

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ASSOCIAÇÃO AMPLA UEPG/UNICENTRO

LÍVIA EIDAM CAMARGO LUZ

CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA, ESTUDO FITOQUÍMICO E
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns
(EUPHORBIACEAE)

PONTA GROSSA
2015

LÍVIA EIDAM CAMARGO LUZ

**CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA, ESTUDO FITOQUÍMICO E
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns
(EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada para a obtenção do Título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, na área de Ciências Farmacêuticas: avaliação química e biológica de produtos naturais.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame
Co-orientadora: Profa. Dra. Katia Sabrina Paludo

**PONTA GROSSA
2015**

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Luz, Livia Eidam Camargo
L979 Caracterização morfoanatômica, estudo
fitoquímico e avaliação da citotoxicidade
de Euphorbia Umbellata (Pax) Bruyns
(Euphorbiaceae)/ Livia Eidam Camargo Luz.
Ponta Grossa, 2015.
122f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências
Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís
Beltrame.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Katia Sabrina
Paludo.

1.Janaúba. 2.Látex. 3.Câncer.
4.Linhagens tumorais. I.Beltrame, Flávio
Luís. II. Paludo, Katia Sabrina. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Mestrado em Ciências Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 615.321



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Ata nº. 01/2015

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DA PÓS-GRADUANDA LÍVIA EIDAM CAMARGO LUZ, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 12 DE FEVEREIRO DE 2015, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao décimo segundo dia do mês de fevereiro de dois mil e quinze, às 14h30min, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Sala M 115 da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame, em sessão pública, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação da pós-graduanda Lívia Eidam Camargo Luz. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia. Linha de Pesquisa: Avaliação química e biológica de produtos naturais. A banca foi constituída pelos pesquisadores: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame (Presidente) / UEPG, Profa. Dra. Jane Manfron Budel / UEPG e Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello / UEM, indicados pelo egrégio colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – nível de Mestrado Acadêmico, desta Universidade, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa de dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. O trabalho analisado foi **“CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA, ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae)”**. Encerrada a defesa de dissertação, procedeu-se o julgamento, tendo sido a candidata aprovada (Aprovada/Reprovada). Foi dada ciência à mestranda que, de acordo com o Art. 34 do Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UNICENTRO/UEPG, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, o aluno tem o prazo de 30 (trinta) dias após esta defesa para entregar as cópias da versão definitiva, que devem ser aprovadas pelo orientador e homologadas pelo Colegiado de curso. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se à presente ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e por mim, Jessica Leme Cano, Jessica Leme Cano, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG.

Ponta Grossa, 12 de fevereiro de 2015

Observação (se necessária):

Realizar as adequações sugeridas pela banca.

Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame - UEPG

Profa. Dra. Jane Manfron Budel - UEPG

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello - UEM

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por estar sempre presente na minha vida e guiar os meus passos. Por estar ao meu lado nestes dois anos de trabalho, me dando toda força necessária, sabedoria e discernimento para que eu conseguisse chegar até aqui.

Aos meus pais, por serem os responsáveis por tudo o que sou, acredito e luto. E principalmente por me ensinarem a não desistir frente a primeira dificuldade. Obrigada por me ouvirem desabafar e a me encorajar a seguir em frente.

Ao meu marido Fernando, presente de Deus na minha vida, que enfrentou comigo cada obstáculo e festejou cada conquista. Você é tudo pra mim.

Ao meu orientador Prof. Flávio, que aceitou me orientar sem nem me conhecer. Foi você que me proporcionou a realização do mestrado e acima de tudo, acreditou no meu potencial. Você não só me ensinou ciência, como esteve ao meu lado nas horas que mais precisei. A convivência neste período me mostrou que sua fama de durão é apenas fama, pois percebi que você tem um coração enorme. Serei para sempre grata!

À Profa. Katia, minha co-orientadora, sempre alegre e disposta a colaborar. Que tornou as incansáveis horas de experimento, mais leves e agradáveis.

À Profa. Carla, que nunca mediu esforços para me ajudar. Muito obrigada, por todos os ensinamentos e por todas as conversas. Você me ensinou muito mais do que os ensaios com as células, me ensinou coisas para vida. Acreditou que eu fosse capaz, quando nem eu mesma acreditava.

À Profa. Jane que desde o início topou em realizar o trabalho de morfoanatomia. O teu jeito de encarar a vida me fascina. Mesmo com aqueles cortes grossos que eu fazia, você nunca me disse que estavam ruins. Dizia apenas que podíamos melhorar. Você é 10!

Ao Prof. Sinvaldo, meu chefe e amigo, por ser plenamente compreensivo com minhas atividades do mestrado. Por estar sempre disposto a me ouvir, me aconselhar e me ensinar que na tempestade a gente sobrevive e planejamos na calmaria.

À Profa. Rosi, por ter cedido amostra da espécie conhecida na região sul por *Synadenium grantii* e ter permitido a coleta do látex.

À Profa. Inês Cordeiro por ter procedido a identificação taxonômica da espécie vegetal.

Ao Prof. Paulo César Ghedini, por ter gentilmente cedido amostra da espécie conhecida na região centro oeste por *Synadenium umbellatum*.

Ao Prof. Andersson Barison e à Angelita Nepel por terem realizado as análises de RMN.

Ao Prof. João e à Profa. Jane pela participação na avaliação deste trabalho.

Às colegas de trabalho, Lucia, Terezinha e Traudi por estarem comigo nestes dois longos anos e estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos alunos de iniciação científica Aline e Victor, que contribuíram grandemente para a conclusão deste trabalho. E aos colegas de laboratório, Bruno, Bruna e Jheniffer pelo convívio agradável.

À Maria Aparecida, técnica do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, pela atenção dispensada ao laboratório.

À Camila, Flávia e Talissa por toda cooperação nos ensaios biológicos.

A todas as pessoas não mencionadas, mas que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

*O sucesso nasce do querer, da
determinação e persistência em se chegar
a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo,
quem busca e vence obstáculos, no
mínimo fará coisas admiráveis.*

José de Alencar

RESUMO

Euphorbia umbellata (Pax) Bruyns, conhecida também por janaúba, pertencente a família Euphorbiaceae e é a nomenclatura aceita para *Synadenium grantii* Hook. f e *Synadenium umbellatum* Pax, as quais são sinônimas segundo algumas referências bibliográficas. É uma espécie empregada popularmente para o tratamento de diversos tipos de câncer, sendo o látex a parte vegetal utilizada para este fim. De forma a identificar corretamente a espécie, contribuir com o controle de qualidade e correlacionar estudos científicos de avaliação anticâncer com o uso etnofarmacológico, os objetivos propostos foram: explorar a morfoanatomia de *E. umbellata*; avaliar a toxicidade para as células HeLa, HRT-18 e Jurkat e proceder a investigação fitoquímica na busca de substâncias ativas. Para a análise macro e microscópica, folhas e caules de espécimes designados como *Synadenium grantii* Hook. F (em Ponta Grossa) e *Synadenium umbellatum* Pax (em Goiania) foram previamente fixados em solução FAA. O material foi cortado à mão nos sentidos transversal e longitudinal. Azul de astra e fucsina básica foram utilizados para a coloração. A citotoxicidade do látex foi estudada através de ensaios biológicos, com metodologias de redução mitocondrial por MTT, internalização de VN por lisossomos; morfologia por May Grunwald e Giemsa; integridade de membrana por azul de tripan; cálculo de IC₅₀; quantificação do conteúdo de DNA por DPA e iodeto de propídio; morfologia por alaranjado de acridina e citometria de fluxo. A fitoquímica, realizada por acompanhamento dos resultados dos ensaios biológicos (biomonitorado), foi feita com a fração Hex. Os resultados etnobotânicos comprovaram que as duas espécimes avaliadas tratam da mesma planta a qual deve ser corretamente denominada *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. Estes resultados elucidaram a existência de cêra epicuticular, estômatos paracíticos e tricomas tectores; assim como os tubos laticíferos; e revelaram marcadores químicos como a marcante presença do látex; compostos lipofílicos e fenólicos; amido e mucilagem. A experimentação *in vitro* mostrou que as células leucêmicas foram primeiramente mais responsivas ao látex e posteriormente à fração Hex. O IC₅₀ calculado para a fração hexânica foi de 1,87 µg/mL, valor este que torna o fitocomplexo constituidor desta fração um promissor agente antitumoral. Após comparação com o IC₅₀ de células não neoplásicas, foi demonstrado IS de 5,98 e isso corrobora a existência de seletividade de ação em relação às células analisadas. Por citometria de fluxo verificou-se parada de progressão celular, com aumento substancial das células em fase G0/G1 e diminuição destas na fase G2/M. O estudo fitoquímico pôde contribuir para o isolamento de dois triterpenos identificados por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN), sendo um pentacíclico denominado como acetato de germanicol e pela primeira vez isolado desta espécie vegetal e outro tetracíclico designado eufol e já isolado de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns.

PALAVRAS CHAVE: Janaúba, látex, câncer, linhagens tumorais

ABSTRACT

Euphorbia umbellata (Pax) Bruyns, also known as janauba, belonging to the Euphorbiaceae family and it is the nomenclature accepts for *Synadenium grantii* Hook. f and *Synadenium umbellatum* Pax, which are synonymies according to some bibliographical references. It is popularly an employed species for the treatment of several cancer types, being the latex the vegetable part used for this purpose. In way to identify the species correctly, to contribute with the quality control and to correlate scientific studies of evaluation anticancer with the use ethnopharmacologic, the proposed objectives were: to explore the morphoanatomy of *E. umbellata*; to evaluate the toxicity for the cells HeLa, HRT-18 and Jurkat and to proceed the phytochemistry investigation in the search of active substances. For the analysis macro and microscopic, leaves and stems of specimens designated as *Synadenium grantii* Hook. F (in Ponta Grossa) and *Synadenium umbellatum* Pax (in Goiânia) were previously fixed fastened in FAA solution. The material was sectioned by hand in the transverse and longitudinal directions. Astra blue and basic fuchsin were employed for staining. The citotoxicity of the latex was studied through biological rehearsals, with methodologies of mitochondrial reduction for MTT, internalization of VN for lysosomes; morphology for May Grunwald and Giemsa; membrane integrity for trypan blue; calculation of IC₅₀; quantification of the content of DNA for DPA and propidium iodide; morphology for acridine orange and flow citometry. The phytochemistry, accomplished by accompaniment of biological rehearsals (biomonitored) results, it was done with the fraction Hex. The results ethnobotanical proved that the two specimens evaluated treat of the same plant which should be correctly denominated *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. These results elucidated the epicuticular wax, paracytic stomata and non-glandular trichomes; as well as laticifers; and they revealed chemical markers as the outstanding presence of the latex; composed lipophilic and phenolics compounds; starch and mucilage. The experimentation in vitro showed that the leukemic cells were firstly more responsive to the latex and later to the fraction Hex. IC₅₀ calculated for the hexane fraction was of 1,87 µg/mL, value this that turns the composed phytocomplex of this fraction a promising antitumoral agents. After comparison with IC₅₀ of non neoplastic cells, it was demonstrated IS of 5,98 and this corroborates the existence of selectivity action in relation to the analyzed cells. For flow citometry stop of cellular progression was verified, with substantial increase of the cells in phase G0/G1 and decrease of these in the phase G2/M. The phytochemistry study could contribute to the isolation of two identified triterpenes for techniques of nuclear magnetic resonance (RMN), being a pentacyclic denominated as germanicol acetate and for the first time isolated of this vegetable species and other tetracyclic designated euphol and already isolated of this *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns.

KEYWORDS: Janaúba, latex, cancer, tumoral lineages

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae), no hábito	30
Figura 2 -	<i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) - Coleta do látex da casca	37
Figura 3 -	Separação cromatográfica da fração hexânica	45
Figura 4 -	<i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) - Aspectos macro e microscópicos da folha	49
Figura 5 -	<i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) - Estrutura e anexos da epiderme da folha	52
Figura 6 -	<i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) - Secção transversal da nervura central e pecíolo	54
Figura 7 -	<i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) - Secção transversal do caule	57
Figura 8 -	<i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) - Testes microquímicos	58
Figura 9 -	Citotoxicidade do látex de <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns por redução do MTT para células HeLa em 24, 48 e 72 h	61
Figura 10 -	Citotoxicidade do látex de <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns por redução do MTT para células HRT-18 em 24, 48 e 72 h	62
Figura 11 -	Citotoxicidade das frações Hex, CHCl ₃ , AcOEt, MeOH por redução do MTT para células HeLa em 24, 48 e 72 h	64
Figura 12 -	Citotoxicidade das frações Hex, CHCl ₃ , AcOEt, MeOH por redução do MTT para células HRT-18 em 24, 48 e 72 h	65
Figura 13 -	Citotoxicidade do látex de <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns por internalização do VN para células HeLa em 24, 48 e 72 h	66
Figura 14 -	Citotoxicidade do látex de <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns por internalização do VN para células HRT-18 em 24, 48 e 72 h	67
Figura 15 -	Citotoxicidade das frações Hex, CHCl ₃ , AcOEt, MeOH por internalização do VN para células HeLa em 14, 48 e 72 h	68
Figura 16 -	Citotoxicidade das frações Hex, CHCl ₃ , AcOEt, MeOH por internalização do VN para células HRT-18 em 24, 48 e 72 h	70

Figura 17 -	Morfologia das células HeLa após 24 h de tratamento com o látex de <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns	75
Figura 18 -	Morfologia das células HeLa após 48 h de tratamento com o látex de <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns	77
Figura 19 -	Morfologia das células HRT-18 após 24 h de tratamento com o látex de <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns	78
Figura 20 -	Morfologia das células HRT-18 após 48 h de tratamento com o látex de <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns	79
Figura 21 -	Citotoxicidade do látex de <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns avaliada por redução do MTT para células Jurkat em 24, 48 e 72 h	83
Figura 22 -	Citotoxicidade das frações Hex, CHCl ₃ , AcOEt, MeOH avaliada por redução do MTT para células Jurkat em 24, 48 e 72 h	85
Figura 23 -	Citotoxicidade da fração Hex, vincristina e clorambucil, avaliada por redução do MTT para células linfócitos humanos em 24, 48 e 72 h	86
Figura 24 -	Citotoxicidade do eufol e acetato de germanicol, isolados da fração Hex, avaliada por redução do MTT para células Jurkat em 72 h	88
Figura 25 -	Quantificação do conteúdo de DNA por DNA-DPA das células Jurkat após incubação com o látex de <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns em 48 h	91
Figura 26 -	Quantificação do conteúdo de DNA por iodeto de propídio das células Jurkat após incubação com o látex de <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns em 72 h	92
Figura 27 -	Quantificação do conteúdo de DNA por DNA-DPA das células Jurkat após incubação com as frações Hex, CHCl ₃ , AcOEt e MeOH em 48 h	92
Figura 28 -	Quantificação do conteúdo de DNA por iodeto de propídio das células Jurkat após incubação com as frações Hex, CHCl ₃ , AcOEt e MeOH em 72 h	93
Figura 29 -	Avaliação morfológica por alaranjado de acridina das células Jurkat após 24 h de incubação com fração Hex, vincristina e clorambucil	95
Figura 30 -	Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	97

Figura 31 -	Acetato de germanicol: estrutura química	100
Figura 32 -	Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , para o acetato de germanicol	101
Figura 33 -	Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , para o acetato de germanicol com detalhamento dos sinais em δ_{H} 4,5 e 4,8	101
Figura 34 -	Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , para o acetato de germanicol com detalhamento dos sinais em δ_{H} 0,7 a 1,6	102
Figura 35 -	Espectro de RMN de HSQC	102
Figura 36 -	Espectro de RMN de HMBC	103
Figura 37 -	Eufol: estrutura química	105
Figura 38 -	Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 para o eufol	106
Figura 39 -	Detalhamento dos sinais em δ_{H} 3,3 e 5,1.....	106
Figura 40 -	Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 para o eufol com detalhamento dos sinais em δ_{H} 0,7 a 1,7.....	107
Figura 41 -	Espectro de DEPT (A) e RMN ^{13}C (B) em CDCl_3 para o eufol com detalhamento dos sinais em δ_{C} 125,2 a 130,8	107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Neoplasias nacionais em destaque para homens e mulheres	24
Quadro 2 -	Medicamentos antitumorais obtidos a partir de plantas medicinais	26
Quadro 3 -	Espécies de <i>Croton</i> sp e <i>Euphorbia</i> sp promissores antitumorais e parte da planta utilizada	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Separação cromatográfica da fração hexânica	43
Tabela 2 -	Separação cromatográfica da fração 34-81	44
Tabela 3 -	Separação cromatográfica da fração 82-140	44
Tabela 4 -	Avaliação da citotoxicidade do látex de <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns e frações particionadas sobre células HeLa e HRT-18, através do cálculo de IC ₅₀ . O cálculo do IC ₅₀ para as amostras foi realizado por análise de Probit, método de Finney, utilizando o Software estatístico StatPlus versão 5.8.4	73
Tabela 5 -	Viabilidade das células Jurkat após incubação com látex de <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns, em 24, 48 e 72 h, avaliada através da integridade de membrana por exclusão de Tripán, conforme descrito no item 4.6.1. Após a normalização dos resultados, estes foram expressos em média e erro padrão da média. Como controle negativo foi utilizado o cultivo celular apenas em meio de cultura RPMI. As concentrações do látex estão compreendidas entre 50 e 800 µg/mL	80
Tabela 6 -	Viabilidade das células Jurkat após incubação com as frações Hex, CHCl ₃ , AcOEt, MeOH em 24, 48 e 72 h, avaliada através da integridade de membrana por exclusão de Tripán, conforme descrito no item 4.6.1. Após a normalização dos resultados, estes foram expressos em média e erro padrão da média. Como controle negativo foi utilizado o cultivo celular apenas em meio de cultura RPMI. As concentrações avaliadas estão compreendidas entre 5 e 80 µg/mL (Fração Hex); 10 e 150 µg/mL (Fração CHCl ₃ , AcOEt e MeOH)	82
Tabela 7 -	Índice de seletividade para linfócitos humanos (células não neoplásicas)	87
Tabela 8 -	Avaliação da citotoxicidade do látex de <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns e frações particionadas sobre células Jurkat, através do cálculo de IC ₅₀ . O cálculo do IC ₅₀ para as amostras foi realizado por análise de Probit, método de Finney, utilizando o Software estatístico StatPlus versão 5.8.4	89
Tabela 9 -	Distribuição do ciclo celular das células Jurkat após tratamento com a fração hexânica. A análise do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo, conforme descrito no item 4.6.7. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média, utilizando análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey, com significância de ***p<0,001	96

Tabela 10 -	Dados de RMN para o acetato de germanicol em comparação com dados da literatura	104
Tabela 11 -	Dados de RMN para o eufol em comparação com dados da literatura	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PBS – Tampão fosfato

VN – Vermelho neutro

DPA – Difenilalanina

Hex – Fração hexânica

CHCl₃ – Fração clorofórmica

AcOEt – Fração acetato de etila

MeOH – Fração metanólica

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

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

DMSO – Dimetilsulfóxido

TCA – Tricloroacético

UV – Ultravioleta

RMN – Ressonância magnética nuclear

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 O CÂNCER E AS PLANTAS MEDICINAIS	23
2.2 FAMÍLIA Euphorbiaceae Juss	26
2.3 GÊNERO <i>Euphorbia</i> L.....	28
2.4 <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns.....	29
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 REAGENTES E SOLVENTES	34
4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	34
4.3 AVALIAÇÃO MORFOANATÔMICA DA FOLHA E CAULE DE <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns	34
4.3.1 Material vegetal	34
4.3.2 Fixação do material vegetal.....	35
4.3.3 Preparo de lâminas semi-permanentes.....	35
4.3.4 Preparo de lâminas permanentes	35
4.3.5 Testes microquímicos.....	36
4.3.6 Microscopia eletrônica de varredura	36
4.4 COLETA DO LÁTEX	36
4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO LÁTEX E FRAÇÕES Hex, CHCl ₃ , AcOEt E MeOH PARA CÉLULAS HeLa E HRT-18	37
4.5.1 Ensaios de citotoxicidade por redução mitocondrial de metil tiazolil tetrazólium (MTT)	37
4.5.2 Ensaio de citotoxicidade por internalização lisossomal de vermelho neutro (VN)	38
4.5.3 Avaliação morfológica por May Grunwald e Giemsa.....	38

4.6 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DO LÁTEX E FRAÇÕES Hex, CHCl ₃ , AcOEt E MeOH PARA CÉLULAS JURKAT.....	39
4.6.1 Ensaio de integridade de membrana por exclusão de azul de Tripan.....	39
4.6.2 Ensaio de citotoxicidade por redução mitocondrial de MTT	39
4.6.3 Quantificação do conteúdo de DNA por difenilalanina (DNA-DPA).....	40
4.6.4 Quantificação do conteúdo de DNA por iodeto de propídio.....	40
4.6.5 Isolamento de linfócitos humanos e avaliação de citotoxicidade da fração Hex e substâncias isoladas por redução mitocondrial de MTT.....	41
4.6.6 Avaliação morfológica celular por meio do emprego dos corantes alaranjado de acridina e brometo de etídeo.....	41
4.6.7 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	42
4.7 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS.....	42
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5 MORFOANATOMIA.....	47
5.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6 ENSAIOS BIOLÓGICOS	59
6.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
6.1.1 Células aderentes	60
6.1.1.1 Ensaio de citotoxicidade por redução mitocondrial de MTT	60
6.1.1.2 Ensaio de citotoxicidade por internalização lisossomal VN.....	66
6.1.1.3 Avaliação de citotoxicidade por cálculo de IC ₅₀	72
6.1.1.4 Análise morfológica	74
6.1.2 Células em suspensão	80
6.1.2.1 Integridade de membrana por exclusão de azul de Tripan.....	80
6.1.2.2 Ensaio de citotoxicidade por redução mitocondrial de MTT	83
6.1.2.3 Avaliação de citotoxicidade por cálculo de IC ₅₀	89
6.1.2.4 Quantificação do conteúdo de DNA por DNA-DPA e Iodeto de propídio	90
6.1.2.5 Avaliação morfológica celular por meio do emprego do corante alaranjado de acridina e brometo de etídeo.....	94
6.1.2.6 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	95
7 FITOQUÍMICA.....	99

7.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
7.1.1 Procedimento extrativo e caracterização das substâncias isoladas	100
8 CONCLUSÃO	110
REFERÊNCIAS	112

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são considerados fontes importantes de obtenção de princípios ativos para o tratamento do câncer. O conhecimento dos possíveis efeitos dos metabólitos presentes nestes, está fundamentado na etnofarmacologia. Entre os produtos ditos naturais destacam-se as plantas medicinais, que são usadas há pelo menos 4.000 anos a.C., sendo que a continuidade da utilização destas remete a medicina tradicional (DURMIC; BLACHE, 2012). Mesmo com relatos antigos, ainda hoje as plantas medicinais são alvos de inúmeras pesquisas científicas, através das quais se verificam cada vez mais o potencial que podem apresentar, principalmente em termos farmacológicos e toxicológicos (DURMIC; BLACHE, 2012).

