



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS MÉDICO-
CIRÚRGICAS**

CAROLINA LYRA BARREIRA CARNEIRO

**GOMA ARÁBICA E EUGENOL NA PROGRESSÃO E ANGIOGÊNESE DO TUMOR
DE WALKER IMPLANTADO NO SUBCUTÂNEO DE RATAS WISTAR**

FORTALEZA

2021

CAROLINA LYRA BARREIRA CARNEIRO

GOMA ARÁBICA E EUGENOL NA PROGRESSÃO E ANGIOGÊNESE DO TUMOR DE
WALKER IMPLANTADO NO SUBCUTÂNEO DE RATAS WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médico - Cirúrgicas. Área de concentração: Metabolismo, Fisiologia, Biologia Celular no Estresse.

Orientadora: Prof.^a Dra. Conceição Aparecida Dornelas.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C288g Carneiro, Carolina Lyra Barreira.
Goma arábica e Eugenol na progressão e angiogênese do tumor de Walker implantado no subcutâneo de ratas Wistar / Carolina Lyra Barreira Carneiro. – 2021.
99 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas.

1. Inibidores da angiogênese. 2. Carcinoma 256 de Walker. 3. Goma arábica. 4. Eugenol. I. Título.
CDD 617

CAROLINA LYRA BARREIRA CARNEIRO

GOMA ARÁBICA E EUGENOL NA PROGRESSÃO E ANGIOGÊNESE DO TUMOR DE
WALKER IMPLANTADO NO SUBCUTÂNEO DE RATAS WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médico - Cirúrgicas. Área de concentração: Metabolismo, Fisiologia, Biologia Celular no Estresse.

Aprovada em: __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Conceição Aparecida Dornelas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Wesley Lyeverton Correia Ribeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Agradeço a Deus, em Seu cuidado o tempo
todo.

Ao meu marido, Samer, por todo empenho nesse período, participação ímpar no experimento, sem medir esforços para contribuir na concretização desse projeto e sonho. Aos meus pais, Danielle e Newton, que sempre acreditaram e investiram na educação como melhor herança. Sem vocês nada disso seria possível. Às minhas irmãs, Giovanna e Mariana, por cada palavra de incentivo, por acreditarem e me incentivarem a ir além.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas, pesquisadora e docente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela excelente orientação e oportunidade de aprender ao seu lado, de desenvolver um apreço e respeito na busca pelo novo, pela ciência. Agradeço por sua disponibilidade, dedicação, sobretudo em tempos incertos vividos diante de uma pandemia. Muito obrigada por acreditar e investir seu tempo e conhecimento nesse projeto.

Ao professor Francisco Vagnaldo Fchine Jamaru por dividir seu tempo, conhecimento e experiência nos *softwares* utilizados.

A Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos, docente do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, por sua colaboração essencial com o fornecimento do eugenol, do Laboratório de Biotecnologia e Produtos Naturais (LBPN).

Ao Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho pelo fornecimento das células do tumor de Walker.

Ao Dr. Francisco Stefânio Barreto, por toda contribuição no manuseio das células tumorais.

À equipe do Biotério Setorial da Universidade Federal do Ceará por todo o trabalho e parceria.

Ao técnico Sr. Francisco Deomar Maciel da Silva, pela dedicação e esmero na confecção histológica das lâminas.

Aos professores participantes da banca examinadora, Prof. Dr. Wesley Lyeverton Correia Ribeiro, Prof^a. Dr^a. Conceição Aparecida Dornelas e Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Às equipes do Laboratório de Cirurgia Experimental e ao NPDM, onde foram realizados os experimentos do trabalho.

Aos alunos da iniciação científica, Gilson Brito e Lucas Gabriel, que exerceram importante papel durante os experimentos e cuidado com os animais.

A Bárbara Dutra e Nayanna Melo, pela amizade, que tornou toda essa jornada mais leve e possível, por todo apoio e suporte oferecido.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

“Voltaire disse que os sonhos e a esperança nos foram dados como compensação às dificuldades da vida. Mas precisamos compreender que os sonhos não são desejos superficiais. Os sonhos são bússolas do coração, são projetos de vida. Os desejos não suportam o calor das dificuldades. Os sonhos resistem às mais altas temperaturas dos problemas. Renovam a esperança quando o mundo desaba sobre nós.”
(Augusto Cury)

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.” (Albert Einstein)

RESUMO

A angiogênese é um processo de múltiplas etapas que leva à formação de novos vasos sanguíneos, a partir de capilares já existentes. Existem vários modelos experimentais que buscam ampliar o arsenal existente de moléculas que possam interferir inibindo ou estimulando a angiogênese. O carcinossarcoma 256 de Walker possui rápido crescimento e agressividade, sendo possível avaliar a resposta de antiangiogênicos de forma experimental. Testou-se a goma arábica, um produto natural, obtido do exsudato dos troncos e dos ramos da *Acácia senegal*, e o Eugenol, que é um dos principais componentes do óleo essencial de cravo-da-índia. Ambos possuem, experimentalmente, atividade antioxidante, além de propriedades anticancerígenas e citotóxicas, porém nenhum estudo, até o presente momento testou essas duas substâncias simultaneamente. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da goma arábica e do eugenol na progressão e angiogênese do tumor 256 de Walker implantado no subcutâneo de ratas Wistar. Sessenta ratas fêmeas Wistar, pesando em média 150 gramas, que foram distribuídas em 10 grupos com 6 animais. Cinco grupos experimentais receberam inóculos de tumor de Walker no primeiro dia do experimento, seguido de gavagem por cinco dias. O grupo controle recebeu as mesmas substâncias, com inóculo de água destilada. As substâncias administradas foram água destilada, na dose de 5mg/kg de peso por dia; celecoxibe 30mg/kg de peso por dia; goma arábica na dose de 500 mg/0,1kg de peso por dia; e eugenol, que foi utilizado de forma pura, na dose de 100 mg/kg de peso. Foram avaliadas as dimensões tumorais, macroscopia e microscopia, corados pela hematoxilina-eosina. O estudo da angiogênese foi realizado por imunohistoquímica (CD-31), e a quantificação foi realizada através de avaliação da densidade microvascular pelo software SAMM em microfotografia de áreas de maior densidade microvascular. Animais do grupo controle negativo apresentaram maior invasão do subcutâneo e da musculatura do dorso pelo tumor em relação aos demais grupos. Houve redução do volume tumoral nos grupos que receberam goma arábica, eugenol, goma arábica com eugenol e celecoxibe (controle positivo), porém a densidade microvascular foi reduzida apenas no grupo celecoxibe. Apenas o celecoxibe inibiu a angiogênese. A goma arábica e o eugenol, nas doses administradas, reduziram o crescimento tumoral, porém não inibiram a angiogênese nos animais que receberam os implantes do tumor de Walker.

Palavras-chave: Inibidores de angiogênese. Carcinoma 256 de Walker. Goma arábica. Eugenol.

ABSTRACT

Angiogenesis is a multi-stage process that leads to the formation of new blood vessels, from already existing capillaries. There are several experimental models that seek to expand the existing arsenal of molecules that can interfere by inhibiting or stimulating angiogenesis. Walker's 256 carcinosarcoma has a fast growth and aggressiveness, being possible to evaluate the antiangiogenic response in an experimental way. Arabica gum was tested, a natural product, obtained from the exudate of the trunks and branches of *Acacia senegal* and Eugenol, which is one of the main components of clove essential oil. Both have, experimentally, antioxidant activity, in addition to anti-cancer and cytotoxic properties, however, no study to date has tested both substances simultaneously. The objective of the present study was to evaluate the effect of gum arabic and eugenol on the progression and angiogenesis of Walker's tumor implanted in the subcutaneous tissue of Wistar rats. 60 female Wistar rats, weighing an average of 150 grams, which were distributed in 10 groups of 6 animals. The five experimental groups received Walker's tumor inoculum on the first day of the experiment, followed by gavage for five days. The control group received the same substances, with distilled water inoculum. The administered substances were distilled water, at a dose of 5mg / kg of weight per day; celecoxib 30mg / kg of weight per day; gum arabic at a dose of 500 mg per 0,1kg of weight per day and eugenol, which was used in a pure form, at a dose of 100 mg / kg of weight. Tumor dimensions, macroscopy and microscopy were evaluated, stained by hematoxylin-eosin. The study of angiogenesis was performed by immunohistochemistry (CD-31) and the quantification was performed by evaluating the microvascular density by the software (SAMB) in microphotography of areas of higher microvascular density. It was observed that the animals that received distilled water, presented a greater invasion of the subcutaneous and back muscles by the tumor in relation to the other groups. There was a reduction in tumoral volume in the groups that received gum arabic, eugenol, arabic gum with eugenol, and celecoxib, but reduced microvascular density only in the celecoxib group. Only celecoxib inhibited angiogenesis. Gum Arabic and eugenol, in the doses administered, reduced tumor growth, but did not inhibited angiogenesis in Walker's tumor implants.

Keywords: Inhibitors of Angiogenesis. Walker Carcinoma 256. Gumarabic. Eugenol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 –	Crescimento tumoral e vascularização.....	18
Figura 02 –	Colheita de goma arábica no Sudão.....	23
Figura 03 –	Goma arábica pronta para ser utilizada.....	23
Figura 04 –	Estrutura química do Eugenol.....	25
Figura 05 –	Desenho experimental.....	33
Figura 06 –	Retirada do tumor da panturrilha da pata traseira do animal.....	35
Figura 07 –	Fragmentos tumorais de carcinossarcoma 256 de Walker.....	36
Figura 08 –	Contagem de células tumorais viáveis na câmara de Neubauer.....	37
Figura 09 –	Procedimento de inoculação de células tumorais.....	38
Figura 10 –	Ressecção da pele e subcutâneo do dorso.....	39
Figura 11 –	Medição das dimensões tumorais.....	40
Figura 12 –	Ambiente do SAMM.....	42
Figura 13 –	Variação de peso em %.....	46
Figura 14 –	Volume do tumor em mm ³	47
Figura 15 –	Densidade microvascular percentual, entre os três <i>hot</i>	48

spots.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Estudos com ratos inoculados com tumor de 21 Walker.....

Tabela 2– Resultados obtidos avaliando densidade percentual, volume e variação relativo peso dos grupos 44 experimentais.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Antiinflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
C	Celsius
COX-2	Ciclooxigenase- 2
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	<i>FoodandDrugAdministration</i>
g	Gramma
FIH	Fator indutor de hipóxia
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
K ⁺	Potássio
Kg	Kilograma
LBD	Lipoproteína de baixa densidade
LNOE	Laboratório Nacional de Oncologia Experimental

Mg ⁺⁺	Magnésio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MM3	Milímetro cúbico
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
P53	Proteína supressora tumoral
PVC	Policloreto de vinila
PAF	Polipose adenomatosa familiar
SAMM	Sistema de Análise Morfométrica
SC	Subcutânea
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
FCEV	Fator de crescimento endotelial vascular
VHS	Velocidade de hemossedimentação
μG	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Angiogênese e progressão tumoral.....	17
1.2	Tumor de Walker.....	20
1.3	Goma arábica.....	22
1.4	Eugenol.....	25
1.5	Celecoxibe.....	27
1.6	Modelo experimental de inóculo subcutâneo em ratas Wistar.....	27
1.7	Relevância justificativa.....	e28
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	Objetivo geral.....	30
2.2	Objetivos específicos.....	30
3	MATERIAL E MÉTODO.....	31
3.1	Protocolo experimental e cuidados	31

	animais.....	
3.2	Substâncias utilizadas.....	34
3.2.1	Goma arábica	34
3.2.2	Eugenol.....	34
3.2.3	Celecoxibe.....	34
3.3	Células tumorais de Walker 256 e inóculo no dorso do animal.....	34
3.4	Aspecto e crescimento tumoral.....	39
3.5	Avaliação de metástases macro e microscopicamente.....	40
3.6	Avaliação da angiogênese tumoral por imunohistoquímica.....	41
3.7	Quantificação da angiogênese tumoral.....	41
3.8	Análise estatística.....	42
4	RESULTADOS	44
4.1	Exclusão de animais	45
4.2	Avaliação do aspecto e crescimento do tumor de Walker.....	45
4.3	Avaliação da angiogênese tumoral.....	47
4.4	Avaliação de metástases.....	48
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
APENDICE A	Tabela de pesos dos animais/grupo.....	61
APENDICE B	Tabela das doses das substâncias administradas.....	63
APENDICE C	Tabela de dimensões do tumor e aspectos macro e microscópicos por grupos.....	64
APENDICE D	Tabela de densidade tumoral por grupos.....	65
APENDICE E	Artigo publicado	66
ANEXO A	Aprovação do projeto de pesquisa pelo CEUA – UFC	87

ANEXO B	Composição nutricional da ração Nuvilab irradiada.....	CR- 188
ANEXO C	Teste de pureza de eugenol.....	do 89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Angiogênese e a progressão tumoral

O termo angiogênese foi utilizado pela primeira vez em 1935, por Hertig, ao descrever a formação de novos vasos sanguíneos na placenta. Atualmente, define-se angiogênese ou neovascularização como o crescimento de novos capilares a partir de capilares e vênulas pré-existentes (SAFATLE *et al.*, 2002). A angiogênese é um processo de múltiplas etapas que leva à formação de novos vasos sanguíneos que participa em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo o crescimento tumoral e suas metástases.

Células normais e tumorais necessitam de um adequado aporte de oxigênio e nutrientes para o seu desenvolvimento e proliferação, que são fornecidos durante o crescimento tissular através de um processo de neovascularização. A neovascularização pode acontecer por dois mecanismos: a vasculogênese, definida como a diferenciação *in situ* de precursores mesodérmicos, em células endoteliais, que posteriormente organizam-se em um plexo capilar primário, e ainda, através da angiogênese, definida como a formação de novos vasos sanguíneos por um processo de germinação de brotos endoteliais a partir de vasos capilares preexistentes (GONZALEZ *et al.*, 2000). A angiogênese pode ocorrer por dois mecanismos distintos: por brotamento ou intussuscepção. Por brotamento consiste num processo lento, de maior gasto energético, invasivo, que depende da proliferação celular do endotélio e formação de um broto de células endoteliais conectado ao vaso de origem. O processo de intussuscepção é rápido, não depende de proliferação celular, onde um único capilar se divide em dois, pela formação de um septo (CADUFF; FISCHER; BURRI, 1986).

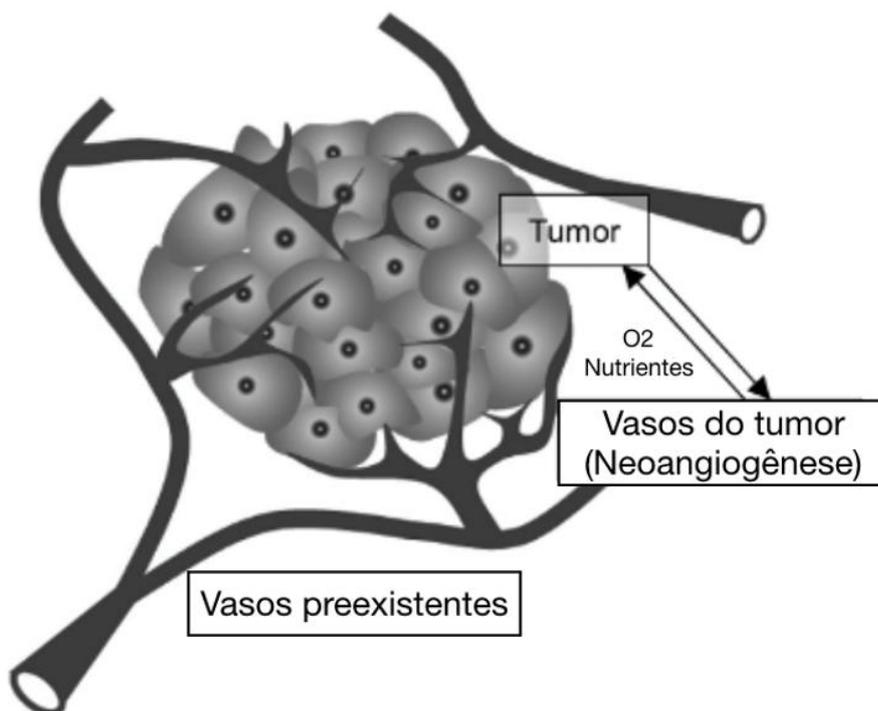
Estudos sobre angiogênese ganharam importância após 1946, quando foi possível observar uma área hiperêmica ao redor do implante de tecido tumoral de ratos no subcutâneo, enquanto o implante de tecido adulto rígido não induzia hiperemia local (SAFATLE *et al.*, 2002). A existência de fatores angiogênicos derivados de tumores foi postulada há cerca de 70 anos e o crescimento vascular dos tumores foi associado a esses fatores. Em 1971, Judah Folkman, conhecido como o “pai da angiogênese”, enfatizou a importância da vascularização tumoral para o crescimento do tumor, postulando que um tumor poderia morrer, se fosse impedido de cultivar seu próprio suprimento sanguíneo. Desde então, inúmeros estudos envolvendo moléculas

antiangiogênicas têm sido realizados, na tentativa de se confirmar a hipótese de que os tumores seriam angiogênico-dependentes (KUBOTA, 2012).

Após meio século de pesquisa sobre o câncer, HANAHAN e WEINBERG, em 2000, publicaram uma revisão intitulada *The Hallmarks of Cancer*, em que descrevem "características adquiridas" necessárias para que células se transformem em cancerosas, auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de inibição de crescimento, evasão da morte celular programada, potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, invasão de tecidos e metástase.

As células cancerígenas possuem alta taxa de proliferação. Visando mantê-la, é necessário que os tumores desenvolvam uma nova rede vascular (Figura 1). O crescimento patológico dos vasos é descontrolado, envolve comprometimento da integridade endotelial e vascular e leva a redes vasculares irregulares, com fluxo sanguíneo alterado, perturbando a homeostase dos tecidos (BREIER; CHAVAKIS; HIRSCH, 2017). Os vasos sanguíneos tumorais são tortuosos, desorganizados e imaturos, levando à má perfusão e ao aumento da permeabilidade (VIALARD; LARRIVEÉ, 2017), ademais fornecem oxigênio e nutrientes para tumores em rápida expansão (KUBOTA, 2012).

Figura 1- Crescimento tumoral e vascularização



Fonte: Adaptado de KUBOTA, 2012.

O equilíbrio entre os fatores angiogênicos e anti-angiogênicos é o responsável pela regulação da angiogênese. Quando há estímulo angiogênico, as células endoteliais alteram sua morfologia, provocam vasodilatação, degradam a membrana basal, proliferam e migram, formando capilares. Há um rápido esgotamento do suprimento de oxigênio disponível nos tecidos tumorais em expansão patológica. A ativação do fator indutor de hipóxia (FIH) em células sensíveis, desencadeia a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (FCEV), que estimula o crescimento vascular em tecidos tumorais com hipóxia, para atender às necessidades de crescimento do tumor (KUBOTA, 2012). Através da ativação e inibição de vias celulares, pode haver modulação da angiogênese em várias células. A vascularização do tumor pode ser utilizada como um promissor alvo terapêutico no tratamento de vários tipos de câncer (MASHREGHI *et al.*, 2018).

A dose apropriada de tratamento antiangiogênico pode levar à normalização da vasculatura, reduzindo a permeabilidade e pressão do fluido intersticial e melhorando fluxo sanguíneo e perfusão do tumor. Com a vasculatura normalizada, o tumor pode reduzir a hipóxia tecidual e, assim, melhorar a administração de medicamentos. Além disso, estudos relatam melhora da sobrevida em pacientes com câncer de mama, colorretal, pulmão e cérebro (RAMJIWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017).

A angiogênese tumoral não é um processo autolimitado, continuando indefinidamente até que o tumor seja erradicado por completo ou até que o hospedeiro chegue ao óbito (FOLKMAN, 2007).

Na busca para desvendar o processo da angiogênese, estudos levaram à aprovação, em 2004, do primeiro antiangiogênico para tratamento do câncer colorretal metastático, gerando grandes expectativas acerca do uso de antiangiogênicos no tratamento do câncer. Porém, tais expectativas não foram atendidas e muitos dos paradigmas originais não se mantiveram, sendo necessários novos estudos. Os antiangiogênicos falharam em prover uma atividade antitumoral duradoura, além de causar efeitos colaterais inesperados e estarem associados ao possível aumento de células tumorais agressivas e metástases. A descoberta de novos mediadores da angiogênese diversificou o cenário e criou desafios para seleção de alvos (RONCA *et al.*, 2017).

Diante do atual cenário de morbimortalidade associada ao câncer no Brasil e em todo o mundo, faz-se necessário buscar novas alternativas para preencher lacunas e

trazer novas possibilidades de tratamento.

1.2 Tumor de Walker

O carcinosarcoma 256 de Walker foi descoberto a partir de um adenocarcinoma de glândula mamária em ratos fêmeas albinos prenhes. Recebeu esse nome em homenagem a George Walker, de Baltimore, Maryland, que iniciou seu estudo em 1928 e, desde então, esse tumor vem sendo mantido em laboratório (DORNELAS *et al.*, 2006).

É um tumor mantido “in vivo” em modelos animais através das inoculações sucessivas de suspensão celular obtida através de tumores sólidos de ratos doadores, disponíveis na Universidade Federal do Ceará (UFC) no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LNOE) desde 1992, quando foi cedido pela Universidade de São Paulo, e é utilizado em diferentes linhas de pesquisa (MORAES *et al.*, 2000). Foram criados diversos modelos com o tumor de Walker em diversos órgãos, entre eles: pulmão (GOMES-NETO *et al.*, 2002), estômago (OLIVEIRA *et al.*, 1998), rim (SILVA *et al.*, 2002), cavidade oral (ALVES *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2007), fígado (ZARUR *et al.*, 2004) e bexiga (DORNELAS *et al.*, 2006).

Estudos realizados utilizando o tumor de Walker evidenciaram uma pega tumoral de quase 100% de sucesso. Por ser bastante agressivo, geralmente o animal evoluía a óbito em até cinco semanas. Durante todas as transferências que Dr. Walker realizou durante o período de 1928 a 1932, foi observada regressão do tumor em apenas quatro casos. Os tumores mostraram crescimento rápido e invasão geral dos tecidos próximos (EARLE, 1935). Em relação ao volume e ao local do inóculo os autores têm utilizado 0,1mL; 0,3mL; 0,5mL; 0,1mL a 0,5mL e 1mL e a via subcutânea ou intramuscular. As aplicações intramusculares pareciam crescer melhor e não mostraram sinal de formação de cápsula. Alguns autores referem que a via subcutânea apresenta crescimento mais lento e superficial, aparecimento de metástases mais tardias, porém com maior necrose. Os sítios mais comuns de metástase são pulmão, baço e fígado (MORAES, 2000).

O tumor pode ser transplantado de diversas formas, todas descritas como eficazes, como através de suspensão celular obtida do tumor na forma sólida e injetada no animal por via intramuscular, intraperitoneal, intrapleural, subcutânea, sanguínea, sendo possível observar o crescimento do tumor no local na inoculação (OLIVEIRA-FILHO; BEVILACQUA; CHAMMAS, 1997). O inóculo é realizado com maior

frequência na coxa do animal, por oferecer uma melhor vascularização local, levando a um crescimento mais uniforme. O crescimento do tumor ocorre em tempo proporcional ao número de células inoculadas (SILVA *et al.*, 2004).

Além de ser um tumor disponível na UFC, é um dos modelos de tumores disponíveis para estudos experimentais nas áreas médicas e biológicas em diferentes linhas de pesquisa. Com seu rápido desenvolvimento e agressividade, é possível avaliar a resposta de antiangiogênicos de forma experimental.

A Tabela 1 exemplifica diferentes estudos que utilizaram o modelo de tumor de Walker em roedores.

Tabela 1- Estudos com ratos inoculados com tumor de Walker.

