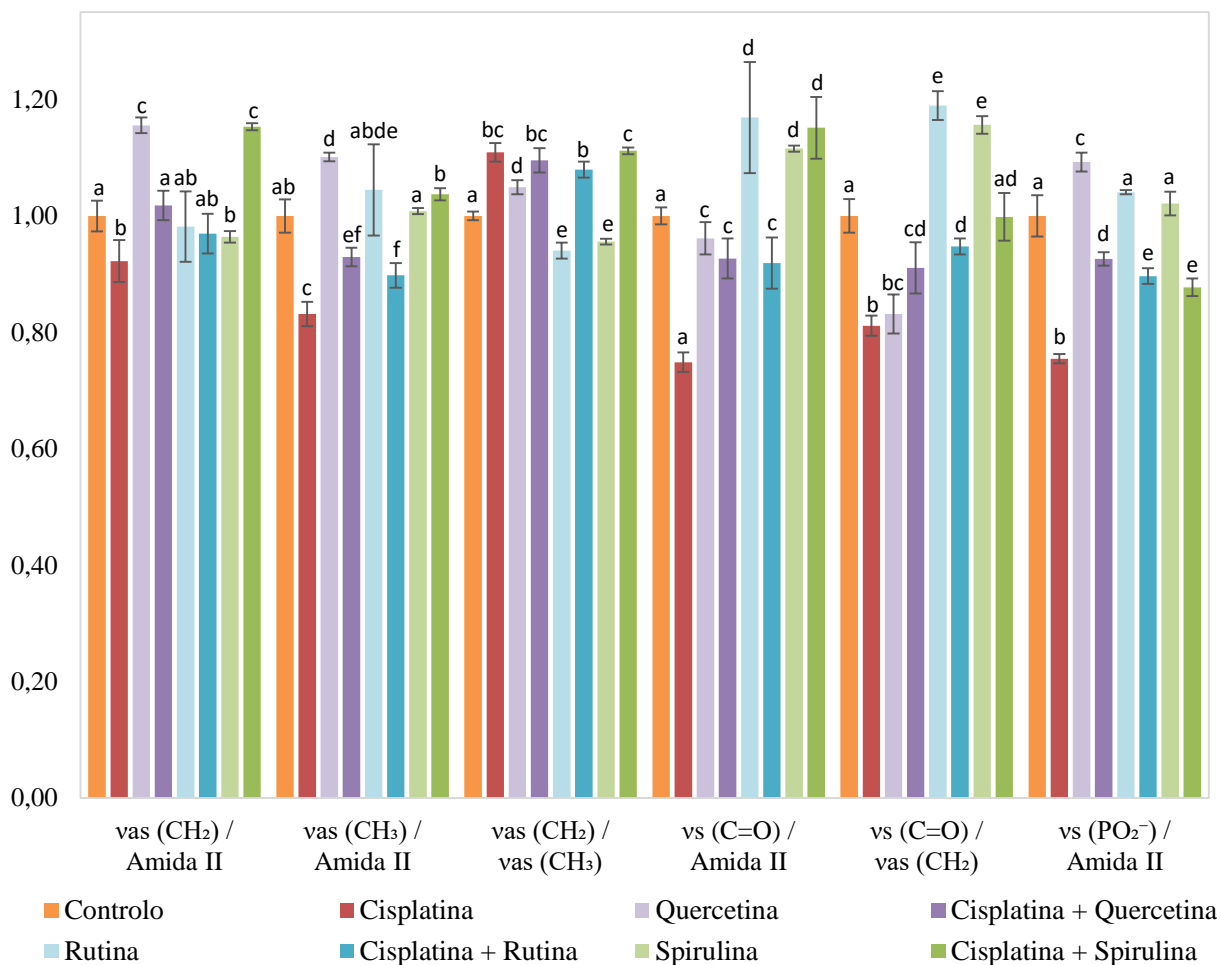


Figura III.32 – Histograma das razões na altura dos picos de cada banda, obtidos a partir dos espectros de espectroscopia de FTIR, para as células MCF-7, tratadas com a cisplatina e com os produtos naturais, durante 24 horas. O controlo foi normalizado a 1, sendo as restantes amostras normalizadas ao controlo. As mesmas letras indicam valores que não podem ser considerados diferentes (p -value > 0,05). Concentrações usadas (DMSO 0 %): cisplatina (7,76 μ M), quercetina (80 μ M), cisplatina (8,30 μ M) + quercetina (80 μ M), rutina (100 μ M), cisplatina (9,00 μ M) + rutina (100 μ M), produtos da digestão de *S. platensis* (1 mg/mL), cisplatina (8,29 μ M) + produtos da digestão de *S. platensis* (1 mg/mL).