A descoberta de novas moléculas ativas a partir de uma espécie vegetal, conhecida popularmente como medicinal é considerada uma atividade promissora, desafiadora e que exige um grande dispêndio de tempo em pesquisa, porque envolve diversas etapas tanto na realização de experimentos *in vitro* quanto *in vivo* e estudo bibliográfico.

O estudo da espécie vegetal que se tem informações sobre possíveis atividades farmacológicas, deve iniciar-se através da correta identificação vegetal do material. Para tanto, o estudo morfoanatômico, que compreende a identificação vegetal, macro e microscópica, é feito através da montagem de uma exsicata; realização de técnicas histológicas e microquímicas; as quais constituem etapas imprescindíveis (YOUSSEF *et al.*, 2013). Isso torna possível a visualização dos tecidos vegetais, estruturas secretoras e anexos; bem como substâncias presentes nos tecidos, como por exemplo: substâncias amilíferas, laticíferas, lipofílicas, mucilagens e cristais. A identificação destes tecidos e possíveis substâncias presentes nas amostras constituem-se em itens de avaliação, que podem diferenciar e/ou confirmar uma espécie vegetal (HUANG *et al.*, 2013). Por outro lado, a ausência desta etapa poderá comprometer anos de pesquisa, por identificação errônea de uma espécie vegetal que se pretende estudar.

Assim como a correta identificação da espécie vegetal, se faz necessária, a avaliação da composição química que é importante e sequencial dentro de um estudo científico. Isto porque, muitas vezes estes vegetais têm suas ações terapêuticas atribuídas a moléculas farmacologicamente ativas chamadas de

metabólitos primários ou principalmente secundários, que podem estar presentes em diversos órgãos vegetais (AZMIR *et al.*, 2013; DURMIC; BLACHE, 2012).

Dentre os metabólitos classificados como secundários há destaque para três classes que apresentam compostos com promissora atividade anticancerígena: terpenos, alcaloides e flavonoides (PENG *et al.*, 2012b; LAGE *et al.*, 2010; NOBILI *et al.*, 2009). Alguns alcaloides descobertos a partir do estudo de plantas medicinais constituem-se hoje os princípios ativos presentes em medicamentos já estabelecidos no mercado, como, por exemplo, a vincristina e a vimblastina, isolados e identificados a partir de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, a vinca (FILHO *et al.*, 2006). No mesmo sentido, os terpenos e compostos fenólicos são descritos como classes metabólicas que apresentam atividade anticancerígena, seja por uma ação diretamente relacionada ao composto (no caso dos terpenos, existem relatos da ação anticâncer do jatrofano, por exemplo) (PESIC *et al.*, 2011) ou indiretamente como os ácidos fenólicos ou flavonoides que por possuírem atividade antioxidante comprovada, podem inibir o desenvolvimento da cascata de formação de radicais livres, que tem capacidade de desenvolver o câncer (MUNHOZ *et al.*, 2014).

Infelizmente há estudos que não enfatizam a complementação da fitoquímica, com o isolamento de compostos, fazendo com que muitas espécies permaneçam apenas nos estudos preliminares, deixando de serem confirmadas as possíveis moléculas bioativas (SAWADOGO *et al.*, 2012; BRANDÃO *et al.*, 2010).

Quando se pensa na busca de moléculas ativas para o tratamento do câncer esse percentual é ainda menor. Principalmente porque esta doença é de grande prevalência mundial e ainda não foi descoberto medicamento seletivo e nem um tratamento ideal (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2011). Ao contrário, os tratamentos medicamentosos existentes atualmente oferecem uma gama de efeitos colaterais, na busca de obtenção de cura do câncer.

Assim, na tentativa de ampliar e melhorar a terapia oncológica, busca-se relacionar os estudos fitoquímicos com os ensaios biológicos, iniciando pelos ensaios *in vitro* e na presença de resultados satisfatórios, finalizado com a pesquisa clínica (ANDRADE *et al.*, 2012)

Nesse sentido o objetivo do trabalho foi realizar o estudo morfoanatômico de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, ensaios biológicos do látex e frações particionadas dele. A partir do estudo preliminar biomonitorado, foi efetuado o estudo fitoquímico, objetivando isolar substâncias da fração com melhor potencial citotóxico

e submetê-las aos ensaios *in vitro* e compará-las aos efeitos em células não cancerígenas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O CÂNCER E AS PLANTAS MEDICINAIS

O câncer é uma doença de grande prevalência mundial, caracterizado pelo crescimento celular rápido, descontrolado e potencialmente invasivo (OCHWANG'I *et al.*, 2014; INCA, 2014). Pressupõe que entre as principais causas estejam a predisposição genética e hábitos de vida (DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Esta doença pode ser diferenciada em fases denominadas de iniciação, promoção e progressão. A primeira delas é marcada por mutações no DNA, as quais a princípio são reparadas enzimaticamente; a segunda é instalada, quando a reparação já não é eficaz e as células mutadas passam a se multiplicar (GOMES; REIS, 2011). Com a multiplicação, as células normais são substituídas progressivamente por células tumorais, as quais por serem menos especializadas levam a perda funcional dos órgãos. Fato que se não tratado a tempo, culmina com a morte do indivíduo; caracterizando a terceira e última fase evolutiva (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

As formas de tratamento estão em torno de quatro vertentes: cirúrgica, radioterápica, imunoterápica e quimioterápica (GOMES; REIS, 2011). Porém tais tratamentos são caracterizados invasivos, causando dentre os diversos efeitos colaterais a alopecia, diarreia ou constipação, vômitos e principalmente problemas neurológicos, cardíacos e renais (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2011). A quimioterapia utiliza medicamentos ciclo celular dependente e ciclo celular não dependente. A diferença consiste no fato de que os fármacos ciclo dependentes agem nas fases de ciclo celular (G1, S, G2 e M), enquanto que o segundo grupo não tem ação nestas etapas (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

Em decorrência desta ineficiência terapêutica, esta enfermidade se torna responsável por elevados índices de mortalidade. Estatísticas mundiais mostram que em 2011, das doenças com maiores índices de mortalidade, o câncer está entre as primeiras (WHO, 2014). Informação esta corroborada por dados estatísticos que relevam que cerca de 8,2 milhões de mortes ocorreram mundialmente no ano de 2012 (WHO, 2014). No mesmo sentido, estimativas preveem aumento para 14 milhões de mortes nas próximas duas décadas e em 2030 está previsto o aparecimento de 21,4 milhões de novos casos de câncer no mundo. No Brasil é previsto o aparecimento de 576 mil novos casos de câncer (INCA, 2014). Dos

estados avaliados, os mais acometidos por esta enfermidade são: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo, onde para cada 100 mil homens há o aparecimento de 214,94 a 374,41 casos e em 100 mil mulheres o surgimento de 190,04 a 306,37 casos (WHO, 2014; INCA, 2014).

Dados preocupantes, principalmente quando se remete ao fato de que apesar de fatores como o tabagismo, incidência de radiação solar e hábitos alimentares serem fatores determinantes e agravantes para o desenvolvimento da doença, muitas das causas ainda são desconhecidas (INCA, 2014).

No Brasil dentre os 10 tipos de neoplasias mais relevantes estão o câncer de cólo de útero; colorretal e leucemia (Quadro 1); podendo ser estudadas pelas linhagens cancerígenas HeLa, HRT-18 e Jurkat respectivamente.

Quadro 1 - Neoplasias nacionais em destaque para homens e mulheres.

HOMENS		MULHERES	
CÂNCER	% CASOS	CÂNCER	% CASOS
Próstata	22,8%	Mama	20,8%
Traquéia, Brônquio e Pulmão	5,4%	Cólon e Reto	6,4%
Cólon e Reto	5,0%	Cólo do Útero	5,7%
Estômago	4,3%	Traquéia, Brônquio e Pulmão	4,0%
Cavidade Oral	3,7%	Estômago	2,9%
Esôfago	2,6%	Glândula Tireoide	2,7%
Laringe	2,3%	Corpo do Útero	2,2%
Bexiga	2,2%	Ovário	2,1%
Leucemia	1,7%	Linfoma não Hodgkin	1,8%
Sistema Nervoso Central	1,6%	Leucemia	1,6%

Fonte: adaptado de INCA, 2014.

HeLa são células cultivadas por aderência, de origem humana e que possuem morfologia epitelial. Ela foi isolada de uma mulher de 31 anos de idade com adenocarcinoma de cérvix. Atinge, portanto, a região cervical e tem como principal agente causador o Papilomavírus humano (ATCC, 2014). Células HRT-18 assim como as células HeLa, são aderentes e apresentam morfologia epitelial. Foram extraídas de um homem com 67 anos que desenvolveu câncer de colorretal (ATCC, 2014; INCA, 2014). A linhagem cancerígena Jurkat, ao contrário das demais se desenvolvem em suspensão. Possuem morfologia linfoblástica e foram obtidas de um menino com aproximadamente 14 anos, portador de leucemia (ATCC, 2014).

Como hoje há preocupação em pesquisar o câncer a nível molecular, juntamente com suas lesões, de forma que seja possível melhorar os resultados clínicos e também utilizá-los como alvo para uma intervenção eficaz; tem-se priorizado a iniciação dos estudos por culturas estabelecidas (TABCHY *et al.*, 2013). Estas por sua vez representam um dos pilares da biologia do tumor e a descoberta de novas drogas através da manipulação experimental (BARRETINA *et al.*, 2012).

Com base nisto é que está sendo utilizada de forma crescente a cultura de células *in vitro*, a qual permite estudar o crescimento, diferenciação e morte celular, com conhecimento da estrutura e função dos genes (CRUZ *et al.*, 2009).

Nesse sentido a experimentação *in vitro*, é considerada via alternativa aos ensaios *in vivo* preliminares (ANDRADE *et al.*, 2012). Eles oferecem, através da cultura de células, a avaliação de citotoxicidade e proliferação de forma mais rápida e ética (ANDRADE *et al.*, 2012; CINGI *et al.*, 1991). Permitem também o controle de fatores ambientais, como temperatura e pH; facilidade de armazenamento, caracterização e quantificação; e homogeneidade celular. Por outro lado a ausência da complexidade de um organismo vivo limita estes ensaios como experimentação única; necessitando serem complementados por ensaios *in vivo* (FRESHNEY, 2005).

Na tentativa de encontrar medicamentos mais eficazes, as plantas medicinais têm sido buscadas e avaliadas, através de metabólitos secundários que são considerados biomoléculas ativas. Manosroi e colaboradores (2012) consideram as plantas medicinais como as principais fontes de obtenção de princípios ativos frente ao tratamento do câncer, uma vez que este conhecimento está baseado no uso popular há anos. Também é acrescido o fato de que até os dias atuais 8 medicamentos antitumorais de importância relevante foram obtidos por plantas medicinais, sendo quatro espécies distintas: *Cantharantus roseus*, *Taxus brevifolia* Nutt., *Podophyllum peltatum* L. e *Camptotheca acuminata* Decne. (Quadro 2).

Quadro 2 - Medicamentos antitumorais obtidos a partir de plantas medicinais.

MEDICAMENTO	PRINCÍPIO ATIVO	ESPÉCIE VEGETAL
Velban®	Vimblastina	<i>Catharanthus roseus</i>
Oncovin®	Vincristina	<i>Catharanthus roseus</i>
Navelbine®	Análogo de vinorelbina	<i>Catharanthus roseus</i>
Taxol®	Paclitaxel	<i>Taxus brevifolia</i>
Taxotere®	Análogo docetaxel	<i>Taxus brevifolia</i>
Vumon®	Análogo teniposídeo	<i>Podophyllum peltatum</i>
Hycamtin®	Camptotecina e os análogos, topotecano	<i>Camptotheca accuminata</i>
Camptosar®	Análogo irinotecano	<i>Camptotheca accuminata</i>

Fonte: Adaptado de Costa-Lotufo *et al.*, 2010.

Assim é importante investir em pesquisas a cerca da biodiversidade mundial, a qual não é conhecida ainda com exatidão. Estima-se que há em torno de 250.000 espécies de plantas superiores, sendo em grande parte naturais da América Latina (BRAZ FILHO, 2010). Apenas o território brasileiro é habitat de aproximadamente 20-22% de todas as plantas existentes, localizadas em 6 biomas principais: Floresta Amazônica, Caatinga, Pampas, Cerrado, Floresta Atlântica e Pantanal (BIESKI *et al.*, 2012; CALIXTO, 2005; GUERRA; NODARI, 2004).

As plantas possuem moléculas complexas e com infinitas variações estruturais, as quais podem apresentar diversas atividades biológicas, conduzindo à descoberta de novos fármacos. E desta forma, constituindo-se em ferramentas importantes na pesquisa biomédica e terapêutica (BRAZ FILHO, 2010; CALIXTO, 2005; NOLDIN; ISAÍAS; CECHINEL FILHO, 2006).

Para tanto, deve-se salientar que a triagem de novas moléculas ativas, no tratamento do câncer, deve ser realizada através de estudos etnofarmacológicos e ensaios biológicos (FERREIRA *et al.*, 2012; BRANDÃO *et al.*, 2010; ELISABETSKY; SOUZA, 2010).

2.2 FAMÍLIA Euphorbiaceae Juss

Euphorbiaceae, conhecida e utilizada desde a antiguidade, é considerada uma das maiores famílias de Angiospermas, com aproximadamente 300 gêneros e 10.000 espécies (WAKJIRA; NEGASH, 2013; PESIC *et al.*, 2011). No Brasil estão catalogados 63 gêneros e 940 espécies (CORDEIRO *et al.*, 2014).

São encontradas principalmente em ambientes tropicais e em menor proporção, subtropicais e temperados (LEE *et al.*, 2010). Dentre elas há aquelas que se apresentam sob a forma herbácea como *Phyllanthus ramillosus* Müll. Arg., *Euphorbia hirta* L., *Euphorbia sciadophila* Boiss, *Croton lobatos* L., *Julocroton humilis* Didr. (SMITH; DOWNS; KLEIN, 1988); arbustiva como *Breynia disticha* J. R. Forst. e G. Forst, *Phyllanthus sellowianus* (Klotzsch) Müll. Arg., *Euphorbia caducifolia* Haines (GOYAL *et al.*, 2012), *Croton stenotrichus* Müll. Arg. Kuntze, *Julocroton ramboi* L. B. Sm. e Downs, *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch; e arbórea: *Euphorbia tirucalli* L. e *Croton urucurana* Baill. (SMITH; DOWNS; KLEIN, 1988).

As espécies vegetais pertencentes à Euphorbiaceae exibem enorme potencial farmacológico. Além dos relatos etnofarmacológicos, há estudos que demonstram a existência de atividades biológicas mais específicas através da análise de extratos brutos de folhas, raízes, caules, cascas e látex; frações e substâncias isoladas para os diversos gêneros. Estudos já evidenciaram atividades antitussígenas para *Emblica officinalis* Gaertn (NOSÁL'OVÁ; MOKRÝ; HASSAN, 2003); antiplasmódico (CIMANGA *et al.*, 2004), antioxidante, hepatoprotetora (HARISH; SHIVANANDAPPA; 2006) e analgésica para *Phyllanthus niruri* L. (MOREIRA *et al.*, 2013); antibacteriana de *Croton campestris* A. St. -Hil (LAVOR *et al.*, 2014); gastroprotetoras para o óleo de *Croton cajucara* Benth (LIMA *et al.*, 2000); antimicrobiana, principalmente contra a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, e atividade antifúngica para o extrato metanólico de *Thecacoris annobonae* Pax & K. Hoffm bem como para o ácido aristolóquico isolado desta fração (KUETE *et al.*, 2010); antiparasitária para *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (HASSAN; MOHAMMED; MOHAMED, 2012); anti HIV em *Euphorbia lactea* Haw e *Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam (ÁVILA *et al.*, 2010).

Estudos recentes citam 32 espécies desta família utilizadas na medicina chinesa (PENG *et al.*, 2012a), 4 no México (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2011) e 2 no oeste da África (SAWADOGO *et al.*, 2012).

Há destaque também para estudos envolvendo atividade antitumoral e Euphorbiaceae. Bhanot, Malleshappa e Noolvi (2011) listaram 117 espécies promissoras na atividade anticâncer, sendo 10 delas pertencentes a esta família, com destaque para *Croton* e *Euphorbia* (Quadro 3). Segundo Ochwang'i e colaboradores (2014) das 65 plantas citadas com importância relevante para tratamento do câncer, 5 delas remetam às Euphorbiaceae.

Quadro 3 - Espécies de *Croton* sp e *Euphorbia* sp promissores antitumorais e parte da planta utilizada.

ESPÉCIE	PARTE UTILIZADA
<i>Croton draco</i> Schltl. & Cham.	Partes aéreas
<i>Croton flavens</i> L.	Folha
<i>Croton lechleri</i> Müll. Arg.	Látex
<i>Croton macrostachyus</i> Hochst. ex Delile	Folha e caule
<i>Croton urucurana</i> Baill.	Casca
<i>Croton reflexifolius</i> Kunth	Folha
<i>Euphorbia ebracteolata</i> Hayata	Partes aéreas
<i>Euphorbia heterophylla</i> L.	Caule
<i>Euphorbia kansui</i> Liou ex S.B. Ho	Raiz
<i>Euphorbia marginata</i> Pursh	Todo
<i>Euphorbia micractina</i> Boiss.	Todo
<i>Euphorbia prolifera</i> Buch.-Ham. ex D. Don	Látex
<i>Euphorbia pulcherrima</i> (Willd.) Klotzsch Ap	Partes aéreas
<i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns	Látex

Fonte: Adaptado de Ochwang'i *et al.*, 2014; Bhanot, Malleshappa e Noolvi, 2011; Alonso-Castro *et al.*, 2011; Ortêncio, 1997.

2.3 GÊNERO *Euphorbia* L.

Euphorbia é destaque dentre os gêneros de Euphorbiaceae, possuindo cerca de 2.000 espécies vegetais (ZHANG *et al.*, 2012; SHI *et al.*, 2008). São plantas cultivadas principalmente em ambientes tropicais e podem ser exploradas na íntegra, ou seja, desde a raiz até frutos e sementes (AYATOLLAHI *et al.*, 2010; SHI *et al.*, 2008).

Por serem conhecidas há bastante tempo, muitas delas são utilizadas como remédios para diversas enfermidades (YANG *et al.*, 2014). Porém seu uso requer cuidados, devido à presença de toxicidade relevante (YANG *et al.*, 2014).

Acredita-se que espécies de *Euphorbia* apresentem os terpenos como metabólitos secundários majoritários (SHI *et al.*, 2008). Fato confirmado pela presença de terpenos isolados e identificados em diversas espécies do gênero, como *E. falcata* L. (VASAS *et al.*, 2012); *E. aellenii* Rech. (AYATOLLAHI *et al.*, 2012); *E. portlandica* L. (MADUREIRA *et al.*, 2006); *E. kansui* S.L.Liou ex S.B.Ho (PENG *et al.*, 2012a); *E. lunulata* Bunge (LIU *et al.*, 2014); *E. tirucalli* (LIN *et al.*, 2012a); *E. dendroides* L. (PESIC *et al.*, 2011); *E. umbellata* (DE OLIVEIRA *et al.*,

2013). Compostos de grande importância principalmente porque se associam a eles a atividade anticâncer.

2.4 *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns

Segundo o sistema proposto por Cronquist, *E. umbellata* (Figura 1) pertence a classe Equisetopsida, subclasse Magnoliidae, ordem Malpighiales, família Euphorbiaceae e gênero *Euphorbia* (TROPICOS, 2014). É uma planta arbustiva, podendo atingir de 3 a 5 m de altura. É nativa da África tropical, mas pode ser encontrada em países como o Brasil e a Índia onde foi introduzida, a princípio, como planta ornamental (OLIVEIRA Jr. *et al.*, 2005; BAGAVATHI; SORG; HECKER, 1988).