Tratamento	Objetivo	Autor(es)
Óleo de peixe	Efeito antitumoral, COX-2, PPAR- γ , gene RelA, expressão de proteínas	BORGHETTI <i>et al.</i> , 2013, 2015
Óleo de copaíba	Efeito antitumoral	BOTELHO <i>et al.</i> , 2013
Metamorfina	Efeito antitumoral na síndrome metabólica	FRANCO <i>et al.</i> , 2014
Vitamina E	Atividade de reabsorção de osteoclastos e citomorfometria em ratos com lesões osteolíticas	BADRAOUI <i>et al.</i> , 2014a
Leucina	Metabolismo de proteínas em músculo gastrocnêmio fetal de ratas prenhas	CRUZ; GOMES-MARCONDES, 2014
Hipertermia	Metabolismo de lipídeos durante o crescimento tumoral	EFREMOV <i>et al.</i> , 2014
Hipertermia	Efeito antitumoral	WANG <i>et al.</i> , 2014
Doxorubicin	Metabolismo energético, K ⁺ e Mg ⁺⁺ na resistência ao quimioterápico	TODOR <i>et al.</i> , 2015
Metformin	Mecanismo do crescimento tumoral e efeito antitumoral na obesidade	QUEIROZ <i>et al.</i> , 2015
Celecoxibe e ibuprofeno	Gliconeogênese no fígado	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2015a
Celecoxibe e ibuprofeno	Desordem metabólica	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2015b
Lactonasesquiterpênicas de <i>M. polymorphum</i>	Efeito antitumoral	MARTINS <i>et al.</i> , 2015
Creatina	Efeito antitumoral, metabolismo da homocisteína, estresse oxidativo e caquexia	DEMINICE <i>et al.</i> , 2016a
Exercícios de resistência	Metabolismo da homocisteína e o balanço redox	DEMINICE <i>et al.</i> , 2016b

Canabinóide tipo 2receptor agonista AM1241	Tolerância à morfina	ZHANG <i>et al.</i> , 2016
Crotoxin	Ação antitumoral	BRIGATTE <i>et al.</i> , 2016
Ginsenoside Rg 3 e Rh 2	Perfil farmacocinético	FAN <i>et al.</i> , 2016
L-glutamina 2%	Caquexia e efeito protetor de células intersticiais de Cajal	FRACARO <i>et al.</i> , 2016
Vinho tinto cabernet franc	Efeito antitumoral	STIPP <i>et al.</i> , 2017
Pioglitazone/ Pioglitazone associado à insulina	Resistência à insulina, caquexia e anormalidades metabólicas	DE FATIMA-SILVA <i>et al.</i> , 2017
Própolis vermelha e l-lisina	Inibição da angiogênese tumoral	JUANES <i>et al.</i> , 2019

Fonte: Adaptado de JUANES, 2018.

1.3 Goma arábica

A goma arábica, também conhecida por goma acácia, é um produto obtido de forma espontânea do exsudato dos troncos e dos ramos da *Acacia senegal* (Linne) (GABAS; CAVALCANTI, 2003), encontrada da África Subsaariana e produzida principalmente no Sudão (Figuras 2 e 3). É composta de um arranjo altamente ramificado dos açúcares simples e também contém um componente protéico dentro do seu arranjo molecular, que desempenha um papel crucial na determinação das propriedades funcionais da goma arábica (MCNAMEE; O'RIORDAN; O'SULLIVAN, 1998). É utilizada pela indústria alimentícia como espessante de bebidas gaseificadas, vários tipos de doces e os produtos não alimentícios incluem cola, cosméticos, adesivos em selos postais, possuindo baixa toxicidade, ampla disponibilidade e baixo custo (VANDAMME *et al.*, 2002).

Figura 2- Colheita de goma arábica no Sudão.



Fonte: Disponível em: http://looklex.com/e.o/gum_arabic.htm

Figura 3 -Goma arábica pronta para ser utilizada.



Fonte: Disponível em: http://looklex.com/e.o/gum_arabic.htm

Novos estudos têm mostrado que a goma arábica tem potentes efeitos antioxidantes nos seres humanos, como demonstrados pela sua habilidade de aumentar a capacidade total antioxidante e diminuir o estresse oxidativo em humanos (KADDAM *et al.* 2019). Foi descoberto um novo efeito da goma arábica que pode ser utilizado em outras condições clínicas e doenças causadas por aumento da peroxidação lipídica e lesão tecidual. Assim, a ingestão de antioxidantes dietéticos na goma arábica pode ajudar a manter um adequado estado de defesa antioxidante e conseqüentemente, contribuir para a condução de danos na doença falciforme, conforme estudo de Kaddamet *al.* 2017.

O efeito antioxidante e citoprotetor da goma arábica a partir da modulação do estresse oxidativo é apontado por Kaddamet *al.* 2019 como responsável pela redução dos índices séricos de colesterol total, LDL e triglicérides em pacientes com síndrome metabólica a partir de sua ingestão dietética como fibra alimentar suplementar, com resultados em animais e em humanos. Babiker *et al.* 2018 demonstrou em um estudo com 91 pacientes que o uso de goma arábica como suplementação alimentar, em comparação com placebo, apresentou melhoras objetivas na distribuição de gordura corporal e nos valores de pressão arterial em pacientes com diabetes tipo 2 durante 3 meses de acompanhamento. Esses dados acrescentam a atividade antioxidante da goma arábica respostas a nível celular, tecidual e antropométrico.

A relação entre o estresse oxidativo e angiogênese está bem estabelecida, e, também, a relação entre estresse oxidativo e hipóxia tumoral (DALEPRANE; ABDALLA, 2013).

Estudos recentes têm mostrado um importante papel da goma arábica na inibição do crescimento de tumores, com influência na expressão das angiogeninas (NASIR, 2013). As angiogeninas são fatores angiogênicos regulados positivamente pelas células tumorais, portanto, é esperado que a inibição da sua síntese neutralize o crescimento tumoral. A observação da influência da goma arábica na expressão das angiogeninas fornece uma explicação para o seu efeito protetor no crescimento do tumor (NASIR, 2010).

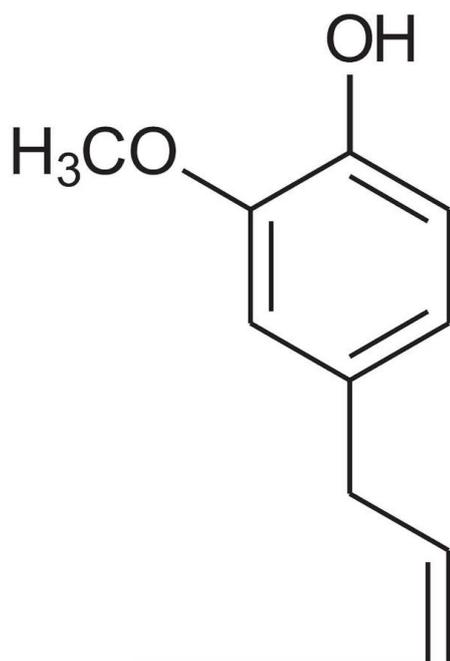
A goma arábica exerce, ainda, influência em vários genes conhecidos por serem importantes para a proliferação celular e crescimento tumoral, como o antígeno CD38, interleucina 18, oncogene vav3, ubiquitina D, β -catenina (NASIR, 2010). Braga *et al.*, 2019, observaram a redução de criptas aberrantes associadas ao carcinoma colorretal.

A fermentação da goma arábica pelas bactérias intestinais gera agentes prebióticos e, segundo Kamalet *al.* 2018, atuam na modulação de mediadores da cascata inflamatória como o TNF-alfa e reduzindo valores séricos da velocidade de hemossedimentação (VHS), demonstrando sua eficácia antiinflamatória em um estudo realizado com pacientes portadores de artrite reumatoide. Esses dados corroboram com a eficácia da goma arábica nos mecanismos da cascata inflamatória, sabidamente presente no processo de angiogênese tumoral. Em se tratando de uma substância vegetal, os estudos com a goma arábica representam um avanço na pesquisa de base para futuros tratamentos de patologias complexas com o uso de substâncias encontradas na natureza.

1.4 Eugenol

O eugenol é um composto natural amplamente encontrado em muitas espécies de plantas aromáticas, especiarias e alimentos, incluindo canela, manjeriço, noz-moscada, e é um dos principais componentes do óleo essencial de cravo-da-índia, obtido principalmente da *Syzygium*. A estrutura química do eugenol é ilustrada na Figura 4.

Figura 4 - Estrutura química do eugenol.



É usado em cosméticos, produtos farmacêuticos, anestésicos odontológicos, obturações dentárias, estudos recentes apontam um potencial papel quimiopreventivo (YAN, 2017). Possui duplo efeito sobre o estresse oxidativo, podendo agir como um agente antioxidante ou pró-oxidante. Além disso, foram relatadas propriedades anticancerígenas, citotóxicas e antitumorais, por mecanismos ainda não completamente elucidados, descritos também no câncer de mama, cólio do útero, fígado, cólon e pulmão (BEZERRA, 2017). Fornece uma visão clara do aumento da taxa de apoptose em comparação com outras drogas comercialmente disponíveis, sendo eficaz através do uso tópico ou vira oral (DAS*et al.*, 2018). Dessa forma, estudos associam seu uso a efeitos no combate ao câncer, por possuir atividade antimutagênica potencial, anticarcinogênica e ação citotóxica para linhagens celulares de tumores humanos, além de induzir a apoptose de células cancerosas humanas (AFFONSO, 2012), através da regulação positiva de p53, caspases 3 e liberação do citocromo c no citosol (KHUDA-BUKHSH, 2014). Há relato do aumento da indução de apoptose relacionado ao eugenol, tanto no ciclo celular, como na citometria de fluxo (DAS*et al.*, 2018). Na mama, seu efeito depende da dosagem e do tempo de exposição (VIDHYA; DEVARAJ, 2011).

Globalmente o câncer tem se caracterizado como uma doença com alta mortalidade, com inúmeras pesquisas buscando novas soluções terapêuticas. Muitos compostos disponíveis em plantas são proclamados como agentes potentes contra o câncer de diversos tipos, além de possuírem atividade antiinflamatória e antioxidante e estarem relacionados à melhora da disponibilidade do medicamento utilizado no tratamento (LIU *et al.*, 2014).

Em 2012, Affonso ainda relatou a capacidade do eugenol em danificar o envelope viral, inibindo a sua replicação em fases iniciais, além de possuir efeito sinérgico em associação ao aciclovir; ação bactericida por sua alta capacidade de penetrar a membrana citoplasmática, aumentando a permeabilidade e extravasamento celular - propriedade bastante valorizada para uso médico, pois tais fármacos possuem menor probabilidade de selecionar bactérias resistentes. Segundo Manikandan*et al.* 2010, o eugenol induz apoptose e inibe invasão e angiogênese no modelo realizado com metilnitronitrosoguanidina, substanciando relatos que a inibição da proliferação celular por agentes quimiopreventivos cria um ambiente para as células cancerosas sofrerem apoptose, impedindo assim a progressão do tumor.

Apesar de ser sugerido o monitoramento cuidadoso por sua possível citotoxicidade contra células normais (SAKAGAMI, 2018), Sadeghiet *al.* 2019, além de

não observaram associação a nenhum efeito tóxico, relataram aumento da sobrevivência dos animais que desenvolveram carcinogênese cutânea de forma induzida após o tratamento, sugerindo um ótimo potencial quimiopreparativo e baixa toxicidade (aproximadamente 5% para o eugenol na concentração de 100 µg/mL), sendo listado pelo *FoodandDrugAdministration* como seguro (AFFONSO, 2012).

1.5 Celecoxibe

O celecoxibe é uma droga de ação analgésica e antiinflamatória não esteroideal, que atua no bloqueio da produção de prostanóides, através da inibição da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) (GHANGHAS *et al.*, 2016).

É amplamente utilizado no tratamento sintomático da osteoartrite, artrite reumatoide, espondilite anquilosante, dor aguda no pós-operatório, doenças musculoesqueléticas, dismenorréia primária e lombalgias.

Tumores do esôfago, estômago e colorretais, tanto em animais de experimentação como em humanos, expressam elevados níveis de COX-2. Tais achados levantam a hipótese do envolvimento da COX-2 na progressão e disseminação do câncer nestes órgãos.

O câncer colorretal foi a primeira neoplasia onde o papel da COX-2 e as prostaglandinas foram relacionadas, após estudos epidemiológicos que revelaram que pacientes que usaram antiinflamatórios não esteroidais para alívio da dor, em casos de tumores gastrointestinais, apresentaram regressão do tumor (HAYES, 2007). Em outros estudos observou-se uma redução de até 50% do risco de desenvolvimento de câncer de cólon e reto em pessoas que faziam uso regular de antiinflamatórios não esteroidais (GROSCH *et al.*, 2006; HAYES, 2007).

Estudos mostram que as doses de 10 mg/kg/peso, 25 mg/kg/peso e 30 mg/kg/peso inibiram a angiogênese em tumores humanos de pulmão, estômago e cólon, respectivamente, inoculados em camundongos e que 30 mg/kg/peso reduziu também a angiogênese em gliosarcoma de ratos inoculados em cérebro de ratos SprageyDowley (LEAHY *et al.*, 2002; FU *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2004; KLENKE *et al.*, 2006).

1.6 Modelo experimental de inóculo subcutâneo em ratas Wistar

Nas pesquisas biomédicas, os modelos experimentais animais são representações simples de uma ocorrência recente ou antiga, que podem traduzir a

materialização de uma parte da realidade. Devem apresentar, com certa precisão, resultados já comprovados anteriormente com a sua utilização na realidade representada (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005).

O rato (*Rattus norvegicus*) é o animal mais utilizado em laboratório e foi o primeiro mamífero domesticado para fins científicos. Wistar é uma das linhagens mais utilizadas ao redor do mundo, sendo um modelo interessante e atrativo para pesquisa por seu porte pequeno, seu ciclo biológico curto, baixo custo para manutenção e grau de similaridade genética com seres humanos - permitindo, assim, que os resultados encontrados gerem uma estimativa de potenciais efeitos em seres humanos, pois cerca de 80% do seu DNA é idêntico ao do homem (MATTARAIA; MOURA, 2012).

Em 2011, Morano utilizou e descreveu um modelo de implante do tumor de Walker no dorso animal. Os tumores, mantidos a cada semana no laboratório, foram retirados de dois animais doadores (região intramuscular) e colocados numa solução contendo Ringer Lactato (5 mL) e gentamicina (10mg/mL). Após fragmentação e maceração do material, foi retirada parte dessa solução para realizar contagem de células viáveis para inóculo, numa concentração de 2×10^6 células/mL. O local escolhido para implante foi o dorso do animal, que foi dividido em quatro quadrantes. Foi inoculado 2 mL contendo a concentração de células determinada no subcutâneo, na linha mediana do dorso, na parte mais superior da linha mediana dos quadrantes inferiores.

1.7 Relevância e Justificativa

Os benefícios alcançados nos últimos anos pelos estudos experimentais, traduzidos em tratamentos de doenças graves em humanos, como a retinopatia diabética, motivaram e estimularam para o estudo aprofundado da angiogênese.

Avolumam-se inúmeros trabalhos publicados, todos procurando novas moléculas que possam interferir inibindo ou estimulando a angiogênese tanto em doenças isquêmicas quanto doenças inflamatórias e neoplasias malignas. No principal índice médicos de busca, o PUBMED, nos últimos cinco anos o termo *angiogenesis* levantou 34.000 novos trabalhos. É fato que os inibidores de angiogênese existentes na atualidade no que se refere a tratamento de neoplasias malignas não são efetivos para todos os tumores, portanto é preciso continuar investigando novas possibilidades.

Os modelos experimentais utilizados para esta investigação são inúmeros,

mas o que dispomos é viável (disponível *in vivo* na UFC), economicamente possível e possível de confecção e análise em curto espaço de tempo. Além disso, o modelo deimplante tumoral de Walker é um modelo clássico e bem conhecido, que tem sido estudado de forma corriqueira para investigação de metabolismo, invasão, angiogênese (GAO *et al.*, 2016) e comportamento tumoral (CHEKHUN *et al.*, 2018).

A goma arábica representa uma substância de origem natural e de propriedades antiinflamatórias e antioxidantes previamente descritas (NASIF; LOTFY; MAHMOUD, 2011). O entendimento de sua influência no processo de angiogênese pode ampliar o arsenal terapêutico.

O eugenol é um composto natural amplamente encontrado em muitas espécies de plantas aromáticas, principalmente no cravo-da-índia. Estudos tem mostrado um potencial papel quimiopreventivo no câncer de mama, cólo do útero, fígado, cólon e pulmão, a maioria dos estudos *in vitro* e alguns poucos *in vivo* (BEZERRA, 2017), evidenciando maiores taxas de apoptose quando comparado com outras drogas disponíveis no mercado (DAS, 2018). Foi observada uma indução daapoptose via mitocondrial nos tumores gástricos, através da modulação das proteínas da família Bcl-2, Citocromo C, Apaf-1 e caspases, além de inibir a invasão e angiogênese, devido a alterações nas atividades de metaloproteinases e na expressão de MMP-2, MMP-9, VEGF, TIMP-2, RECK e VEGFR1, sugerindo capacidade de manipular o equilíbrio entre proteínas pró e anti-apoptóticas, além do equilíbrio entre estimuladores e inibidores de angiogênese e invasão tumoral.

Grande parcela do sistema imune do corpo está localizada na parede gastrointestinal e nos linfonodos mesentéricos, onde o consumo de goma arábica estimula a função do sistema imune intestinal e esplênico (NASIF; LOTFY; MAHMOUD, 2011).

Espera-se que neste modelo e na associação de dois produtos isolados de plantas com suas propriedades descritas se reproduza e/ou sejam sinérgicos na inibição do tumor e na angiogênese.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da goma arábica e do eugenol na progressão (crescimento) e angiogênese do tumor de Walker implantado no subcutâneo de ratas Wistar.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da goma arábica e do eugenol na angiogênese do tumor de Walker implantado em subcutâneo de ratas Wistar através da imunohistoquímica;

Avaliar o aspecto e o tamanho do tumor de Walker implantado em tela subcutânea;

Avaliar metástases macroscopicamente e microscopicamente em pulmão, fígado, baço e rins.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Protocolo experimental e cuidados animais

O projeto de pesquisa foi realizado conforme o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, em 08 de agosto de 2019, sob número 8162060619 (Anexo A).

Foram utilizadas 60 ratas fêmeas Wistar, fornecidas pelo Biotério Central da UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, medindo 50x 60x 22 cm, em número de 6 animais por gaiola, num total de 10 gaiolas. Todas as gaiolas foram mantidas a 23°C, em média, ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, com acesso em livre demanda à ração Nuvilab irradiada (anexo B) e água, sistema contínuo de exaustão, forradas com maravalha branca de pinho, autoclavada e foram enriquecidas com túneis de PVC, possibilitando aos animais um ambiente de desenvolvimento e diminuição do estresse. A maravalha foi trocada duas vezes por semana e, logo após, realizada higienização das gaiolas.

Durante o experimento, os animais foram pesados no dia do inóculo e no dia da eutanásia, conforme os respectivos grupos (Apêndice A). Foram avaliados clinicamente durante todo o experimento, quanto a possíveis mudanças no comportamento, respiração, perda de peso, movimentação atípica e crescimento do tumor.

As substâncias administradas foram água destilada, celecoxibe (Celebra[®] 200mg, Pfizer); goma arábica, como previamente descrito por NASIF, em 2011, e eugenol que foi utilizado de forma pura. A tabela de doses das substâncias administradas encontra-se no apêndice B.

Os grupos I, II, III, IV e V (controle) receberam inóculo de água destilada (0,1mL) no dorso, enquanto os grupos VI, VII, VIII, IX e X receberam inóculo do tumor de Walker no dorso, no primeiro dia do experimento e, nos cinco dias consecutivos, as substâncias foram administradas por gavagem, em ambos os grupos, desenhando-se assim, um estudo de caso-controle, em um experimento com grau 2 de invasividade, da seguinte forma:

Grupo I (controle, n=6) recebeu água destilada 5mL/kg peso/dia por gavagem, um dia após o inóculo de água destilada no dorso, por 5 dias;

Grupo II (controle, n=6) recebeu Celecoxibe 30mg/kg de peso diluído em água destilada 5mL/kg peso 1 vez ao dia, por gavagem, um dia após o inóculo de água destilada no dorso, por 5 dias;

Grupo III (controle, n=6) recebeu goma arábica 500mg/0,1kg de peso por dia (NASIF *et al.*, 2011) diluída em água destilada 5mL/kg peso, aquecida a 60°C e centrifugada, por gavagem, um dia após o inóculo de água destilada no dorso, por 5 dias;

Grupo IV (controle, n=6) recebeu eugenol 100mg/kg de peso/dia (BEZERRA *et al.*, 2017) por pipeta, um dia após o inóculo de água destilada no dorso, por 5 dias;

Grupo V (controle, n=6) recebeu eugenol 100mg/kg de peso/dia e goma arábica 500mg/0,1kg de peso por dia (NASIF *et al.*, 2011) diluída em água destilada 5mL/kg peso, aquecida a 60°C e centrifugada, por pipeta e gavagem, respectivamente, um dia após o inóculo de água destilada no dorso, por 5 dias;

Grupo VI (n=6) recebeu água destilada 5mL/kg peso/dia por gavagem, um dia após inoculação de células tumorais no dorso, por 5 dias;

Grupo VII (n=6) recebeu Celecoxibe 30mg/kg de peso diluído em água destilada 5mL/kg peso 1 vez ao dia, por gavagem, um dia após inoculação de células tumorais no dorso, por 5 dias;

Grupo VIII (n=6) recebeu goma arábica 500mg/0,1kg de peso por dia (NASIF *et al.*, 2011) diluída em água destilada 5mL/kg peso, aquecida a 60°C e centrifugada, por gavagem, um dia após inoculação de células tumorais no dorso, por 5 dias;

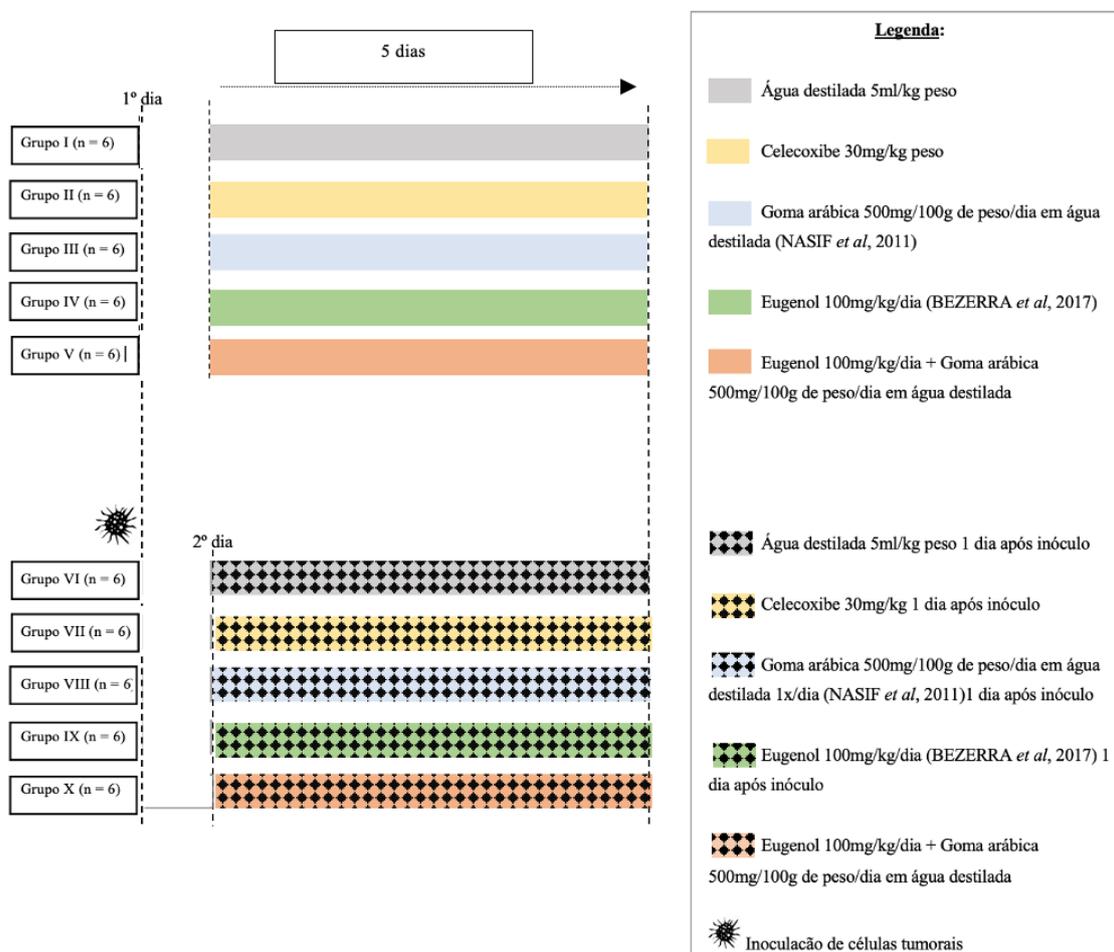
Grupo IX (n=6) recebeu eugenol 100mg/kg de peso/dia (BEZERRA *et al.*, 2017) por pipeta, um dia após inoculação de células tumorais no dorso, por 5 dias;

Grupo X (n=6) recebeu eugenol 100mg/kg de peso/dia e goma arábica 500mg/0,1kg de peso por dia (NASIF *et al.*, 2011) diluída em água destilada 5mL/kg peso, aquecida a 60°C e centrifugada, por pipeta e gavagem, respectivamente, um dia após inoculação de células tumorais no dorso, por 5 dias.

Foram utilizados como critério de exclusão do estudo os animais que não apresentaram crescimento tumoral ou que tiveram invasão tumoral, entretanto este modelo de inóculo já foi previamente testado (MORANO *et al.*, 2011) e a pega é de 100% sem contaminação ou infecção.

O desenho experimental é ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - Desenho experimental.



Fonte: Próprio autor.

3.2 Substâncias utilizadas

3.2.1 Goma arábica

Uma solução de goma arábica 1% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda) foi utilizada na dose de 500 mg/0,1kg de peso, como descrito por Nasif *et al.*, 2011, diluída em água destilada 5mL/kg de peso, aquecida a 60°C e centrifugada, armazenada em frascos de vidro esterilizados e administrada por gavagem.