Quando as células foram tratadas com a combinação da cisplatina e da quercetina observa-se o aumento das cadeias dos ácidos gordos, sem haver alteração na sua quantidade. Este alongamento das cadeias parece dever-se à cisplatina, dado que o efeito produzido é semelhante ao causado pela cisplatina sozinha. Também observa-se uma diminuição da quantidade dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos, indicando fragmentação do DNA durante a apoptose, com tendência de diminuir na presença da cisplatina.

A incubação das células com a rutina na concentração de DMSO igual a 0 % observa-se uma diminuição do tamanho das cadeias dos ácidos gordos, existindo, para além disso, mais lípidos na forma de fosfolípidos. Também observa-se uma alteração ao nível dos ácidos nucleicos com a diminuição dos seus fosfatos associados, sugerindo a possível fragmentação do DNA que juntamente com o aumento de fosfolípidos, caracterizam o processo de apoptose. Estes resultados são diferentes dos obtidos para a rutina na concentração de DMSO igual a 0,5 %, sugerindo que o solvente tem um papel interferente na ação da rutina.

Quando as células foram incubadas com a cisplatina e a rutina observa-se um aumento das cadeias dos ácidos gordos e este efeito parece ter tendência a aumentar com o fármaco. Observa-se também uma diminuição do nível dos carbonilos relativamente ao conteúdo proteico, sugerindo a existência de menos lípidos na forma de fosfolípidos, com tendência a diminuir na presença do tamoxifeno. Para além disso, observa-se uma diminuição dos níveis dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos, sugerindo a ocorrência de fragmentação que juntamente com as alterações observadas na composição dos lípidos caracterizam a morte celular por apoptose (Nagata *et al.* 2003).

Quando as células foram incubadas com os produtos da digestão de *S. platensis* observa-se a diminuição do número de ligações CH₂ dos lípidos. Esta alteração deu-se devido a diminuição do tamanho das cadeias dos ácidos gordos. Para além disso, também observa-se a existência de mais lípidos na forma de fosfolípidos. Quanto ao nível dos ácidos nucleicos não se observa qualquer efeito ao nível dos seus fosfatos associados. As alterações observadas nos lípidos podem dever-se a formação de vesículas que ocorre durante o processo de reciclagem de resíduos celulares.

Na incubação das células com a combinação da cisplatina e dos produtos da digestão de *S. platensis* observa-se um aumento de ligações CH₂ dos lípidos, que parece resultar do efeito da interação entre os compostos. Esta alteração deu-se devido ao aumento do tamanho das cadeias dos ácidos gordos, com tendência a aumentar na presença da cisplatina e ao aumento na sua quantidade, que parece resultar do efeito da interação entre os compostos. Para além disso, observa-se um aumento dos carbonilos relativamente ao conteúdo proteico indicando a existência de mais lípidos na forma de fosfolípidos, sendo o efeito semelhante ao causado pelos produtos da digestão sozinhos. Também é possível observar uma diminuição dos níveis dos fosfatos associados com tendência a diminuir na presença da cisplatina. Deste modo, a diminuição dos fosfatos, provavelmente, devido a fragmentação do DNA e o rearranjo na composição dos lípidos sugerem a ocorrência de morte celular por apoptose (Elmore 2007).

Conclui-se com os estudos de espectroscopia de FTIR que a presença dos produtos naturais altera o efeito que os fármacos têm sobre o metabolismo celular, introduzindo alterações especialmente ao nível do rearranjo dos lípidos constituintes da membrana e ao nível dos fosfatos associados aos ácidos nucleicos. Estas alterações poderão estar associadas ao processo de morte celular por apoptose.

IV. Conclusões e trabalho futuro

Os compostos naturais testados demonstraram alterar o efeito dos fármacos usados na quimioterapia de cancro:

- A quercetina demonstrou aumentar o efeito citotóxico do tamoxifeno e diminuir o efeito da cisplatina nas células HeLa, pelo que este flavonoide sugere interagir com as vias apoptóticas induzidas pelos fármacos. Nas células MCF-7, a quercetina demonstrou apenas interferir no mecanismo de ação da cisplatina, diminuindo o seu efeito tóxico.
- A rutina demonstrou diminuir a atividade citotóxica de tamoxifeno nas células HeLa e da cisplatina nas células MCF-7, possivelmente devido ao seu papel antioxidante.
- Os péptidos resultantes da digestão de *S. platensis* demonstraram ter um papel na diminuição do efeito citotóxico da cisplatina nas células HeLa e da cisplatina e tamoxifeno nas células MCF-7.