Na região sul do Brasil é conhecida cientificamente por *Synadenium grantii* Hook. f. e popularmente como janaúba e leitosinha; enquanto que na região centro oeste é conhecida por *Synadenium umbellatum* Pax ou mais comumente como colanota, avelós, milagrosa e cancerola (MOTA *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2012). Sua classificação gera ainda hoje confusões. Dentre sites renomados há aqueles que as consideram como espécies distintas (TRÓPICOS, 2014), enquanto outros afirmam serem espécies sinônimas (THE PLANT LIST, 2014).

É utilizada popularmente na forma de garrafada, manipulada artesanalmente e empregada para o tratamento do câncer, cujo preparo consiste na diluição de 18 gotas de látex *in natura* em 1 L de água potável, administrada 3x ao dia (ORTÊNCIO, 1997).

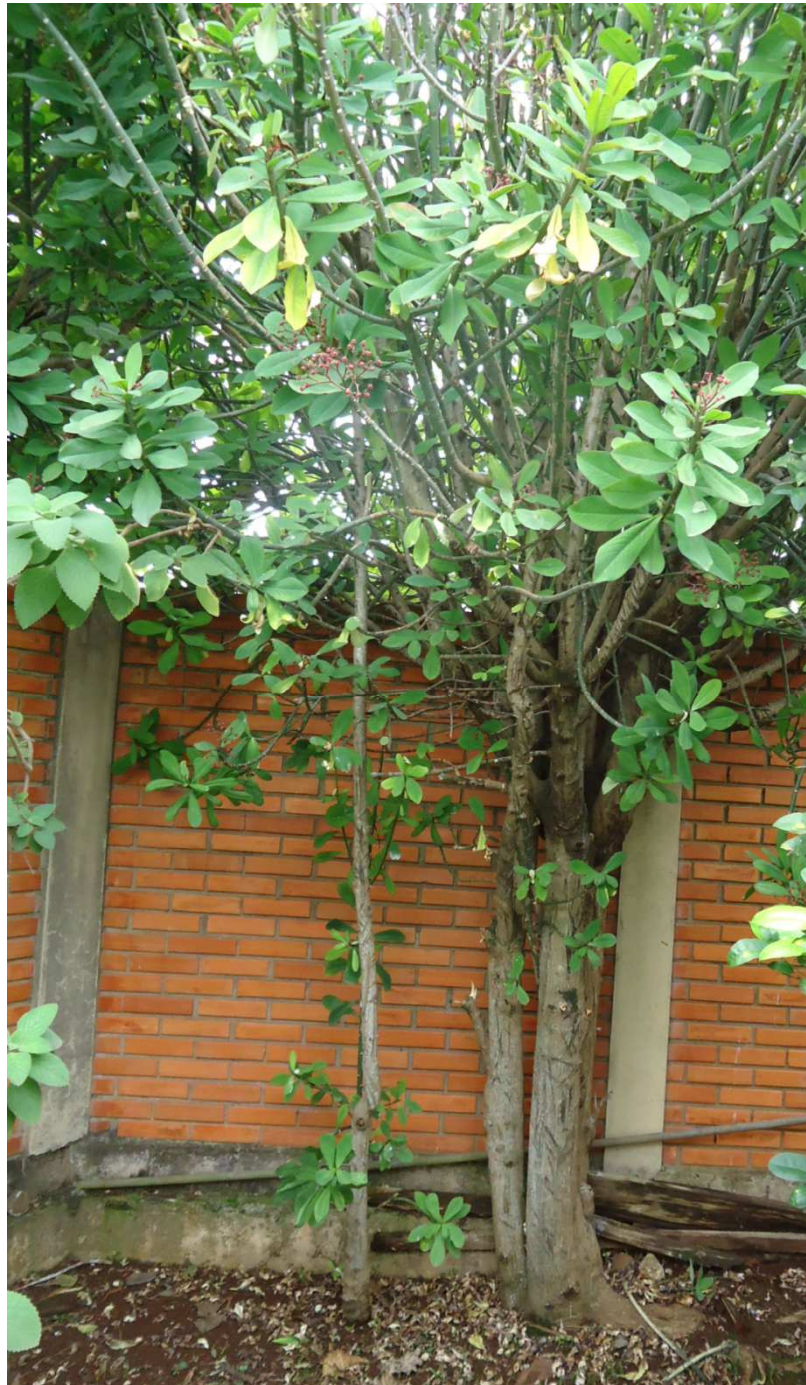
Dentre os metabólitos encontrados, estão os taninos, cumarinas e antraquinonas, identificados por reações de caracterização (COSTA *et al.*, 2012). De forma complementar, análises cromatográficas quantificaram antocianinas nas folhas (ANDERSEN *et al.*, 2010) e a fitoquímica do látex, demonstrou a presença de esteroides (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; NIELSEN *et al.*, 1987), em proporções majoritárias, os terpenos, e mais especificamente os triterpenos (UZABAKILHO; LARGEAU; CASADEVAL, 1987).

Além dos metabólitos secundários presentes no látex, há também os metabólitos primários. Menon e colaboradores (2002) quantificaram enzimas proteolíticas, sobre as quais há relatos de influenciarem na inibição do processo metastático em neoplasias (ALVARENGA *et al.*, 2014). E dentre as proteases, Rajesh e colaboradores (2006) isolaram enzimas fibrinolíticas. Somado a isto está o

potencial efeito anti-angiogênico observado no extrato bruto etanólico de *E. umbellata* (NOGUEIRA *et al.*, 2008).

Diante da revisão é justificada a pesquisa do látex, fitocomplexo tão característico da espécie e promissor no tratamento oncológico.

Figura 1 - *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae), no hábito.



Fonte: A autora.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a morfoanatomia de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, a citotoxicidade e a fitoquímica do látex, frações Hex, CHCl₃, AcOEt e MeOH e substâncias isoladas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Explorar aspectos macro e microscópicos de *E. umbellata*;
- ✓ Investigar por técnicas microquímicas a presença de compostos lipofílicos e fenólicos, grãos de amido, mucilagem, compostos nitrogenados e estruturas lignificadas;
- ✓ Verificar a citotoxicidade do látex e frações particionadas dele por meio de ensaios biológicos, utilizando células HeLa, HRT-18 e Jurkat;
- ✓ Realizar estudo fitoquímico do látex, bem como o isolamento e identificação de substâncias presentes na fração com melhor potencial citotóxico;
- ✓ Avaliar a toxicidade dos compostos isolados com a linhagem celular que demonstrar maior citotoxicidade;
- ✓ Comparar a toxicidade visualizada em células cancerígenas com as células não cancerígenas;
- ✓ Submeter as células tratadas com a fração mais citotóxica à citometria de fluxo;
- ✓ Analisar e interpretar estatisticamente os resultados obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLVENTES

Acetaldeído; ácido acético, aldeído fórmico; ácido clorídrico 0,1M (Vetec); ácido sulfúrico; acetato de etila; água purificada; água ultra purificada; álcool isopropílico grau P.A. (Panreac); azul de astra; azul de metileno; brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (Amresco); CHCl_3 ; cloreto de cálcio (Anidrol); corante Giemsa; corante May Grunwald; difenil alanina; dimetilsulfóxido grau P.A.; etanol 70%; floroglucina clorídrica; fucsina básica; glicerina (50%); esmalte incolor; parafina; xilol; iodeto de propídio; citrato (Sigma); lugol (0,5%); meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab); metanol; hexano; clorofórmio; reativo de Bouchardat; soro fetal bovino (Gibco); Sudam III; tampão fosfato; triton X-100 (Sigma); vermelho neutro (Inlab), alaranjado de acridina (Fluka); brometo de etídio (Invitrogen); RNase; Hepes (Sigma).

Os solventes que foram utilizados são de grau analítico.

4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Sílica 35-70 mesh (Merck) e 230-400 mesh (Macherey-Nagel); lâminas cortantes; lâminas; lamínulas retangulares e circulares; bloco de isopor; micrótomo (Leica); manta aquecedora (Quimis); placas de cultura de 24 e 96 poços (Kasvi); balança analítica (Shimadzu); estufa (Logen); incubadora de CO_2 (Sanyo); leitor de placas (Biotec); banho maria (Logen); câmera fotográfica (Olympus C-7070, Olympus DP71); microscópio óptico (Olympus CX31, Olympus BX41); microscópio eletrônico (JSM- 6360LV); filtros de 0,22 μm ; banho ultratermostático (Odontobrás); fluxo laminar (Veco); tubos de 2 mL, 15 mL e 50 mL; micropipetas de volume variável (Brand); pHmêtro (Gehaka); vórtex (Marconi); ressonância magnética nuclear (Bruker AvanceIII HD 600); citometro de fluxo (FACS Calibur).

4.3 AVALIAÇÃO MORFOANATÔMICA DA FOLHA E CAULE DE *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns

4.3.1 Material vegetal

Dois espécimes já identificados como *S. umbellatum* foram coletados em Goiânia (GO) no mês de setembro de 2013 a 787 m de altitude, 16°40'15,5" S de latitude e 49°14'53" O de longitude. E três espécimes identificados como *S. grantii*

foram coletados em Ponta Grossa (PR) no mês de agosto de 2013, a 975 m de altitude, 25°05'38" S de latitude e 50°09'30" O de longitude. A exsicata foi identificada em fevereiro de 2014 pela taxonomista especialista em Euphorbiaceae Profa. Dra. Inês Cordeiro, depositada e registrada no Herbário Maria Eneida P. Kauffmann Fidalgo, do Instituto de Botânica de São Paulo, sob número de registro SP453920.

4.3.2 Fixação do material vegetal

Folhas e caules de *E. umbellata in natura* foram previamente fixados em solução composta de etanol (70%): ácido acético: aldeído fórmico (FAA, 90:5:5, v/v/v) (JOHANSEN, 1940) por 7 dias. Posteriormente a solução de FAA foi substituída por solução estoque de etanol 70% (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

4.3.3 Preparo de lâminas semi-permanentes

Para análise morfológica foi empregado folhas e caules fixados conforme descrição do item 4.3.2. Separado o caule e folha, realizou-se secção transversal e paradérmica para folhas e somente transversal para o caule. A secção transversal foi auxiliada por lâmina cortante e bloco de isopor. Enquanto que a secção paradérmica foi realizada com lâmina cortante sem o auxílio de isopor. Após seleção criteriosa, os cortes foram corados com azul de astra e fucsina básica (ROESER, 1972). Após a dupla coloração, folhas e caules foram colocados sobre as lâminas, adicionados sobre eles 3 gotas de solução de glicerina 50% (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e cobertos com lamínulas retangulares. A lutagem foi feita com esmalte incolor (BEÇAK; PAULET, 1976), e os cortes foram visualizados em microscópio óptico acoplado à câmara fotográfica digital.

Para a obtenção do corte paradérmico, foi utilizado apenas lâmina cortante e diferentemente do transversal, optou-se por fazer coloração simples, utilizando portanto apenas um corante (fucsina básica).

4.3.4 Preparo de lâminas permanentes

Folhas e caules foram previamente fixados em FAA, conforme descrito no item 4.3.2. Secções de folhas e caules foram separados e submetidos à desidratação alcoólica crescente em 70%, 80%, 90% e 100% por 1 h com troca de solvente e

repetição por igual período em todas as graduações etanólicas. Os cortes desidratados foram imersos em xilol por 30 min, com uma repetição sequencial. Posteriormente foram deixados em solução de xilol e parafina por 36 h, sendo a solução trocada a cada 12 h. Finalizada a fase de preparo folhas e caules foram imersos em parafina por 12 h com repetição por mais 12 h, quando então foram emblocados.

As secções dos materiais parafinizados foram feitas em micrótomo, com espessura de 5 μ m, os quais foram colocados sobre lâminas de vidro. Após a secagem do material, os cortes foram desparafinizados, passando por xilol 2 vezes por 5 min e submetidos a série alcoólica decrescente (100% a 70%). Ao final, foram corados com azul de astra e fucsina básica com a mesma diluição empregada para as lâminas semi-permanentes (BRITO; ALQUINI, 1996).

4.3.5 Testes microquímicos

Para os testes microquímicos folhas e caules foram cortados transversalmente. Estes foram dispostos em lâminas e sobre eles adicionados gota a gota, até imersão completa os reativos de Sudam III para identificação de compostos lipofílicos (SASS,1951); cloreto férrico para compostos fenólicos (JOHANSEN,1940); lugol para grãos de amido (BERLYN; MIKSCHE, 1976); azul de metileno para mucilagem (OLIVEIRA; AKISUE, 1989); reativo de Bouchardat para alcaloides (MOREIRA, 1979) e floroglucina clorídrica para estruturas lignificadas (FOSTER, 1949).

4.3.6 Microscopia eletrônica de varredura

Para a análise de microscopia eletrônica de varredura da superfície foliar e caulinar foi utilizado o material previamente fixado, conforme descrito no item 4.3.2. As amostras foram submetidas ao processo de desidratação etanólica crescente e pelo ponto crítico de CO₂ (SOUZA, 1998), analisadas e registradas em microscópio eletrônico de varredura do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

4.4 COLETA DO LÁTEX

O látex de *E. umbellata* foi coletado através de incisões transversais no caule da espécie (Figura 2).

Figura 2 - *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) - Coleta do látex da casca.



Fonte: A autora.

4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO LÁTEX E FRAÇÕES Hex, CHCl_3 , AcOEt E MeOH PARA CÉLULAS HeLa E HRT-18

4.5.1 Ensaios de citotoxicidade por redução mitocondrial de metil tiazolil tetrazólium (MTT)

Células HeLa e HRT-18 foram semeadas em placas de 96 poços em 80 μL de meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB e 1% dos antibióticos estreptomicina e penicilina (100 mg/L e 100 U/L respectivamente). O plaqueamento foi feito com concentração de 8×10^3 células/poço. As placas foram armazenadas por 24 h em incubadora com 5% CO_2 a 37 °C. Posteriormente, substituiu-se o meio de cultura e adicionou-se sobre as células o látex nas concentrações de 19,45 a 1000 $\mu\text{g/mL}$; as frações Hex, CHCl_3 , AcOEt e MeOH nas concentrações de 10 a 150 $\mu\text{g/mL}$, obtendo volume final de 200 μL /poço.

Ao final de cada período de incubação procedeu-se a retirada do meio de cultura com adição sequencial de 70 μL de MTT (0,5 mg/mL) sobre as células. A placa foi então recolocada na incubadora de CO_2 por 2 h para metabolização

mitocondrial do MTT. Ao final, observou-se a formação de cristais de *Formazan*, os quais foram eluídos com álcool isopropílico acidificado com 0,1M de HCl e efetuou-se a leitura colorimétrica em 570 nm (MOSMANN, 1983).

4.5.2 Ensaio de citotoxicidade por internalização lisossomal de vermelho neutro (VN)

A metodologia de avaliação do potencial citotóxico do látex e frações a partir da internalização do vermelho neutro em lisossomos foi adaptada de Borenfreund e Puerner (1985). Células HeLa e HRT-18 foram semeadas na concentração de 8×10^3 /poço em placas de 96 poços, com 80 µL de meio de cultura RPMI 1640, adicionados de 10% de SFB e 1% dos antibióticos estreptomicina e penicilina (100 mg/L e 100 U/L respectivamente). Estas foram armazenadas em incubadora de CO₂. Após o período de aderência celular, foi adicionado sobre as células, o látex nas concentrações de 19,45 a 1000 µg/mL e as frações Hex, CHCl₃, AcOEt e MeOH de 10 a 150 µg/mL; atingindo volume final de 200 µL por poço.

Ao final de cada período de avaliação, retirou-se o meio de cultura e adicionou-se 100 µL de vermelho neutro (40 µg/mL em meio RPMI), aguardando 1 h de incubação. Depois as células foram lavadas e lisadas com 200 µL da solução de CaCl₂, PBS e aldeído fórmico. O VN incorporado pelos lisossomos foi eluído com 200 µL etanol 96 °GL, PBS e ácido acético. Obtida a coloração, a absorvância foi lida a 520 nm.

4.5.3 Avaliação morfológica por May Grunwald e Giemsa

A análise morfológica foi realizada em placas de 24 poços, para 24 h e 48 h. Para isso foram selecionadas duas concentrações em que se observou, por MTT, a morte de aproximadamente 50% das células. O plaqueamento foi feito sobre a lamínula circular, com densidade celular de 2×10^4 células/poço com 400 µL de meio RPMI suplementados com 10% de SFB e 1% dos antibióticos estreptomicina e penicilina (100 mg/L e 100 U/L respectivamente). As placas foram armazenadas em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂.

Em cada tempo, foi procedida à retirada do meio de cultura, lavagem com PBS e adição 2% de formol em PBS. Esta solução foi deixada em contato por 10 min para fixação do material celular. Na sequência foram lavadas com PBS, sobre elas adicionados 300 µL do corante May Grunwald e deixados em contato por 5 min para

obtenção da coloração desejada. Após, realizou-se lavagem com água, com adição subsequente do corante Giemsa por 15 min. Finalizado o tempo de coloração, foi feita a lavagem com água.

Para a montagem das lâminas, a lamínula circular foi transferida para uma lâmina retangular a qual foi vedada com esmalte. A visualização foi feita em microscópio óptico e registrado com câmera fotográfica.

4.6 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DO LÁTEX E FRAÇÕES Hex, CHCl_3 , AcOEt E MeOH PARA CÉLULAS JURKAT

4.6.1 Ensaio de integridade de membrana por exclusão de azul de Tripán

As células Jurkat foram semeadas na concentração de 1×10^5 células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB % e 1% dos antibióticos estreptomicina e penicilina (100 mg/L e 100 U/L respectivamente) em placas de 24 poços. Sequencialmente foram incubadas a 37 °C com 5% de CO_2 por 24 h.

Transcorrido este período foi adicionado o látex nas concentrações de 50 a 800 $\mu\text{g/mL}$; fração Hex em 5 a 80 $\mu\text{g/mL}$ e as demais frações CHCl_3 , AcOEt e MeOH com 10 a 150 $\mu\text{g/mL}$. Ao final dos períodos de tratamento cada amostra foi homogeneizada e uma alíquota de 50 μL foi utilizada para determinação da viabilidade celular. A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer utilizando o método de exclusão do azul de Tripán 0,5% em PBS e a viabilidade calculada pelo quociente entre células viáveis e células totais (células viáveis e não viáveis).

4.6.2 Ensaios de citotoxicidade por redução mitocondrial de MTT

Células Jurkat foram semeadas em placas de 24 poços, na concentração de 1×10^5 células/poço em meio de cultura RPMI 1640, 10% de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina (100 mg/L e 100 U/L respectivamente). Para estabilização das culturas as placas foram mantidas em incubadora de CO_2 por 24 h. De forma semelhante às células aderentes, esta avaliação foi feita em 24, 48 e 72 h. Na sequência, adicionaram-se: látex nas concentrações de 50 a 800 $\mu\text{g/mL}$; fração Hex em 5 a 80 $\mu\text{g/mL}$ e as demais frações CHCl_3 , AcOEt e MeOH com 10 a 150 $\mu\text{g/mL}$.

Ao final de cada tempo de análise, transferiu-se o conteúdo celular para tubos de 2 mL, os quais foram centrifugados a 220 g por 5 min. Descartado o

sobrenadante, foi adicionado sobre o precipitado 200 μ L de MTT (0,5 mg/mL). Depois de 30 min na incubadora CO₂ os tubos foram novamente centrifugados, porém a 900 g por 5 min. O sobrenadante foi retirado e os cristais eluídos com 200 a 400 μ L de DMSO. Findada esta etapa, a coloração obtida foi quantificada em leitor de placas a 550 nm.

4.6.3 Quantificação do conteúdo de DNA por difenilalanina (DNA-DPA)

Neste ensaio células Jurkat foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/poço, em meio de cultura RPMI 1640, 10% de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina (100 mg/L e 100 U/L respectivamente), com leitura em 48 h. Depois de 24 h na incubadora de CO₂, acrescentaram-se: látex de 50 a 800 μ g/mL; fração Hex de 5 a 80 μ g/mL; frações CHCl₃, AcOEt e MeOH com diluições de 10 a 150 μ g/mL.

Após 48 h de incubação, as células foram transferidas para tubos de 2 mL, centrifugados por 5 min com velocidade de 220 g. Na sequência o sobrenadante foi descartado e sobre as células adicionaram-se 500 μ L do reagente de DNA-DPA, sendo este obtido pela mistura imediata de 20 mL da solução estoque de DPA (difenilamina em 98% ácido acético, 2% de ácido sulfúrico) em água, 28% de água e 0,35% de acetaldeído 1%. A leitura foi procedida após 24 h de reação, ao abrigo da luz, no comprimento de onda de 578 nm.