3.2.2 Eugenol

O eugenol foi adquirido no laboratório QUINARI e foi avaliado em sua pureza no laboratório de Química Orgânica da UFC (Anexo C)- Professora Telma Leda Lemos. Foi administrado por pipeta na dose 100mg/kg de peso/dia (BEZERRA *et al.*, 2017), de forma cautelosa, considerando sua volatilidade por ser um óleo essencial.

3.2.3 Celecoxibe

O anti-inflamatório celecoxibe (Celebra[®] 200mg, Pfizer) foi administrado por gavagem na dose de 30mg/kg de peso, diluído em água destilada 5mL/kg peso, uma vez ao dia, utilizado como controle positivo na inflamação e crescimento tumoral, conforme descrito na literatura (DAVIS *et al.*, 2004).

3.3 Células tumorais de Walker 256 e inóculo no dorso animal

A manutenção do tumor de Walker é realizada semanalmente no biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Seguindo o protocolo utilizado, cinco animais foram solicitados com uma semana de antecedência. Foi preparada uma solução de Ringer Lactato (10 mL) e gentamicina (100uL de gentamicina na concentração 40mg/mL) e dividida em 2 tubos de Falcon. Um volume de 5mL dessa solução foi colocada numa placa de Petri, mantida sob gelo. Foi realizada, então, a eutanásia dos animais que estão com tumor de Walker, de forma ética, técnica e humanitária, através de sobredose anestésica, evitando dor, sofrimento e distresse

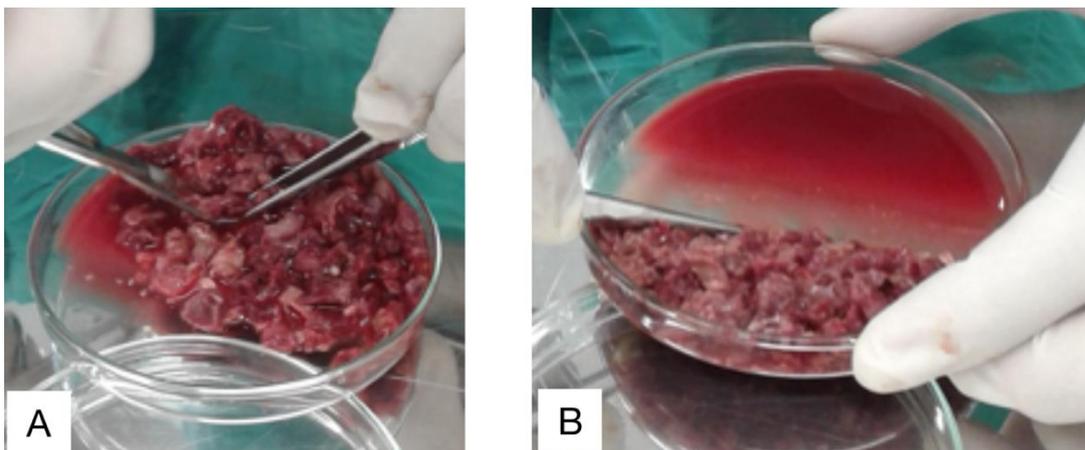
(conforme instruções e resolução 37 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA). Foi retirado o tumor(Figura6), preferindo as partes mais avermelhadas, desprezando as partes amarronzadas e foram colocadas sobre a placa de petri, picotadas com tesoura cirúrgica até formar um macerado(Figura7 a) com partes sólidas e líquida(Figura7b). O sólido foi desprezado, coletando apenas a parte líquida com seringa, que foi despejada em tubo de Falcon. Foi inoculado 0,7 mL na panturrilha da pata traseira, via intramuscular, na concentração de 10^6 células tumorais/mL, dos 5 animais. As caixas com animais inoculados foram identificadas.

Figura6-Retirada do tumor da panturrilha da pata traseira do animal.



Fonte: Próprio autor.

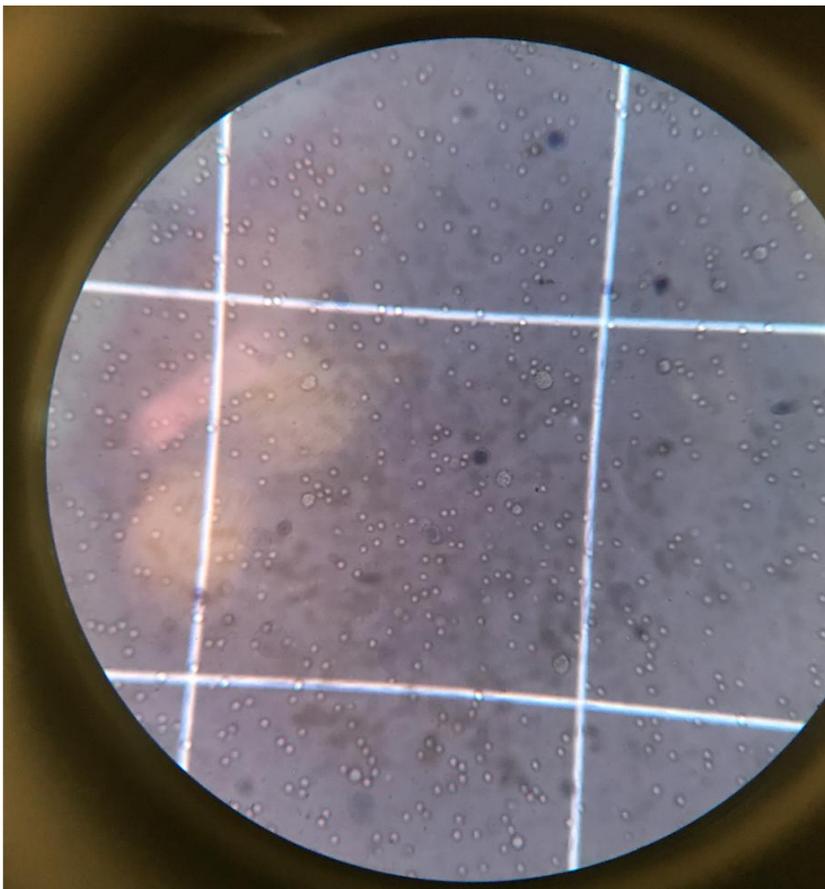
Figura7 -Fragmentos tumorais de carcinossarcoma 256 de Walker. A. Partes do tumor sendo maceradas. B. Conteúdo sólido desprezado.



Fonte: Próprio autor.

Após 7 dias, os 5 animais foram submetidos à eutanásia, o tumor foi retirado para proceder à contagem de células (Figura 8), para alcançar a concentração de $2,0 \times 10^6$ células tumorais/mL. Foi preparada solução de 20uL de líquido tumoral com 20uL de azul de tripam em eppendorf, colocada em câmara de Neubauer para contagem em dois campos na diagonal, com o objetivo de avaliar a viabilidade e integridade celular, relevada pela não coloração da célula em azul. Após esse processo, foi multiplicado por 10^6 para gerar a concentração estimada de células tumorais/mL e diluído para adequar a concentração ao volume de 0,1mL que foi inoculado.

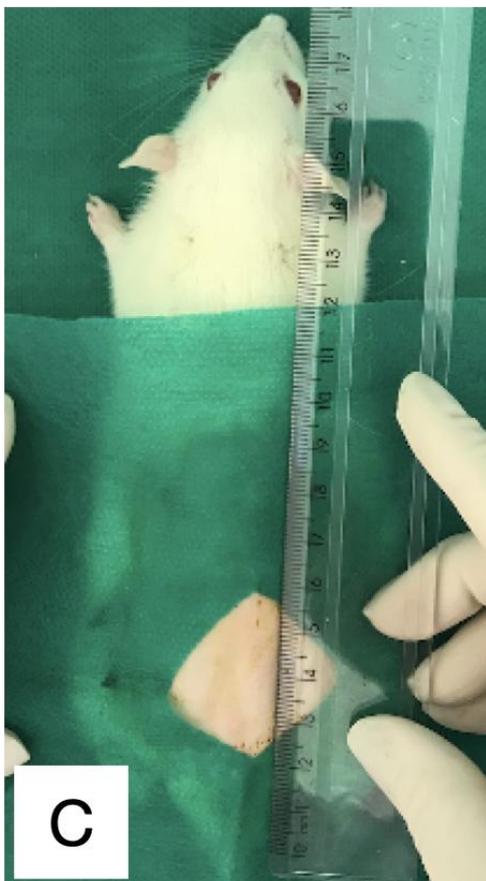
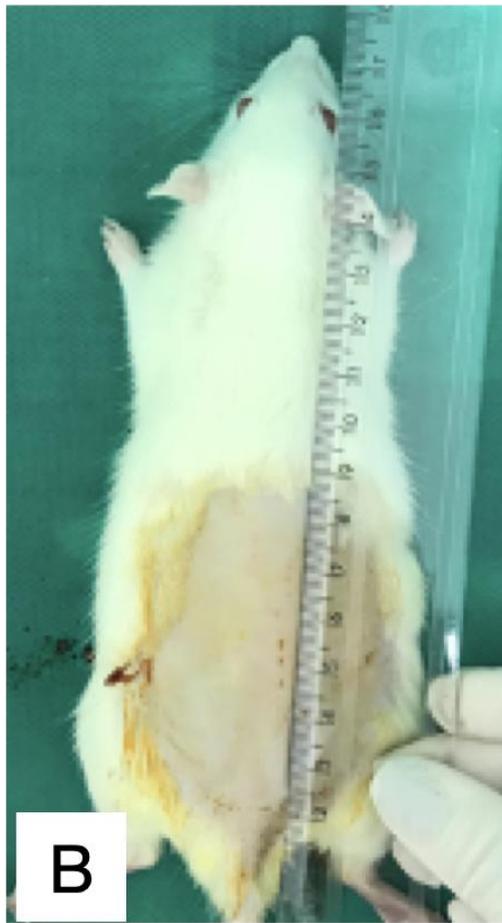
Figura 8 -Contagem de células tumorais viáveis na câmara de Neubauer.



Fonte: Próprio autor.

A etapa seguinte foi o implante do tumor Walker 256 na tela subcutânea (SC). Para o implante, foi escolhido o dorso do animal, onde células de carcinossarcoma 256 de Walker foram inoculadas no subcutâneo, na linha mediana do dorso do animal. Para isso, foi inicialmente realizada anestesia com cetamina 100mg/kg peso e xilazina 10mg/kg peso. Logo após, foi feita a tricotomia dorso do animal (Figura 9 a), a fim de evitar contaminação ou infecção na realização do inóculo e realizada antissepsia com iodopovidona (Figura 9 b). Em seguida foi realizada a marcação da área do inóculo (Figura 9 c) seguida da inoculação da suspensão de células tumorais (Figura 9 d) a 4cm da cauda do animal.

Figura 9 - Procedimento de inoculação de células tumorais. A. Tricotomia. B e C: Antissepsia e marcação da área do inóculo. D. Realização do inóculo.



Fonte: Próprio autor.

No sétimo dia, os animais foram submetidos à anestesia com cetamina 100 mg/kg peso e xilazina 10 mg/kg/peso para ressecção cirúrgica da pele e subcutâneo do dorso (Figura 10) com bisturi elétrico (para evitar esvaziamento dos vasos sanguíneos). Após a retirada do material a ser examinado, o animal foi eutanasiado por sobredose anestésica (três vezes a dose utilizada para o procedimento anestésico).

Figura 10-Ressecção da pele e subcutâneo do dorso.

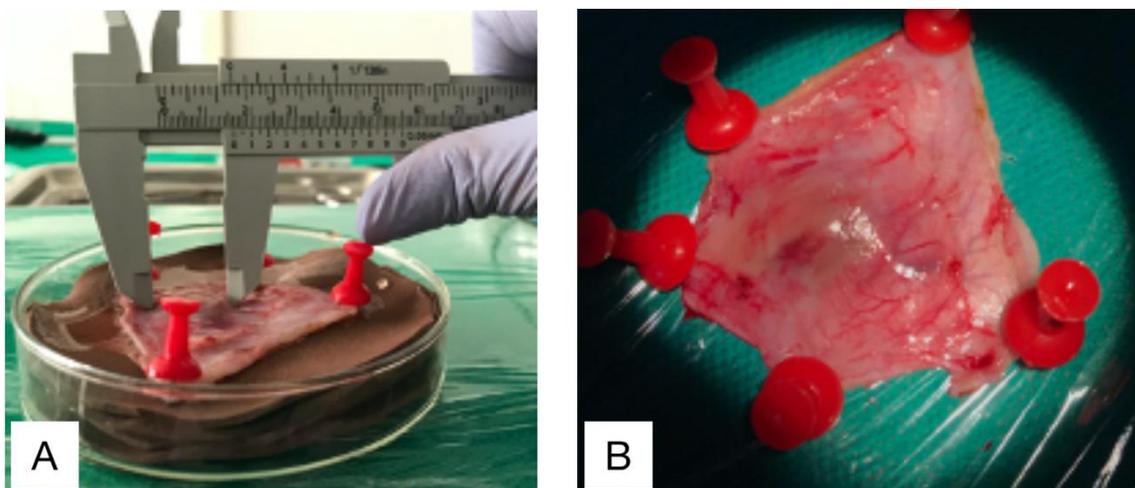


Fonte: Próprio autor.

3.4 Aspecto e tamanho tumoral

Após a retirada da tela subcutânea do dorso, o aspecto do tumor foi avaliado quanto à invasão, necrose e aderência e foi utilizado paquímetro para medir suas maiores dimensões e observação dos aspectos macroscópicos do tumor (Figura 11). O volume do tumor foi calculado através da fórmula: volume do tumor (cm^3) = (maior diâmetro em cm x menor diâmetro em cm^2) x 0,5 (TEICHER, 2002; LEE *et al.*, 2003). As dimensões tumorais, aspectos macroscópicos e microscópicos por grupo encontram-se no Apêndice C.

Figura 11 - Medição das dimensões tumorais. A. medição utilizando paquímetro B. observação dos aspectos macroscópicos do tumor.



Fonte: Próprio autor.

3. 5 Avaliação de metástases macro e microscopicamente

Após eutanásia dos animais, foram retirados pulmão, fígado, baço e rins para análise macro e microscópica e fixados em formol a 10%. Foram examinados sob aspecto macroscópicos e clivados, colocados em cassetes histológicos, seguindo as etapas de processamento: desidratação em álcool a 70%, 95% e 100%, diafazinados com xilol e impregnados em parafina fundida a 60°. A parafina formou com o tecido um bloco, que foram cortados na espessura de 5 μm através de um micrótomo rotativo. Os cortes foram desparafinados, hidratados e, então, corados com hematoxilina e eosina, para montagem de lamínula e análise microscópica. As carcaças dos animais foram enviadas para descarte e posterior incineração.

3.6 Avaliação da angiogênese tumoral por imunohistoquímica

Os critérios de exclusão para realizar a imunohistoquímica foram: não desenvolvimento do tumor e tumores com extensa necrose. Foram incluídos todos os 30 animais. As lâminas silanizadas foram desparafinizadas em estufa por uma hora a 65°C, imersas em xilol, reidratadas em solução decrescente de álcool, lavadas em água corrente e submetidas à recuperação antigênica com solução de Tris-EDTA pH 9,0 em banho maria a 85°C por 30 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente os cortes foram lavados em solução tampão de fosfato 0,1M pH7,3 (PBS) em dois banhos de cinco minutos cada e realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução 3% de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) diluída em PBS por 30 minutos (HSU; RAINE; FANGER, 1981)

Após duas lavagens de cinco minutos em PBS as lâminas foram incubadas *emovernight* com o seguinte anticorpo: Abcam CD-31 (1:100).

No dia seguinte após resfriamento em temperatura ambiente os cortes foram lavados com dois banhos de cinco minutos de PBS, incubados com polímero anti-coelho/anti-rato Dako Envision Dual Link System HRP (Dako®) por 30 minutos. Após nova lavagem com dois banhos de cinco minutos de PBS, as lâminas foram incubadas com 3,3-diamino-benzidina (DAB) por 5 minutos. A reação foi parada com água destilada.

As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris 7% por 10 segundos, lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com Enthellam® (ANDRADE *et al.*, 2007). Como controle positivo, foi utilizado tecido de rim de rato e como controle negativo foi realizado a supressão do anticorpo primário, com incubação do diluente do anticorpo.

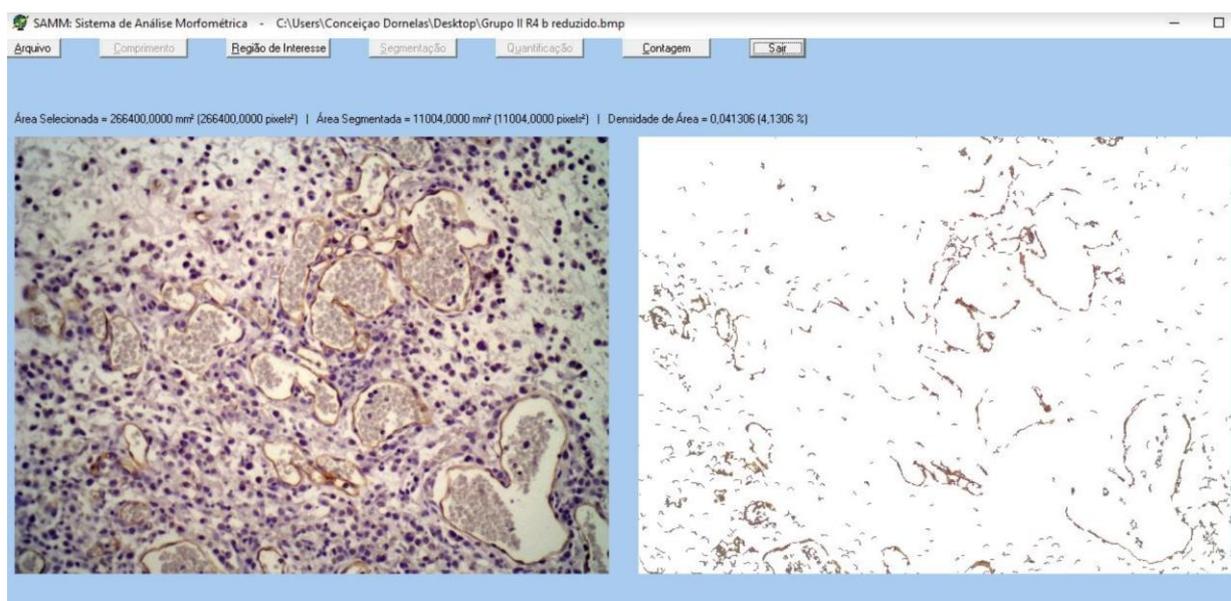
3.7 Quantificação da angiogênese tumoral

Imagens digitais dos preparados histológicos foram capturadas de forma padronizada, utilizando-se, para tanto, um microscópio de luz (BX4, OLYMPYS OPTICAL CO LTD – JAPÃO) equipado com uma câmera digital (C7070 Wide Zoom, OLYMPUS IMAGING AMERICA INC – EUA). O procedimento compreendeu, inicialmente, uma varredura do tumor, utilizando o pequeno aumento (40 vezes), com o objetivo de identificar as zonas de maior densidade vascular (*hot spots*) (Apêndice

D)(WEIDNER, 1995). Para cada tumor, selecionaram-se três *hot spots*. Em seguida, utilizou-se uma magnificação de 200 vezes. Foram capturadas imagens digitais coloridas dos campos relativos os três *hot spots* escolhidas. As imagens foram armazenadas no formato Windows Bitmap (BMP), com as dimensões 600 x 444 pixels, de acordo com o modelo de cores RGB (*Red, Green, Blue*).

As imagens foram analisadas pelo Sistema de Análise Morfométrica (SAMM) (Figura 12), um *software* desenvolvido para tal finalidade (FECHINE-JAMACARU, 2006). O sistema foi previamente calibrado para reconhecer o espectro de cores relativo às estruturas da microvasculatura, segundo a técnica de coloração utilizada. Esse procedimento habilita ao *software* a identificar e segmentar automaticamente os vasos sanguíneos (separando-os dos demais componentes do preparado), sendo possível na imagem inteira ou apenas numa região de interesse definida pelo usuário. Realizada a segmentação, o mesmo determina a densidade microvascular do campo avaliado. Para isso, calculou-se a densidade de área, definida pelo quociente entre área ocupada pela microvasculatura e a área total do campo analisado.

Figura 12 - Ambiente do SAMM - Identificação e segmentação de vasos e células imunocoradas com cálculo de densidade da área (densidade microvascular): área total ocupada pela microvasculatura dividida pela área total do campo analisado.



Fonte: Próprio autor.

3.8 Análise estatística

Com o propósito de identificar e remover valores discrepantes e evitar resultados inconsistentes em decorrência de tais discrepâncias, as medidas da variação relativa do peso corporal, do volume tumoral e da densidade vascular foram analisadas pelo método de Tukey, que define como discrepantes aquelas medidas que são inferiores a $(Q1 - 1,5 \times IIQ)$ e superiores a $(Q3 + 1,5 \times IIQ)$, em que Q1 e Q3 correspondem, respectivamente, ao primeiro e terceiro quartis, enquanto IIQ denota o intervalo interquartil ($IIQ = Q3 - Q1$). Em seguida, essas variáveis foram analisadas pelo teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da distribuição, uma vez que se tratam de variáveis quantitativas. Como tal requisito foi constatado para as referidas variáveis, então, para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão, bem como aplicaram-se métodos paramétricos para a estatística analítica. Comparações entre os grupos Água Destilada (AD), Celecoxibe (CEL), Goma Arábica (GA), Eugenol (EUG) e Goma Arábica associada ao Eugenol (GA+EUG) em relação às variáveis supracitadas foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para um fator de classificação, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares.

Em todas as análises, empregaram-se testes bicaudais, estabelecendo-se o nível de significância em 0,05 (5%), considerando-se, por conseguinte, como estatisticamente significativo um valor P menor que 0,05. O *software* GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

4 RESULTADOS

Tabela 2 – Variação relativa do peso corporal dos animais, volume tumoral e densidade microvascular mensurados nos animais dos grupos Água Destilada (AD), Celecoxibe (CEL), Goma Arábica (GA), Eugenol (EUG) e Goma Arábica associada ao Eugenol (GA+EUG). Comparações entre os cinco grupos de tratamento foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para um fator de classificação, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares.

Parâmetro	D	EL	A	UG	A+EUG	Significância (ANOVA)
	Média± DP (n = 6)	Média± DP (n = 6)	Média± DP (n = 5)	Média± DP (n = 5)	Média± DP (n = 5)	
Variação relativa do peso corporal (%)	2,74 ± 2,42 (n = 6)	2,01 ± 2,01 (n = 6)	3,98 ± 2,54 (n = 5)	3,25 ± 3,59 (n = 5)	1,48 ± 0,73 (n = 5)	P = 0,5071
Volume tumoral (mm ³)	2,02 ± 1,10 (n = 6)	0,69 ± 0,26 ^a (n = 5)	1,07 ± 0,48 (n = 5)	0,98 ± 0,41 (n = 6)	1,10 ± 0,55 (n = 6)	P = 0,0242
Densidade microvascular (%)	14,11 ± 2,57 (n = 6)	8,18 ± 3,93 ^b (n = 6)	11,52 ± 2,85 (n = 6)	15,18 ± 2,83 ^c (n = 5)	14,56 ± 1,84 ^d (n = 5)	P = 0,0028

Fonte: Próprio autor. DP: desvio padrão; As letras ^a(P=0,0193) e ^b(P=0,0145) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo AD, enquanto as letras ^c(P=0,0052) e ^d(P=0,0117) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo CEL (teste de comparações múltiplas de Tukey).

4.1 Exclusão de animais

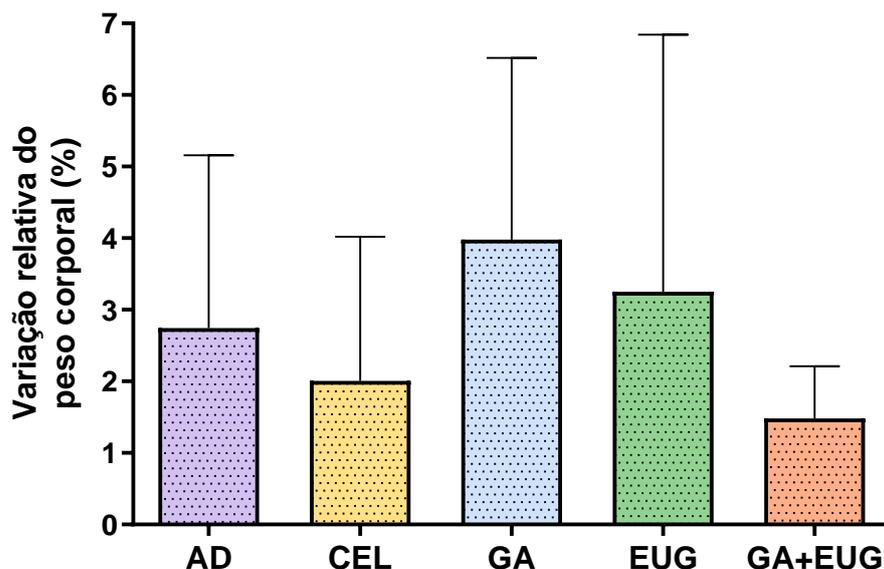
Nenhum animal foi excluído do estudo. Não houve mortalidade.