A modulação da citotoxicidade do tamoxifeno pelos produtos naturais poderá ser devida alteração da metabolização deste pró-fármaco. A metabolização do tamoxifeno demonstrou ser muito difícil de ser analisada por técnicas como HPLC-DAD e FTIR quando presente em amostras biológicas. Mais estudos necessitam ser realizados para desenvolver uma metodologia que permita analisar o tamoxifeno e seus metabolitos em amostras biológicas, onde estes se parecem associar fortemente a proteínas.

Para uma melhor compreensão do efeito da interação dos fármacos com os produtos naturais em trabalho futuro seria interessante efetuar estudos em células não tumorais, que permitirão observar o efeito dos produtos sobre os danos causados pelos fármacos em células normais, o que poderá justificar o teste de novas combinações de fármacos com produtos naturais *in vivo*.

Referências bibliográficas

- Afanas'ev, Igor B., Anatolii I. Derozhko, Aleksander V. Brodskii, Vladimir A. Kostyuk, and Alla I. Potapovitch. 1989. "Chelating and Free Radical Scavenging Mechanisms of Inhibitory Action of Rutin and Quercetin in Lipid Peroxidation." *Biochemical Pharmacology* 38 (11):1763–69. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90410-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90410-3).
- Akbas, S. Halide, Mujgan Timur, and Tomris Ozben. 2005. "The Effect of Quercetin on Topotecan Cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB 231 Human Breast Cancer Cells1." *Journal of Surgical Research* 125 (1):49–55. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.11.011>.
- Akers, Johnny C., David Gonda, Ryan Kim, Bob S. Carter, and Clark C. Chen. 2013. "Biogenesis of Extracellular Vesicles (EV): Exosomes, Microvesicles, Retrovirus-like Vesicles, and Apoptotic Bodies." *Journal of Neuro-Oncology* 113 (1):1–11. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>.
- Bailey, Rachel W., Thaothanh Nguyen, Leslie Robertson, Elizabeth Gibbons, Jennifer Nelson, Ryan E. Christensen, Jacob P. Bell, Allan M. Judd, and John D. Bell. 2009. "Sequence of Physical Changes to the Cell Membrane During Glucocorticoid-Induced Apoptosis in S49 Lymphoma Cells." *Biophysical Journal* 96 (7):2709–18. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.3925>.
- Bamberg, K.R., E. Schültke, B.R. Wood, S.T. Ringley MacDonald, K. Ataelmannan, R.W. Griebel, B.H.J. Juurlink, and D. McNaughton. 2006. "A Fourier Transform Infrared Microspectroscopic Imaging Investigation into an Animal Model Exhibiting Glioblastoma Multiforme." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758 (7):900–907. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.004>.
- Basu, Alakananda, and Soumya Krishnamurthy. 2010. "Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage." *Journal of Nucleic Acids* 2010:1–16. <https://doi.org/10.4061/2010/201367>.
- Bennett, A., and L. Bogorad. 1973. "Complementary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue-Green Alga." *The Journal of Cell Biology* 58 (2):419–35.
- Bilge, Duygu, Nadide Kazanci, and Feride Severcan. 2013. "Acyl Chain Length and Charge Effect on Tamoxifen–lipid Model Membrane Interactions." *Journal of Molecular Structure* 1040 (May):75–82. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2013.02.031>.
- Borlak, J., and C. Zwiadlo. 2003. "Expression of Drug-Metabolizing Enzymes, Nuclear Transcription Factors and ABC Transporters in Caco-2 Cells." *Xenobiotica* 33 (9):927–43. <https://doi.org/10.1080/00498250310001614286>.
- Bourassa, P., S. Dubeau, Ghulam M. Maharvi, Abdul H. Fauq, T.J. Thomas, and H.A. Tajmir-Riahi. 2011. "Binding of Antitumor Tamoxifen and Its Metabolites 4-Hydroxytamoxifen and Endoxifen to Human Serum Albumin." *Biochimie* 93 (7):1089–1101. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.03.006>.
- Chaurio, Ricardo A., Christina Janko, Luis E. Muñoz, Benjamin Frey, Martin Herrmann, and Udo S. Gaipl. 2009. "Phospholipids: Key Players in Apoptosis and Immune Regulation." *Molecules* 14 (12):4892–4914. <https://doi.org/10.3390/molecules14124892>.
- Chen, J. 2002. "Metabolism of Flavonoids via Enteric Recycling: Role of Intestinal Disposition." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 304 (3):1228–35. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.046409>.
- Chen, S.-S., J. Gong, F.-T. Liu, and U. Mohammed. 2000. "Naturally Occurring Polyphenolic Antioxidants Modulate IgE-Mediated Mast Cell Activation." *Immunology* 100 (4):471–480.
- Choi, Jung-A., Ja-Young Kim, Jeong-Yim Lee, Chang-Mo Kang, Ho-Jeong Kwon, Young-Do Yoo, Tae-Whan Kim, Yun-Sil Lee, and Su-Jae Lee. 2001. "Induction of Cell Cycle Arrest and