4.6.4 Quantificação do conteúdo de DNA por iodeto de propídio

Para a análise de determinação do conteúdo de DNA utilizando iodeto de propídio foram plaqueadas 1×10^5 células/poço em placas de 24 poços em meio de cultura RPMI 1640, 10% de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina (100 mg/L e 100 U/L respectivamente). Após 24 h foi adicionado látex nas concentrações de 50 a 800 μ g/mL; fração Hex de 5 a 80 μ g/mL; frações CHCl₃, AcOEt e MeOH com diluições de 10 a 150 μ g/mL. Após 72 h de incubação, as células foram homogeneizadas, retiradas alíquotas de 50 μ L (correspondentes à densidade celular de 2×10^4) e transferidas para uma placa âmbar de 96 poços. Sobre elas foram adicionados 150 μ L de solução de iodeto de propídio (0,1% de citrato, 0,1% de triton X-100 e 50 μ g/mL de iodeto de propídio). Procedeu-se leitura depois de 24 h de

reação, em leitor de placas, nos comprimentos de onda de 525 nm (excitação) e 617 nm (emissão).

4.6.5 Isolamento de linfócitos humanos e avaliação de citotoxicidade da fração Hex e substâncias isoladas por redução mitocondrial de MTT

Para proceder o isolamento de linfócitos humanos, foi submetido e aprovado o projeto junto ao Comitê de Ética (número 544.847). Amostra de sangue (30 mL) foi coletada em tubos a vácuo contendo anticoagulante (EDTA). Para o isolamento de linfócitos foi utilizado o reagente Histopaque, conforme instruções do fabricante. Resumidamente diluíram-se 15 mL de sangue em igual volume de PBS, o qual foi homogeneizado lentamente. Sobre 7,5 mL de Histopaque foram adicionados 15 mL de sangue previamente diluído. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 500 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, o resíduo celular diluído em 10 mL de PBS e centrifugado a 220 g por 10 min a 4 °C. O sedimento obtido foi novamente lavado com 10 mL de PBS e centrifugado. Ressuspendeu-se o precipitado celular em 20 mL de meio de cultura RPMI 1640, acrescido de 10% de (SFB) e 1% de penicilina e estreptomicina (100 mg/L e 100 U/L respectivamente). Depois de 2 h na incubadora de CO₂, os linfócitos em suspensão foram centrifugados a 220 g por 5 min, resuspensores em 5 mL de meio de cultura e contados em câmara de Neubauer.

Posteriormente à contagem foi plaqueado 8×10^5 células/poço. Aguardou-se 1 h para estabilização celular e na sequência foram adicionadas diluições da fração Hex nas concentrações de 5 a 80 µg/mL.

Em 48 h de análise foi realizada a redução mitocondrial por MTT, conforme descrito no item 4.6.2.

4.6.6 Avaliação morfológica celular por meio do emprego dos corantes alaranjado de acridina e brometo de etídio

A avaliação morfológica foi iniciada com plaqueamento em placas de 24 poços na concentração de 1×10^5 células em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina (100 mg/L e 100 U/L respectivamente). Após 24 h foram adicionadas diluições da fração Hex (2 a 40 µg/mL), vincristina (40 nM) e clorambucil (20 µM). As placas foram mantidas em

incubadora de CO₂ por igual período. Em 24 h de tratamento as células foram homogeneizadas e transferidas para tubos de 2 mL e centrifugadas a 220 g. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com 500 µL de PBS gelado. Na sequência as células foram centrifugadas novamente a 220 g e sobre as células foram adicionados 25 µL de PBS e 2 µL da solução de alaranjado de acridina e brometo de etídio (200 µg/mL).

A coloração foi visualizada em microscópio óptico de fluorescência (filtro com excitação de 480/30 nm e emissão 535/40 nm) e os campos foram registrados com câmera fotográfica.

4.6.7 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Para analisar o ciclo celular por citometria de fluxo, as células Jurkat foram plaqueadas na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/ poço em meio de cultura RPMI 1640, 10% de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina (100 mg/L e 100 U/L respectivamente). Após 24 h para o estabelecimento da cultura celular, foram adicionadas diluições da fração Hex (2, 20 e 40 µg/mL). Em 48 h de incubação, as células foram homogeneizadas, transferidas para tubos de 2 mL e submetidas a centrifugação a 300 g por 7 min. Descartou-se o sobrenadante, a camada celular foi lavada com PBS e centrifugada novamente nas condições já citadas. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 150 µL de PBS e fixadas com 1350 µL de etanol 70%. Antecedendo a leitura, a suspensão celular foi centrifugada e a camada celular ressuspensa em 200 µL da solução de 1,4 µL de Triton X-100 1%, 20 µL de RNase (20 mg/mL), 60 µL de iodeto de propídio (2 mg/mL), 9.918 µL de PBS. Transcorridos 30 min foi procedida a leitura em citômetro de fluxo.

4.7 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS

O látex *in natura* (56,27 g) foi submetido a uma partição líquido-líquido em funil de separação. Para tanto o látex foi solubilizado em água (200 mL) e particionado com Hex, CHCl₃, AcOEt e MeOH (para esta fase a fração aquosa foi resfriada a 5 °C). Foram realizadas cinco extrações consecutivas para cada solvente, utilizado 200 mL em cada etapa extrativa. As quatro frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida a 50 °C. Finalizado este

processo, os resíduos obtidos foram liofilizados e o rendimento de extração calculado. As frações foram mantidas em refrigeração a 0 °C até o momento do uso.

Parte da fração Hex (1,4 g) (Figura 3) foi submetida a separação em coluna cromatográfica (CC) contendo sílica 35-70 mesh (25 g) e cromatografadas empregando os eluentes Hex, CHCl_3 , AcOEt e MeOH. Desta etapa resultaram-se 169 frações (Tabela 1), as quais foram monitoradas em cromatografia em camada delgada, utilizando como revelador luz ultravioleta (UV) e reagente de cor (vanilina sulfúrica, anisaldeído sulfúrico e iodo). Procedeu-se a reunião das subfrações com base na semelhança no fator de retenção (R_f) das manchas observadas.

Tabela 1 - Separação cromatográfica da fração hexânica.

SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA FRAÇÃO HEXÂNICA		
FRAÇÕES	SOLVENTE	VOLUME UTILIZADO (mL)
1-17	Hex	200
18-32	Hex: CHCl_3 90:10	200
33-47	Hex: CHCl_3 80:20	200
48-62	Hex: CHCl_3 70:30	200
63-77	Hex: CHCl_3 60:40	200
78-92	Hex: CHCl_3 50:50	200
93-107	Hex: CHCl_3 40:60	200
108-122	Hex: CHCl_3 30:70	200
123-137	Hex: CHCl_3 20:80	200
138-145	CHCl_3	100
146-153	CHCl_3 : AcOEt 50:50	100
154-161	AcOEt	100
162-169	MeOH	100

A fração 34-81 (101 mg) foi recromatografada empregando-se cromatografia no modo *flash* de eluição, (sílica 230-400 mesh, 6 g) gerando 103 frações (Tabela 2). Estas foram novamente avaliadas quanto ao seu R_f e reunidas. A subfração 16 (2,62 mg) eluída com Hex: CHCl_3 (1:1,v/v) em CCD, apresentou R_f 0,9. Esta fração mostrou-se como mancha única de coloração arroxeada e foi encaminhada para análise por RMN.

Tabela 2 - Separação cromatográfica da fração 34-81.

SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA FRAÇÃO 34-81		
FRAÇÕES	SOLVENTE	VOLUME UTILIZADO (mL)
1-8	Hex	20
9-24	Hex: CHCl ₃ 50:50	50
25-57	CHCl ₃	100
58-74	CHCl ₃ : AcOEt 50:50	50
75-85	AcOEt	30
86-95	AcOEt: MeOH 50:50	30
96-103	MeOH	20

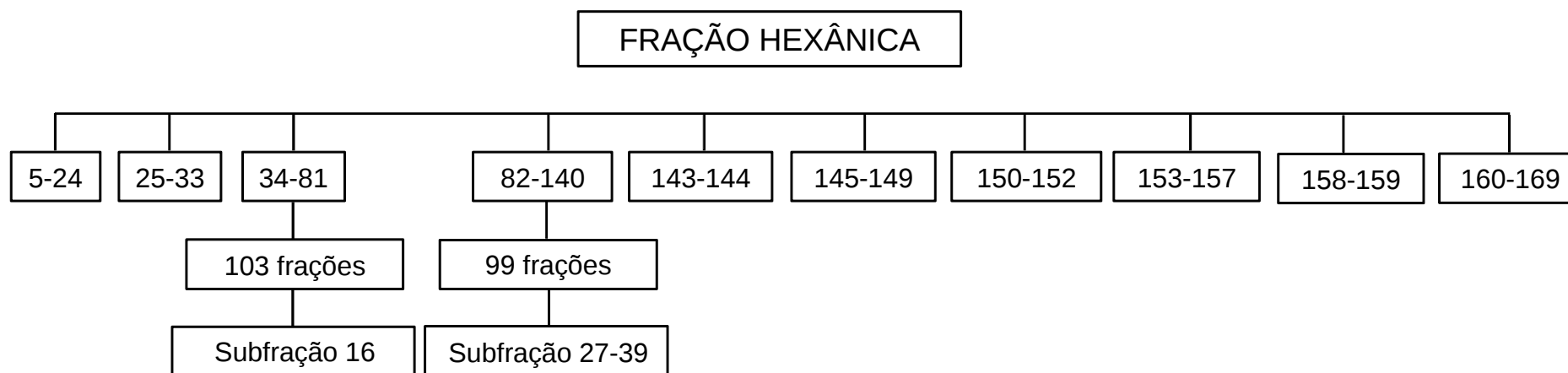
No mesmo sentido, a fração 82-140 (692 mg) foi recromatografada em coluna cromatográfica em modo *flash* de eluição (230-400 mesh, 17 g), gerando 99 frações (Tabela 3). Estas foram novamente avaliadas por CDD e reunidas de acordo com a semelhança de R_f . A subfração 27-39 (10,92 mg) eluída com CHCl₃ em CCD apresentou R_f 0,8, se mostrou como mancha única de coloração arroxeada e foi encaminhada para análise por RMN.

Tabela 3 - Separação cromatográfica da fração 82-140.

SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA FRAÇÃO 82-140		
FRAÇÕES	SOLVENTE	VOLUME UTILIZADO (mL)
1-4	Hex	50
5-9	Hex: CHCl ₃ 50:50	50
10-18	CHCl ₃	100
19-32	CHCl ₃ : AcOEt 50:50	100
33-59	AcOEt	100
60-79	AcOEt: MeOH 50:50	100
80-99	MeOH	100

As estruturas químicas destas substâncias foram elucidadas através da análise dos dados de RMN de ¹³C, HSQC, HMBC, Dept e ¹H e comparadas com dados da literatura.

Figura 3 - Separação cromatográfica da fração hexânica.



4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados normalizados foram analisados pelo programa estatístico *Graph Pad Prism* versão 5 e expressos em erro padrão da média. Optou-se por utilizar o teste de variância ANOVA de uma via, submetidos ao pós teste de Tukey. Foram considerados $P < 0,05$; $P < 0,01$ e $P < 0,001$; com significância de 95%, 99% e 99,9% respectivamente.

A citotoxicidade foi expressa como a concentração da amostra que induziu morte celular de cerca de 50% das células (IC_{50}) e foi calculada por regressão de Probit, método de Finney utilizando o Software estatístico *StatPlus* versão 5.8.4.

O índice de seletividade foi calculado através do quociente do IC_{50} obtido para linfócitos sobre o IC_{50} das células Jurkat tratadas com diluições da fração Hex.

MORFOANATOMIA

5 MORFOANATOMIA

5.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação morfoanatômica, além de proporcionar a correta identificação de uma espécie vegetal, caracteriza os aspectos macro e microscópicos e norteia as análises de controle de qualidade e autenticidade vegetal (YOUSSEF *et al.*, 2013; FARIAS, 2010).

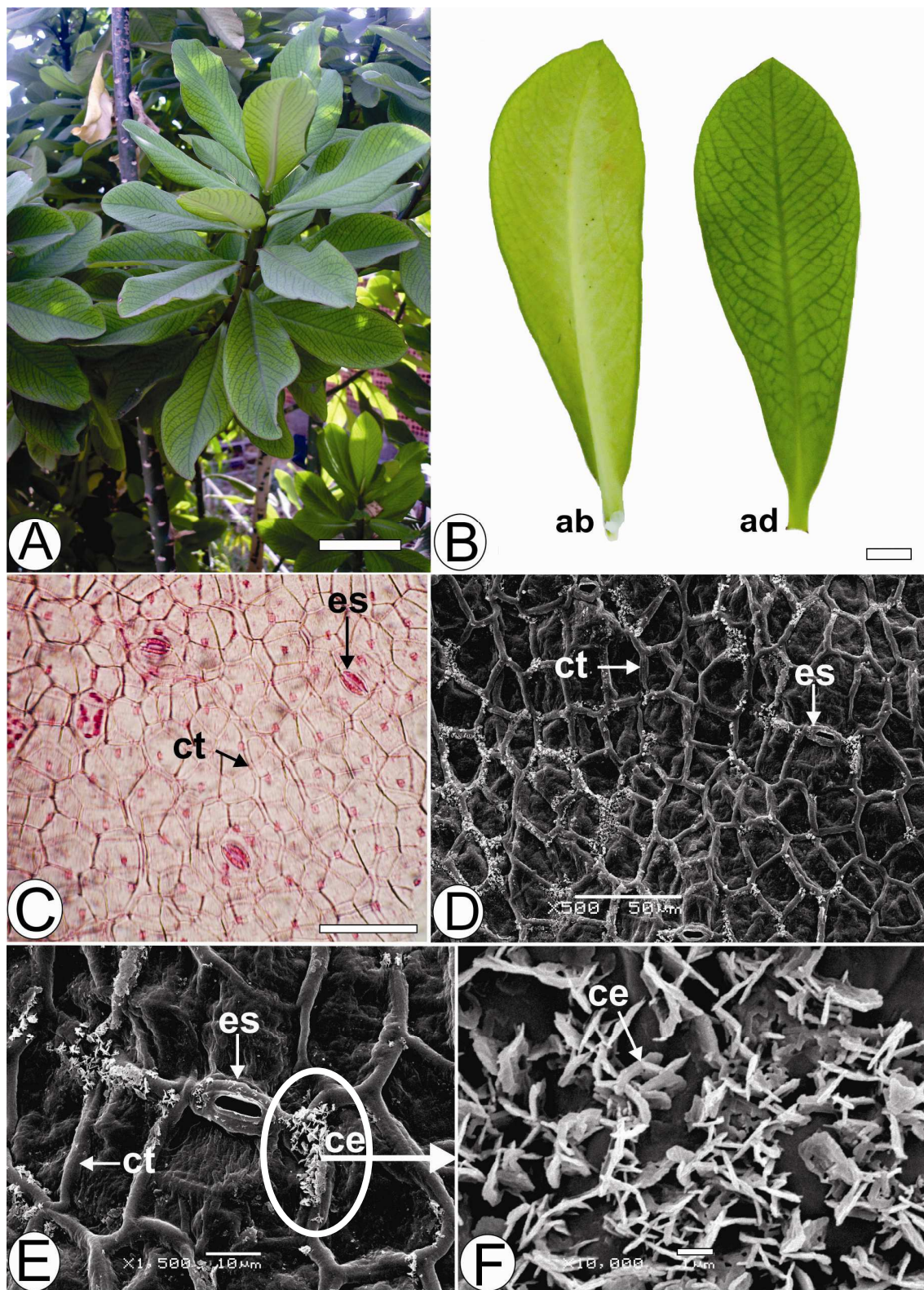
A literatura relata informações contraditórias envolvendo *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, *Synadenium grantii* Hook e *Synadenium umbellatum* Pax. Algumas referências consideram *S. umbellatum* sinônimo de *E. umbellata*, porém distinta de *S. grantii* (TRÓPICOS, 2014). Porém outras fontes de referência afirmam que as espécies mencionadas tratam-se da mesma espécie e que tem como nomenclatura aceita apenas *E. umbellata* (THE PLANT LIST, 2014).

A fim de esclarecer e dirimir esta dúvida foram coletadas amostras de *S. umbellatum* e *S. grantii* para uma avaliação morfoanatômica comparativa de ambas as espécies.

Os resultados mostram que *S. umbellatum* e *S. grantii* se referem à mesma espécie, pois não foram verificadas diferenças morfoanatômicas entre elas, conforme as descrições das características farmacobotânicas apresentadas a seguir e de forma conjunta para as duas espécies avaliadas.

Macroscopicamente, as folhas de *E. umbellata* (Figura 4A) são verdes, mais claras na face abaxial e medem aproximadamente 12,4 cm de comprimento e 4,7 cm de largura. Elas são simples, pecioladas e peninervadas, exibindo forma de espatulada a lanceolada, ápice obtuso, base atenuada e margem inteira (Figura 4B). A filotaxia revela organização alternada (Figura 4A).

Figura 4 - *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) - Aspectos macro e microscópicos da folha.



(A) Aspecto dos órgãos vegetativos aéreos. (B) Aspecto geral das folhas. (C-E) Epiderme em vista frontal. (C) Face adaxial, mostrando paredes anticlinais retas, cutícula e estômatos. (D) Face adaxial, apresentando cutícula e estômatos (MEV). (E) Detalhe da figura anterior, mostrando cutícula, estômatos e cera epicuticular (MEV). (F) Detalhe da cera epicuticular (MEV). ab: face abaxial; ad: face adaxial; ce: cera epicuticular; ct: cutícula; es: estômatos. Barra = 4 cm (A); 1 cm (B); 50 µm (C).

O sistema de revestimento do vegetal em crescimento primário é representado pela epiderme que, comumente, é formada por uma camada compacta de células e coberta por cutícula e cera epicuticular. A epiderme pode ser diferenciada pela forma de suas células, presença e tipo de estômatos, disposição e tipo de tricomas, além da ocorrência de células especializadas (ESAÚ, 1974).

A epiderme de *E. umbellata* é uniestratificada em ambas as faces e, em vista frontal, as células epidérmicas apresentam paredes anticlinais finas e retas na face adaxial (Figura 4C) e levemente ondeadas na face abaxial (Figura 5A). A epiderme é coberta por cutícula delgada e cera epicuticular. A cutícula não é contínua, apresentando-se em faixas sobre a epiderme (Figuras 4C, 4D, 4E, 5B e 5C). A cera epicuticular é do tipo cristalóide em forma de rosetas (Figuras 4E e 4F).

Em espécies de *Jatropha* (Euphorbiaceae), também pode ser evidenciada epiderme com cutícula estriada e cera epicuticular, porém se verifica que a cera epicuticular está disposta na forma de partículas e flocos (OLWOKUDEJO, 1993).

Os estômatos são largamente distribuídos nas partes aéreas das plantas, principalmente em folhas e caules jovens. A característica do estômato em vista frontal tem caráter diagnóstico para as espécies vegetais (ESAÚ, 1974). De acordo com Metcalfe e Chalk (1957), espécies europeias de *Euphorbia* apresentam predominantemente estômatos anomocíticos. Estômatos anisocíticos e anomocíticos foram observados em *Euphorbia helioscopi* L. e *Euphorbia myrsinites* L. (GALES; TOMA, 2006).

Em *E. umbellata*, os estômatos (Figuras 4C, 4D, 4E e 5C) paracíticos estão presentes no mesmo nível das demais células epidérmicas (Figura 5G) e em ambas as faces, caracterizando a folha como anfiestomática. Estômatos similares foram verificados em *Euphorbia virgata* Waldst. & Kit., porém apenas na face abaxial (GALES; TOMA, 2006). Em se tratando da disposição dos estômatos, folhas anfiestomáticas foram observadas em *Euphorbia nicaeensis* subsp. *glareosa* Pall. ex M.Bieb. (LUKOVIC' *et al.*, 2009), *E. amygdaloides* L., *E. cyparissias* L., *E. taurinensis* All., *E. falcata* subsp. *acuminata* Simonk., *E. bazargica* Prodán e *E. carniolica* Jacq. (GALES; TOMA, 2006).