4.2 Avaliação do aspecto e tamanho do tumor de Walker

Após a retirada da tela subcutânea do dorso animal, foi avaliando o aspecto macroscópico tumoral, e utilizando um paquímetro, foram obtidas suas maiores dimensões (Apêndice C). Os animais que receberam água destilada (grupo VI) apresentaram maior invasão do subcutâneo e da musculatura do dorso.

Todos os animais foram pesados no primeiro e último dia do experimento e foi calculado a variação do peso em percentual (Figura 13). A variação relativa do peso corporal ($\Delta P\%$), expressa em termos percentuais, foi verificada nos animais dos grupos Água Destilada (AD), Celecoxibe (CEL), Goma Arábica (GA), Eugenol (EUG) e Goma Arábica associada ao Eugenol (GA+EUG), calculada conforme a expressão: $\Delta P\% = [(P_{D1} - P_{D6}) / P_{D1}] \cdot 100$, em que P_{D1} e P_{D7} denotam o peso corporal medido no dia um e no dia sete, respectivamente. Dados foram expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas nos animais. Comparações entre os cinco grupos de tratamento foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para um fator de classificação, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos AD, CEL, GA, EUG e AD+EUG em relação à variação relativa do peso corporal (ANOVA: $F = 0,8531$; $P = 0,5071$).

Figura 13 - Variação do peso corporal em %.



Fonte: Próprio autor.

O volume do tumor foi calculado através da seguinte fórmula (TEICHER, 2002; LEE *et al.*, 2003):

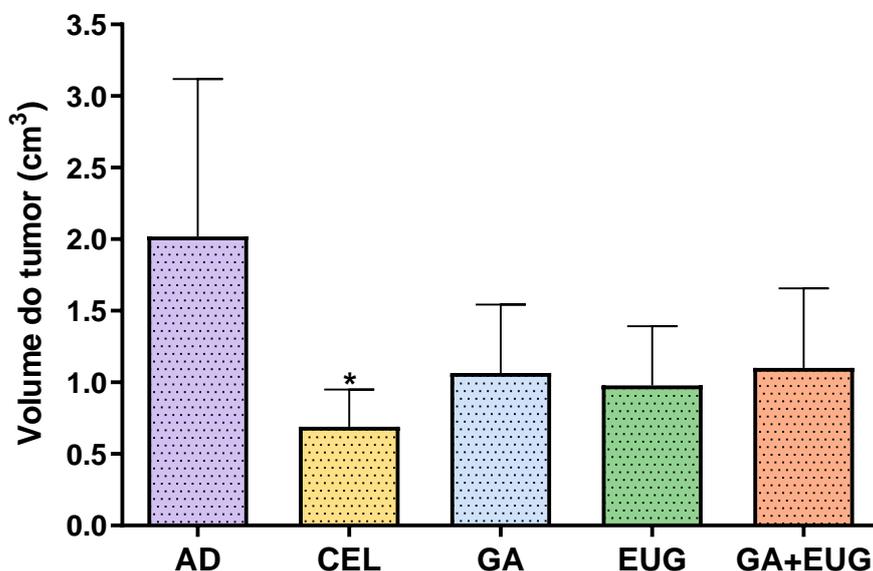
$$\text{Volume do tumor (cm}^3\text{)} = (D \cdot d^2) \times 0,5, \text{ onde:}$$

D: é o maior diâmetro do tumor, em centímetros; e
d: é o menor diâmetro do tumor, em centímetros.

Volume tumoral, expresso em cm^3 , mensurado nos animais dos grupos Água Destilada (AD), Celecoxibe (CEL), Goma Arábica (GA), Eugenol (EUG) e Goma Arábica associada ao Eugenol (GA+EUG) no dia sete do estudo. Dados foram expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas nos animais. Comparações entre os cinco grupos de tratamento foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para um fator de classificação, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares. Constatou-se que o volume tumoral mensurado no grupo CEL foi significativamente menor (* $P=0,0193$) que o verificado no grupo AD.

O tumor apresentou redução do volume nos grupos que receberam celecoxibe, goma arábica, eugenol e goma arábica com eugenol (grupos VII, VIII, IX e X, respectivamente) ($P < 0,05$), principalmente no grupo que recebeu celecoxibe (Figura

14).

Figura 14 -Volume do tumor em cm³.

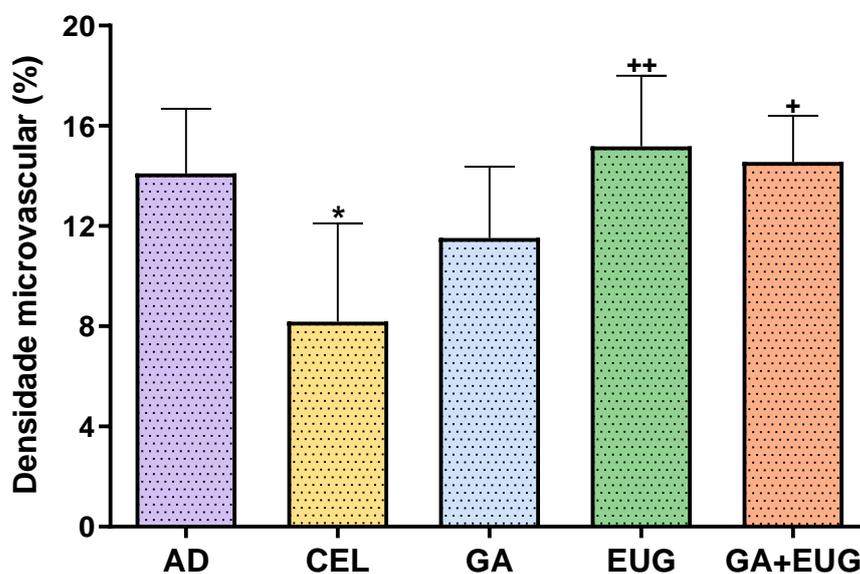
Fonte: Próprio autor. * $P < 0,05$ versus grupo tratado com água destilada.

4.3 Avaliação da angiogênese tumoral

Através de uma varredura microscópica do tumor, foram escolhidas três zonas entre as identificadas como de maior densidade vascular. Após análise realizada pelo SAMM, o *software* identificou, segmentou os vasos sanguíneos e determinou a densidade microvascular dos locais estudados, correspondendo ao quociente entre a área ocupada pela microvasculatura e a área total do campo analisado.

A densidade microvascular, expressa em termos percentuais, verificada nos animais dos grupos Água Destilada (AD), Celecoxibe (CEL), Goma Arábica (GA), Eugenol (EUG) e Goma Arábica associada ao Eugenol (GA+EUG) no dia sete do estudo, definida como a razão entre a área da marcação da microvasculatura e área total do campo analisado multiplicada por 100. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em seis animais dos grupos AD, CEL e GA e em cinco ratas dos grupos EUG e AD+EUG. Comparações entre os cinco grupos de tratamento foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para um fator de classificação, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares (Figura 15).

Figura 15 -Densidade microvascular percentual entre os três *hot spots*.



Fonte:Próprio autor.* $P = 0,0145$ versus grupo tratado com AD. ++($P=0,0052$) e +($P=0,0117$) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo CEL.

4.4 Avaliação de metástases

Foram avaliadas macroscopicamente e microscopicamente em pulmão, fígado, baço e rins, corados pela hematoxilina eosina.

Apenas os grupos que receberam celecoxibe, goma arábica e eugenol (grupos VII, VIII e IX, respectivamente) apresentaram metástases. No grupo VII, um animal apresentou metástase no fígado; no grupo VIII, um animal apresentou metástase no fígado e outro no rim; no grupo IX, também um animal apresentou metástase no fígado e outro no rim.

5DISCUSSÃO

Desde 1971, quando Judah Folkman chamou atenção para a importância da vascularização tumoral para o crescimento do tumor, vários estudos sobre antiangiogênicos têm sido realizados, buscando um alvo promissor no tratamento de vários tipos de câncer (MASHREGHI *et al.*, 2018). Sabe-se que os inibidores de angiogênese disponíveis no mercado para tratamento de neoplasias malignas não são efetivos para todos os tumores, sendo necessária a busca por novas possibilidades.

No presente estudo, buscou-se avaliar o efeito do eugenol e da goma arábica na progressão e angiogênese do tumor de Walker em ratas Wistar, que foram escolhidas pela facilidade de aquisição, manuseio, manutenção, alimentação e higiene nas gaiolas, resistência às infecções e baixo custo (SILVA; SAKATA; ISSY, 2004). Possuem ciclo biológico curto, grau de similaridade genética com seres humanos, com cerca de 80% do DNA idêntico ao do homem (MATTARAIA, 2012), comportamento dócil e tamanho suficiente para permitir seu uso em procedimentos cirúrgicos (BOTELHO, 2016) e acompanhar o crescimento do carcinossarcoma de Walker.

O modelo experimental utilizado, foi descrito por Morano *et al.* 2011, utilizando implante do tumor no dorso animal. Existem diversos modelos experimentais possíveis, que são utilizados para esta investigação, porém o tumor de Walker é mais viável por ser disponível na UFC, tornando-o possível economicamente. Além disso, o modelo em questão já é bem conhecido no estudo do comportamento tumoral (CHEKHUN *et al.*, 2018) e angiogênese (GAO *et al.*, 2016), amplamente utilizado por ser bastante virulento, com pega tumoral de quase 100% e rápido crescimento, podendo ser avaliado em curto espaço de tempo (EARLE, 1935).

Os tumores, que são mantidos semanalmente em laboratório, foram retirados dos animais doadores e após preparo, células viáveis foram utilizadas para inóculo, na concentração de 2×10^6 células/mL e implantados no dorso animal. O inóculo pode ser realizado no subcutâneo, no músculo, peritônio, na pleura (FILHO, 1981), no coração, baço e intravascular (SOARES; TERRA, 1993). Apesar de o músculo da coxa possuir excelente vascularização e ser um excelente local para inóculo tumoral, quando o tumor cresce, limita a movimentação do animal.

No dia seguinte ao inóculo, as substâncias de cada grupo foram administradas por cinco dias. Os grupos VI, VII, VII, IX e X receberam, respectivamente, água destilada, celecoxibe, goma arábica, eugenol e goma arábica com

eugenol. No sétimo dia do experimento, os animais foram anestesiados e submetidos à ressecção cirúrgica da pele e subcutâneo do dorso com bisturi elétrico, para análise macroscópica de suas dimensões, através do paquímetro, e microscópica quanto à necrose, invasão, aderência. A densidade microvascular tumoral foi analisada através de imagens digitais, a partir dos preparados histológicos do tumor coradas pela imunohistoquímica (CD-31).

Conforme descrito na literatura, uso de medicamentos como a aspirina e medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais na associação do câncer e inflamação são utilizados para diminuir a inflamação e o crescimento tumoral evitando o surgimento de tumores sólidos. As respostas imunológicas agem de duas formas diferentes na célula tumoral, consistindo em reação contra antígenos tumorais específicos e contra antígenos associados ao tumor e assim as terapias desenvolvidas são baseadas no reconhecimento de antígenos e devem ser fundamentadas de forma segura garantindo que estas respostas induzirão somente a destruição de células tumorais (GIACOMINI, 2012). Além do efeito antiinflamatório, alguns estudos recentes revelam que a inibição da formação de mediadores inflamatórios pode influenciar o desenvolvimento de tumores, e especialmente pode reduzir a perda de peso corporal mediada pelo tumor (DAVIS *et al.*, 2004). O celecoxibe foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1999 como um agente quimiopreventivo, na dose de 400mg, duas vezes ao dia. É o único dentre os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) que foi aprovado como tratamento adjuvante em pacientes com polipose adenomatosa familiar (PAF) (GASPARINI *et al.*, 2003; GROSH *et al.*, 2006). O efeito antitumoral do celecoxibe parece ocorrer por mecanismos dependentes e independentes da inibição da ciclooxigenase 2, enzima chave da síntese de prostaglandinas (DAVIS *et al.*, 2004). O tumor libera metabólitos e pode produzir fatores catabólicos além de citocinas pró-inflamatórias. É provável que seu efeito nas alterações metabólicas seja, em parte, devido à redução dos metabólitos e produtos tumorais. O possível mecanismo anticarcinogênico envolve bloqueio da proliferação celular e da angiogênese, indução da apoptose e modulação da resposta imune, e tais mecanismos dependem ou não da inibição da COX-2 (GROSH *et al.*, 2006). Tais estudos corroboram com os resultados encontrados neste trabalho, que demonstrou redução do volume tumoral principalmente no grupo que recebeu celecoxibe, diminuindo ainda a densidade microvascular, apresentando ação na inibição da angiogênese tumoral e, neste caso específico, o celecoxibe foi utilizado como controle positivo, levando-se em conta seu efeito tão

festejado pela literatura.

As propriedades antiinflamatórias e antioxidantes da goma arábica (NASIF *et al.*, 2011), sabidamente presentes no processo de angiogênese tumoral, despertam para sua melhor compreensão. Conhecendo sua influência no processo de angiogênese torna-se possível ampliar o arsenal terapêutico e buscar futuros tratamentos de patologias complexas, usando substâncias disponíveis na natureza. Neste estudo, a goma arábica foi determinante para redução do volume tumoral. Em 2010, Nasir publicou um estudo relatando a goma arábica como um potente inibidor do crescimento tumoral e inflamação. Nosso grupo de pesquisa, em publicação recente, comprovou ações antioxidante e antígeno-tóxica da goma arábica 2,5% e 5% em camundongos submetidos à carcinogênese colorretal, com inibição de criptas aberrantes (lesão pré-neoplásica de cólon) em camundongos (AVELINO *et al.*, 2021). Braga *et al.* 2019, observaram a redução de criptas aberrantes associadas ao carcinoma colorretal em ratos Wistar, com goma arábica 1%. Apesar de a goma arábica diminuir o estresse oxidativo, que leva a uma possível diminuição da angiogênese, não foi um achado deste trabalho. Os animais do grupo VIII, que receberam goma arábica, apresentaram redução do volume do tumor comparado ao grupo que recebeu água destilada (grupo VI, controle), mas não apresentaram diminuição da densidade média ou percentual. Não foi possível observar inibição da angiogênese nas doses administradas.

Muitos agentes quimioterápicos utilizados atualmente têm efeitos colaterais a longo prazo. Uma nova geração de drogas com maior eficiência e especificidade são urgentemente necessárias. O eugenol, também um composto natural, tem sido apontado em estudos com um potencial quimiopreventivo de diversos tipos de câncer (BEZERRA, 2017), mostrando ainda maiores taxas de apoptose em relação a outras drogas já disponíveis no mercado (DAS, 2018). Segundo Al-Sharif, o eugenol, em doses baixas, tem toxicidade específica contra diferentes células de câncer de mama, com propriedades anticancerígenas de câncer de mama *in vitro* e *in vivo*, indicando que pode ser utilizado para consolidar o tratamento adjuvante. Estudos descrevem seu duplo efeito sobre o estresse oxidativo, podendo atuar como agente antioxidante ou pró-oxidante. Embora haja um grande número de artigos sobre as propriedades do eugenol, os resultados controversos atrasam a conclusão sobre eficácia e segurança. Sua dualidade parece estar relacionada à dose e concentração, por exemplo, em baixas doses e concentrações sugere-se um efeito antioxidante e em altas doses e concentrações, efeito pró-oxidante. Problemas relacionados ao grau de pureza do composto, sua

volatilidade durante os experimentos pode contribuir para os resultados controversos (BEZERRA *et al.*, 2017) e portanto, no presente estudo foi utilizado em sua forma pura. Os animais dos grupos que receberam eugenol apresentaram redução do volume tumoral em relação aos animais que receberam apenas água destilada. Após análises histopatológicas coradas pela imunohistoquímica dos três *hot spots* não foi encontrado inibição da densidade microvascular com relação ao eugenol.

Diante do observado, houve redução do volume tumoral nos grupos que receberam celecoxibe, goma arábica, eugenol e goma arábica com eugenol (grupos VII, VIII, IX e X, respectivamente), porém a densidade foi reduzida apenas no grupo que recebeu celecoxibe (grupo VII). Sugere-se que a redução do volume tumoral não foi influenciada pela densidade microvascular do tumor (angiogênese). O aspecto do tumor foi avaliado quanto à invasão, necrose e aderência e foram observados seus aspectos macroscópicos. Os animais do grupo VI, que receberam água destilada, apresentaram maior invasão do subcutâneo e da musculatura do dorso pelo tumor, em relação aos demais grupos.

O peso corporal dos animais não sofreu variação com significância estatística em nenhum dos grupos avaliados.

6 CONCLUSÃO

A goma arábica, o celecoxibe e o eugenol reduziram o volume tumoral. Tais achados corroboram com estudos realizados, que demonstraram efeito inibidor do crescimento tumoral das substâncias utilizadas.

Apesar da diminuição do estresse oxidativo associada à goma arábica e ao eugenol demonstrado na literatura, neste estudo, nenhuma das duas substâncias influenciaram na progressão tumoral.

O celecoxibe foi efetivo na diminuição da densidade microvascular, apresentando ação na inibição da angiogênese tumoral, de acordo com dados descritos pela literatura.

REFERÊNCIAS

AFFONSO, R. S. *et al.* Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Rev Virtual Quim**, v. 4, n. 2, p. 146-161, maio. 2012. DOI <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20120012>.

AHN, M. R. *et al.* Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. **Mol Nutr Food Res**, v. 53, n. 5, p. 643-51, May. 2009. DOI [10.1002/mnfr.200800021](https://doi.org/10.1002/mnfr.200800021).

AL-SHARIF, I.; REMMAL, A.; ABOUSSEKHRA, A. Eugenol triggers apoptosis in breast cancer cells through E2F1/surviving down-regulation. **BMC Cancer**, v. 13, 2013. DOI [10.1186/1471-2407-13-600](https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-600).

ALVES, A. P. N. N. *et al.* Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinossarcoma de Walker 256. **Acta Cir Bras.**, v. 19, n.4, p.406-414, 2004. ISSN 1678-2674. DOI [10.1590/S0102-86502004000400011](https://doi.org/10.1590/S0102-86502004000400011).

ALVES, A. P. *et al.* Radiographic and histological evaluation of bisphosphonate alendronate and metotrexate effects on rat mandibles inoculated with Walker 256 carcinosarcoma. **Acta Cir Bras.**, v. 22, n. 6, p. 457-64, 2007. DOI [10.1590/S0102-86502007000600008](https://doi.org/10.1590/S0102-86502007000600008)

ANDRADE, V. P. *et al.* O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **J Bras Patol Med Lab**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 55-60, fev. 2007. DOI [10.1590/S1676-24442007000100011](https://doi.org/10.1590/S1676-24442007000100011).

AVELINO, A. L. N. *et al.* Antioxidant and Antigenotoxic Actions of Gum Arabic on the Intestinal Mucosa, Liver and Bone Marrow of Swiss Mice Submitted to Colorectal Carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, Jun., p. 1-9, 2021. DOI: [10.1080/01635581.2021.1931699](https://doi.org/10.1080/01635581.2021.1931699).

BABIKER, R. *et al.* Effect of Gum Arabic (Acacia Senegal) supplementation on visceral adiposity index (VAI) and blood pressure in patients with type 2 diabetes mellitus as indicator of cardiovascular disease (CVD): a randomized and placebo-controlled clinical trial. **Lipids Health Dis**, v. 17, n. 1, p. 56, Mar. 2018. DOI [10.1186/s12944-018-0711-y](https://doi.org/10.1186/s12944-018-0711-y).

BADRAOUI, R. *et al.* Walker 256/B malignant breast cancer cells disrupt osteoclast cytomorphometry and activity in rats: modulation by α -tocopherol acetate. **Pathol Res Pract**, v. 210, n. 3, p. 135-41, Mar 2014. ISSN 1618-0631.

BEZERRA, D. P. *et al.* The Dual Antioxidant/Prooxidant Effect of Eugenol and Its Action in Cancer Development and Treatment. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1367, Dec. 2017. DOI [10.3390/nu9121367](https://doi.org/10.3390/nu9121367).

BORGHETTI, G. et al. Fish oil administration mediates apoptosis of Walker 256 tumor cells by modulation of p53, Bcl-2, caspase-7 and caspase-3 protein expression. **Lipids Health Dis**, v. 14, p. 94, 2015. ISSN 1476-511X.

BOTELHO, R. S. T. **Elementos da macroscopia em patologia experimental**. 2016. Dissertação (Mestrado em Medicina Dentária) – Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.

BRAGA, V. N. L. et al. Gum arabic and red propolis protecting colorectal preneoplastic lesions in a rat model of azoxymethane. **Acta Cir Bras**, v. 34, n. 2, e201900207, Feb. 2019. DOI 10.1590/s0102-8650201900207.

BREIER, G.; CHAVAKIS, T.; HIRSCH, E. Angiogenesis in metabolic-vascular disease. **ThrombHaemost**, v. 117, n. 7, p. 1289-1295, Jun. 2017. DOI 10.1160/TH17-05-0325.

BRIGATTE, P. et al. Walker 256 Tumor Growth Suppression by Crotoxin Involves Formyl Peptide Receptors and Lipoxin A4. **Mediators Inflamm**, v. 2016, p. 2457532, 2016. ISSN 1466-1861.

CADUFF, J. H.; FISCHER, L. C.; BURRI, P. H. Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. **Anat Rec**, v. 216, n.2, p. 154-164, Oct. 1986. DOI 10.1002/ar.1092160207.

CHEKHUN, V. F. et al. Antitumor and genotoxic effects of lactoferrin in Walker-256 tumor-bearing rats. **Exp Oncol**, v. 40, n. 3, p. 200-204, Oct. 2018.

CRUZ, B.; GOMES-MARCONDES, M. C. Leucine-rich diet supplementation modulates foetal muscle protein metabolism impaired by Walker-256 tumour. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, p. 2, 2014. ISSN 1477-7827.

DALEPRANE, J. B.; ABDALLA, D. S. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 175135, Apr. 2013. DOI 10.1155/2013/175135.

DAS, A. et al. Evaluation of Therapeutic Potential of Eugenol-A Natural Derivative of *Syzygium aromaticum* on Cervical Cancer. **AsianPac J CancerPrev**, v. 19, n. 7, p. 1977-1985, Jul. 2018. DOI 10.22034/APJCP.2018.19.7.1977.

DAVIS, T. W. et al. Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Celecoxib Reverses Tumor-Induced Wasting. **J PharmacolExpTher**, v. 308, n. 3, p. 929-934, Mar. 2004. DOI 10.1124/jpet.103.063099.

DE FATIMA SILVA, F. et al. Pioglitazone improves insulin sensitivity and reduces weight loss in Walker-256 tumor-bearing rats. **Life Sci**, v. 171, p. 68-74, Feb 2017. ISSN 1879-0631.

DE QUEIROZ, E. A. et al. Metformin reduces the Walker-256 tumor development in obese-MSG rats via AMPK and FOXO3a. **Life Sci**, v. 121, p. 78-87, Jan 2015. ISSN 1879-0631.

DE SOUZA, C. O. *et al.* Effects of celecoxib and ibuprofen on metabolic disorders induced by Walker-256 tumor in rats. **Mol Cell Biochem**, v. 399, n. 1-2, p. 237-46, Jan 2015. ISSN 1573-4919.

DEMINICE, R. *et al.* Creatine supplementation prevents hyperhomocysteinemia, oxidative stress and cancer-induced cachexia progression in Walker-256 tumor-bearing rats. **Amino Acids**, Jan 2016. ISSN 1438-2199.

DORNELAS, C. A. *et al.* Experimental model of Walker 256 carcinosarcoma in rats bladder. **Acta CirBras**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 38-42, jan./ fev. 2006. DOI 10.1590/S0102-86502006000100009.

EARLE, W. R. A study of the Walker rat mammary Carcinoma 256, in vivo and in vitro. **Am J Cancer**. v. 24, p.566-612, 1935.

EFREMOV, A. V. *et al.* Changes in lipid metabolism during Walker 256 tumor growth and the therapeutic effect of hyperthermia. **Bull Exp Biol Med**, v. 156, n. 6, p. 838-40, Apr 2014. ISSN 1573-8221.

FAN, H. *et al.* Comparative Pharmacokinetics of Ginsenoside Rg3 and Ginsenoside Rh2 after Oral Administration of Ginsenoside Rg3 in Normal and Walker 256 Tumor-bearing Rats. **PharmacognMag**, v. 12, n. 45, p. 21-4, 2016 Jan-Mar 2016. ISSN 0973-1296.

FECHINE-JAMACARU, F, V. **Quantificação da angiogênese corneanain vivo através de processamento de imagens digitais**. 2006.Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Experimental models in research. **Acta CirBras**, São Paulo, v. 20, p. 28-34, 2005.supl. 2. DOI 10.1590/S0102-86502005000800008.