- Apoptosis in Human Breast Cancer Cells by Quercetin.” *International Journal of Oncology* 19 (4):837–844.
- Chou, Chu-Chung, Jai-Sing Yang, Hsu-Feng Lu, Siu-Wan Ip, Chyi Lo, Chih-Chung Wu, Jing-Pin Lin, et al. 2010a. “Quercetin-Mediated Cell Cycle Arrest and Apoptosis Involving Activation of a Caspase Cascade through the Mitochondrial Pathway in Human Breast Cancer MCF-7 Cells.” *Archives of Pharmacal Research* 33 (8):1181–91. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0808-y>.
- . 2010b. “Quercetin-Mediated Cell Cycle Arrest and Apoptosis Involving Activation of a Caspase Cascade through the Mitochondrial Pathway in Human Breast Cancer MCF-7 Cells.” *Archives of Pharmacal Research* 33 (8):1181–91. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0808-y>.
- Cuellar-Bermudez, Sara P., Iris Aguilar-Hernandez, Diana L. Cardenas-Chavez, Nancy Ornelas-Soto, Miguel A. Romero-Ogawa, and Roberto Parra-Saldivar. 2015. “Extraction and Purification of High-Value Metabolites from Microalgae: Essential Lipids, Astaxanthin and Phycobiliproteins: High-Value Metabolites Form Algae.” *Microbial Biotechnology* 8 (2):190–209. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12167>.
- Danihelová, Martina, Miroslav Veverka, Ernest Šturdík, and Soňa Jantová. 2013. “Antioxidant Action and Cytotoxicity on HeLa and NIH-3T3 Cells of New Quercetin Derivatives.” *Interdisciplinary Toxicology* 6 (4). <https://doi.org/10.2478/intox-2013-0031>.
- Dasari, Shaloam, and Paul Bernard Tchounwou. 2014. “Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action.” *European Journal of Pharmacology* 740 (October):364–78. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
- Di Carlo, G., N. Mascolo, A. A. Izzo, and F. Capasso. 1999. “Flavonoids: Old and New Aspects of a Class of Natural Therapeutic Drugs.” *Life Sciences* 65 (4):337–53.
- Duthie, S. J., W. T. Melvin, and M. D. Burke. 1995. “Drug Toxicity Mechanisms in Human Hepatoma HepG2 Cells: Cyclosporin A and Tamoxifen.” *Xenobiotica* 25 (10):1151–64. <https://doi.org/10.3109/00498259509061915>.
- Elmore, Susan. 2007. “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.” *Toxicologic Pathology* 35 (4):495–516.
- Fasinu, Pius, Patrick J Bouic, and Bernd Rosenkranz. 2012. “Liver-Based in Vitro Technologies for Drug Biotransformation Studies—a Review.” *Current Drug Metabolism* 13 (2):215–224.
- Flier, Arjan van der, and Arnoud Sonnenberg. 2001. “Function and Interactions of Integrins.” *Cell and Tissue Research* 305 (3):285–98. <https://doi.org/10.1007/s004410100417>.
- Flores Hernandez, Flor Yohana, Sanghamitra Khandual, and Inocencia Guadalupe Ramírez López. 2017. “Cytotoxic Effect of *S. platensis* Platensis Extracts on Human Acute Leukemia Kasumi-1 and Chronic Myelogenous Leukemia K-562 Cell Lines.” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7 (1):14–19. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.10.011>.
- Frank, Éva, Zoltán Mucsi, István Zupkó, Borbála Réthy, George Falkay, Gyula Schneider, and János Wölfling. 2009. “Efficient Approach to Androstene-Fused Arylpyrazolines as Potent Antiproliferative Agents. Experimental and Theoretical Studies of Substituent Effects on BF₃-Catalyzed Intramolecular [3 + 2] Cycloadditions of Olefinic Phenylhydrazones.” *Journal of the American Chemical Society* 131 (11):3894–3904. <https://doi.org/10.1021/ja808636e>.
- Fried, Karen M., and Irving W. Wainer. 1994. “Direct Determination of Tamoxifen and Its Four Major Metabolites in Plasma Using Coupled Column High-Performance Liquid Chromatography.” *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 655 (2):261–268.
- Furuya, Y., N. Kohno, Y. Fujiwara, and Y. Saitoh. 1989. “Mechanisms of Estrogen Action on the Proliferation of MCF-7 Human Breast Cancer Cells in an Improved Culture Medium.” *Cancer Research* 49 (23):6670–74.
- Gad, Ahmed S., Yasser A. Khadrawy, Aziza A. El-Nekeety, Sherif R. Mohamed, Nabila S. Hassan, and Mosaad A. Abdel-Wahhab. 2011. “Antioxidant Activity and Hepatoprotective Effects of