Tricomas são estruturas formadas a partir de células epidérmicas e adaptadas para diversas funções, podendo ocorrer em todas as partes do vegetal (CUTTER, 1986). Nas folhas podem ser encontrados tricomas glandulares e tectores, papilas, escamas e acúleos (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

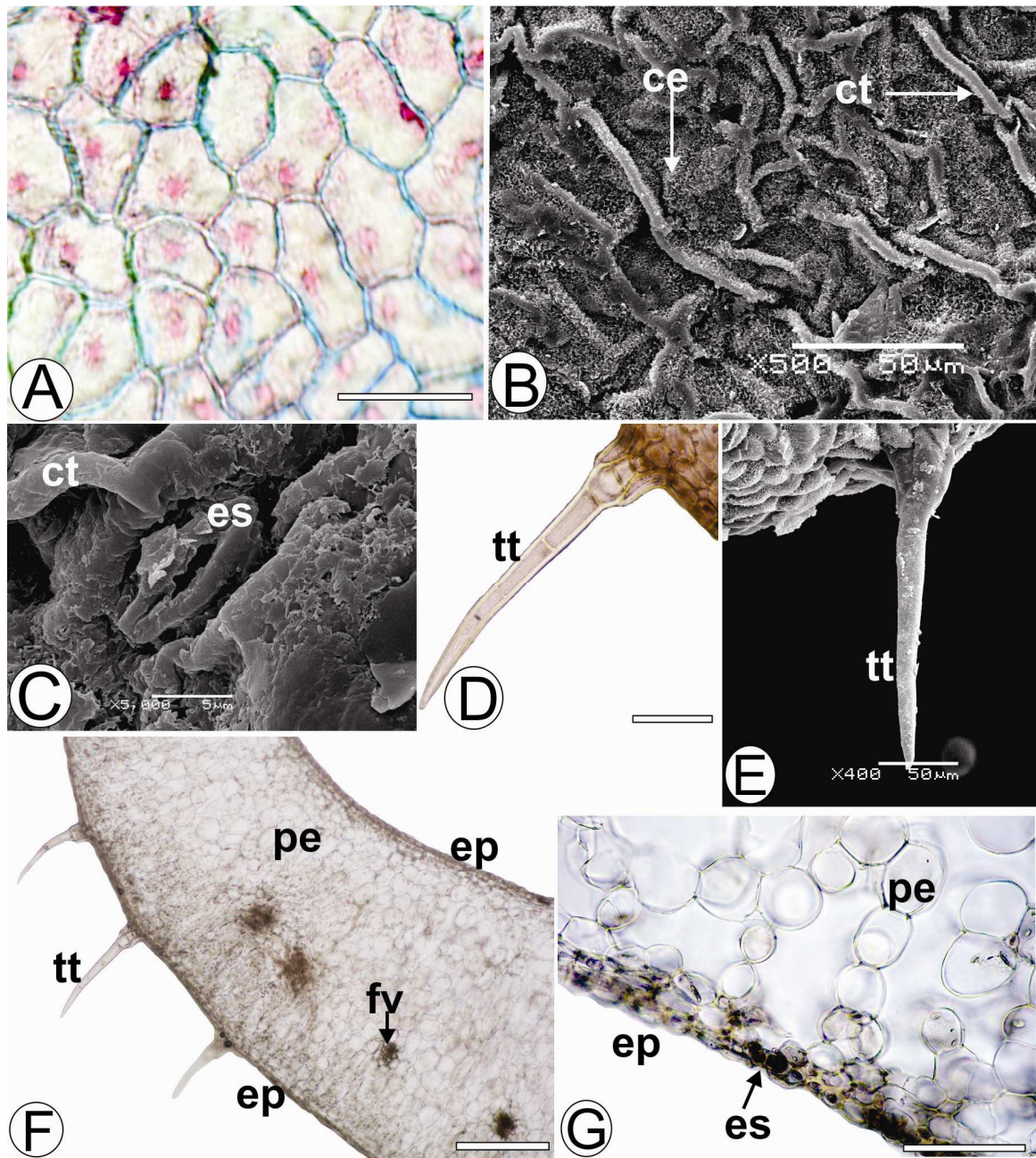
A presença de tricomas não é uma característica comum nas espécies de *Euphorbia*. Dentre as espécies já estudadas a maioria apresentou-se glabra. Apenas *Euphorbia agraria* M. Bieb. apresentou tricomas unicelulares, enquanto *E. maculata* L., *E. amygdaloides* e *E. esula* (Pers.) Dumort. evidenciaram tricomas pluricelulares e unisseriados em trabalho de Gales e Toma (2006).

Na espécie em estudo, tricomas tectores pluricelulares e unisseriados ocorrem individualmente (Figuras 5D, 5E e 5F). Eles são constituídos por cerca de 5 células, as quais mostram paredes lignificadas que reagiram à presença de floroglucina clorídrica nos testes microquímicos (Figura 5D).

O mesofilo corresponde à maior parte do parênquima fundamental do limbo foliar caracterizado pela abundância de cloroplastos e por espaços intercelulares, podendo ser relativamente homogêneo ou diferenciado em parênquima paliçádico e esponjoso (ESAÚ, 1974).

Muitos membros de *Euphorbia* apresentam mesofilo isobilateral (LUKOVIC´ *et al.*, 2009; GALES; TOMA 2006). Entretanto, *E. umbellata* apresenta mesofilo homogêneo com diversas camadas de parênquima esponjoso (Figura 5F, 5G). Feixes vasculares colaterais são envoltos por bainha parenquimática e estão localizados no terço inferior da lâmina (Figura 5F).

Figura 5 - *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) - Estrutura e anexos da epiderme da folha.



(A) Epiderme da face adaxial, em vista frontal, mostrando parede anticlinal. (B) Epiderme da face abaxial, em vista frontal, exibindo cutícula e cera epicuticular. (C) Epiderme da face abaxial, em vista frontal, apresentando cutícula e estômatos. (D) Tricoma tector. (E) Tricoma tector (MEV). (F) Limbo foliar, em secção transversal, revelando mesofilo homogêneo, epiderme e tricomas tectores. (G) Detalhe da figura anterior, mostrando estômatos, epiderme e parênquima esponjoso. ce: cera epicuticular; ct: cutícula; ep: epiderme; es: estômato; fv: feixe vascular; pe: parênquima esponjoso; tt: tricoma tector. Barra = 25 μ m (A, G); 50 μ m (D); 200 μ m (F).

Lukovic e colaboradores (2009) descreveram a nervura central de espécies do gênero *Euphorbia* como contendo um único feixe vascular de tamanho inconstante, enquanto Gales e Toma (2006) encontraram o feixe vascular em arco aberto para as espécies *E. plathyphyllos* L. e *E. agraria* M. Bieb. No estudo em

questão, *E. umbellata*, apresentou formato plano-convexo em secção transversal (Figura 6A) e vários feixes vasculares colaterais livres (Figuras 6B e 6D) no parênquima fundamental.

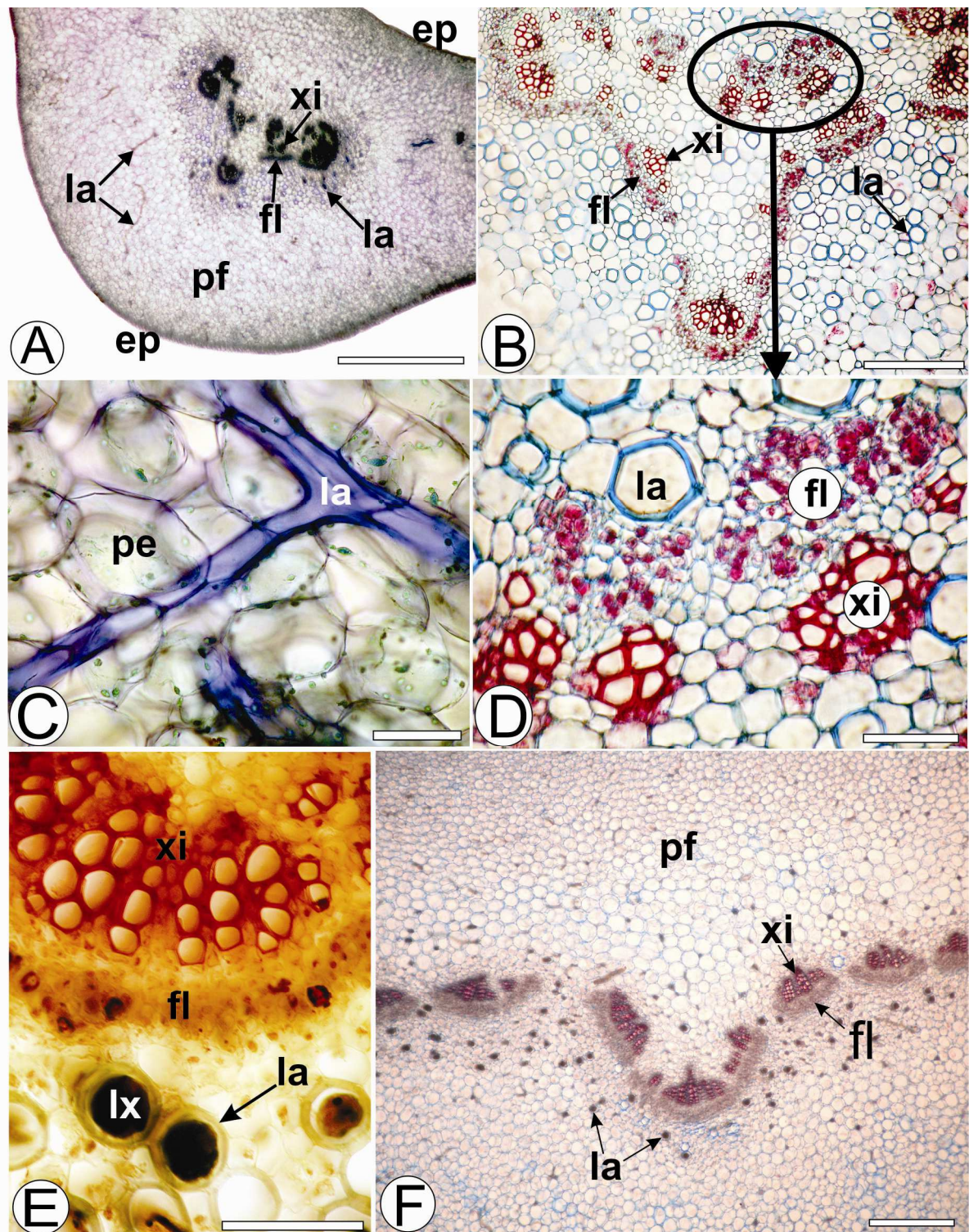
De acordo Esaú (1974); Hagel e colaboradores (2008), Euphorbiaceae e *Euphorbia* apresentam tubos laticíferos não articulados, ramificados e não anastomosados. Estes podem estar localizados não só na medula e no córtex primário, como também próximo do feixe vascular da folha e no mesofilo de plantas adultas (METCALF; CHALK, 1957).

Nas folhas de *E. umbellata*, os tubos laticíferos (Figura 6C) são não articulados, ramificados e não anastomosados. Adicionalmente eles mostram parede espessa e forma poligonal em secção transversal (Figura 7B, 7D e 7E). Esta é uma característica marcante de Euphorbiaceae, porém não exclusiva. Autores já demonstraram sua ocorrência em alguns gêneros de Asteraceae, Moraceae (HAGEL *et al.*, 2008; HAO; WU, 2000; ESAÚ, 1974) e Campanulaceae (FOLQUITO *et al.*, 2014).

Características similares foram encontradas em *E. virgata* Waldst. & Kit., entretanto, os laticíferos apresentaram paredes finas e similaridade com dutos secretores (GALES; TOMA, 2007). Nesse estudo, o látex que é encontrado nos tubos laticíferos é responsável pela atividade antitumoral apresentada e reagiu positivamente com azul de metileno para pesquisa de mucilagens (Figura 6C) e com Sudam III para compostos lipofílicos (Figura 8A).

O pecíolo, em secção transversal, apresenta formato plano-convexo. O sistema vascular é formado por feixes vasculares colaterais livres dispersos no parênquima fundamental. Tubos laticíferos, similares aos anteriormente descritos, foram encontrados próximos aos feixes vasculares e em maior número próximos ao sistema floemático (Figura 6F).

Figura 6 - *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) - Secção transversal da nervura central e pecíolo.



(A) Secção transversal da nervura central, mostrando epiderme, sistema vascular e tubos laticíferos. (B) Nervura central, indicando sistema vascular e tubos laticíferos. (C) Detalhe dos tubos laticíferos. (D) Detalhe do sistema vascular e tubos laticíferos da nervura central. (E) Nervura central mostrando sistema vascular, tubos laticíferos e látex em reação com floroglucina clorídrica. (F) Pecíolo em secção transversal, mostrando os feixes vasculares no parênquima fundamental. ep: epiderme; la: tubos laticíferos; fl: floema; lx: látex; pf: parênquima fundamental; xi: xilema. Barra = 50 μ m (C, D, E); 100 μ m (B); 200 μ m (A, F).

Em várias espécies de *Euphorbia*, as células epidérmicas do caule têm paredes anticlinais espessadas e cobertas por cutícula de espessura variável (GALES; TOMA, 2006). *Euphorbia umbellata*, em secção transversal, mostra formato circular (Figura 7A), epiderme unisseriada (Figura 7B), cutícula delgada e ligeiramente estriada e com reação positiva para compostos lipofílicos (Figura 8A). Estômatos (Figura 7C) são encontrados no mesmo nível ou ligeiramente abaixo das demais células epidérmicas.

Com referência aos tricomas, o caule de algumas espécies de *Euphorbia* são pubescentes. Gales e Toma (2006) encontraram tricomas unicelulares em *E. helioscopia* L., *E. amygdaloides* L., *E. agraria* M. Bieb., e *E. glareosa* Pall. ex M. Bieb.; pluricelulares e unisseriados em *E. maculata* L. Neste estudo, tricomas não foram evidenciados no caule.

A maioria de *Euphorbia* analisadas por Gales e Toma (2006) apresentou número variável de camadas de colênquima dispostos tangencialmente abaixo da epiderme e em *E. plathyphyllos* e *E. helioscopia*, o cortex é formado por colênquima angular. Na espécie em estudo foram observados vários estratos de parênquima cortical (Figuras 7B e 7D). Esse tecido é formado por células que apresentam pequenos meatos e contém grãos de amido (Figuras 8C, 8D, 8E e 8F). O colênquima não foi observado na espécie avaliada

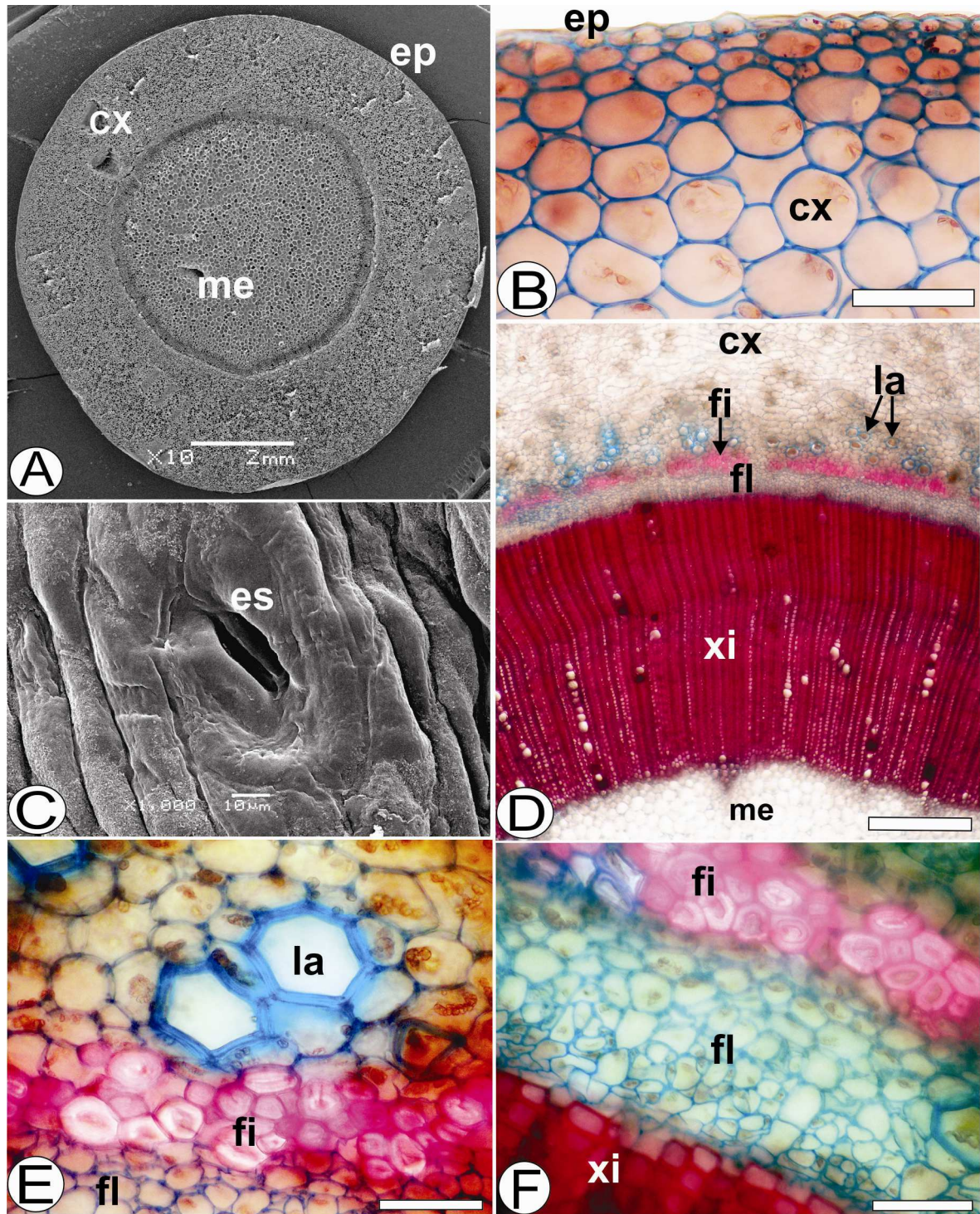
Em *E. umbellata*, o sistema vascular é típico, formado por floema externo e xilema interno (Figura 7D e 7F). Fibras perivasculares são visualizadas opostas ao floema (Figuras 7D, 7E e 7F). Xilema e fibras reagiram positivamente com floroglucina clorídrica (Figura 8G) e o xilema apresentou reação positiva com cloreto férrico (Figura 8B) nos testes microquímicos. Fibras perivasculares são comuns em *Euphorbia*, entretanto, não foram observadas em *E. myrsinites* subsp. *litardierei* Font Quer & Garcias Font, *E. myrsinites* subsp. *myrsinites* L. e *E. dobrogensis* Prodán em estudo de Gales e Toma (2006).

Laticíferos similares aos encontrados nas folhas de *E. umbellata* são frequentemente observados próximos ao floema no caule desta espécie. O látex presente nos laticíferos reagiu positivamente à pesquisa com cloreto férrico (Figura 6B), confirmando a presença de compostos fenólicos. A fim de confirmar a presença de compostos nitrogenados no látex, secções transversais de caules foram expostas ao reativo de Bouchardat, com controle negativo e positivo para efeito comparativo

(Figura 8C e 8D respectivamente); conferindo resultado positivo para os compostos avaliados.

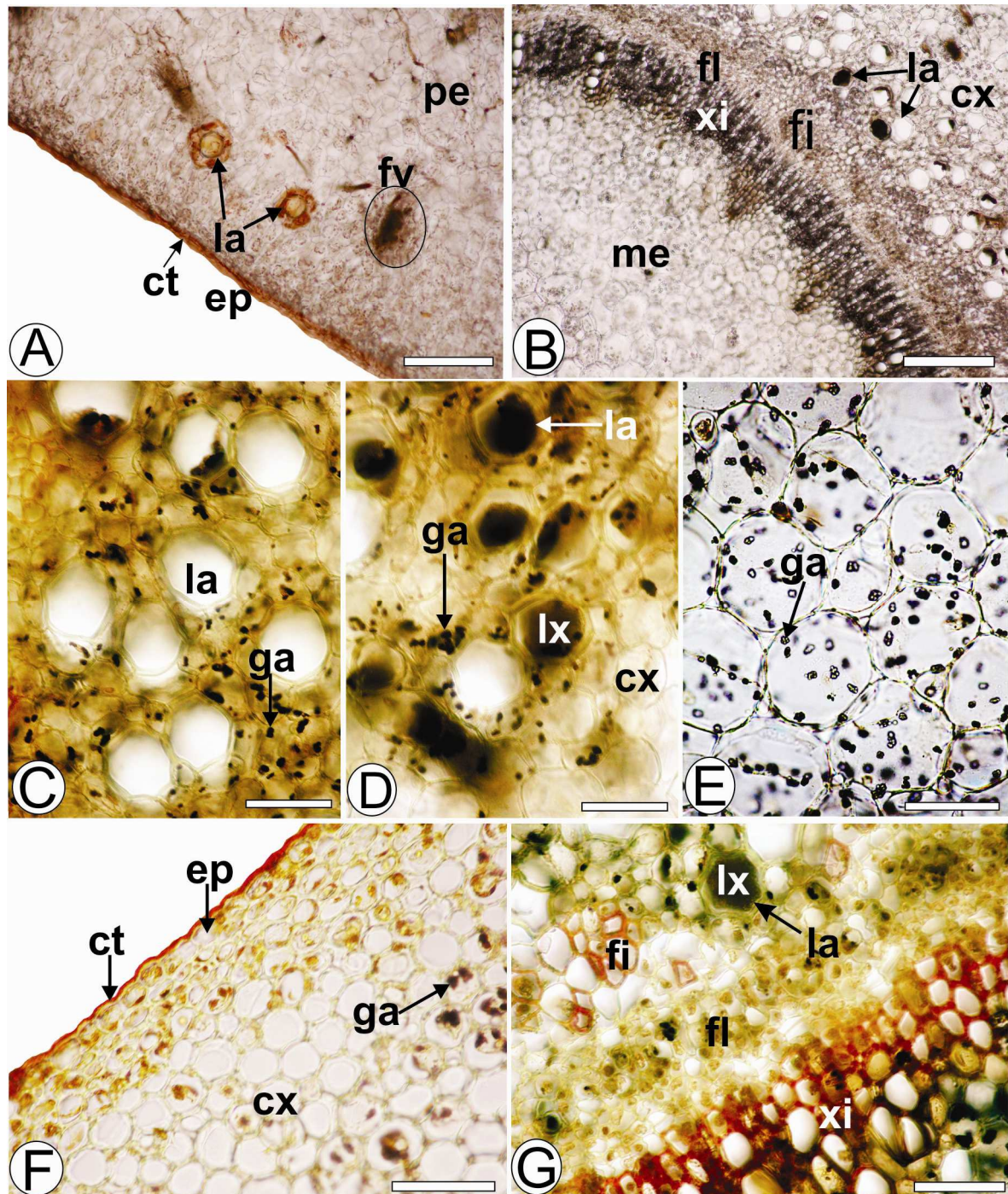
Muitas *Euphorbia*, a exemplo de *E. glareosa*, *E. myrsinites* subsp. *litardierei*, *E. myrsinites* subsp. *myrsinites* e *E. cyparissias* mostraram medula com numerosas apresentou-se relativamente compacta. Neste estudo, a medula é compacta, formada por células parenquimáticas de parede celular delgada (Figuras 7A e 7B), apresentando grãos de amido (Figura 8E).