FILHO, M. M. O. **Efeitos antineoplásicos do Cróton mucronifolius o Carcinossarcoma 256 de Walker**.Dissertação(Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, 1981.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: anorganizingprinciple for drugdiscovery? **Nat RevDrug Discov**, v. 6, n. 4, p. 273-86, Apr. 2007. DOI 10.1038/nrd2115.

FRACARO, L. *et al.* Walker 256 tumor-bearing rats demonstrate altered interstitial cells of Cajal. Effects on ICC in the Walker 256 tumor model. **NeurogastroenterolMotil**, v. 28, n. 1, p. 101-15, Jan 2016. ISSN 1365-2982.

FRANCO, C. C. *et al.* Protective effect of metformin against walker 256 tumor growth is not dependent on metabolism improvement. **Cell PhysiolBiochem**, v. 34, n. 6, p. 1920-32, 2014. ISSN 1421-9778.

FU, S, L. *et al.* Anti-cancer effects os COX-2 inhibitors and their correlation with angiogenesis and invasion in gastric cancer. **World J Gastroenterol.**, v. 10, n. 13, p. 1971, 2004.

GABAS, V. G. S.; CAVALCANTI, O. A. Influência da adição da goma arábica em filmes isolados de polímero acrílico: estudo das propriedades de intumescimento e de permeabilidade. **RevBrasCiencFarm**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 442-448, out. /dez. 2003. DOI 10.1590/S1516-93322003000400012.

GAO, H. *et al.* Inhibitory effect of endostatin gene therapy combined with phosphorus-32 colloid on tumour growth in Wistar rats. **Biosci Rep**, v. 36, n. 3, e00353, Jun. 2016. DOI 10.1042/BSR20160117.

GAO, W. *et al.* Effect of microbubble-enhanced ultrasound on percutaneous ethanol ablation of rat walker-256 tumour. **Eur Radiol**, Dec 2015. ISSN 1432-1084.

GASPARINI, G. *et al.* Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents? **Lancet Oncol**, v.4, n. 10, p.605-615, Oct. 2003. DOI 10.1016/s1470-2045(03)01220-8.

GAZOLLA, P. A. R. *et al.* Síntese e avaliação da atividade citotóxica de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. **QuímNova**, São Paulo, v. 41, n. 5, p. 497-506, 2018. DOI 10.21577/0100-4042.20170206

GIACOMINI, G, MENEZES, H. Técnicas e perspectivas em imunoterapia do câncer. **Revista Saúde e Pesquisa**, São Paulo, v.5, n.3, p.567-578, set/dez. 2012.

GOMES-NETO. A. *et al.* Modelo de tumor de pulmão em rato com o carcinossarcoma de Walker. **Acta CirBras**, v. 17, n. 1, p. 12-22, jan./fev. 2002.

GONZALEZ, R. P. *et al.* Método para o estudo in vivo da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. **Acta CirBras**, São Paulo, v. 15, n. 3, jul./ago./set. 2000. DOI 10.1590/S0102-86502000000300006.

GRÖSCH, S.; MAIER, T. J.; SCHIFFMANN, S. *et al.* Cyclooxygenase-2 (COX-2) - independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. **J Natl Cancer Inst**, v. 98, n. 11, p. 736-747, Jun. 2006. DOI 10.1093/jnci/djj206.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of cancer. **Cell**, vol. 100, n.1, p-57-70, Jan. 2000. DOI 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

HSU, S.; RAINE, L.; FANGER, H. The use of antiavidinantibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. **Am J Clin Pathol**, v. 75, n. 6, p. 816-821, Jun. 1981. DOI 10.1093/ajcp/75.6.816.

JUANES, C. C. **Própolis vermelha e L-lisina inibindo a angiogênese no tumor de Walker em modelo de bolsa jugal de hamster**. 2018. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

KADDAM, L. *et al.* Gum Arabic as novel anti-oxidant agent in sickle cell anemia, phase II trial. **BMC Hematol**, v. 17, n.4, p. 2-6, Mar. 2017. DOI 10.1186/s12878-017-0075-y. eCollection 2017.

KADDAM, L. *et al.* Acacia Senegal (Gum Arabic) supplementation modulate lipid

profile and ameliorated dyslipidemia among sickle cell anemia patients. **J Lipids**, v. 2019:3129461, Jun. 2019. DOI 10.1155/2019/3129461. eCollection 2019.

KAMAL, E.*et al.* Gum Arabic fibers decreased inflammatory markers and disease severity score among rheumatoid arthritis patients, phase II trial. **Int J Rheumatol**, v. 2018:4197537, Jul. 2018. DOI 10.1155/2018/4197537. eCollection 2018.

KHUDA-BUKHSH, A. R. *et al.* Molecular approaches toward targeted cancer prevention with some food plants and their products: inflammatory and other signal pathways. **NutrCancer**, v. 66, n.2, p. 194-205, 2014. DOI10.1080/01635581.2014.864420.

KLENKE, F. M. *et al.* The selective COX-2 inhibitor Celecoxib suppresses angiogenesis and growth of secondary bone tumors: an intravital microscopy study in mice. **BMC Cancer**, v. 6, n. 9, p. 1-8, 2006.

KUBOTA, Y. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. **Keio J Med**, v.61, n.2, p. 47-56, 2012. DOI 10.2302/kjm.61.47.

LEAHY, K. M. *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxibe reduced proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. **Cancer Res.**, v. 62, p. 625-631, 2002.

LEE, Y.L. *et al.* Oral administration of *Agaricusblazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a Sarcoma 180 inoculation model. **Exp Anim**, v.52, n. 5, p. 371-375. Oct. 2003. DOI 10.1538/expanim.52.371.

LIU H., *et al.* Clove extract inhibits tumor growth and promotes cell cycle arrest and apoptosis. **Oncol Res**, v. 21, n.5, p. 247-59, 2014. DOI 10.3727/096504014X13946388748910.

MANIKANDAN, P. *et al.* Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. **Life Sciences**, v. 86, p. 936-941, 2010. DOI 10.1016/j.lfs.2010.04.010.

MARTINS, G. G. *et al.* Sesquiterpene lactones of *Moquiniastrumpolymorphum* subsp. *floccosum* have antineoplastic effects in Walker-256 tumor-bearing rats. **Chem Biol Interact**, v. 228, p. 46-56, Feb 2015. ISSN 1872-7786.

MASHREGHI, M. *et al.* Angiogenesis biomarker and their targeting ligands as potential targets for tumor angiogenesis. **J CellPhysiol**, v. 233, n. 4, p. 2949-2965, Apr. 2018. DOI 10.1002/jcp.26049.

MATTARAIA, V.G.M.; MOURA, A.S.A.M.T. Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. **CiencRural**, SantaMaria, v. 42, n. 8, p. 1490-1496, ago. 2012. DOI 10.1590/S0103-84782012000800026.

MCNAMEE, B. F.; O'RIORDAN, D.; O'SULLIVAN, M. Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. **J Agric Food Chem**, v. 46, p. 4551-4555, Oct.1998. DOI10.1021/jf9803740.

MORAES, S. P. DE. *et al.* Walker's tumoral experimental model. **Acta CirBras**, São Paulo, v. 15, n. 4, out. /nov./dez. 2000. DOI 10.1590/S0102-86502000000400008.

MORANO, J. A. C. O. D. *et al.* Experimental model of ultrasound thermotherapy in rats inoculated with Walker-236 tumor. **Acta CirBras**, São Paulo, v. 26, p. 53-56, 2011.supl. 1. DOI 10.1590/S0102-86502011000700011.

NASIF, W. A.; LOTFY, M.; MAHMOUD, M. R. Protective effect of gum acacia against the aspirin induced intestinal and pancreatic alterations. **EurRevMedPharmacolSci**, v. 15, n. 3, p. 285-292, Mar. 2011.

NASIR, O. *et al.* Downregulation of Angiogenin Transcript Levels and Inhibition of Colonic Carcinoma by Gum Arabic (*Acacia senegal*). **Nutr Cancer**, v. 62, n. 6, p. 802–810, 2010. DOI 10.1080/01635581003605920.

NASIR, O. Renal and Extrarenal Effects of Gum Arabic (*Acacia Senegal*) – What Can be Learned from Animal Experiments? **Kidney Blood Press Res**, v. 37, n. 4-5, p. 269-279, 2013. DOI 10.1159/000350152.

OLIVEIRA-FILHO, R. S.; BEVILACQUA, R. G.; CHAMMAS, R. Hyperthermia increases the metastatic potential of murine melanoma. **Braz J MedBiol Res**, v. 30, n. 8, p. 941-945, Aug. 1997. DOI 10.1590/S0100-879X1997000800005.

OLIVEIRA, P. F. M. *et al.* Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de Walker em estômago de rato . **Acta CirBras**, v. 13, n. 4, p. 243-248, 1998.

PARK, Y. K. *et al.* Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **JAgric Food Chem**, v. 52, p. 1100-1103, 2004.

RAMJAWAN, R. R.; GRIFFIOEN, A. W., DUDA, D. G. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? **Angiogenesis**, v. 20, n.2, p. 185- 204, May. 2017. DOI 10.1007/s10456-017-9552-y.

RONCA, R. *et al.* Tumor angiogenesis revisited: regulators and clinical implications. **Med Res Rev**, v. 37, n. 6, p. 1231-1274, Nov. 2017. DOI 10.1002/med.21452.

SADEGHI, S. *et al.* Anti-cancer effects of cinnamon: Insights into its apoptosis effects. **Eur J Med Chem**, v. 15, p. 131-140, Sep. 2019. DOI 10.1016/j.ejmech.2019.05.067.

SAFATLE, A. M. V. *et al.* Implantation of two biological membranes in a corneal micropocket as an experimental model for angiogenesis. **Braz JVet Res AnimSci**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 189-195, 2002. DOI 10.1590/S1413-95962002000400005.

SAKAGAMI, H. *et al.* Changes in metabolic profiles of human oral cells by benzylidene ascorbates and eugenol. **Medicines**, v. 5, n. 4, 116, Oct. 2018. DOI 10.3390/medicines5040116.

SILVA, N. S. F.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. Correlation between CSF concentration and side effects after spinal morphine injection in rats. **Rev Bras Anesthesiol**, Rio de Janeiro, v. 54, n.1, p. 53-59. fev. 2004. DOI 10.1590/s0034-70942004000100007.

SILVA, L. F. G. *et al.* Experimental tumor model in rats kidney. **Acta Cir Bras**, v. 17, n. 1, p. 62-66, jan. / fev. 2002. DOI 10.1590/S0102-86502002000100009.

SOARES, F. A.; TERRA, V. C. Thoracic lymphnode metastasis and carcinomatous lymphangitis after inoculation of Walker 256 tumor through the trachea. **Brazilian J Med Bio Res**, v. 26, n. 2, p. 191-101. Feb. 1993.

STIPP, M. C. *et al.* Necroptosis mediates the antineoplastic effects of the soluble fraction of polysaccharide from red wine in Walker-256 tumor-bearing rats. **Carbohydr Polym**, v. 160, p. 123-133, Mar 2017. ISSN 1879-1344.

TEICHER, B. A. **Tumor models in cancer research**. Totowa, New Jersey Human Press. 2002.

TODOR, I. N. *et al.* Metabolic changes during development of Walker-256 carcinosarcoma resistance to doxorubicin. **Exp Oncol**, v. 37, n. 1, p. 19-22, Mar 2015. ISSN 1812-9269.

VANDAMME, T. F. *et al.* The use of polysaccharides to target drugs to the colon. **Carbohydrate Polymer**, v. 48, p. 219-231, 2002.

VIALARD, C.; LARRIVEÉ, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutics targets. **Angiogenesis**, v. 20, n. 4, p. 409-426, Nov. 2017. DOI 10.1007/s10456-017-9562-9.

VIDHYA, N.; DEVARAJ, S. N. Induction of apoptosis by eugenol in human breast cancer cells. **Indian J Exp Biol**, v. 49, n. 11, p. 871-8, Nov. 2011.

WANG, H. *et al.* Abscopal antitumor immune effects of magnet-mediated hyperthermia at a high therapeutic temperature on Walker-256 carcinosarcomas in rats. **Oncol Lett**, v. 7, n. 3, p. 764-770, Mar 2014. ISSN 1792-1074.

WEIDNER, N. Intratumor microvessels density as prognostic factor in cancer. **Am J Pathol**, v. 147, n. 1, p. 9-19, Jul. 1995.

YAN, X. *et al.* Eugenol inhibits oxidative phosphorylation and fatty acid oxidation via downregulation of c-Myc/PGC-1 β /ERR α signaling pathway in MCF10A-ras cells. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 12920, Oct. 2017. DOI 10.1038/s41598-017-13505-x.

ZHANG, M. *et al.* Low-Dose Cannabinoid Type 2 Receptor Agonist Attenuates Tolerance to Repeated Morphine Administration via Regulating μ -Opioid Receptor Expression in Walker 256 Tumor-Bearing Rats. **Anesth Analg**, v. 122, n. 4, p. 1031- 7, Apr 2016. ISSN 1526-7598.

ZARUR, J. M. *et al.* Transarterial hepatic chemoembolization: an experimental model in rats. *Acta Cir Bras*, v. 19, n. 5, p. 511-6, set. / out. 2004. DOI 10.1590/S0102-86502004000500009.

APENDICE A - TABELA DE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS POR GRUPO

GRUPO I	Peso no D1	Peso no D6
Rata 1	114 g	130 g
Rata 2	118 g	140 g
Rata 3	126 g	144 g
Rata 4	124 g	140 g
Rata 5	128 g	142 g
Rata 6	128 g	140 g
GRUPO II	Peso no D1	Peso no D6
Rata 1	114 g	142 g
Rata 2	126 g	146 g
Rata 3	110 g	126 g
Rata 4	122 g	134 g
Rata 5	120 g	140 g
Rata 6	126 g	142 g
GRUPO III	Peso no D1	Peso no D6
Rata 1	122 g	140 g
Rata 2	116 g	128 g
Rata 3	122 g	138 g
Rata 4	118 g	134 g
Rata 5	134 g	150 g
Rata 6	122 g	137 g
GRUPO IV	Peso no D1	Peso no D6
Rata 1	116 g	130 g
Rata 2	120 g	132 g
Rata 3	122 g	136 g
Rata 4	126 g	138 g
Rata 5	124 g	140 g
Rata 6	120 g	132 g
GRUPO V	Peso no D1	Peso no D6
Rata 1	128 g	142 g
Rata 2	116 g	132 g
Rata 3	130 g	144 g
Rata 4	120 g	128 g
Rata 5	118 g	130 g
Rata 6	130 g	142 g
GRUPO VI	Peso no D1	Peso no D6
Rata 1	141 g	146 g

Rata 2	160 g	164 g
Rata 3	183 g	186 g
Rata 4	150 g	148 g
Rata 5	140 g	147 g
Rata 6	157 g	165 g
GRUPO VII	Peso no D1	Peso no D6
Rata 1	170 g	170 g
Rata 2	155 g	159 g
Rata 3	168 g	173 g
Rata 4	176 g	180 g
Rata 5	145 g	152 g
Rata 6	164 g	163 g
GRUPO VIII	Peso no D1	Peso no D6
Rata 1	168 g	173 g
Rata 2	175 g	175 g
Rata 3	162 g	171 g
Rata 4	160 g	170 g
Rata 5	180 g	198 g
Rata 6	176 g	185 g
GRUPO IX	Peso no D1	Peso no D6
Rata 1	158 g	162 g
Rata 2	141 g	149 g
Rata 3	165 g	172 g
Rata 4	156 g	166 g
Rata 5	142 g	169 g
Rata 6	154 g	150 g
GRUPO X	Peso no D1	Peso no D6
Rata 1	161 g	168 g
Rata 2	162 g	166 g
Rata 3	174 g	176 g
Rata 4	155 g	158 g
Rata 5	161 g	163 g
Rata 6	165 g	166 g

Fonte: Próprio autor.

APENDICE B- TABELA DAS DOSES DAS SUBSTÂNCIAS ADMINISTRADAS

	Água destilada	Celecoxibe	Goma Arábica	Eugenol
Grupo I	0,6 mL	-	-	-
Grupo II	-	0,6 mL	-	-
Grupo III	-	-	1,0 mL	-
Grupo IV	-	-	-	10 µL
Grupo V	-	-	1,0 mL	10 µL
Grupo VI	0,7mL	-	-	-
Grupo VII	-	0,8 mL	-	-
Grupo VIII	-	-	1,0 mL	-
Grupo IX	-	-	-	14 µL
Grupo X	-	-	1,0 mL	15 µL

Fonte: Próprioautor.

APENDICE C- TABELA DE DIMENSÕES DO TUMOR E ASPECTOS MACRO E MICROSCÓPICOS POR GRUPOS

GRUPO VI	Dimensões (cm)	Aspecto
Rata 1	1,3 x 1,2	-
Rata 2	2,0 x 1,7	Tumor invadindo musculatura do dorso
Rata 3	2 x 1,4	Tumor aderido à musculatura
Rata 4	1,2 x 2,2	Invasão de subcutâneo em profundidade
Rata 5	2,3 x 1,8	Tumor aderido
Rata 6	1,4 x 1,2	-
GRUPO VII	Dimensões	Aspecto
Rata 1	1,2 x 1,2	Tumor aderido microscopicamente à musculatura
Rata 2	1,3 x 1,4	-
Rata 3	1,2 x 1,2	-
Rata 4	0,7 x 1,1	-
Rata 5	1,2 x 1,2	-
Rata 6	1,0 x 1,2	-
GRUPO VIII	Dimensões	Aspecto
Rata 1	2,5 x 2,3	-
Rata 2	1,1 x 1,5	-
Rata 3	1,0 x 1,1	-
Rata 4	1,4 x 1,6	Tumor aderido à musculatura
Rata 5	1,4 x 1,6	-
Rata 6	1,2 x 1,1	-
GRUPO IX	Dimensões	Aspecto
Rata 1	1,3 x 1,0	-
Rata 2	1,2 x 1,2	-
Rata 3	1,1 x 1,0	-
Rata 4	1,2 x 1,3	-
Rata 5	1,5 x 1,5	-
Rata 6	1,4 x 1,3	-
GRUPO X	Dimensões	Aspecto
Rata 1	1,1 x 1,1	-
Rata 2	1,5 x 1,5	-
Rata 3	1,2 x 1,1	-
Rata 4	1,7 x 1,5	-
Rata 5	1,1 x 1,1	-
Rata 6	1,3 x 1,2	-

Fonte: Próprioautor.

APENDICE D- TABELA DE DENSIDADE TUMORAL POR GRUPOS

GRUPO VI	Densidade 1	%	Densidade 2	%	Densidade 3	%
Rata 1	0,072	7,241	0,204	20,430	0,139	13,956
Rata 2	0,166	16,678	0,128	12,810	0,159	15,944
Rata 3	0,186	18,678	0,166	16,686	0,182	18,206
Rata 4	0,110	11,016	0,108	10,8093	0,087	8,786
Rata 5	0,212	21,263	0,098	9,830	0,135	13,505
Rata 6	0,227	22,757	0,072	7,203	0,080	8,088
GRUPO VII	Densidade 1	%	Densidade 2	%	Densidade 3	%
Rata 1	0,121	12,141	0,187	18,735	0,142	14,225
Rata 2	0,065	6,564	0,077	7,789	0,175	17,508
Rata 3	0,142	14,231	0,124	12,418	0,118	11,897
Rata 4	0,110	11,087	0,089	8,921	0,129	12,956
Rata 5	0,042	4,250	0,049	4,923	0,099	9,994
Rata 6	0,164	16,423	0,145	14,581	0,122	12,296
GRUPO VIII	Densidade 1	%	Densidade 2	%	Densidade 3	%
Rata 1	0,037	3,789	0,192	19,202	0,153	15,349
Rata 2	0,209	20,999	0,113	11,350	0,153	15,387
Rata 3	0,077	7,726	0,043	4,332	0,150	15,085
Rata 4	0,143	14,363	0,101	10,156	0,207	2,076
Rata 5	0,095	9,527	0,095	9,559	0,093	9,336
Rata 6	0,150	15,078	0,143	14,398	0,096	9,626
GRUPO IX	Densidade 1	%	Densidade 2	%	Densidade 3	%
Rata 1	0,142	14,272	0,267	26,751	0,144	14,408
Rata 2	0,133	13,335	0,183	18,305	0,181	18,314
Rata 3	0,134	13,421	0,112	11,256	0,079	7,968
Rata 4	0,121	12,109	0,134	13,474	0,113	11,308
Rata 5	0,135	13,529	0,120	12,012	0,181	18,128
Rata 6	0,145	14,539	0,084	8,439	0,229	22,969
GRUPO X	Densidade 1	%	Densidade 2	%	Densidade 3	%
Rata 1	0,142	14,201	0,129	12,956	0,123	12,301
Rata 2	0,146	14,681	0,051	5,168	0,220	22,084
Rata 3	0,193	19,316	0,185	18,501	0,087	8,769
Rata 4	0,211	21,246	0,072	7,203	0,234	23,417
Rata 5	0,292	29,266	0,049	4,927	0,043	4,380
Rata 6	0,149	14,972	0,157	15,761	0,092	9,213

Fonte: Próprioautor.

APENDICE E –ARTIGO PUBLICADO**EFFECT OF GUM ARABIC AND EUGENOL ON THE PROGRESSION AND ANGIOGENESIS OF WALKER TUMORS IMPLANTED SUBCUTANEOUSLY IN WISTAR RATS**

Lead Author: Carolina Lyra Barreira Carneiro ¹

Co-authors:

Gilson Brito de Oliveira², Bárbara de Araújo Lima Dutra³, Nayanna de Oliveira Ramos Melo⁴, Francisco Stefânio Barreto⁵, Francisco VagnaldoFechine Jamacaru⁶, Telma Leda Gomes de Lemos⁷, Conceição Aparecida Dornelas⁸

1 Master's student in the Postgraduate Program in Medical Sciences – Surgery, of the School of Medicine, Ceará Federal University.

2Graduated at the School of Medicine, Ceará Federal University.

3 Master's student in the Postgraduate Program in Pathology, School of Medicine, Ceará Federal University.

4 Doctoral student in the Postgraduate Program in Medical Sciences – Surgery, School of Medicine, Ceará Federal University.

5 PhD in Pharmacology

6 PhD in Surgery and researcher with the Drug Research and Development Center, School of Medicine, Ceará Federal University.

7 PhD in Pharmacognosy, professor with the Department of Organic and Inorganic Chemistry, Ceará Federal University

8 PhD in Surgery, associate professor in the Postgraduate Program in Medical-Surgical Sciences of the Department of Surgery of the Federal University of Ceará, Brazil

Corresponding author: Carolina Lyra Barreira Carneiro, Department of Surgery, School of Medicine, Ceará Federal University (UFC), Rua Prof. Costa Mendes, 1608 - 3o Andar - BlocoDidático, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará. CEP: 60430140. Telephone: +55 85 981640404. E-mail: carolllyra@hotmail.com

ABSTRACT

Many experimental models are applied to expand the arsenal of molecules that can inhibit or stimulate angiogenesis. Walker 256 carcinosarcoma was discovered when analyzing mammary gland adenocarcinomas in female rats and has been maintained in the laboratory since then. It has fast and aggressive growth, enabling experimental evaluation of the response to antiangiogenics. We analyzed the use of gum arabic, a natural substance obtained from the sap of the trunks and branches of *Acacia senegal* trees, and eugenol, one of the main components of clove essential oil, against Walker tumors in rats. Both substances alone have been experimentally found to have antioxidant activity, as well as anticancerogenic and cytotoxic effects, but no study has yet tested the effect of both substances simultaneously. Specifically, we evaluated the effect of gum arabic and eugenol on the progression and angiogenesis of Walker tumor cells implanted in the subcutaneous tissue of Wistar rats. Sixty female rats, with average weight of 150 grams, were distributed in 10 groups of 6 animals each, with five control groups and five treatment groups. The treatment groups received Walker tumor implants on the first day of the experiment, followed by administration of the test substances by gavage for 5 days. The control groups received the same substances, except the inoculum was distilled water. The substances administered were distilled water, celecoxib, gum arabic and eugenol, the last of which was used in pure form. We evaluated the tumor dimensions and macroscopic and microscopic appearance (hematoxylin-eosin staining). The study of angiogenesis was performed by immunohistochemistry (CD-31), and the quantification was achieved by evaluation of the microvascular density by the SAMM software applied to images of the areas with greatest microvascular density. The animals that received only distilled water suffered from greater invasion of the dorsal subcutaneous tissue and musculature by the tumor in relation to the other groups. The tumor volume was smaller in the groups that received gum arabic or eugenol alone and those receiving gum arabic together with eugenol and celecoxib, but the microvascular density was smaller only in the group that received celecoxib alone. Thus, only celecoxib inhibited angiogenesis. Gum arabic and eugenol, in the doses administered, reduced the tumor growth, but did not inhibit angiogenesis of the Walker tumor cell implants.

Keywords: Angiogenesis inhibitors. Walker 256 carcinoma. Gum arabic. Eugenol.