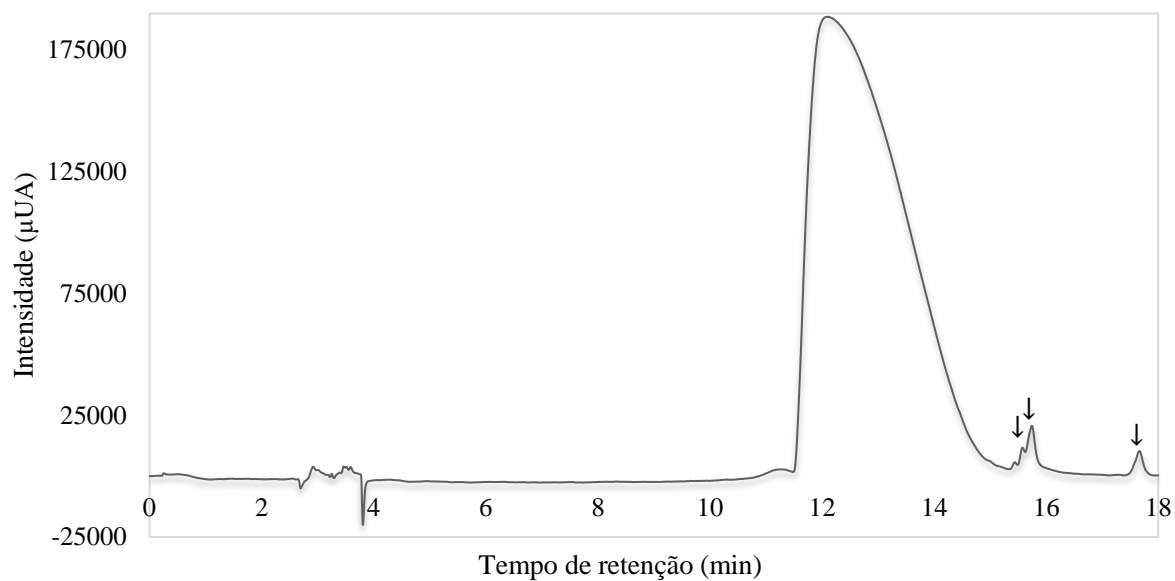
- Whey Protein and *S. platensis* in Rats.” *Nutrition* 27 (5):582–89. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.04.002>.
- Galati, Giuseppe, and Peter J O’Brien. 2004. “Potential Toxicity of Flavonoids and Other Dietary Phenolics: Significance for Their Chemopreventive and Anticancer Properties.” *Free Radical Biology and Medicine* 37 (3):287–303. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034>.
- Gasparri, Fabio, and Marta Muzio. 2003. “Monitoring of Apoptosis of HL60 Cells by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy.” *Biochemical Journal* 369 (2):239–248.
- Geiger, Benjamin, Alexander Bershadsky, Roumen Pankov, and Kenneth M. Yamada. 2001. “Transmembrane Crosstalk between the Extracellular Matrix and the Cytoskeleton.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (11):793.
- Gerber, B., C. Scholz, T. Reimer, V. Briese, and W. Janni. 2006. “Complementary and Alternative Therapeutic Approaches in Patients with Early Breast Cancer: A Systematic Review.” *Breast Cancer Research and Treatment* 95 (3):199–209. <https://doi.org/10.1007/s10549-005-9005-y>.
- Gonzales, Gerard Bryan, Guy Smaghe, Charlotte Grootaert, Moises Zotti, Katleen Raes, and John Van Camp. 2015. “Flavonoid Interactions during Digestion, Absorption, Distribution and Metabolism: A Sequential Structure-Activity/Property Relationship-Based Approach in the Study of Bioavailability and Bioactivity.” *Drug Metabolism Reviews* 47 (2):175–90. <https://doi.org/10.3109/03602532.2014.1003649>.
- Jaiyesimi, Ishmael A., Aman U. Buzdar, David A. Decker, and Gabriel N. Hortobagyi. 1995. “Use of Tamoxifen for Breast Cancer: Twenty-Eight Years Later.” *Journal of Clinical Oncology* 13 (2):513–529.
- Jiang, Wen, and Ming Hu. 2012. “Mutual Interactions between Flavonoids and Enzymatic and Transporter Elements Responsible for Flavonoid Disposition via Phase II Metabolic Pathways.” *RSC Advances* 2 (21):7948. <https://doi.org/10.1039/c2ra01369j>.
- Jordan, P., and M. Carmo-Fonseca. 2000. “Molecular Mechanisms Involved in Cisplatin Cytotoxicity.” *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 57 (8–9):1229–1235.
- Jordan, V. Craig. 1993. “A Current View of Tamoxifen for the Treatment and Prevention of Breast Cancer.” *British Journal of Pharmacology* 110 (2):507–17. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13840.x>.
- Kashyap, Dharambir, Sonam Mittal, Katrin Sak, Paavan Singhal, and Hardeep Singh Tuli. 2016. “Molecular Mechanisms of Action of Quercetin in Cancer: Recent Advances.” *Tumor Biology* 37 (10):12927–39. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5184-x>.
- Khadka, Nawal K., Xiaolin Cheng, Chian Sing Ho, John Katsaras, and Jianjun Pan. 2015. “Interactions of the Anticancer Drug Tamoxifen with Lipid Membranes.” *Biophysical Journal* 108 (10):2492–2501. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.010>.
- Khalili, Amelia, and Mohd Ahmad. 2015. “A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications.” *International Journal of Molecular Sciences* 16 (8):18149–84. <https://doi.org/10.3390/ijms160818149>.
- Khar, A., and A. M. Ali. 1987. “Serum Protects HeLa Cells from Antiestrogen Effects in Culture.” *European Journal of Cancer & Clinical Oncology* 23 (6):761–63.
- Kumar, Vijay, Stephen Green, Gary Stack, Meera Berry, Jia-Rui Jin, and Pierre Chambon. 1987. “Functional Domains of the Human Estrogen Receptor.” *Cell* 51 (6):941–951.
- Lamson, D. W., and M. S. Brignall. 1999. “Antioxidants in Cancer Therapy; Their Actions and Interactions with Oncologic Therapies.” *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic* 4 (5):304–29.
- Lewis-Wambi, Joan S., and V. Craig Jordan. 2009. “Estrogen Regulation of Apoptosis: How Can One Hormone Stimulate and Inhibit?” *Breast Cancer Research* 11 (3):206.