Figura 7 - *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) - Secção transversal do caule.



(A) Aspecto geral do caule (MEV). (B) Epiderme e Córtex. (C) Estômatos em vista frontal (MEV). (D) Secção transversal, mostrando córtex, tubos laticíferos, fibras, floema, xilema e medula. (E) Detalhe das fibras e tubos laticíferos. (F) Sistema vascular e fibras. cx: córtex; ep: epiderme; es: estômato; fi: fibra; fl: floema; la: tubos laticíferos; me: medula; xi: xilema. Barra = 50 μ m (B, E, F); 200 μ m (D).

Figura 8 - *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) - Testes microquímicos.



(A) Lâmina foliar mostrando látex e cutícula em reação com Sudam III. (B) Caule indicando xilema e látex em reação com cloreto férrico. (C) Caule em reação com Bouchardat, pesquisa negativa, exibindo os tubos laticíferos. (D) Caule em reação com Bouchardat exibindo o látex nos tubos laticíferos. (E) Grãos de amido reagidos com lugol na medula. (F) Caule mostrando cutícula em reação com Sudam III. (G) Caule exibindo fibras e xilema em reação com floroglucina clorídrica. ct: cutícula; cx: córtex; ep: epiderme; fi: fibra; fl: floema; fv: feixe vascular; ga: grãos de amido; la: tubo laticífero; lx: látex; me: medula; pe: parênquima esponjoso; xi: xilema. Barra = 50 μ m (A, C, D, E, F); 200 μ m (B).

ENSAIOS BIOLÓGICOS

6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

6.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1.1 Células aderentes

6.1.1.1 Ensaios de citotoxicidade por redução mitocondrial de MTT

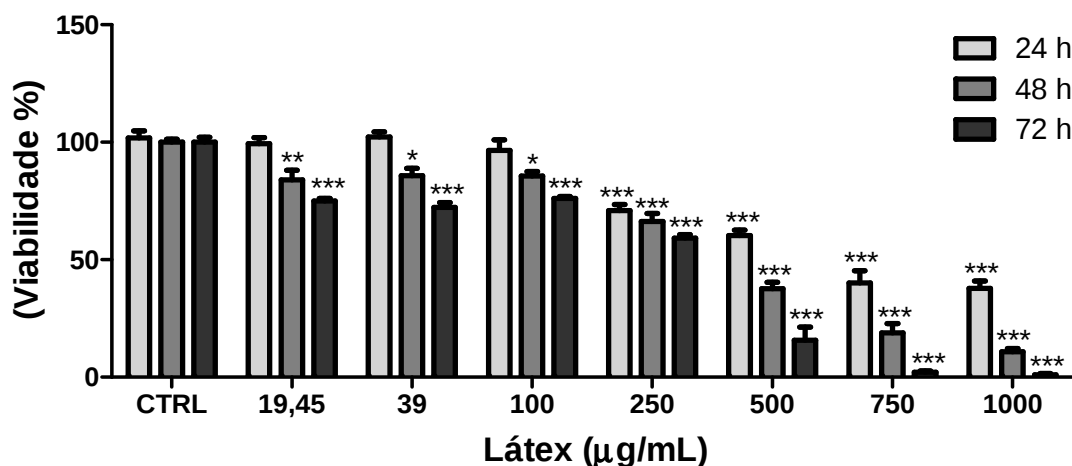
Análise de MTT é um método de avaliação de citotoxicidade muito empregado para quantificar a toxicidade celular de diferentes substâncias testes (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). O princípio desta técnica de quantificação da citotoxicidade é descrito por autores como sendo obtida por redução mitocondrial do reagente de MTT em que a mensuração ocorre pela formação da coloração violeta, originada após a solubilização dos cristais de *Formazan* (WANG *et al.*, 2011). Ressaltando que a intensidade dos cristais formados está diretamente relacionada a maior viabilidade celular (STOCKERT *et al.*, 2012).

Na figura 9 está demonstrado a responsividade das células HeLa ao tratamento com o látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. Os resultados revelam a citotoxicidade deste fitocomplexo nas diferentes concentrações avaliadas (19,45 a 1000 µg/mL), visualizados nos diferentes tempos de exposição.

Pode-se observar que a sensibilidade destas células para o látex se mostrou dose e tempo dependentes. Em 24 h de análise é possível verificar diferença significativa de toxicidade para as concentrações de 250 a 1000 µg/mL. Ao passo que para as demais diluições não foram constatadas perda de viabilidade.

Entretanto, nota-se que o aumento do tempo de incubação do látex com as células HeLa, resulta em redução de viabilidade, desde a menor concentração. Constata-se nos períodos sequenciais de 48 e 72 h, um acréscimo de toxicidade para as concentrações de 19,45 a 100 µg/mL, revelando diferenças estatísticas quando comparadas ao controle negativo; bem como a intensa redução mitocondrial das células HeLa quando incubadas com 500 a 1000 µg/mL de látex.

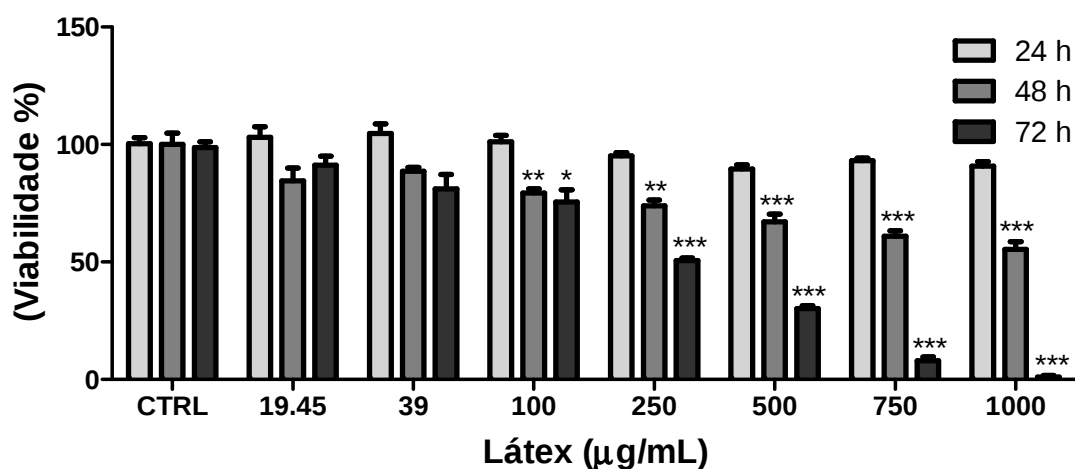
Figura 9 - Citotoxicidade do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns por redução do MTT para células HeLa em 24, 48 e 72 h.



A viabilidade foi avaliada pelo ensaio redução do MTT, conforme descrito no item 4.5.1. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Após a normalização dos resultados que foram expressos em média e erro padrão da média, procedeu-se a análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey e as diferenças estatísticas estão demonstradas com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

O estudo da toxicidade do látex para as células HRT-18, avaliada pelo ensaio de redução mitocondrial, MTT, demonstrou maior resistência destas células a matriz vegetal. Fato observado pela ausência de citotoxicidade do látex nas primeiras 24 h (Figura 10). Somente a partir de 48 h de incubação foi possível identificar redução na viabilidade celular nas concentrações de 100 a 1000 µg/mL. No último período analisado (72 h) o látex apresentou-se efetivamente tóxico, com perfil semelhante ao observado para as células HeLa, para a diluição de 1000 µg/mL.

Figura 10 - Citotoxicidade do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns por redução do MTT para células HRT-18 em 24, 48 e 72 h.



A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT, conforme descrito no item 4.5.1. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Após a normalização dos resultados que foram expressos em média e erro padrão da média, procedeu-se a análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey e as diferenças estatísticas estão demonstradas com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

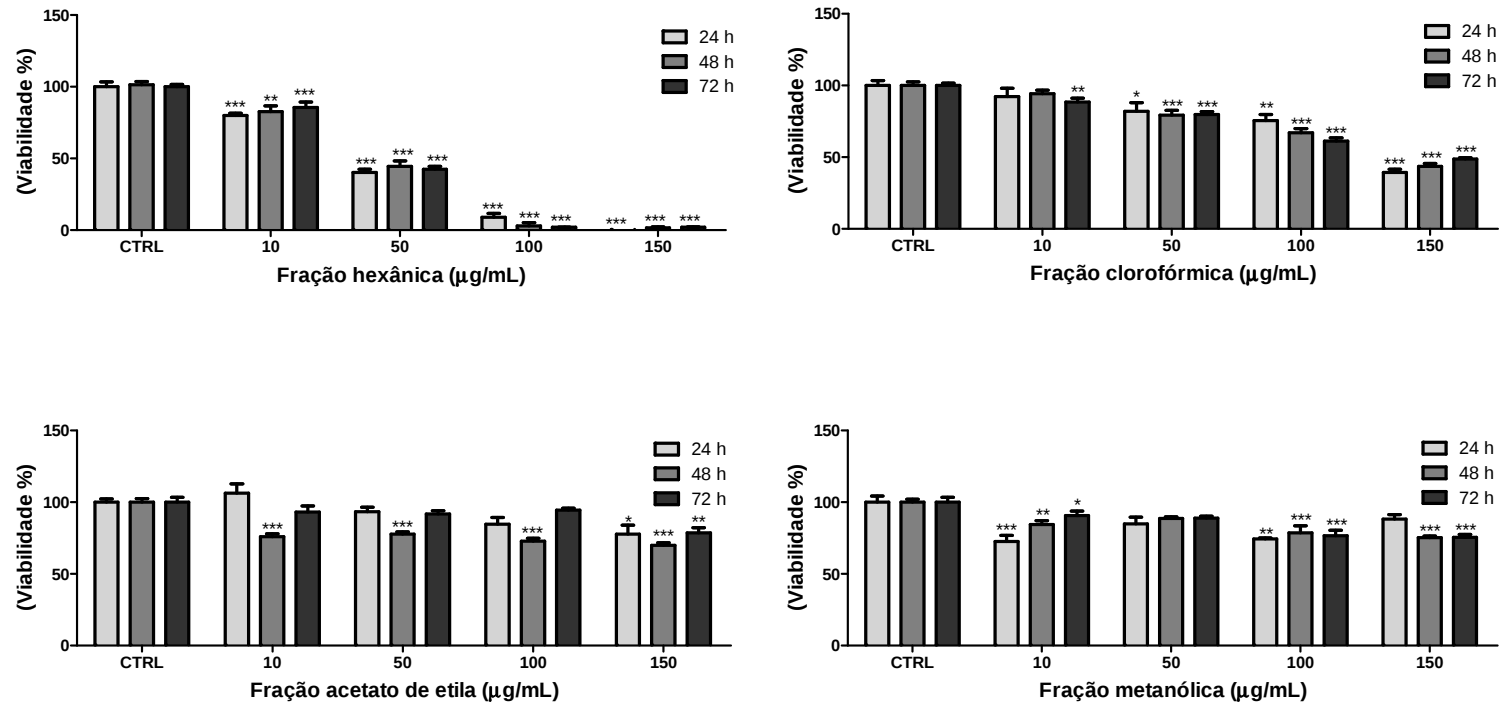
As frações obtidas por particionamento do látex de *E. umbellata* permitiu realizar o estudo biomonitorado na tentativa de encontrar aquela com melhor potencial citotóxico. Na figura 11 os resultados revelam maior toxicidade para as frações Hex e CHCl_3 e menor efeito para as frações AcOEt e MeOH. Dentre as apolares, as células HeLa foram mais sensíveis a fração Hex, seguida pela CHCl_3 .

Com 24 h de exposição às frações o efeito é mais pronunciado para a fração Hex, sendo que para as concentrações de 100 a 150 µg/mL, a viabilidade mitocondrial variou 9,02%. Para a maior concentração empregada, a fração CHCl_3 gerou como resposta uma viabilidade compreendida entre 39,49 e 48,71%. As demais frações mesmo apresentando diferenças significativas de viabilidade em comparação ao grupo controle, a redução é inferior às apolares. O valor percentual encontrado para a fração AcOEt foi na ordem de 106,2 a 69,78% e a fração MeOH, de 90,54 a 72,55%; ambas nos três períodos de análises.

Ao contrário das respostas apresentadas pelas células HeLa e HRT-18 frente ao látex, em que as células de adenocarcinoma de cérvix (HeLa) foram mais responsivas; após incubação com as frações as células HRT-18 responderam melhor tanto para fração Hex quanto para a CHCl_3 (Figura 12). Porém mantiveram comportamento similar para as frações polares (Figura 12).

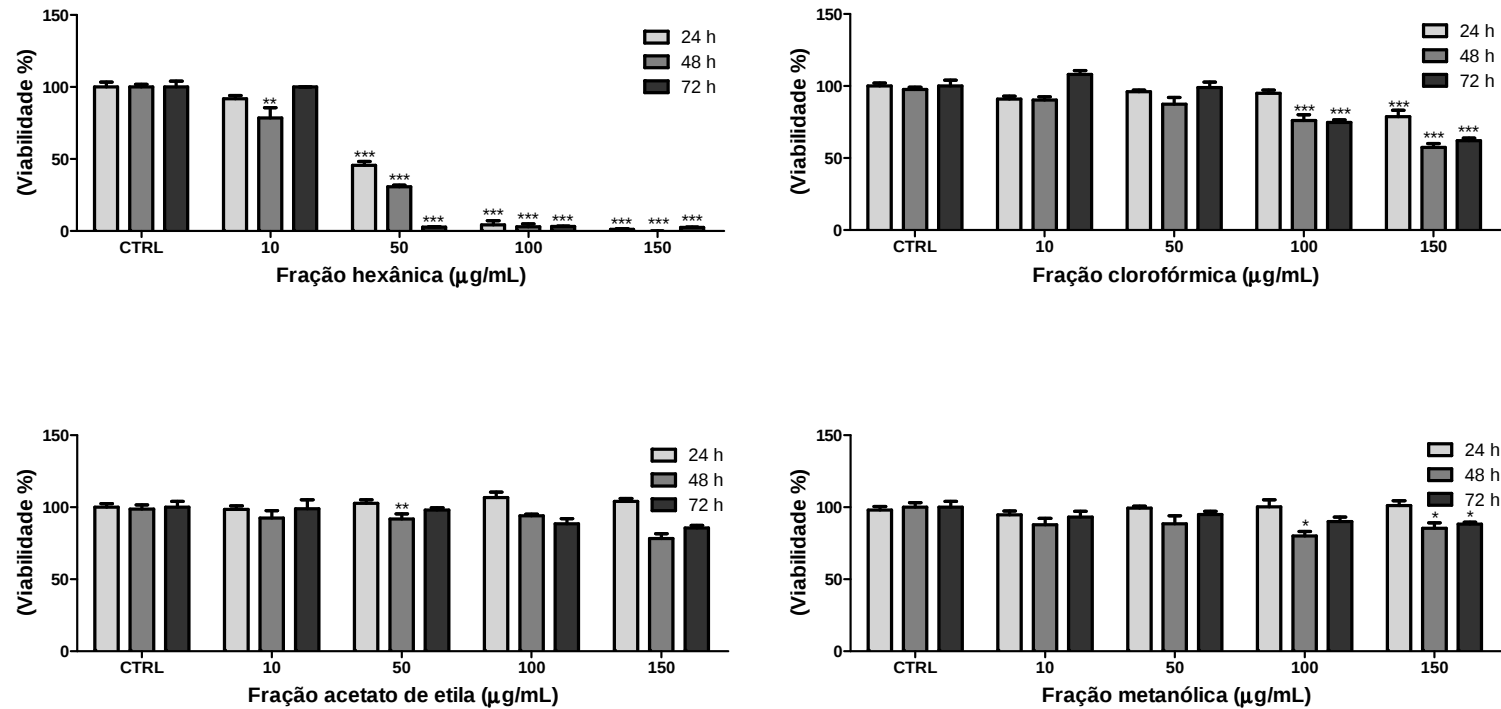
Após 24 h de incubação das células HRT-18 com a fração Hex, foi evidenciada variação de viabilidade de aproximadamente 0,62% entre as concentrações de 100 a 150 µg/mL. Ainda sobre esta última concentração, porém em relação a fração CHCl₃, a viabilidade observada foi de 78,86%, 57,47% e 62,01% para 24, 48 e 72 h respectivamente.

Figura 11 - Citotoxicidade das frações Hex, CHCl₃, AcOEt, MeOH por redução do MTT para células HeLa em 24, 48 e 72 h.



A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT, conforme descrito no item 4.5.1. O controle utilizado consistiu na cultura de células tratadas com as frações Hex, CHCl₃, AcOEt e MeOH com o veículo de solubilização das frações (DMSO < 0,5%). Após a normalização dos resultados que foram expressos em média e erro padrão da média, procedeu-se a análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey e as diferenças estatísticas estão demonstradas com significância de *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

Figura 12 - Citotoxicidade das frações Hex, CHCl₃, AcOEt, MeOH por redução do MTT para células HRT-18 em 24, 48 e 72 h.



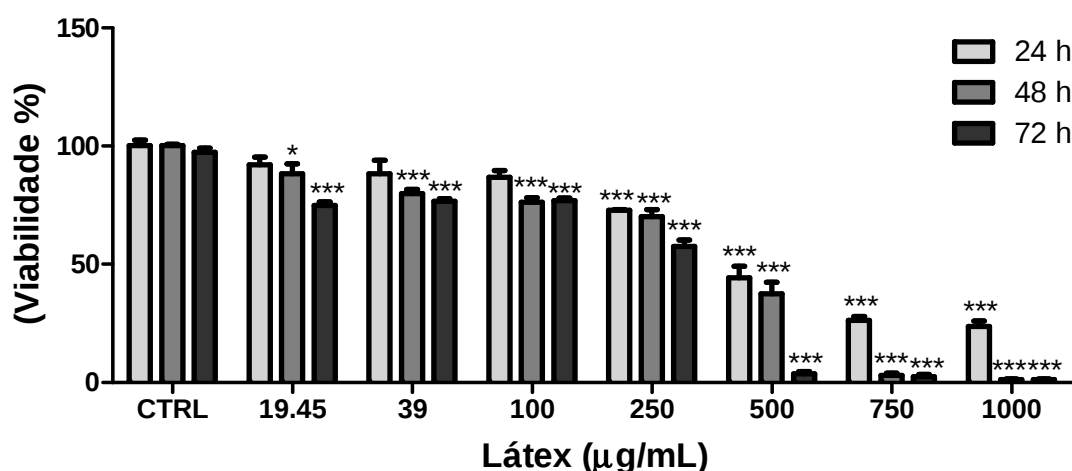
A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT, conforme descrito no item 4.5.1. O controle utilizado consistiu na cultura de células tratadas com as frações Hex, CHCl₃, AcOEt e MeOH com o veículo de solubilização das frações (DMSO < 0,5%). Após a normalização dos resultados que foram expressos em média e erro padrão da média, procedeu-se a análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey e as diferenças estatísticas estão demonstradas com significância de *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

6.1.1.2 Ensaio de citotoxicidade por internalização lisossomal de vermelho neutro (VN)

A técnica de VN também é um método de avaliação de citotoxicidade *in vitro* para diversos compostos (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Sua ação consiste na capacidade de internalização do corante em organelas lisossomais de células viáveis, resultando na formação de grânulos, os quais são posteriormente lisados para a quantificação colorimétrica (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Os resultados dos ensaios de MTT e VN são confirmatórios, pois avaliam a citotoxicidade por organelas distintas. Enquanto o primeiro ensaio age em mitocôndrias, o segundo tem ação sobre os lisossomos (NOGUEIRA *et al.*, 2011). Consequentemente, compostos testados podem gerar respostas divergentes quanto as diferentes análises de citotoxicidade, sendo recomendado portanto a utilização de mais de uma metodologia (IVANOVA; UHLIG, 2008).

Figura 13 - Citotoxicidade do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns por internalização do VN para células HeLa em 24, 48 e 72 h.