INTRODUCTION

Angiogenesis is a process consisting of multiple steps leading to the formation of new blood vessels from existing capillaries. In 1971, Judah Folkman reported the importance of vascularization for the growth of tumors, postulating that a tumor might die if it were prevented from obtaining its own blood supply. Therefore, inhibition of tumor vascularization can be a promising way to treat various types of cancer (Mashreghiet *al*, 2018). The appropriate dose of the antiangiogenic agent can lead to normalization of the tumor vasculature, and thus improve the effect of chemotherapy.

Because of the rising incidence of cancer morbimortality in Brazil and the rest of the world, it is necessary to find new alternatives to fill gaps in the current treatment arsenal.

The Walker 256 carcinosarcoma was discovered in 1928 in mammary gland adenocarcinomas of pregnant female albino rats. Since then, these tumors have been maintained in the laboratory in musculature implants of rats (Dornelaset *al.*, 2006). Their rapid development and aggressiveness enables experimentally evaluating the response to antiangiogenics.

Gum arabic is a product obtained from the sap of the trunks and branches of *Acacia Senegal* trees (Gabaset *al.*, 2003). Various studies have shown its potent antioxidant effects in humans, by diminishing oxidative stress (Kaddam, 2017). The relationship between oxidative stress and angiogenesis is well established, as is that between oxidative stress and tumor hypoxia (Daleprane& Abdalla, 2013).

Eugenol is one of the principal components of clove essential oil. It reportedly has anticancerogenic, cytotoxic and antitumor activities (Bezerra, 2017), producing a greater cancer cell apoptosis rate than other commercially available drugs (Das *et al.*, 2018).

The angiogenesis inhibitors currently available to treat malignant neoplasms are not effective against all tumors, so it is necessary to investigate new possibilities. The objective of this work was to evaluate the effect of gum arabic and eugenol, alone and combined, on the progression and angiogenesis of Walker tumors implanted in Wistar rats, through immunohistochemistry, as well as the tumor growth and possible metastasis.

METHODS

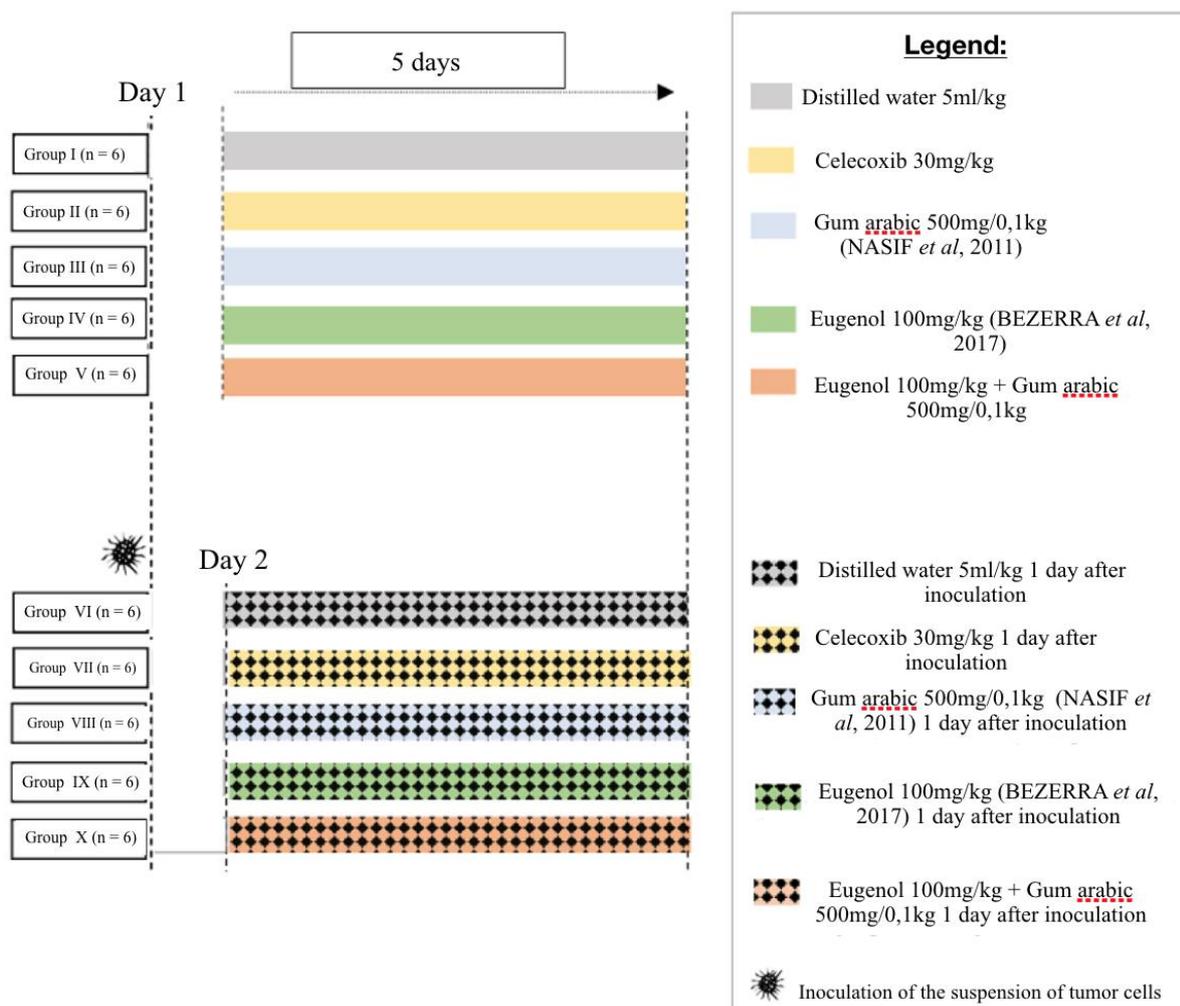
Subjects

This study was approved by the Committee on Ethical Use of Animals (CEUA) of Ceará Federal University (UFC). We used 60 female Wistar rats, supplied by the bioterium of UTC's Department of Surgery. The animals were kept in groups of 6 per cage, in 10 cages, and were clinically assessed throughout the experiment.

Experiment

On the first day of the experiment, groups I, II, III, IV and V (control) received inoculum of distilled water (0.1 mL) on the back, while groups VI, VII, VIII, IX and X received Walker tumor cell implants on the back. In the five ensuing days, the substances were administered by gavage in both groups, in a case-control experimental design (Figure 1)

Figure 1 – Experimental design



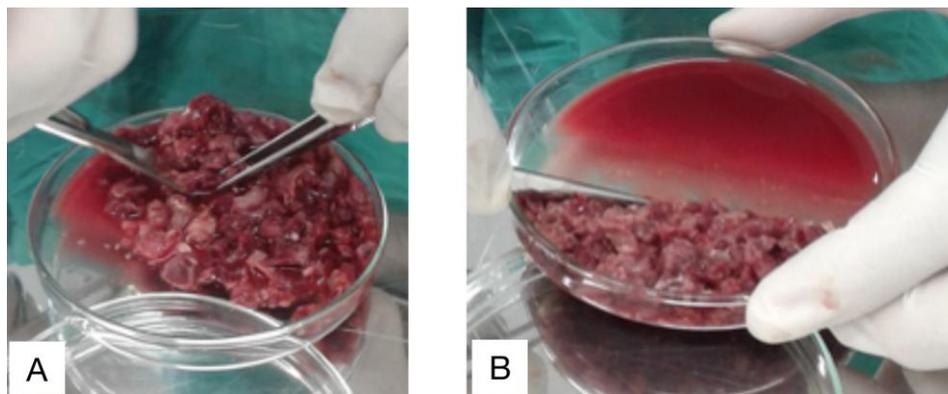
Walker tumor cells and inoculum administration on the animals' backs

The Walker tumor cells are maintained weekly in the bioterium of the Drug Research and Development Center (NPDM). A solution was prepared of Ringer's lactate (10 mL) and gentamicin (100 uL at a concentration of 40 mg/mL) and divided in two Falcon tubes. Then 5 ml of this solution was placed in a Petri dish and kept on ice. Next, three animals with Walker tumors were euthanized by anesthetic overdose (according to the National Council on Animal Control and Experimentation - CONCEA). The tumor was removed from each animal (Figure 2) and placed in a Petri dish and cut into small pieces with surgical scissors and tweezers until forming a macerate with solid and liquid parts (Figures 3a and 3b). The solid was discarded and the liquid part was collected in a syringe and emptied into a Falcon tube. From this material, 0.7 mL was inoculated intramuscularly in the calf of one of the hind legs, at a concentration of 10^6 tumor cells/mL, of five animals, which were placed individually in labeled cages.

Figure 2: Removing the tumor from the hind calf.



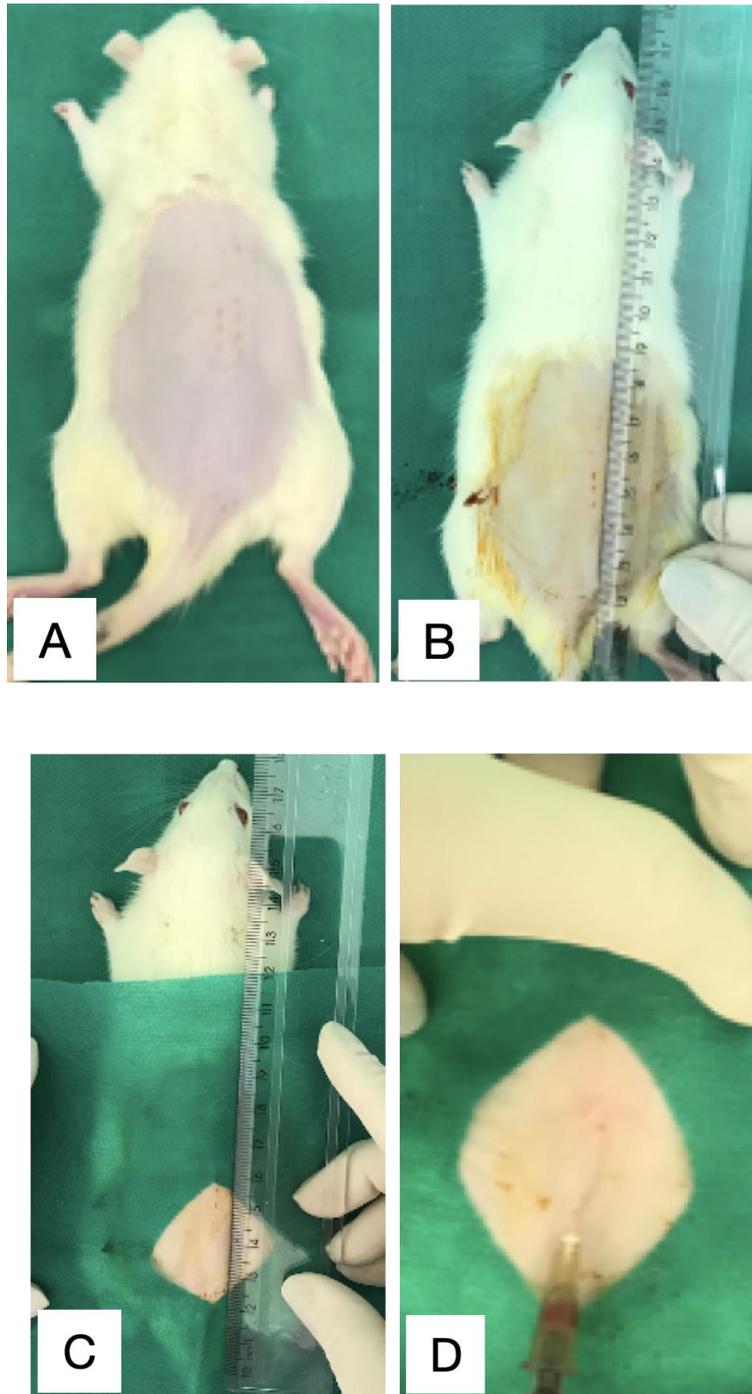
Figure 3. A. Parts of the tumor being macerated. B. Solid content pending disposal.



After seven days, the five animals were euthanized and the tumor was removed to count the cells, to attain a concentration of 2.0×10^6 tumor cells/mL. Then a solution was prepared of 20 μ L of tumor liquid with 20 μ L of trypan blue in an Eppendorf tube, and placed in a Neubauer chamber for counting in two fields on the diagonal. The value was multiplied by 10^6 to establish the estimated concentration of tumor cells/mL and diluted to adjust the concentration to the volume of 0.1 mL, for inoculation.

The next step was to implant the Walker 256 tumor cells in the subcutaneous tissue along the dorsal midline of each animal. The animals were previously anesthetized with ketamine at 100 mg/kg weight and xylazine at 10 mg/kg weight. Soon thereafter, trichotomy was performed on the back of each animal (Figure 4a), to avoid any contamination or infection due to the inoculation, and antisepsis was performed (Figure 4b). Next, the inoculate was demarcated (Figure 4c), followed by inoculation of the suspension of tumor cells (Figure 4d) at 4 cm from the animal's tail.

Figure 4 – Procedure for inoculation of tumor cells.



Legend: A. Trichotomy. B and C: Antisepsis and marking of the inoculation area. D. Inoculation.

On the seventh day, the animals were anesthetized for surgical resection of the skin and subcutaneous tissue of the back (Figure 5) with an electric scalpel (to avoid leakage from the blood vessels). After removal of the material for examination, the animal was euthanized with anesthetic overdose.

Figure 5. Resection of the skin and dorsal subcutaneous tissue



Tumor aspect and growth

After removal of the subcutaneous tissue from the back, the tumor appearance was evaluated regarding invasion, necrosis and adherence, using a pachymeter to measure the main dimensions (Figure 6).

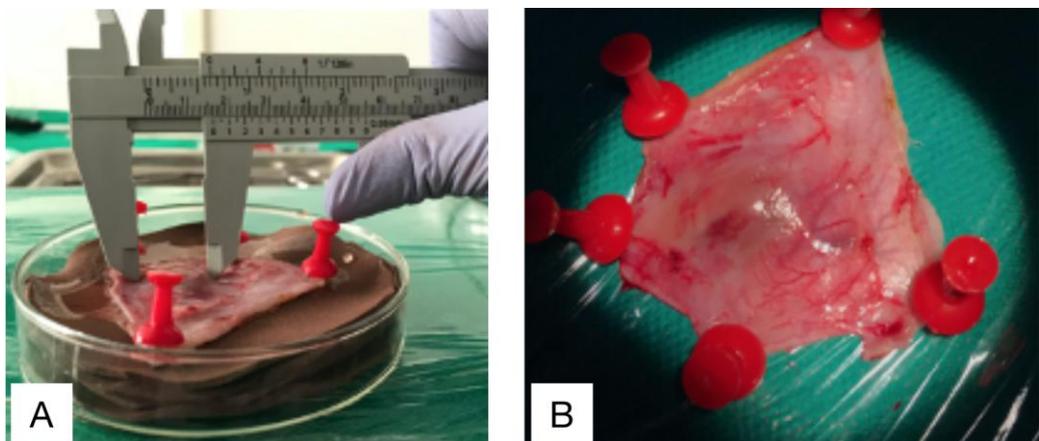
The tumor volume was calculated through the following expression (Teicher, 2002; Lee *et al.*, 2003):

$$\text{Tumor volume (cm}^3\text{)} = (D \cdot d^2) \times 0.5, \text{ where:}$$

D: is the major tumor diameter, in cm

d: is the minor tumor diameter, in cm

Figure 6 – Measuring the tumor dimensions



Legend: A. Measuring the tumor dimensions with a pachymeter. B. Microscopic aspects of the tumor.

Macroscopic and microscopic evaluation of metastasis

After euthanasia of the rats, the lungs, liver, spleen and kidneys were removed for macro and microscopic analysis by fixing in 10% formol. In the case of microscopic examination, tissue sections were stained with hematoxylin and eosin.

The animals' carcasses were incinerated.

Evaluation of tumor angiogenesis by immunohistochemistry

The exclusion criteria for the immunohistochemistry analysis were no tumor development and presence of tumors with extensive necrosis. All 30 animals were included. The silanized slides were deparaffinized in an oven for one hour at 65 °C, immersed in xylene, rehydrated in a decreasing alcohol series, washed with tap water and submitted to antigen recovery with a solution of Tris-EDTA at pH 9.0 in a water bath at 85 °C for 30 minutes. After cooling to room temperature, the sections were washed in phosphate buffer solution (PBS - 0.1 M, pH 7.3) in two baths of five minutes each. Then the endogenous peroxidase was blocked with a 3% solution of H₂O₂ (hydrogen peroxide) diluted in PBS for 30 minutes (Hsu *et al.*, 1981).

After two washings of five minutes in PBS, the slides were incubated overnight with the antibody Abcam CD-31 (1:100). Then they were allowed to cool to room temperature, and the sections were washed twice in PBS baths for five minutes each, followed by incubation with anti-rabbit/anti-rat polymer (Dako[®]EnVision Dual Link System HRP) for 30 minutes. After two further washings for five minutes in PBS, the slides were incubated with 3,3-diaminobenzidine (DAB) for five minutes. The reaction was stopped with distilled water and the slides were counter-stained with 7% Harris modified hematoxylin for 10 seconds, washed in tap water, dehydrated, diaphanized and mounted with Enthellam[®] (Andrade *et al.*, 2007). The positive control was rat kidney tissue and the negative control was performed by suppression of the primary antibody response with incubation of the antibody diluent.

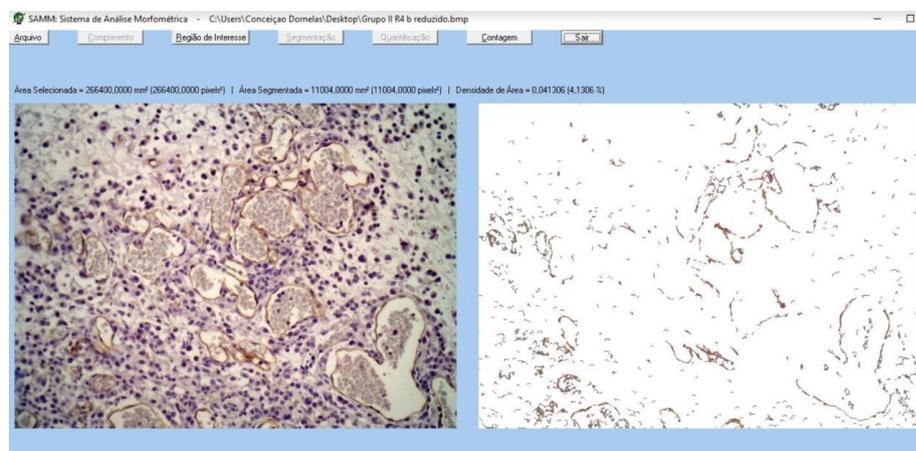
Quantification of tumor angiogenesis

Digital images of the histological slides were captured in standardized form using a light microscope (BX4, Olympus Optical Co Ltd – Japan) coupled to a digital camera (C7070 Wide Zoom, Olympus Imaging America Inc. – USA). Initially we

scanned the tumor using low magnification (40 x), for the purpose of identifying the zones of greatest vascular density, or hot spots (Weidner, 1995). For each tumor, we selected three hot spots. Then we captured color images at 200x of the fields related to the three hot spots. The images were stored in Windows Bitmap format (BMP), with dimensions of 600 x 444 pixels, according to the RGB: (Red, Green, Blue) color model.

The images were analyzed by a system for analysis of morphometry denoted by SAMM (Figure 7), part of a program developed for that purpose (Fechine-Jamacaru, 2006). The software was previously calibrated to recognize the spectrum of colors related to the structures of interest (microvasculature), according to the staining technique used. This procedure enables the software to automatically identify and segment the blood vessels (separating them from the other components of the preparation), both in the entire image and in the region of interest defined by the user. After the segmentation, the program determines the microvascular density of the field studied. For that purpose, it calculates the density of the area, defined by the quotient between the area occupied by the microvasculature and the total area of the field under analysis.

Figure 7. SAMM environment



Legend: Identification and segmentation of immunostained vessels and cells, to calculate the density of the area (microvascular density): total area occupied by the microvasculature divided by the total area of the field under analysis.

Statistical analysis

For the purpose of identifying and removing discrepant values and to avoid inconsistent results due to such discrepancies, the main variables, namely the variation

of body weight, tumor volume and microvascular density, were initially analyzed by the Tukey method, which defines as outliers those measures that are less than $Q1 - 1.5 \times IQR$ and higher than $Q3 + 1.5 \times IQR$, where $Q1$ and $Q3$ correspond, respectively, to the first and third quartiles, while IQR denotes the interquartile range ($IQR = Q3 - Q1$). Then these variables were analyzed by the Shapiro-Wilk test to verify the normality of the distribution. For descriptive statistics, the mean and standard deviation (SD) were calculated and parametric tests were applied for analytical statistics. Thus, comparisons between the groups distilled water (DW), celecoxib (CEL), gum arabic (GA), eugenol (EUG) and the association of gum arabic with eugenol (GA+EUG), concerning the variables mentioned above, were carried out using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test to check for differences between paired groups. In all analyzes, two-tailed tests were applied and the significance level was set at 0.05 (5%), thus considering $P < 0.05$ as statistically significant. GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) was used to perform statistical procedures and plot the graphs.

RESULTS

Table 1 – Relative variation of body weight, tumor volume and microvascular density measured in the animals of the distilled water (DW), celecoxib (CEL), gum arabic (GA), eugenol (EUG) and gum arabic plus eugenol (GA+EUG) groups. Comparisons of the five groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) complemented with the Tukey multiple comparison test, to verify pairwise difference between the groups.

Parameter	DW	CEL	GA	EUG	GA+EUG	Significance (ANOVA)
	Mean \pm SD					
Relative variation of body weight (%)	2.74 \pm	2.01 \pm	3.98 \pm	3.25 \pm	1.48 \pm	P = 0.5071
	2.42	2.01	2.54	3.59	0.73	
	(n = 6)	(n = 6)	(n = 5)	(n = 5)	(n = 5)	

Tumor volume (mm ³)	2.02 ± 1.10 (n = 6)	0.69 ± 0.26 ^a (n = 5)	1.07 ± 0.48 (n = 5)	0.98 ± 0.41 (n = 6)	1.10 ± 0.55 (n = 6)	P = 0.0242
Microvascular density (%)	14.11 ± 2.57 (n = 6)	8.18 ± 3.93 ^b (n = 6)	11.52 ± 2.85 (n = 6)	15.18 ± 2.83 ^c (n = 5)	14.56 ± 1.84 ^d (n = 5)	P = 0.0028

Source: Authors. SD: standard deviation. The letters ^a(P=0.0193) and ^b(P=0.0145) denote statistically significant differences in relation to the DW group, while the letters ^c(P=0.0052) and ^d(P=0.0117) indicate statistically significant differences in relation to the CEL group (Tukey test).

Exclusion of animals

No animals were excluded from the study – there was no mortality.

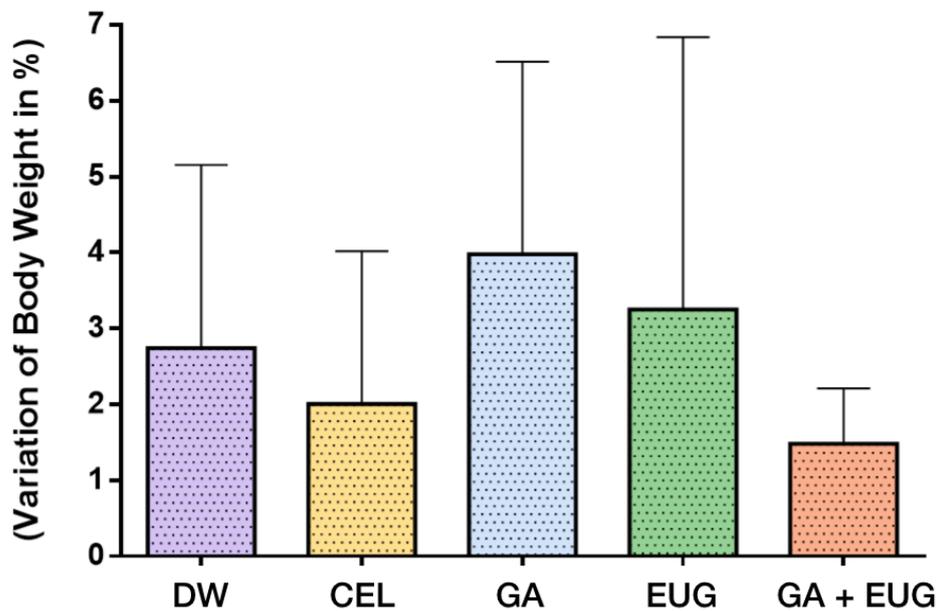
Evaluation of the appearance and growth of the Walker tumors

After removing the dorsal subcutaneous tissue from each animal, we evaluated the macroscopic tumor appearance and measured the dimensions with a pachymeter. The animals that received distilled water (group VI) had the greatest invasion of dorsal subcutaneous tissue and musculature.