- Li, Bing, Mei-Hua Gao, Xue-Cheng Zhang, and Xian-Ming Chu. 2006. "Molecular Immune Mechanism of C-Phycocyanin from *S. platensis* Platensis Induces Apoptosis in HeLa Cells in Vitro." *Biotechnology and Applied Biochemistry* 43 (3):155. <https://doi.org/10.1042/BA20050142>.
- Li, Cheng, Sung-Cil Lim, Jin Kim, and Jun-Shik Choi. 2011. "Effects of Myricetin, an Anticancer Compound, on the Bioavailability and Pharmacokinetics of Tamoxifen and Its Main Metabolite, 4-Hydroxytamoxifen, in Rats." *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 36 (3):175–82. <https://doi.org/10.1007/s13318-011-0036-y>.
- Li, Yan, and James W Paxton. 2013. "The Effects of Flavonoids on the ABC Transporters: Consequences for the Pharmacokinetics of Substrate Drugs." *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 9 (3):267–85. <https://doi.org/10.1517/17425255.2013.749858>.
- Liu, Youqing, Hui Xing, Xiaobing Han, Xiaoyan Shi, Fengqi Liang, Gang Chen, and Ding Ma. 2005. "The Mechanism of Cisplatin-Induced Apoptosis in HeLa Cells." *Chinese Journal of Clinical Oncology* 2 (6):866–869.
- Liu, Yufeng, Lizhi Xu, Ni Cheng, Lijun Lin, and Chengwu Zhang. 2000. "Inhibitory Effect of Phycocyanin from *S. platensis* Platensis on the Growth of Human Leukemia K562 Cells." *Journal of Applied Phycology* 12 (2):125–130.
- Luxo, C., A. S. Jurado, J. B. Custódio, and V. M. Madeira. 2001. "Toxic Effects of Tamoxifen on the Growth and Respiratory Activity of *Bacillus Stearothermophilus*." *Toxicology in vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 15 (4–5):303–5.
- Monteiro, Luara de Sousa, Katherine Xavier Bastos, José Maria Barbosa-Filho, Petrônio Filgueiras de Athayde-Filho, Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, and Marianna Vieira Sobral. 2014. "Medicinal Plants and Other Living Organisms with Antitumor Potential against Lung Cancer." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014:1–15. <https://doi.org/10.1155/2014/604152>.
- Mosmann, T. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods* 65 (1–2):55–63.
- Nagata, S., H. Nagase, K. Kawane, N. Mukae, and H. Fukuyama. 2003. "Degradation of Chromosomal DNA during Apoptosis." *Cell Death & Differentiation* 10 (1):108–116.
- Narayana, K. Raj, M. Spiral Reddy, M. R. Chaluvadi, and D. R. Krishna. 2001. "Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential." *Indian Journal of Pharmacology* 33 (1):2–16.
- Obrero, Maria, David V. Yu, and David J. Shapiro. 2002. "Estrogen Receptor-Dependent and Estrogen Receptor-Independent Pathways for Tamoxifen and 4-Hydroxytamoxifen-Induced Programmed Cell Death." *Journal of Biological Chemistry* 277 (47):45695–703. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208092200>.
- Oliveira, Naila Francis Paulo de, Selma Candelária Genari, and Heidi Dolder. 2010. "Cell Death Induced by Tamoxifen in Human Blood Lymphocytes Cultivated in Vitro." *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 32 (4). <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v32i4.7015>.
- Pardhasaradhi, Bobbili VV, A. Mubarak Ali, A. Leela Kumari, Pallu Reddanna, and Ashok Khar. 2003. "Phycocyanin-Mediated Apoptosis in AK-5 Tumor Cells Involves down-Regulation of Bcl-2 and Generation of ROS." *Molecular Cancer Therapeutics* 2 (11):1165–1170.
- Pawlikowska-Pawłęga, Bożena, Wiesław Ignacy Gruszecki, Lucjan Misiak, Roman Paduch, Tomasz Piersiak, Barbara Zarzyka, Jarosław Pawelec, and Antoni Gawron. 2007. "Modification of Membranes by Quercetin, a Naturally Occurring Flavonoid, via Its Incorporation in the Polar Head Group." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1768 (9):2195–2204. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.05.027>.