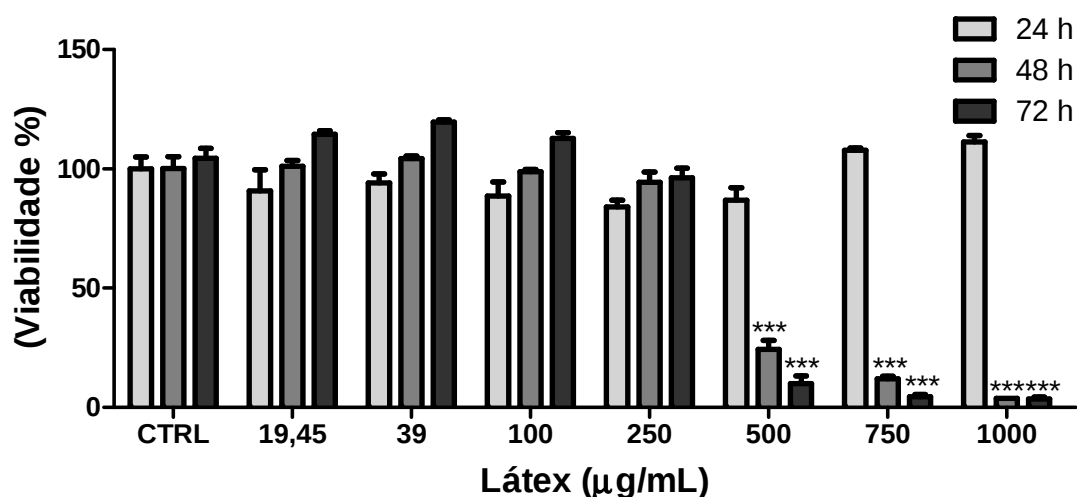


A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de internalização do VN, conforme descrito no item 4.5.2. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Após a normalização dos resultados que foram expressos em média e erro padrão da média, procedeu-se a análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey e as diferenças estatísticas estão demonstradas com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

De forma semelhante aos resultados para MTT, as análises de VN possibilitaram a confirmação da toxicidade para HeLa (Figura 13). Os resultados reforçam a informação de que é necessário ter maior tempo de contato entre as células e o látex, para então evidenciar toxicidade celular. No mesmo sentido, os

resultados obtidos pelo experimento do ensaio com VN, demonstram que as células HRT-18, apresentam menor sensibilidade do que as células HeLa, frente aos compostos presentes no látex de *E. umbellata* (Figura 14).

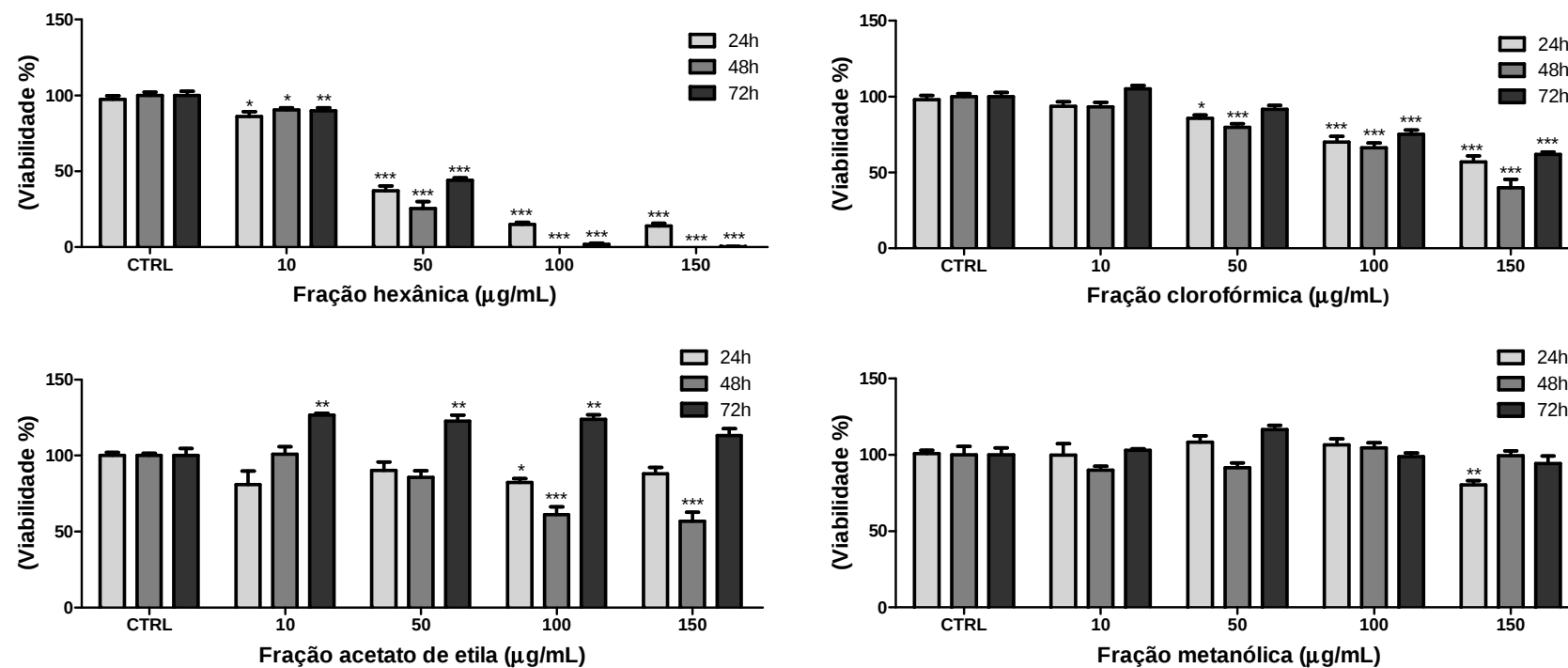
Figura 14 - Citotoxicidade do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns por internalização do VN para células HRT-18 em 24, 48 e 72 h.



A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de internalização do VN, conforme descrito no item 4.5.2. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Após a normalização dos resultados que foram expressos em média e erro padrão da média, procedeu-se a análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey e as diferenças estatísticas estão demonstradas com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Por meio dos resultados das frações, pôde-se notar maior citotoxicidade da fração Hex frente a HeLa (Figura 15). Este efeito se mostrou dose dependente para as concentrações avaliadas. Também se verificou redução de viabilidade para a fração CHCl_3 , porém com menor intensidade em relação ao controle negativo. A fração AcOEt nas concentrações de 100 e 150 µg/mL apresentou toxicidade significativa em 48 h de análise (Figura 15). Porém no período seguinte este efeito se tornou imperceptível com o restabelecimento da viabilidade celular. Divergentemente a partição MeOH não desenvolveu efeitos tóxicos sobre as células HeLa (Figura 15).

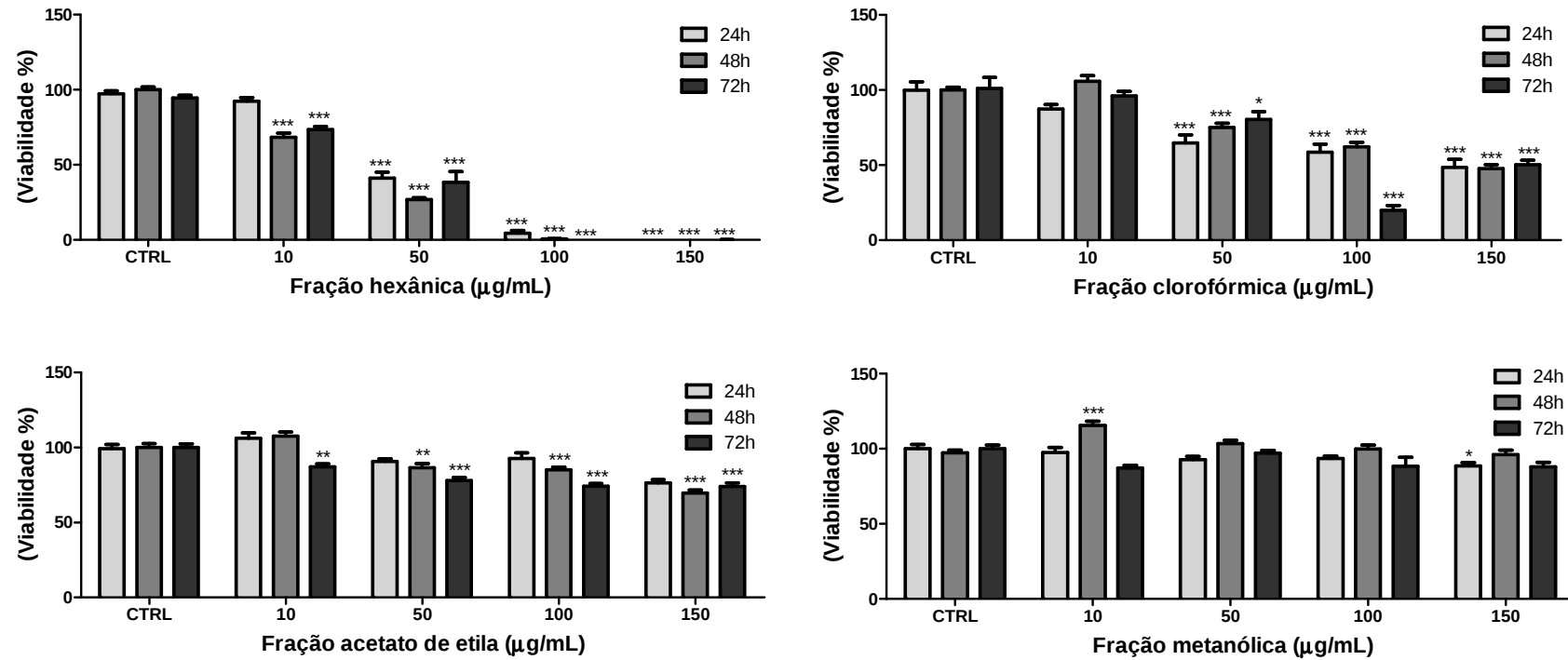
Figura 15 - Citotoxicidade das frações Hex, CHCl₃, AcOEt, MeOH por internalização do VN para células HeLa em 14, 48 e 72 h.



A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de internalização do VN, conforme descrito no item 4.5.2. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Após a normalização dos resultados que foram expressos em média e erro padrão da média, procedeu-se a análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey e as diferenças estatísticas estão demonstradas com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

As células HRT-18 reagiram de forma semelhante à linhagem de colo uterino (HeLa). A figura 16 mostra a presença de toxicidade em ordem crescente para as frações CHCl_3 e Hex respectivamente. A fração AcOEt nas concentrações de 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$ apresentou toxicidade significativa em 48 e 72 h (Figura 16). Fato já não observado para a fração MeOH, devido a inexistência de atividade citotóxica nos períodos analisados.

Figura 16 - Citotoxicidade das frações Hex, CHCl₃, AcOEt, MeOH por internalização do VN para células HRT-18 em 24, 48 e 72 h.



A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de internalização do VN, conforme descrito no item 4.5.2. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Após a normalização dos resultados que foram expressos em média e erro padrão da média, procedeu-se a análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey e as diferenças estatísticas estão demonstradas com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Os resultados das análises de MTT e VN mostram toxicidade em ordem crescente para o látex, fração CHCl_3 e Hex. Porém não evidenciam toxicidade significativa para as frações mais polares. A menor resposta do látex observada nas células HeLa e HRT-18 pode ser explicada pela composição laticífera, formada por compostos citotóxicos e não citotóxicos. Isso faz com que a toxicidade não se torne demasiadamente perceptível quando ambos estão presentes; fato que ocorre em matrizes vegetais não purificadas.

Estudos anteriores descritos na literatura relataram citotoxicidade do látex, frações e substâncias isoladas, de outras espécies de plantas de Euphorbiaceae, para células tumorais HeLa. Hsieh e colaboradores (2011), mostraram a toxicidade do látex de *Euphorbia antiquorum* L. para células HeLa, causando redução da viabilidade celular dose e tempo dependentes para as concentrações de 0,5 a 3 mg/mL. Análises complementares revelaram ainda que o processo de morte celular ocorre por apoptose, pois evidenciaram eventos como a diminuição do potencial da membrana mitocondrial, aumento de espécies reativas de oxigênio e ativação das caspases 3, 8 e 9. Em diferentes estudos Hsieh e colaboradores (2014), perceberam aumento do percentual celular na fase S do ciclo celular, indicando com isso parada do ciclo celular destas células tratadas com látex de *E. antiquorum*.

Alonso-Castro e colaboradores (2012) demonstraram a toxicidade do extrato metanólico das folhas de *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) para a mesma linhagem celular, em que após incubação das células HeLa com anexina V (proteína que se liga fosfatidilserina, externalizada na membrana celular em células em processo de morte celular) comprovaram 30% de apoptose através da análise de ciclo celular.

Perda de viabilidade também observada para o óleo essencial e frações particionadas a partir do extrato bruto de partes aéreas e raízes da espécie *Euphorbia macrorrhiza* C. A. Mey. para células CaCO₂ (carcinoma de cólon retal) (LIN *et al.*, 2012b). Por meio do ensaio de redução de MTT os autores observaram um percentual crescente de redução mitocondrial do óleo essencial e das partes aéreas para a fração AcOEt, CHCl_3 e Hex, com inibição de crescimento de 4,61; 68,22; 83,57 e 96,12 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. As frações mais polares não apresentaram redução significativa, condizendo aos resultados apresentados neste trabalho. Sobre o extrato bruto das raízes a inibição mitocondrial foi semelhante

àquela observada para os extratos obtidos das folhas, flores, frutos e sementes. Tais resultados mostram o potencial efeito citotóxico das frações apolares sobre as mais polares.

Baseado nisto pode-se afirmar que a fração Hex do látex de *E. umbellata* foi a partição que apresentou maior inibição de crescimento celular, com a viabilidade variando de 2,14 a 85,54% para as concentrações de 10 a 150 µg/mL em 72 h de exposição. É possível ainda pressupor que potencial efeito citotóxico esteja relacionado aos terpenos, uma vez que são compostos majoritários da fração hexânica.

Informação corroborada por Acqua e colaboradores (2011) que testaram terpenos isolados de espécies de Euphorbiaceae, os quais se mostraram tóxicos para células HeLa. De forma semelhante Vasas e colaboradores (2012), revelaram atividade citotóxica dos diterpenos ciclomirsinano e premirsinano para HeLa, com redução da proliferação de 56,95% a 83,90% na concentração de 30 µg/mL. Zhang e colaboradores (2012), após testarem triterpenos isolados de *Euphorbia kansuensis* Prokh. demonstraram elevado poder de inibição, exibindo concentração inibitória mínima compreendida entre 13 a 16 µg/mL, corroborando com outros resultados relatados na literatura. Jadranin e colaboradores (2013) verificaram eficácia do diterpeno jatrofano, para linhagem de colo retal, DLD1. Os autores relataram inibição da sobre-expressão da proteína P, a qual por sua vez é a responsável pela resistência celular ao tratamento anticâncer, atuando como um transportador de membranas que elimina fármacos antitumorais.

6.1.1.3 Avaliação de citotoxicidade por cálculo de IC₅₀

A citotoxicidade pode ser avaliada através dos valores de IC₅₀, que corresponde a concentração de morte celular para 50% das células de uma cultura (ASSAF *et al.*, 2013). Neste sentido a partir dos ensaios de redução de MTT, foi calculado o valor de IC₅₀ para o látex e frações Hex, CHCl₃, AcOEt e MeOH frente a células HeLa e HRT-18.

Na tabela 4 é possível visualizar os valores de IC₅₀ obtidos, verificando assim maior toxicidade do látex sobre as células tumorais de cólo de útero (HeLa) em relação às de colorretal (HRT-18). A menor susceptibilidade desta é demonstrada pelo IC₅₀ obtido que foi de 369,25 µg/mL.

A incubação das células com as frações possibilitou encontrar aquela com maior potencial citotóxico, que por sua vez, ficou evidenciado ser a fração Hex. A fração CHCl_3 apresentou baixa toxicidade, enquanto que as frações mais polares não mostraram o efeito sobre as células avaliadas.

Em análise comparativa da matriz vegetal bruta com a fração Hex, percebe-se a vantagem em realizar a purificação de compostos, se aproximando da molécula majoritária para determinado efeito farmacológico.

Tabela 4 - Avaliação da citotoxicidade do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns e frações particionadas sobre células HeLa e HRT-18, através do cálculo de IC_{50} . O cálculo do IC_{50} para as amostras foi realizado por análise de Probit, método de Finney, utilizando o Software estatístico StatPlus versão 5.8.4.

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE POR VALORES DE IC_{50}		
CÉLULAS	AMOSTRA	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
HeLa	Látex	124,84
	Fração Hex	30,50
	Fração CHCl_3	180,44
	Fração AcOEt	> 1000
	Fração MeOH	> 1000
HRT-18	Látex	369,25
	Fração Hex	26,16
	Fração CHCl_3	170,85
	Fração AcOEt	> 1000
	Fração MeOH	> 1000

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, plantas medicinais são consideradas como promissores antitumorais quando ao terem a toxicidade de seus extratos brutos avaliados frente a linhagens tumorais, com valores de IC_{50} inferiores a 30 $\mu\text{g/mL}$ (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2012).

Baseado nesta informação, não se pode considerar o látex de *E. umbellata* um promissor antitumoral para células HeLa e HRT-18. De forma semelhante, a toxicidade do extrato etanólico do látex de diferentes espécies de *Euphorbia* mostrada por Whelan e Ryan (2003), também não se enquadra como promissor na terapia oncológica. Neste caso os valores encontrados para *E. grandidens* Haw., *E. grandicorni* Goebel ex N.E. Br., *E. lactea* Haw. e *E. trigona* Haw foram respectivamente 57, 89, 89 e 330 $\mu\text{g/mL}$.

Divergindo dos resultados anteriores, Alonso-Castro e colaboradores (2012), relataram toxicidade elevada do extrato metanólico *C. lechleri* para células HeLa, obtendo IC₅₀ de 17 µg/mL.

Porém não há posicionamento a cerca de compostos semi-purificados, como as frações. Há uma lacuna entre o valor de referência para extratos brutos (30 µg/mL) e o IC₅₀ aceitável para compostos purificados, que é inferior a 4 µg/mL (ASSAF *et al.*, 2013).

6.1.1.4 Análise morfológica

A análise morfológica possibilita, por meio do estudo das alterações morfológicas, dar indícios do mecanismo de morte celular. Tem aplicabilidade para células aderentes e em suspensão e pode ser realizada sob microscopia fluorescente e óptica.

Dentre os mecanismos existentes pode-se avaliar a necrose e apoptose. O mecanismo de morte celular necrótico é também conhecido por morte celular accidental, caracterizado por aumento celular, preservação da cromatina, alteração da morfologia mitocondrial e lise; sendo os fragmentos gerados responsáveis por iniciar processos inflamatórios (MEER *et al.*, 2010; MANNHEIM, 1998). Por outro lado, apoptose é também referenciada como morte programada em que os eventos observados são retração celular; condensação da cromatina e desintegração celular, porém com manutenção da integridade de membrana (MEER *et al.*, 2010).

Os resultados morfológicos das células HeLa, revelaram em 24 h a perda da aderência e arredondamento celular, formação de *blebs* e condensação da cromatina (Figura 17). A perda da aderência celular pode ser considerada o primeiro efeito da cascata de morte celular. Em 48 h, com toxicidade mais intensa, além dos efeitos apoptóticos observados no período anterior, houve também a vacuolização, indicativo de necrose (Figura 18).

Figura 17 - Morfologia das células HeLa após 24 h de tratamento com o látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns.