All the animals were weighed on the first and last day of the experiment to calculate the weight variation in percent (Figure 8). The relative body weight variation ($\Delta P\%$), also expressed in percent, was determined in the animals of the distilled water (DW), celecoxib (CEL), gum arabic (GA), eugenol (EUG) and gum arabic plus eugenol (GA+EUG) groups, calculated according the expression: $\Delta W\% = [(W_{D1} - W_{D6}) / W_{D1}] \cdot 100$, where W_{D1} and W_{D7} denote the body weight measured on the first and seventh days, respectively. Data are expressed as mean and standard deviation of the measurements. Comparisons among the five groups were carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) complemented by the Tukey multiple comparison test between the paired groups. There were no statistically significant differences of the DW, CEL, GA, EUG and DW+EUG groups regarding relative variation of body weight (ANOVA: F=

0.8531; $P=0.5071$).

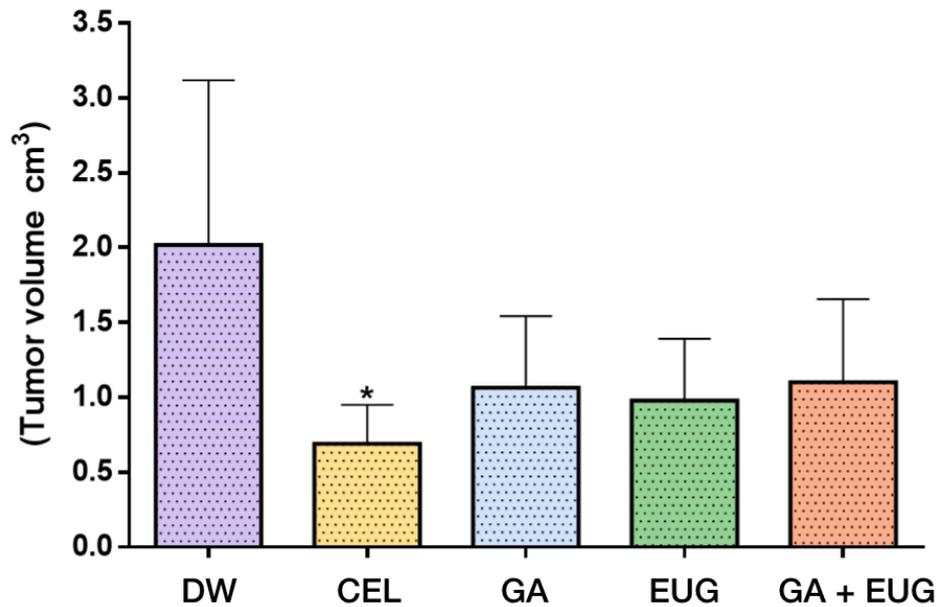
Figure 8 – Variation of body weight in %.



Source: Authors.

The tumor volume in the CEL group was significantly smaller ($*P=0.0193$) than in the DW group. The tumor volume was also smaller in the groups that received gum arabic, eugenol and gum arabic with eugenol (groups VIII, IX and X, respectively) ($P < 0.05$) (Figure 9).

Figure 9 – Tumor volume in cm^3 .



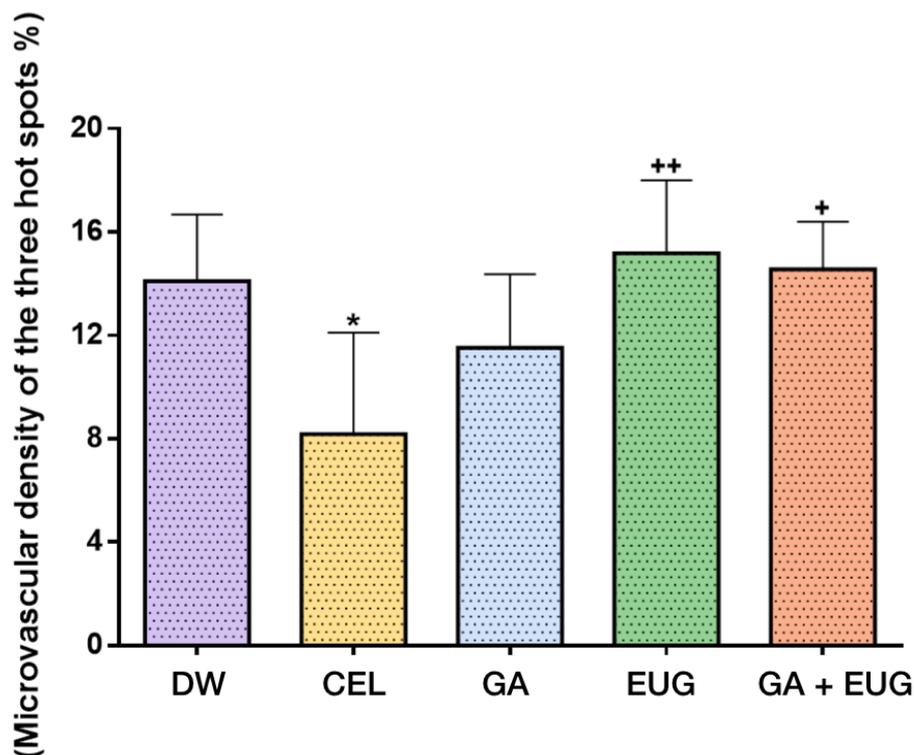
Source: Authors. * $P < 0.05$ versus group treated with distilled water.

Evaluation of tumor angiogenesis

After analysis by the SAMM software of the three zones identified as having greatest vascular density, the program identified, segmented the blood vessels and determined the microvascular density of the sites studied, corresponding to the quotient between the area occupied by the microvasculature and the total area of the field analyzed.

The microvascular density, expressed as a percentage, was the ratio between the area of the microvasculature and total area of the field analyzed, multiplied by 100.

Figure 10 - Microvascular density of the three hot spots.



Source: Authors. * $P = 0.0145$ versus the group treated with DW. ++($P=0.0052$) and +($P=0.0117$) indicate statistically significant differences in relation to the CEL group.

Evaluation of metastases

To detect metastases, we macroscopically and microscopically evaluated lung, liver, spleen and kidney tissue sections, stained with hematoxylin and eosin. Only the animals in the groups that received celecoxib, gum arabic and eugenol (groups VII, VIII and IX, respectively) presented metastases. In group VII, one animal presented metastasis in the liver; in group VIII, one animal had signs of metastasis in the liver and another in a kidney; and in group IX, one animal also presented metastasis in the liver and one in a kidney.

DISCUSSION

Since 1971, when Judah Folkman called attention to the importance of tumor vascularization for the growth of tumors, many studies of antiangiogenics have been conducted, seeking promising targets for treatment of various types of cancer (Mashreghiet *al.*, 2018). It is known that the inhibitors of angiogenesis available in the market for treatment of malignant neoplasms are not effective for all tumor types, so the search for new possibilities is necessary.

This study was designed to evaluate the effect of eugenol and gum arabic on the

progression and angiogenesis of Walker tumors in Wistar rats, which were chosen for their ease of obtainment, maintenance, feeding and hygiene in cages, resistance to infections, and low cost (Silva, Sakata & Issy, 2004). They also have a short biological cycle, a high degree of genetic similarity with humans (sharing around 80% of DNA) (Mattaraia, 2012), docile behavior and size sufficient for use in surgical procedures (Botelho, 2016) to accompany the growth of Walker tumors.

Our experimental model followed that described by Morano *et al.* (2011), utilizing dorsal tumor implantation. There are many experimental models that can be used to investigate angiogenesis. We chose the Walker tumor model because it is available at UFC, making it economically possible. Besides this, the model is well known in studies of tumor behavior (Chekhunet *et al.*, 2018) and angiogenesis (Gao *et al.*, 2016), besides having high virulence, with a tumor take rate of almost 100%, and rapid growth, enabling evaluation in a short time span (Earle, 1935).

The tumors, which are maintained weekly in the laboratory, were removed from the donor animals and used to extract viable cells for inoculation on the backs of the animals at a concentration of 2×10^6 cells/mL.

On the day after inoculation, the substances of each group were administered for five days. Groups VI, VII, VII, IX and X received, respectively, distilled water, celecoxib, gum arabic, eugenol, and gum arabic plus eugenol. On the seventh day, the animals were anesthetized and submitted to surgical resection of the dorsal skin and subcutaneous tissue with an electric scalpel, for macroscopic analysis of the tumor dimensions with a pachymeter and microscopic observation regarding necrosis, invasion and adherence. The tumor microvascular density was analyzed by digital images from the histological slides of tumor tissue, stained for immunohistochemistry (CD-31).

As described in the literature, medicines such as aspirin and non-steroidal anti-inflammatories are used to diminish the inflammation and tumor growth, avoiding the development of solid tumors. The immunological responses act in two ways in the tumor cells, namely reaction against specific tumor antigens and against antigens associated with the tumor, so the therapies developed are based on recognition of antigens and should guarantee that these responses will only induce destruction of tumor cells (Giacomini, 2012). Besides the anti-inflammatory effect, some recent studies have revealed that inhibition of the formation of inflammatory mediators can influence the development of tumors, and especially can reduce tumor-mediated body

weight loss (Davis *et al.*, 2004). Celecoxib was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 1999 as a chemopreventive agent at a dosage of 400 mg, twice a day. It is the only non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) approved for adjuvant treatment of patients with familial adenomatous polyposis (FAP) (Gasparini *et al.*, 2003; Groshet *et al.*, 2006). The antitumor effect of celecoxib seems to occur by dependent and independent mechanisms that inhibit cyclooxygenase 2, a key enzyme for synthesis of prostaglandins (Davis *et al.*, 2004). The tumor can release metabolites and produce catabolic factors along with pro-inflammatory cytokines. It is likely that the drug's effect on metabolic alterations is in part due to the reduction of metabolites and tumor products. The possible anticancerogenic mechanism involves blocking of cell proliferation and angiogenesis, induction of apoptosis and modulation of the immune response, and those mechanisms can depend or not depend on inhibition of COX-2 (Groshet *et al.*, 2006). Our results corroborate those studies, demonstrating reduction of the tumor volume mainly in the group that received celecoxib, which also reduced the microvascular density and inhibited tumor angiogenesis.

The anti-inflammatory and anti-oxidant properties of gum arabic (Nasifet *et al.*, 2011), known to be present in the tumor angiogenesis process, require better comprehension. Knowledge of its influence on the angiogenesis process can help expand the therapeutic arsenal and promote development of future therapies for complex pathologies, using readily available natural substances. In this study, administration of gum arabic was a determining factor for reduction of tumor volume. In 2010, Nasir and colleagues published a study reporting that gum arabic is a potent inhibitor of tumor growth and inflammation. Our research group recently published a paper reporting the anti-oxidant and antigenotoxic of gum arabic at 2.5% and 5% in mice submitted to colorectal carcinogenesis, with inhibition of aberrant crypts (pre-neoplastic lesions) in mice (Avelino *et al.*, 2021). Braga *et al.* (2019) observed a reduction of aberrant crypts associated with colorectal carcinoma in Wistar rats treated with 1% gum arabic. Although gum arabic can diminish oxidative stress, leading to possible reduction of angiogenesis, we did not observe this effect in the present study. The animals of group VIII, which received gum arabic, had reduced tumor volume compared to the other groups, but did not present reduction of the mean density or percentage of incidence. There was no inhibition of angiogenesis by the doses administered.

Many of the chemotherapeutic agents used nowadays have negative long-term side effects. A new generation of drugs with greater efficacy and specificity is urgently needed. Eugenol, also a natural compound, has been indicated in various studies as having chemoprotective potential against diverse types of cancer (Bezerra, 2017), causing greater rates of apoptosis than other drugs available in the market (Das, 2018). According to Al-Sharif et al. (2013), eugenol at low doses has specific toxicity against different breast cancer cells, with anticancerogenic properties demonstrated by *in vitro* and *in vivo* experiments, indicating it can be used to consolidate adjuvant treatment. Other studies have described its dual effect on oxidative stress, acting either as an anti-oxidant or pro-oxidant agent. Despite the large number of articles about the properties of eugenol, the discrepant results prevent a definitive conclusion about its efficacy and safety. This duality appears to be related to the dose and concentration. For example, at low doses and concentrations, it has been shown to have an anti-oxidant effect, while at high doses and concentrations it has been found to have a pro-oxidant effect. Problems related to the purity of the compound and its volatility during experiments may help explain these contrary results (Bezerra et al., 2017). Therefore, in this study we used it in pure form. The animals in the groups that received eugenol presented smaller tumor volume than the animals that only received distilled water. The histopathological analyses of stained tissue sections of the three hot spots did not find inhibition of microvascular density related to eugenol.

There was reduction of the tumor volume in the groups that received celecoxib, gum arabic, eugenol, and gum arabic plus eugenol (groups VII, VIII, IX and X, respectively), but the tumor density was only reduced in the group that received celecoxib (group VII), suggesting that the reduction of the tumor volume was not influenced by the microvascular density of the tumor (angiogenesis). The appearance of the tumors was evaluated regarding invasion, necrosis and adherence, and the macroscopic aspects were recorded. The animals in group VI, which received distilled water, had greater invasion of the dorsal subcutaneous tissue and musculature by the tumor in relation to the other groups.

The variation of the animals' body weight was not statistically significant in any of the groups evaluated.

CONCLUSIONS

Gum arabic, celecoxib and eugenol reduced the tumor volume.

Gum arabic and eugenol did not influence the tumor progression.

Celecoxib was effective in reducing the microvascular density, thus presenting inhibition of tumor angiogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the staff of the Laboratory for Experimental Surgery, the Drug Research and Development Center, and the Laboratory of Pharmacology and Preclinical Research, all associated with the Medical School of Ceará Federal University (UFC), in Fortaleza, CE, Brazil.

CONFLICTS OF INTEREST

None.

This study is part of a master's degree thesis research of Carolina Carneiro in the Graduate Program in Medical-Surgical Sciences, UFC. Faculty adviser: Prof. Conceição Aparecida Dornelas.

REFERENCES

1. MASHREGHI, M. *et al.* Angiogenesis biomarker and their targeting ligands as potential targets for tumor angiogenesis. **J Cell Physiol**, v. 233, n. 4, p. 2949-2965, Apr. 2018. DOI 10.1002/jcp.26049.
2. DORNELAS, C. A. *et al.* Experimental model of Walker 256 carcinosarcoma in rats bladder. **Acta Cir. Bras**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 38-42, Jan.-Feb. 2006. DOI 10.1590/S0102-86502006000100009.
3. SILVA, L. F. G. *et al.* Experimental tumor model in rats kidney. **Acta Cir Bras**, v. 17, n. 1, p. 62-66, Jan.-Feb..2002. DOI 10.1590/S0102-86502002000100009.
4. GABAS, V. G. S.; CAVALCANTI, O. A. Influência da adição da gumarabic em filmes isolados de polímero acrílico: estudo das propriedades de intumescimento e de permeabilidade. **Rev. Bras. Cienc. Farm**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 442-448, Oct.-Dec. 2003. DOI 10.1590/S1516-93322003000400012.

5. KADDAM, L. *et al.* Gum Arabic as novel anti-oxidant agent in sickle cell anemia, phase II trial. **BMC Hematol**, v. 17, n.4, p. 2-6, Mar. 2017. DOI 10.1186/s12878-017-0075-y. eCollection 2017
6. DALEPRANE, J. B.; ABDALLA, D. S. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 175135, Apr. 2013. DOI 10.1155/2013/175135.
7. BEZERRA, D. P. *et al.* The Dual Antioxidant/Prooxidant Effect of Eugenol and Its Action in Cancer Development and Treatment. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1367, Dec. 2017. DOI 10.3390/nu9121367.
8. DAS, A. *et al.* Evaluation of Therapeutic Potential of Eugenol-A Natural Derivative of *Syzygium aromaticum* on Cervical Cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 19, n. 7, p. 1977-1985, Jul. 2018. DOI 10.22034/APJCP.2018.19.7.1977.
9. AL-SHARIF, I.; REMMAL, A.; ABOUSSEKHRA, A. Eugenol triggers apoptosis in breast cancer cells through E2F1/surviving down-regulation. **BMC Cancer**, v. 13, 2013. DOI [10.1186/1471-2407-13-600](https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-600).
10. MORANO, J. A. C. O. D. *et al.* Experimental model of ultrasound thermotherapy in rats inoculated with Walker-236 tumor. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 26, p. 53-56, 2011.supl. 1. DOI 10.1590/S0102-86502011000700011.
11. NASIF, W. A.; LOTFY, M.; MAHMOUD, M. R. Protective effect of gum acacia against the aspirin induced intestinal and pancreatic alterations. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 15, n. 3, p. 285-292, Mar. 2011.
12. NASIR, O. *et al.* Downregulation of Angiogenin Transcript Levels and Inhibition of Colonic Carcinoma by Gum Arabic (*Acacia senegal*). **NutrCancer**, v. 62, n. 6, p. 802–810, 2010. DOI 10.1080/01635581003605920.
13. AVELINO, A. L. N. *et al.* Antioxidant and Antigenotoxic Actions of Gum Arabic on the Intestinal Mucosa, Liver and Bone Marrow of Swiss Mice Submitted to

Colorectal Carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, Jun., p. 1-9, 2021. DOI: 10.1080/01635581.2021.1931699.

14. BRAGA, V. N. L. *et al.* Gum arabic and red propolis protecting colorectal preneoplastic lesions in a rat model of azoxymethane. **Acta Cir Bras**, v. 34, n. 2, e201900207, Feb. 2019. DOI [10.1590/s0102-8650201900207](https://doi.org/10.1590/s0102-8650201900207).

15. FECHINE-JAMACARU, F. V. **In vivo quantification of corneal angiogenesis using digital image processing**. 2006. Tese (Doutorado em Cirurgia) – School of Medicine, Ceará Federal University, Fortaleza, 2006.

16. CHEKHUN, V. F. *et al.* Antitumor and genotoxic effects of lactoferrin in Walker-256 tumor-bearing rats. **Exp Oncol**, v. 40, n. 3, p. 200-204, Oct. 2018.

17. GAO, H. *et al.* Inhibitory effect of endostatin gene therapy combined with phosphorus-32 colloid on tumour growth in Wistar rats. **Biosci Rep**, v. 36, n. 3, e00353, Jun. 2016. DOI [10.1042/BSR20160117](https://doi.org/10.1042/BSR20160117).

18. EARLE, W. R. A study of the Walker rat mammary Carcinoma 256, in vivo and in vitro. **Am J Cancer**. v. 24, p. 566-612, 1935.

19. SILVA, N. S. F.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. Correlation between CSF concentration and side effects after spinal morphine injection in rats. **Rev Bras Anesthesiol**, Rio de Janeiro, v. 54, n. 1, p. 53-59. Feb. 2004. DOI [10.1590/s0034-70942004000100007](https://doi.org/10.1590/s0034-70942004000100007).

20. MATTARAIA, V.G.M.; MOURA, A.S.A.M.T. Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1490-1496, Aug. 2012. DOI [10.1590/S0103-84782012000800026](https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000800026).

21. BOTELHO, R. S. T. **Elementos da macroscopia em patologia experimental**. 2016. Dissertação (Mestrado em Medicina Dentária) – School of Medicine, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.

22. GIACOMINI, G, MENEZES, H. Técnicas e perspectivas em imunoterapia do câncer. **Revista Saúde e Pesquisa**, São Paulo, v.5, n.3, p.567-578, Sep.-Dec. 2012.
23. DAVIS, T. W. *et al.* Inhibition of Cyclooxygenase-2 by celecoxib Reverses Tumor-Induced Wasting. **J PharmacolExpTher**, v. 308, n. 3, p. 929-934, Mar. 2004.DOI 10.1124/jpet.103.063099.
- 23.GASPARINI, G. *et al.* Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents? **Lancet Oncol**, v.4, n. 10, p. 605-615, Oct. 2003.DOI 10.1016/s1470-2045(03)01220-8.
25. GRÖSCH, S.; MAIER, T. J.; SCHIFFMANN, S. *et al.* Cyclooxygenase-2 (COX-2) - independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. **J Natl Cancer Inst**, v. 98, n. 11, p. 736-747, Jun. 2006. DOI 10.1093/jnci/djj206.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO CEUA - UFC



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "GOMA ARÁBICA E EUGENOL NA PROGRESSÃO E ANGIOGÊNESE DO TUMOR DE WALKER IMPLANTADO NO SUBCUTÂNEO DE RATAS WISTAR ", protocolada sob o CEUA nº 8162060619 (ID 001159), sob a responsabilidade de **Conceição Aparecida Dornelas e equipe; Carolina Lyra Barreira Carneiro; Conceição Aparecida Dornelas** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 08/08/2019.

We certify that the proposal "GUM ARABIC AND EUGENOL ON THE PROGRESSION AND ANGIOGENESIS OF THE WALKER TUMOR IMPLANTED IN THE SUBCUTANEOUS WISTAR RATS", utilizing 60 Heterogenics rats (60 females), protocol number CEUA 8162060619 (ID 001159), under the responsibility of **Conceição Aparecida Dornelas and team; Carolina Lyra Barreira Carneiro; Conceição Aparecida Dornelas** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 08/08/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [03/2019](#) a [12/2019](#)

Área: [Departamento de Patologia E Medicina Legal](#)

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [18 a 10 semanas](#)

N: [60](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [100 a 110 g](#)

Local do experimento: SALA DE MANUSEIO DE ANIMAIS DO DPML NPDM

Fortaleza, 08 de agosto de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO: MILHO INTEGRAL MOÍDO, FARELO DE SOJA, FARELO DE TRIGO, CARBONATO DE CÁLCIO, FOSFATO BICÁLCICO, CLORETO DE SÓDIO, ÓLEO VEGETAL, VITAMINA A, VITAMINA D3, VITAMINA E, VITAMINA K3, VITAMINA B1, VITAMINA B2, VITAMINA B6, VITAMINA B12, NIACINA, PANTOTENATO DE CÁLCIO, ÁCIDO FÓLICO, BIOTINA, CLORETO DE COLINA, SULFATO DE FERRO, MONÓXIDO DE MANGANÊS, ÓXIDO DE ZINCO, SULFATO DE COBRE, IODATO DE CÁLCIO, SELENITO DE SÓDIO, SULFATO DE COBALTO, LISINA, METIONINA, BHT.

NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DO PRODUTO: UMIDADE (MÁX): 125g/kg PROTEÍNA BRUTA (MIN): 220g/kg EXTRATO ETÉREO (MIN): 50g/kg MATERIAL MINERAL (MÁX): 90g/kg FIBRA BRUTA (MÁX): 70g/kg CÁLCIO (MÍN-MÁX): 10-14 g/kg FÓSFORO; 6.000 mg/kg

VITAMINAS: A (MIN) 13.000 UI/Kg; VITAMINA D3 (MIN) 2.000 UI/Kg, VITAMINA E (MIN) 34 UI/Kg, VITAMINA K3 (MIN) 3mg/Kg, VITAMINA B1 (MIN) 5 mg/Kg, VITAMINA B2 (MIN) 6mg/Kg, VITAMINA B6 (MIN) 7 mg/Kg, VITAMINA B12 (MIN) 22 mcg/Kg, NIACINA (MIN) 60 mg/Kg, PANTOTENO DE CÁLCIO (MIN) 21 mg/Kg, ÁCIDO FÓLICO (MIN) 1mg/Kg, BIOTINA (MIN) 0,05mg/Kg, COLINA 1.900 mg/Kg. MINERAIS: SÓDIO (MIN) 2700 mg/Kg; FERRO (MIN) 50mg/Kg; MANGANÊS (MIN) 60mg/Kg; ZINCO (MIN) 60mg/Kg; COBRE (MIN) 10mg/Kg; IODO (MIN) 2MG/KG; SELÊNIO (MIN) 0,05mg/Kg; COBALTO (MIN) 1,5 mg/Kg, FLÚOR (MÁX) 60mg/Kg. AMINOÁCIDOS: LISINA (MIN) 12g/Kg, METIONINA (MIN) 4.000Mg/Kg, ADITIVOS BHT 100,00mg/Kg.

INDICAÇÃO: ração irradiada para camundongos e ratos de laboratório.

USO: administração a vontade em comedouros suspensos.

CONSERVAÇÃO: conservar o produto em ambiente seco e arejado, sobre estrados, evitando

Luz e calor excessivos.

ATENÇÃO: o produto deve ser armazenado afastado da parede e longe de focos de contaminação. Manter uma higienização eficiente do local, com métodos legais de Controles de Pragas (empresas terceirizadas que sejam registradas no Ministério). Evitar que o produto permaneça exposto ao ambiente, mantendo-o sempre fechado. O empilhamento dos produtos não deve comprometer seu manuseio.