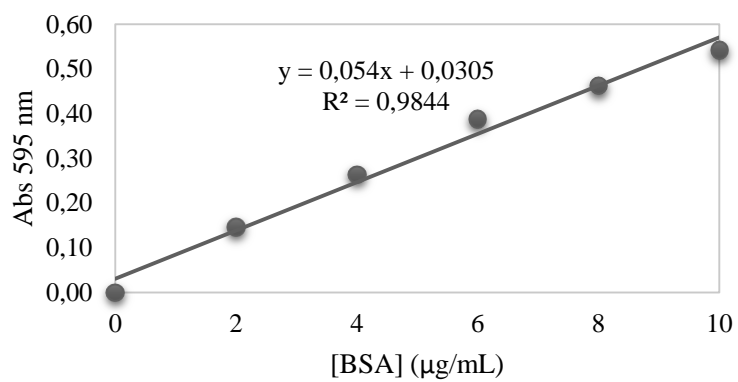
- Ranganathan, Santhalakshmi, Devaraj Halagowder, and Niranjali Devaraj Sivasithambaram. 2015. "Quercetin Suppresses Twist to Induce Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells." Edited by Pankaj K Singh. *PLOS ONE* 10 (10):e0141370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141370>.
- Ravi, Mathangi, Shilpa Tentu, Ganga Baskar, Surabhi Rohan Prasad, Swetha Raghavan, Prajisha Jayaprakash, Jeyaraman Jeyakanthan, Suresh K Rayala, and Ganesh Venkatraman. 2015. "Molecular Mechanism of Anti-Cancer Activity of Phycocyanin in Triple-Negative Breast Cancer Cells." *BMC Cancer* 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1784-x>.
- Roy, Swarup. n.d. "Research and Reviews: Journal of Pharmacology and Toxicological Studies."
- Saiful Yazan, Latifah, and Wan Nor Hafiza. 2014. "Potential Implications of GRP58 Expression and Susceptibility of Cervical Cancer to Cisplatin and Thymoquinone-Based Therapy." *OncoTargets and Therapy*, August, 1375. <https://doi.org/10.2147/OTT.S62928>.
- Saija, Antonella, Mario Scalese, Maria Lanza, Daniela Marzullo, Francesco Bonina, and Francesco Castelli. 1995. "Flavonoids as Antioxidant Agents: Importance of Their Interaction with Biomembranes." *Free Radical Biology and Medicine* 19 (4):481–486.
- Sak, Katrin. 2014. "Cytotoxicity of Dietary Flavonoids on Different Human Cancer Types." *Pharmacognosy Reviews* 8 (16):122–46. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.134247>.
- Šavikin, Katarina, Gordana Zdunić, Teodora Janković, Tatjana Stanojković, Zorica Juranić, and Nebojša Menković. 2009. "In vitro Cytotoxic and Antioxidative Activity of *Cornus Mas* and *Cotinus Cogglyria*." *Natural Product Research* 23 (18):1731–39. <https://doi.org/10.1080/14786410802267650>.
- Sharma, Shrestha, Asgar Ali, Javed Ali, Jasjeet K. Sahni, and Sanjula Baboota. 2013. "Rutin: Therapeutic Potential and Recent Advances in Drug Delivery." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 22 (8):1063–79. <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.805744>.
- Siddik, Zahid H. 2003. "Cisplatin: Mode of Cytotoxic Action and Molecular Basis of Resistance." *Oncogene* 22 (47):7265–79. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>.
- Slavin, J. L., and B. Lloyd. 2012. "Health Benefits of Fruits and Vegetables." *Advances in Nutrition: An International Review Journal* 3 (4):506–16. <https://doi.org/10.3945/an.112.002154>.
- Srinivasan, Asha, Chellappagounder Thangavel, Yi Liu, Sunday Shoyele, Robert B. Den, Ponniah Selvakumar, and Ashakumary Lakshmikuttyamma. 2016. "Quercetin Regulates β -Catenin Signaling and Reduces the Migration of Triple Negative Breast Cancer: QUERCETIN INHIBITS CELL MIGRATION." *Molecular Carcinogenesis* 55 (5):743–56. <https://doi.org/10.1002/mc.22318>.
- Steinmetz, K. A., and J. D. Potter. 1996. "Vegetables, Fruit, and Cancer Prevention: A Review." *Journal of the American Dietetic Association* 96 (10):1027–39. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(96\)00273-8](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(96)00273-8).
- Tyurina, Y. Y., A. A. Shvedova, K. Kawai, V. A. Tyurin, C. Kommineni, P. J. Quinn, N. F. Schor, J. P. Fabisiak, and V. E. Kagan. 2000. "Phospholipid Signaling in Apoptosis: Peroxidation and Externalization of Phosphatidylserine." *Toxicology* 148 (2):93–101.
- Vidya Priyadarsini, R., R. Senthil Murugan, S. Maitreyi, K. Ramalingam, D. Karunakaran, and S. Nagini. 2010. "The Flavonoid Quercetin Induces Cell Cycle Arrest and Mitochondria-Mediated Apoptosis in Human Cervical Cancer (HeLa) Cells through p53 Induction and NF- κ B Inhibition." *European Journal of Pharmacology* 649 (1–3):84–91. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.020>.
- Wang, Rongsheng E., Ling Tian, and Yie-Hwa Chang. 2012. "A Homogeneous Fluorescent Sensor for Human Serum Albumin." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 63 (April):165–69. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.12.035>.