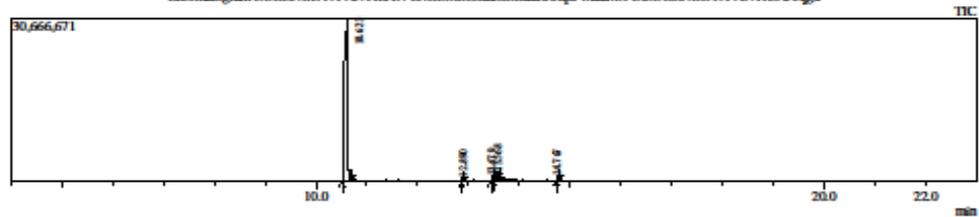
ANEXO C- TESTE DE PUREZA DO EUGENOL

Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

Sample Information

Analyzed by : Dr Felipe Maia
 Analyzed : 31/05/2019 19:30:55
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : EUGENOL-PA-ANTICAN
 Sample ID : EUGENOL-PA-ANTICAN
 IS Amount : [1]-1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 1
 Injection Volume : 1.00
 Data File : C:\GCMSolution\Data\Felipe Maia\UFC\EUGENOL-PA-ANTICAN.gcd
 Orig Data File : C:\GCMSolution\Data\Felipe Maia\UFC\EUGENOL-PA-ANTICAN.gcd
 Method File : C:\GCMSolution\Data\Felipe Maia\Acro\fenomeno e derivados.gcm
 Orig Method File : C:\GCMSolution\Data\Felipe Maia\Acro\fenomeno e derivados.gcm
 Report File :
 Tuning File : C:\GCMSolution\System\Tuning\Tuning 25-04-2019.gct
 Modified by : Admin
 Modified : 31/05/2019 21:01:31

Chromatogram EUGENOL-PA-ANTICAN C:\GCMSolution\Data\Felipe Maia\UFC\EUGENOL-PA-ANTICAN.gcd



Peak#	R.Time	L.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	10.623	10.525	10.715	136025311	96.08	30419160	88.45	4.47		3-Allyl-6-methoxyphenol
2	12.890	12.870	12.915	786976	0.56	1026309	2.98	0.77		Hexadecanoic acid, methyl ester
3	13.479	13.455	13.500	741484	0.52	610685	1.78	1.21		6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-
4	13.568	13.500	13.620	2837757	2.00	1444247	4.20	1.96	V	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-
5	14.767	14.740	14.800	1177970	0.83	889695	2.59	1.32		9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 2-hyd
				141569498	100.00	34390096	100.00			

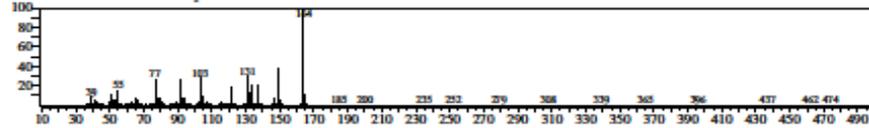
Library

<< Target >>

Line# 1 R.Time: 10.620 (Scan#: 1325) MassPeak: 350

RawMode: Averaged 10.615-10.625 (1324-1326) BasePeak: 164.05 (5636376)

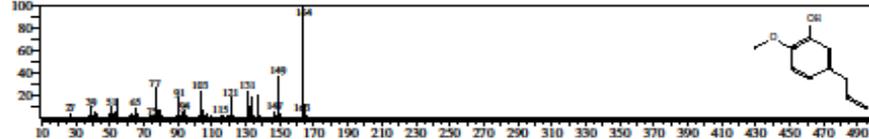
BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit# 1 Entry: 23175 Library: NIST14.Lib

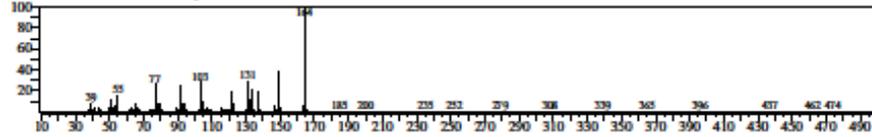
SL: 57 Formula: C10H12O2 CAS: 501-19-9 MolWeight: 164 RefIndex: 1.392

Compound: 3-Allyl-6-methoxyphenol \$\$ Phenol, 2-methoxy-5-(2-propenyl)- \$\$ 5-Allyl-2-methoxyphenol # \$\$ 2-Methoxy-5-(2-propenyl)phenol \$\$ Chavicol



<< Target >>

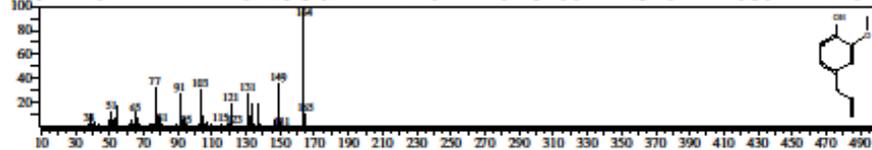
Line# 1 R Time: 10.620 (Scan#: 1325) MassPeak: 350
 RawMode: Averaged 10.615-10.625(1324-1326) BasePeak: 164.05(5636376)
 BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#2 Entry: 12142 Library: NIST14s.lib

SI: 96 Formula: C₁₀H₁₂O₂ CAS: 97-53-0 MolWeight: 164 RetIndex: 1392

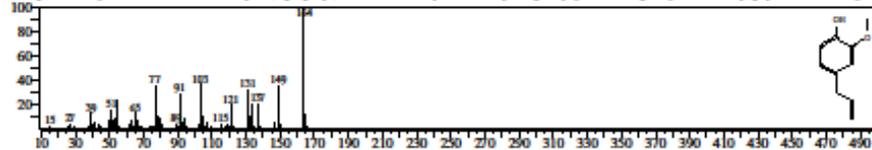
CompName: Eugenol \$\$ Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)- \$\$ Phenol, 4-allyl-2-methoxy- \$\$ p-Allylguaiacol \$\$ p-Eugenol \$\$ Caryophyllenic acid \$\$ Engeno



Hit#3 Entry: 23166 Library: NIST14s.lib

SI: 96 Formula: C₁₀H₁₂O₂ CAS: 97-53-0 MolWeight: 164 RetIndex: 1392

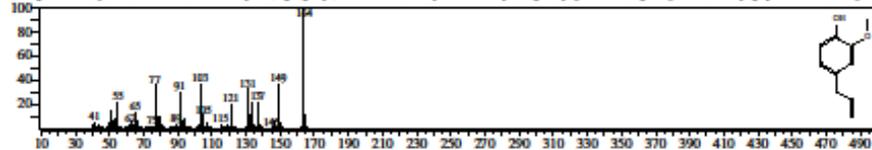
CompName: Eugenol \$\$ Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)- \$\$ Phenol, 4-allyl-2-methoxy- \$\$ p-Allylguaiacol \$\$ p-Eugenol \$\$ Caryophyllenic acid \$\$ Engeno



Hit#4 Entry: 12144 Library: NIST14s.lib

SI: 94 Formula: C₁₀H₁₂O₂ CAS: 97-53-0 MolWeight: 164 RetIndex: 1392

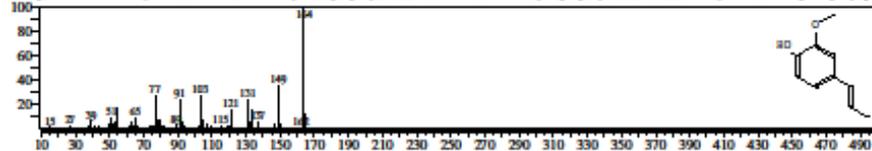
CompName: Eugenol \$\$ Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)- \$\$ Phenol, 4-allyl-2-methoxy- \$\$ p-Allylguaiacol \$\$ p-Eugenol \$\$ Caryophyllenic acid \$\$ Engeno



Hit#5 Entry: 23177 Library: NIST14s.lib

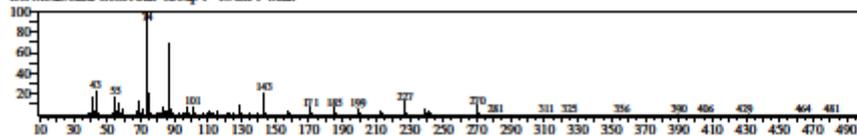
SI: 94 Formula: C₁₀H₁₂O₂ CAS: 5932-68-3 MolWeight: 164 RetIndex: 1410

CompName: trans-Isoeugenol \$\$ Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-, (E)- \$\$ Phenol, 2-methoxy-4-propenyl-, (E)- \$\$ (E)-Isoeugenol \$\$ trans-p-Propenylgua



<< Target >>

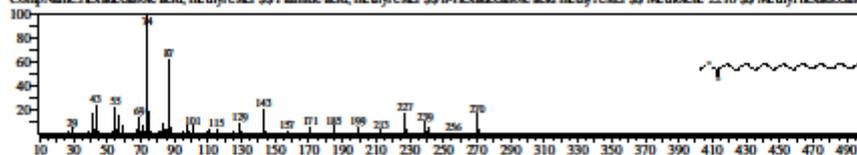
Line# 2 R-Time: 12.890 (Scan#: 1779) MainPeak: 307
 RawMode: Averaged 12.885-12.895 (1778-1780) BasePeak: 74.00 (159539)
 BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit# 1 Entry: 26273 Library: NIST14s.lib

SI: 95 Formula: C17H34O2 CAS: 112-39-0 MolWeight: 270 RefIndex: 1.878

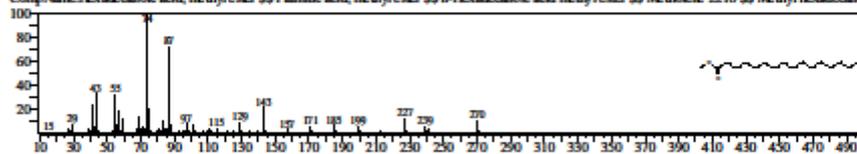
CompName: Hexadecanoic acid, methyl ester \$\$ Palmitic acid, methyl ester \$\$ n-Hexadecanoic acid methyl ester \$\$ Metholene 2216 \$\$ Methyl hexadecanoic acid



Hit# 2 Entry: 104648 Library: NIST14s.lib

SI: 95 Formula: C17H34O2 CAS: 112-39-0 MolWeight: 270 RefIndex: 1.878

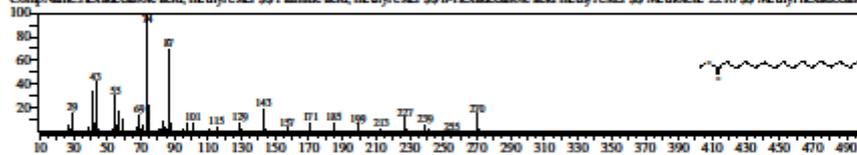
CompName: Hexadecanoic acid, methyl ester \$\$ Palmitic acid, methyl ester \$\$ n-Hexadecanoic acid methyl ester \$\$ Metholene 2216 \$\$ Methyl hexadecanoic acid



Hit# 3 Entry: 26271 Library: NIST14s.lib

SI: 95 Formula: C17H34O2 CAS: 112-39-0 MolWeight: 270 RefIndex: 1.878

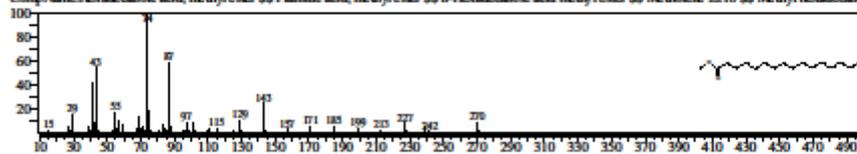
CompName: Hexadecanoic acid, methyl ester \$\$ Palmitic acid, methyl ester \$\$ n-Hexadecanoic acid methyl ester \$\$ Metholene 2216 \$\$ Methyl hexadecanoic acid



Hit# 4 Entry: 26270 Library: NIST14s.lib

SI: 95 Formula: C17H34O2 CAS: 112-39-0 MolWeight: 270 RefIndex: 1.878

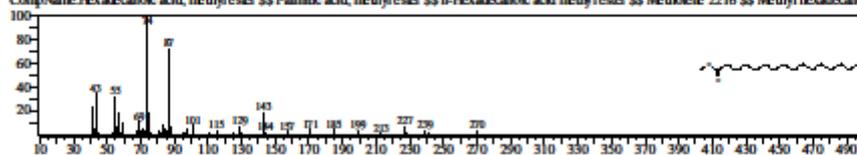
CompName: Hexadecanoic acid, methyl ester \$\$ Palmitic acid, methyl ester \$\$ n-Hexadecanoic acid methyl ester \$\$ Metholene 2216 \$\$ Methyl hexadecanoic acid



Hit# 5 Entry: 26272 Library: NIST14s.lib

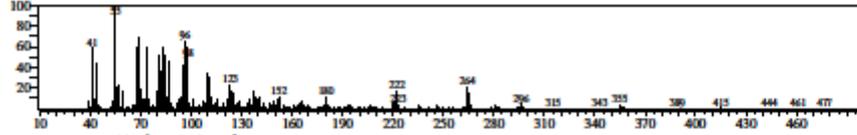
SI: 95 Formula: C17H34O2 CAS: 112-39-0 MolWeight: 270 RefIndex: 1.878

CompName: Hexadecanoic acid, methyl ester \$\$ Palmitic acid, methyl ester \$\$ n-Hexadecanoic acid methyl ester \$\$ Metholene 2216 \$\$ Methyl hexadecanoic acid



<< Target >>

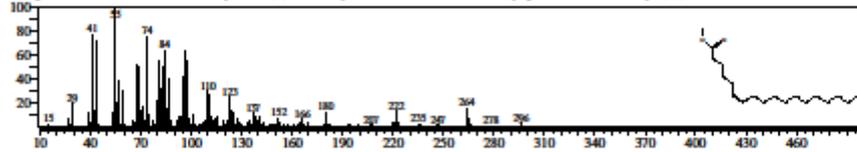
Line# 3 R-Time: 13.480 (Scan#: 1897) MainPeak: 338
 RawMode: Averaged 13.475-13.485 (1896-1898) BasePeak: 55.05 (26633)
 BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit# 1 Entry: 127655 Library: NIST14.lib

SI: 94 Formula: C19H36O2 CAS: 2777-58-4 MolWeight: 296 RefIndex: 2085

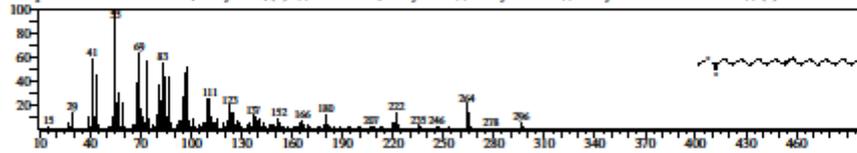
CompName: 6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)- \$\$ Methyl cis-6-octadecenoate \$\$ Methyl ptoseinate \$\$ Methyl (6Z)-6-octadecenoate # \$\$ cis-6-Octa



Hit# 2 Entry: 28138 Library: NIST14.lib

SI: 93 Formula: C19H36O2 CAS: 1937-62-8 MolWeight: 296 RefIndex: 2085

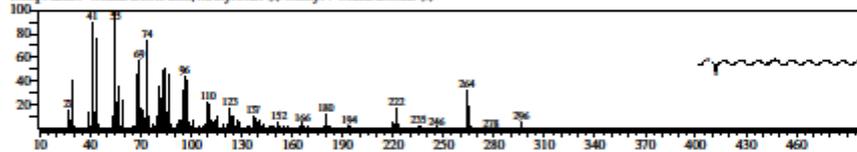
CompName: 9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)- \$\$ Elaidic acid, methyl ester \$\$ Methyl elaidate \$\$ Methyl trans-9-octadecenoate \$\$ (E)-9-Octadecenoic



Hit# 3 Entry: 127644 Library: NIST14.lib

SI: 92 Formula: C19H36O2 CAS: 57396-98-2 MolWeight: 296 RefIndex: 2085

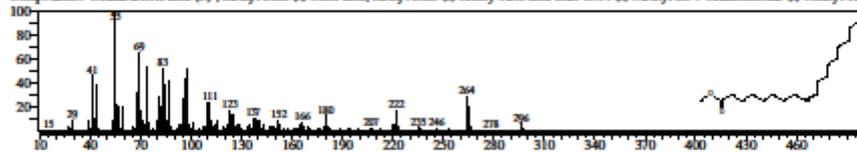
CompName: 7-Octadecenoic acid, methyl ester \$\$ Methyl 7-octadecenoate \$\$



Hit# 4 Entry: 127644 Library: NIST14.lib

SI: 92 Formula: C19H36O2 CAS: 112-62-9 MolWeight: 296 RefIndex: 2085

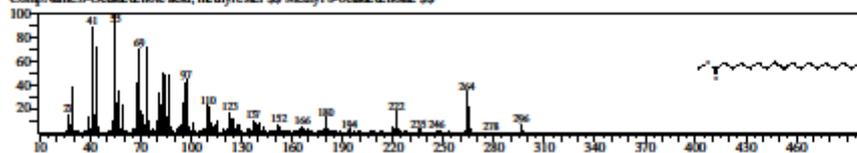
CompName: 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester \$\$ Oleic acid, methyl ester \$\$ Emery oleic acid ester 2301 \$\$ Methyl cis-9-octadecenoate \$\$ Methyl ole



Hit# 5 Entry: 127641 Library: NIST14.lib

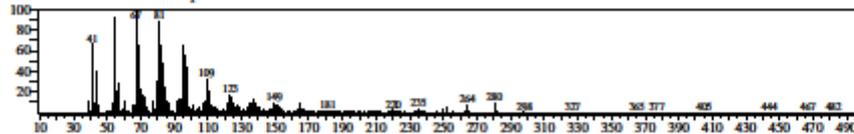
SI: 91 Formula: C19H36O2 CAS: 2345-29-1 MolWeight: 296 RefIndex: 2085

CompName: 8-Octadecenoic acid, methyl ester \$\$ Methyl 8-octadecenoate \$\$



<< Target >>

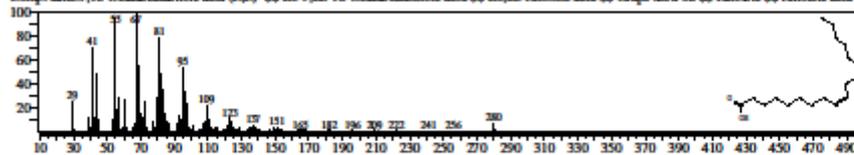
Line#4 R-Time:13.570(Scan#:1915) MainPeak:354
 RawMode:Averaged 13.565-13.575(1914-1916) BasePeak:67.05(79398)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#1 Entry:26959 Library:NIST14c.lib

SI:89 Formula:C18H32O2 CAS:60-33-3 MolWeight:280 RetIndex:2183

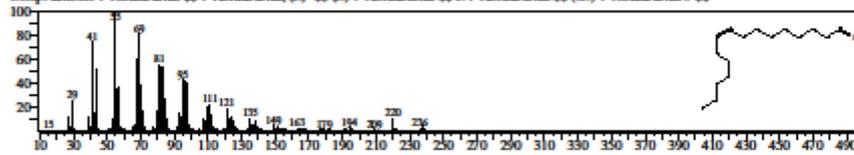
CompName:9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- \$\$ cis-9,cis-12-Octadecadienoic acid \$\$ cis,cis-Linoleic acid \$\$ Grape seed oil \$\$ Linoleic \$\$ Linoleic acid \$\$



Hit#2 Entry:77352 Library:NIST14c.lib

SI:89 Formula:C16H30O2 CAS:56219-04-6 MolWeight:238 RetIndex:1808

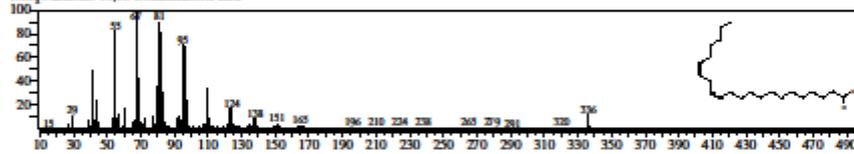
CompName:cis-9-Hexadecenal \$\$ 9-Hexadecenal, (Z)- \$\$ (Z)-9-Hexadecenal \$\$ Z-9-Hexadecenal \$\$ (9Z)-9-Hexadecenal # \$\$



Hit#3 Entry:163563 Library:NIST14c.lib

SI:89 Formula:C22H40O2 CAS:7370-49-2 MolWeight:336 RetIndex:2580

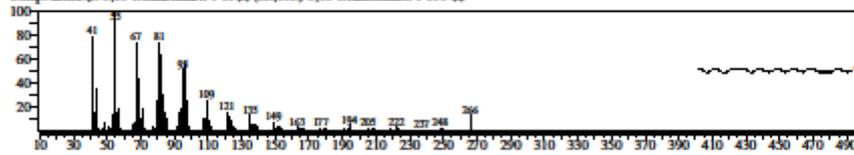
CompName:cis-13,16-Docosadienoic acid



Hit#4 Entry:101006 Library:NIST14c.lib

SI:89 Formula:C18H34O2 CAS:0-00-0 MolWeight:266 RetIndex:2069

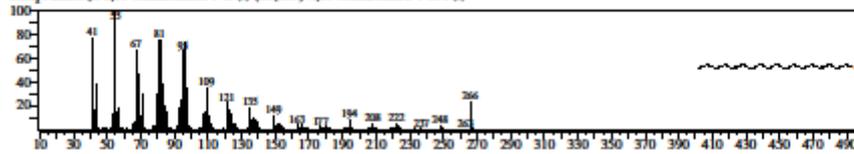
CompName:Z,Z-3,13-Octadecadien-1-ol \$\$ (3Z,13Z)-3,13-Octadecadien-1-ol # \$\$



Hit#5 Entry:101004 Library:NIST14c.lib

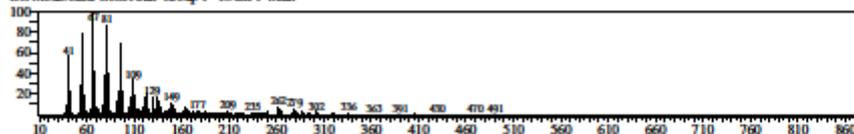
SI:89 Formula:C18H34O2 CAS:0-00-0 MolWeight:266 RetIndex:2069

CompName:E,E-3,13-Octadecadien-1-ol \$\$ (3E,13E)-3,13-Octadecadien-1-ol # \$\$



<< Target >>

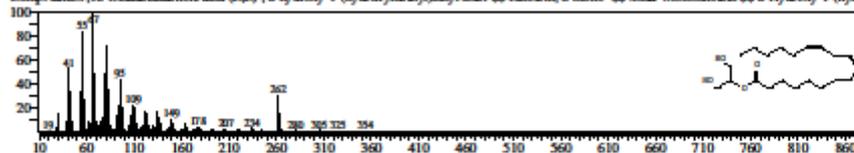
Line# 5 RTime:14.765(Scan#:2154) MainPeak:355
 RawMode:Averaged 14.760-14.770(2153-2155) BasePeak:37.05(56488)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#1 Entry:31069 Library:NIST14a.lib

SI:91 Formula:C21H38O4 CAS:3443-82-1 MolWeight:354 RetIndex:2713

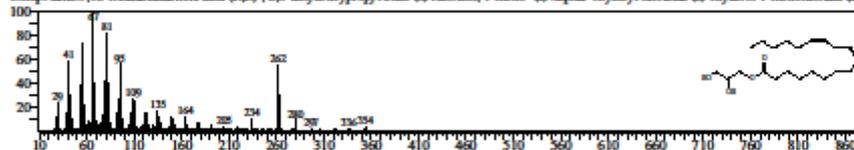
CompName:9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester SS Linolein, 2-mono- SS beta-Monolinolein SS 2-Hydroxy-1-(hydr



Hit#2 Entry:177731 Library:NIST14a.lib

SI:90 Formula:C21H38O4 CAS:2277-28-3 MolWeight:354 RetIndex:2697

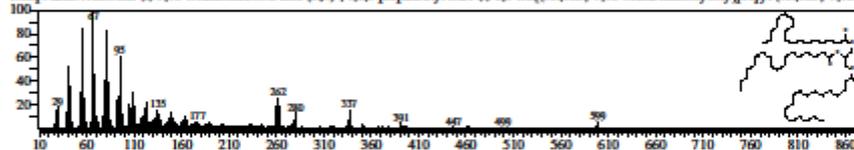
CompName:9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 2,3-dihydroxypropyl ester SS Linolein, 1-mono- SS alpha-Glyceryl linoleate SS Glycerol 1-monolinoleate SS (



Hit#3 Entry:242258 Library:NIST14a.lib

SI:90 Formula:C57H98O6 CAS:537-40-6 MolWeight:878 RetIndex:5173

CompName:Trilinolein SS 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 1,2,3-propanetriyl ester SS 2,3-Bis(9Z,12Z)-9,12-octadecadienoyl propyl (9Z,12Z)-9,12-o



Hit#4 Entry:28026 Library:NIST14a.lib

SI:89 Formula:C17H32O CAS:64566-18-3 MolWeight:252 RetIndex:1907

CompName:(R)-(-)-14-Methyl-8-hexadecyn-1-ol SS 14-Methyl-8-hexadecyn-1-ol # SS



Hit#5 Entry:113262 Library:NIST14a.lib

SI:89 Formula:C18H32O2 CAS:80060-76-0 MolWeight:280 RetIndex:0

CompName:(Z)-18-Octadec-9-enolide SS Octacyclononadec-10-en-2-one, (10Z)- SS Octacyclononadec-10-en-2-one, (Z)- SS (Z)-Octacyclononadec-10-en-2-o