- Wang, Zhujun, and Xuewu Zhang. 2016. "Inhibitory Effects of Small Molecular Peptides from *S. platensis* (Arthrospira) Platensis on Cancer Cell Growth." *Food Funct.* 7 (2):781–88. <https://doi.org/10.1039/C5FO01186H>.
- . 2017. "Isolation and Identification of Anti-Proliferative Peptides from *Spirulina Platensis* Using Three-Step Hydrolysis: Anti-Proliferation Peptides." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97 (3):918–22. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7815>.
- Yde, Christina Westmose, and Olaf-Georg Issinger. 2006. "Enhancing Cisplatin Sensitivity in MCF-7 Human Breast Cancer Cells by down-Regulation of Bcl-2 and Cyclin D1." *International Journal of Oncology* 29 (6):1397–1404.
- Yoshitomi, S., K. Ikemoto, J. Takahashi, H. Miki, M. Namba, and S. Asahi. 2001. "Establishment of the Transformants Expressing Human Cytochrome P450 Subtypes in HepG2, and Their Applications on Drug Metabolism and Toxicology." *Toxicology in vitro* 15 (3):245–256.
- You, Hyun Ju, Hyung Jin Ahn, and Geun Eog Ji. 2010. "Transformation of Rutin to Antiproliferative Quercetin-3-Glucoside by *Aspergillus Niger*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (20):10886–92. <https://doi.org/10.1021/jf102871g>.
- Zelig, Udi, Joseph Kapelushnik, Raymond Moreh, Shaul Mordechai, and Ilana Nathan. 2009. "Diagnosis of Cell Death by Means of Infrared Spectroscopy." *Biophysical Journal* 97 (7):2107–14. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.07.026>.
- Zhang, G. J., I. Kimijima, M. Onda, M. Kanno, H. Sato, T. Watanabe, A. Tsuchiya, R. Abe, and S. Takenoshita. 1999. "Tamoxifen-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells Relates to down-Regulation of Bcl-2, but Not Bax and Bcl-X(L), without Alteration of p53 Protein Levels." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 5 (10):2971–77.

Anexos



Anexo 1 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD para o tamoxifeno na concentração de 500 nM. As setas indicam os picos correspondentes ao tamoxifeno.



Anexo 2 – Reta de calibração obtida para diferentes concentrações da BSA pelo método de Bradford.