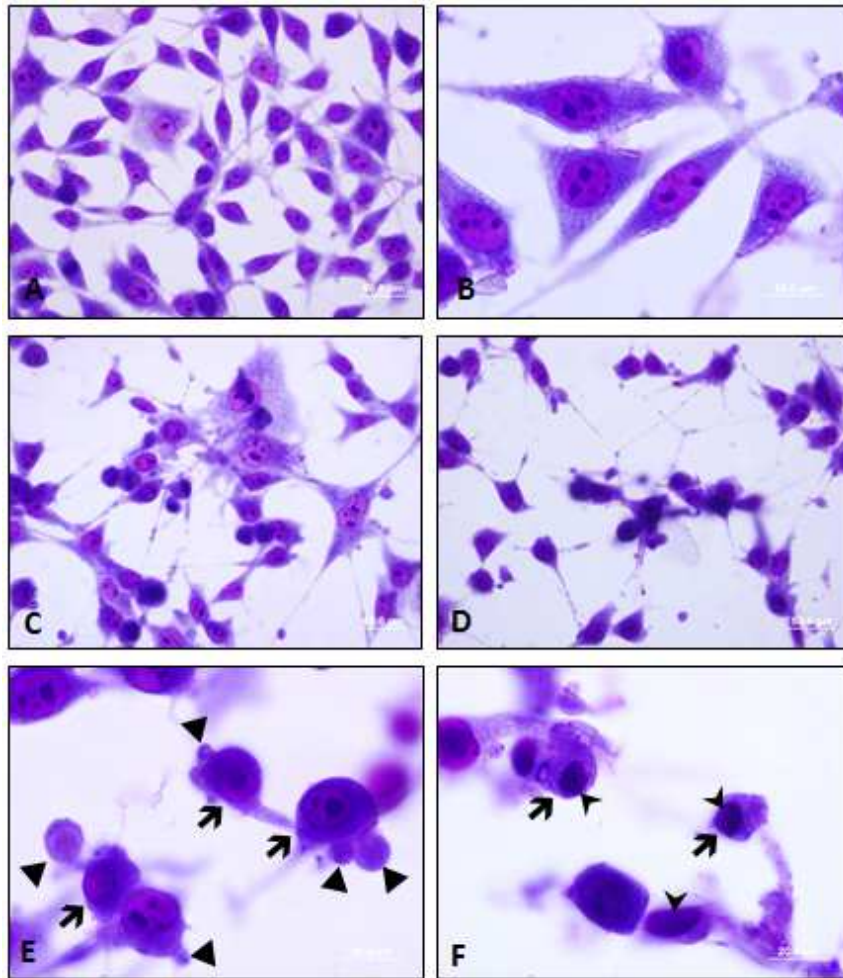
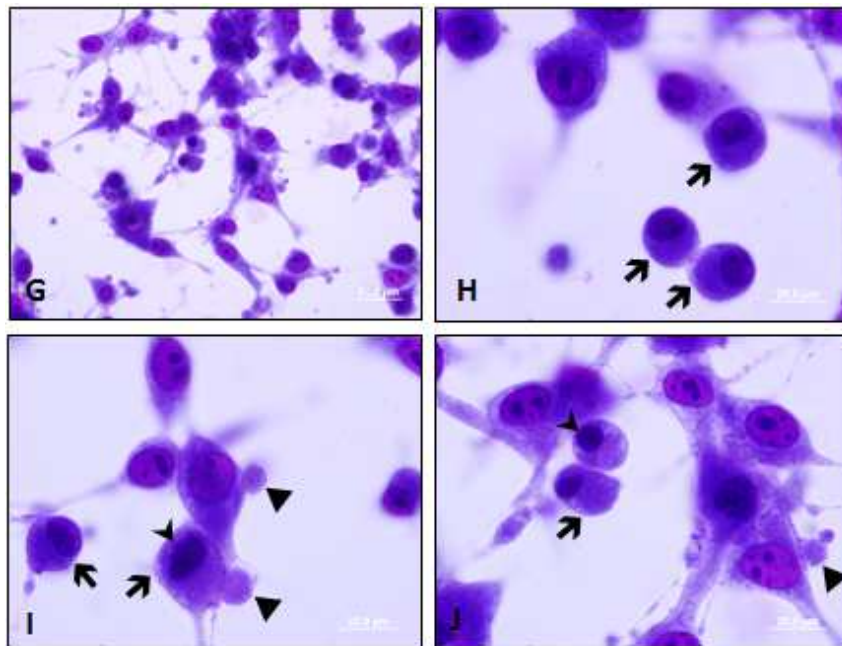
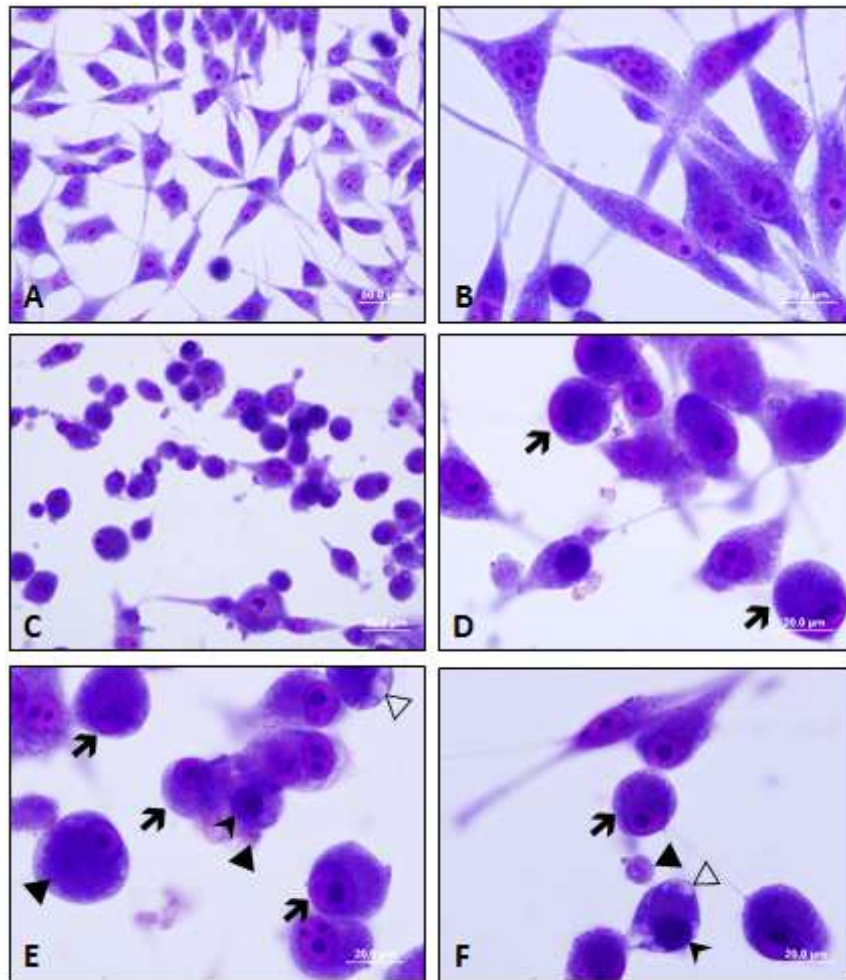


Figura 17 - continuação.



A morfologia foi avaliada pela técnica descrita no item 4.5.3. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. (A) controle, aumento de 400x; (B) controle, aumento de 1000x; (C e D) 500 µg/mL de látex, aumento de 400x; (E e F) 500 µg/mL de látex, aumento de 1000x; (G) 750 µg/mL de látex, aumento de 40x; (H, I e J) 750 µg/mL de látex, aumento de 1000x. ↑ Arredondamento celular, ▲ formação de *blebs*, ▲ condensação de cromatina.

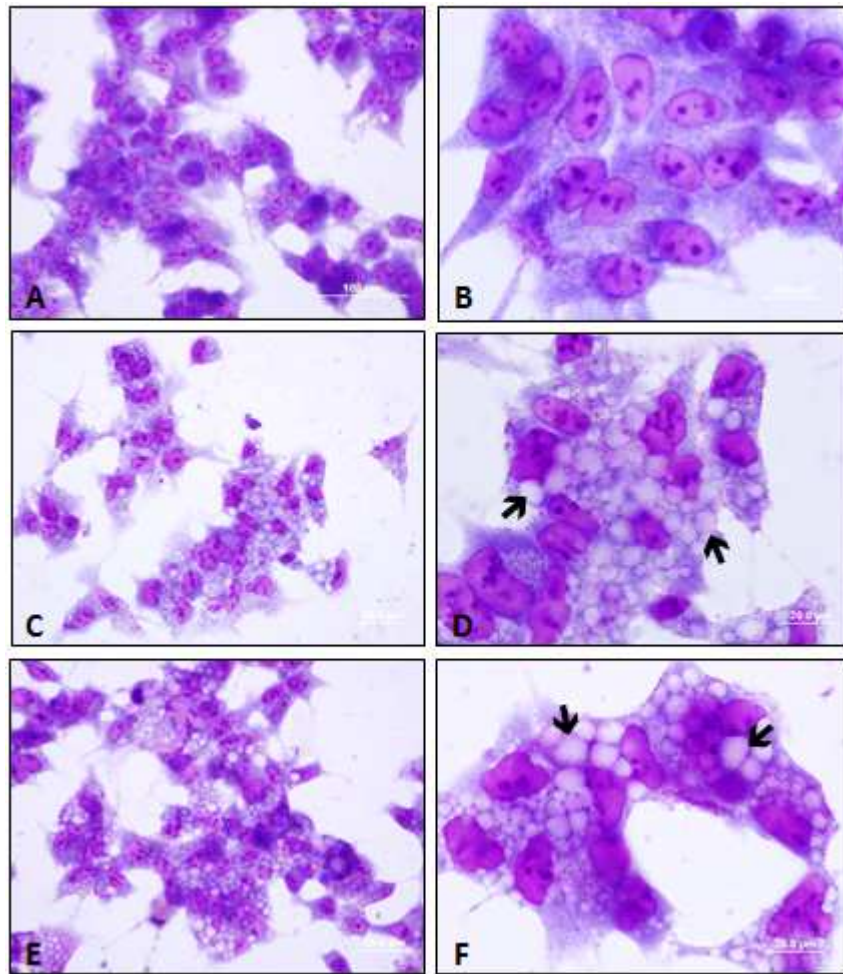
Figura 18 - Morfologia das células HeLa após 48 h de tratamento com o látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns.



A morfologia foi avaliada pela técnica descrita no item 4.5.3. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. (A) controle, aumento de 400x; (B) controle, aumento de 1000x; (C) 500 µg/mL de látex, aumento de 400x; (D) 500 µg/mL de látex, aumento de 1000x (E e F) 500 µg/mL de látex, aumento de 1000x. ↑ Arredondamento celular, ▲ formação de *blebs*, ▲ condensação de cromatina, △ vacuolização.

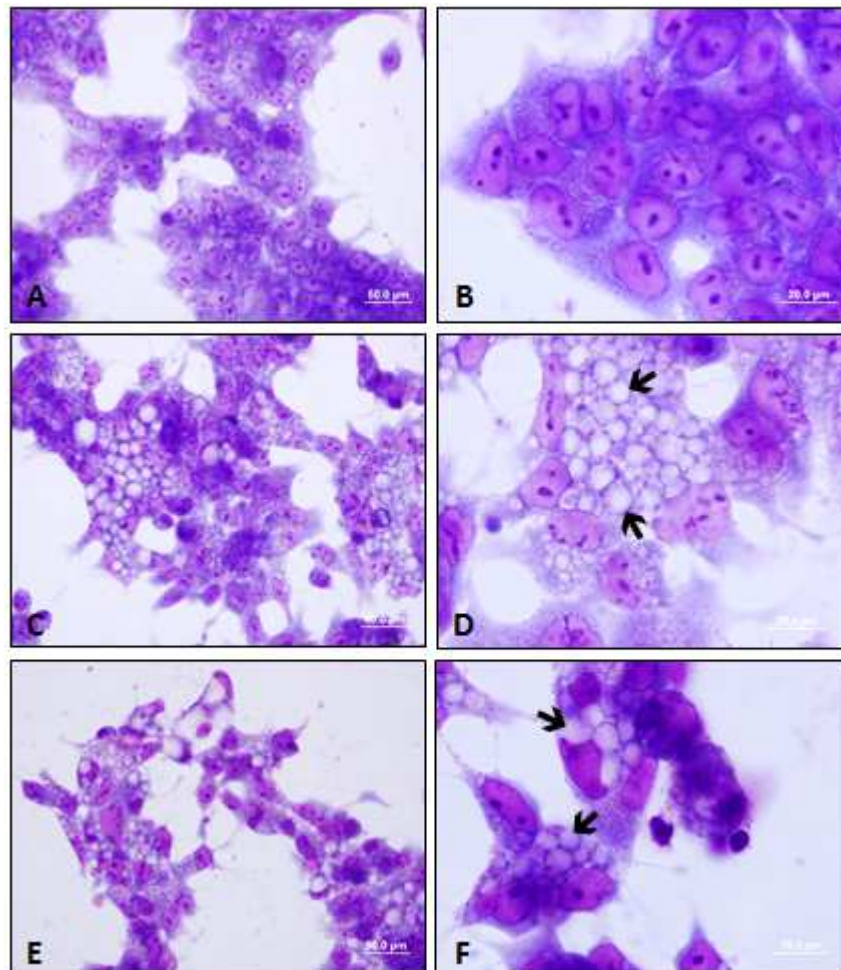
Células HRT-18, diferentemente das células HeLa, apresentaram apenas vacuolização no primeiro período avaliado (24 h), evento que se intensificou após 48 h de análise (Figura 19 e 20).

Figura 19 - Morfologia das células HRT-18 após 24 h de tratamento com o látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns.



A morfologia foi avaliada pela técnica descrita no item 4.5.3. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. (A) controle, aumento de 400x; (B) controle, aumento de 1000x; (C) 750 µg/mL de látex, aumento de 400x; (D), 750 µg/mL de látex, aumento de 1000x; (E) 1000 µg/mL de látex, aumento de 400x (E); 1000 µg/mL, aumento de 1000x (F). ↑ vacuolização.

Figura 20 - Morfologia das células HRT-18 após 48 h de tratamento com o látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns.



A morfologia foi avaliada pela técnica descrita no item 4.5.3. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. (A) controle, aumento de 400x; (B) controle, aumento de 1000x; (C) 750 µg/mL de látex, aumento de 400x (C); (D) 750 µg/mL de látex, aumento de 1000x; (E) 1000 µg/mL, aumento de 400x; (F) 1000 µg/mL, aumento de 1000x. ↑ vacuolização.

As alterações demonstradas para células HeLa em 24 h de análise, traduzem indício de que a morte celular ocorre por apoptose, conforme descrito por Mota, Benfica e Valadares (2012). Neste estudo a morfologia de células leucêmicas (K-562) frente ao extrato de *E. umbellata*, mostraram como eventos a formação de *blebs* e condensação de cromatina. Com a utilização do fluoróforo Hoechst 33342, verificaram além dos efeitos citados acima, fragmentação nuclear e confirmaram a morte das células ascíticas tumorais de Ehrlich por apoptose (MOTA *et al.*, 2012).

6.1.2 Células em suspensão

6.1.2.1 Integridade de membrana por exclusão de azul de Tripan

A técnica de exclusão de azul de Tripan pode também ser considerada um ensaio de citotoxicidade, capaz de diferenciar células viáveis das células não viáveis através da coloração. O azul de Tripan tem capacidade de penetrar e corar células que perderam a integridade de membrana. Sendo este fenômeno observado em células mortas (VARGAS-CORTES; HELLSTROM; PERLMANN, 1983).

Células Jurkat incubadas com látex de *E. umbellata* apresentaram redução de viabilidade celular, perceptível pelo decréscimo de viabilidade, calculada considerando células viáveis e não viáveis conforme descrito no item 4.6.1. A concentração de 800 µg/mL gerou valores percentuais de viabilidade na ordem de 49,50; 34,22 e 24,90 µg/mL para 24, 48 e 72 h respectivamente. Nas demais diluições não foi possível notar reduções proporcionais da viabilidade celular nos períodos analisados. Fato que pode ser explicado pela presença de toxicidade que reduz a capacidade de multiplicação celular, influenciando diretamente no número de células presentes (Tabela 5).

Tabela 5 - Viabilidade das células Jurkat após incubação com látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, em 24, 48 e 72 h, avaliada através da integridade de membrana por exclusão de Tripan, conforme descrito no item 4.6.1. Após a normalização dos resultados, estes foram expressos em média e erro padrão da média. Como controle negativo foi utilizado o cultivo celular apenas em meio de cultura RPMI. As concentrações do látex estão compreendidas entre 50 e 800 µg/mL.

Grupo		Viabilidade		
		24 h	48 h	72 h
CTRL		98,70 ± 0,68	97,85 ± 0,60	95,66 ± 0,51
LÁTEX (µg/mL)	50	81,20 ± 3,07	83,07 ± 1,61	93,28 ± 0,68
	100	77,95 ± 3,22	79,52 ± 1,25	92,29 ± 0,59
	200	79,55 ± 1,95	75,21 ± 1,20	87,09 ± 1,48
	400	66,68 ± 2,54	54,32 ± 1,32	70,30 ± 2,59
	800	49,50 ± 2,37	34,22 ± 2,09	24,90 ± 3,22

Dentre as frações, a redução de viabilidade foi mais evidente para a fração Hex e CHCl₃ e com menor efeito para as frações AcOEt e MeOH (Tabela 6). Para a fração mais apolar esse fenômeno é verificado primariamente em 5 µg/mL com 24 h de análise. Neste período a viabilidade variou em 68,03% entre as concentrações

avaliadas. Em 72 h a redução se tornou ainda mais pronunciada, com a viabilidade variando 85,75% entre o grupo controle a fração Hex a 80 µg/mL. A concentração de 80 µg/mL reduziu intensamente a viabilidade celular com percentual de 6,83%. Para a fração CHCl₃ também observa-se diminuição considerável de células viáveis em relação a quantificação total, com mensuração de 82,48% em 24 h; 47,57% em 48 h e 16,95% em 72 h para a concentração de 150 µg/mL.

Por outro lado as frações mais polares apesar de terem gerado similarmente diminuição de viabilidade, estes valores foram de menor intensidade. A viabilidade celular das culturas tratadas com a fração AcOEt em 24 h foi de 23,47%, sendo que nos períodos sequenciais variou respectivamente para 13,84% e 9,48%. As células Jurkat se mostraram menos responsivas à fração MeOH, apresentando variação de viabilidade na ordem de 6,16%; 6,40% e 3,63% para 24, 48 e 72 h.

Tabela 6 - Viabilidade das células Jurkat após incubação com as frações Hex, CHCl_3 , AcOEt, MeOH em 24, 48 e 72 h, avaliada através da integridade de membrana por exclusão de Tripan, conforme descrito no item 4.6.1. Após a normalização dos resultados, estes foram expressos em média e erro padrão da média. Como controle negativo foi utilizado o cultivo celular apenas em meio de cultura RPMI. As concentrações avaliadas estão compreendidas entre 5 e 80 $\mu\text{g/mL}$ (Fração Hex); 10 e 150 $\mu\text{g/mL}$ (Fração CHCl_3 , AcOEt e MeOH).

Grupo		Viabilidade		
		24 h	48 h	72 h
CTRL		96,08 $\pm$ 1,00	95,90 $\pm$ 1,10	92,58 $\pm$ 1,79
FRAÇÃO Hex ($\mu\text{g/mL}$)	5	91,88 $\pm$ 1,34	80,43 $\pm$ 1,89	82,77 $\pm$ 0,71
	10	88,47 $\pm$ 1,33	76,07 $\pm$ 1,26	83,70 $\pm$ 1,55
	20	82,32 $\pm$ 2,19	71,00 $\pm$ 1,75	76,89 $\pm$ 1,32
	40	76,62 $\pm$ 1,66	63,37 $\pm$ 2,43	58,26 $\pm$ 2,99
		80	28,05 $\pm$ 4,05	11,33 $\pm$ 3,24
			6,83 $\pm$ 1,50	

Grupo		Viabilidade		
		24 h	48 h	72 h
CTRL		95,49 $\pm$ 0,78	96,51 $\pm$ 0,43	92,37 $\pm$ 0,52
FRAÇÃO CHCl_3 ($\mu\text{g/mL}$)	10	95,70 $\pm$ 1,44	92,67 $\pm$ 0,75	92,33 $\pm$ 0,76
	50	90,80 $\pm$ 1,61	91,70 $\pm$ 1,07	90,32 $\pm$ 1,15
	100	88,41 $\pm$ 1,80	77,96 $\pm$ 1,43	63,91 $\pm$ 2,00
	150	82,48 $\pm$ 2,92	47,57 $\pm$ 2,07	16,95 $\pm$ 2,04

Grupo		Viabilidade		
		24 h	48 h	72 h
CTRL		95,81 $\pm$ 1,21	94,96 $\pm$ 0,85	93,45 $\pm$ 1,16
FRAÇÃO AcOEt ($\mu\text{g/mL}$)	10	86,89 $\pm$ 3,46	87,40 $\pm$ 1,43	87,88 $\pm$ 2,41
	50	80,42 $\pm$ 2,57	88,48 $\pm$ 1,87	89,55 $\pm$ 1,01
	100	82,25 $\pm$ 1,42	84,68 $\pm$ 1,93	86,81 $\pm$ 1,59
	150	72,34 $\pm$ 1,66	81,12 $\pm$ 1,68	83,97 $\pm$ 1,50

Grupo		Viabilidade		
		24 h	48 h	72 h
CTRL		92,99 $\pm$ 0,92	95,54 $\pm$ 1,16	95,32 $\pm$ 0,31
FRAÇÃO MeOH ($\mu\text{g/mL}$)	10	92,31 $\pm$ 1,12	94,67 $\pm$ 0,98	96,22 $\pm$ 0,55
	50	87,83 $\pm$ 1,26	92,48 $\pm$ 1,55	92,04 $\pm$ 0,37
	100	90,23 $\pm$ 1,28	89,80 $\pm$ 1,28	90,30 $\pm$ 1,64
	150	86,83 $\pm$ 1,27	89,14 $\pm$ 1,35	91,69 $\pm$ 1,71

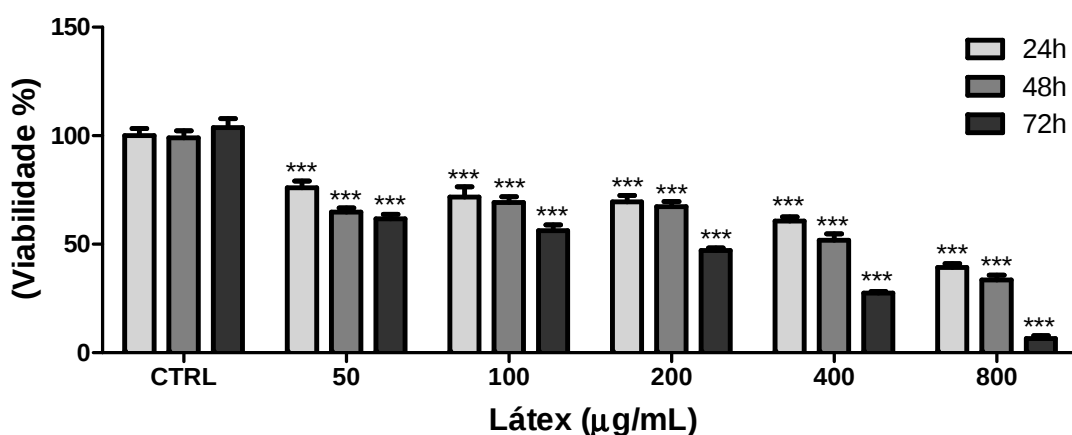
Dentre o látex e as frações de *E. umbellata*, a perda da integridade foi menor e em ordem crescente para o látex e as frações MeOH, AcOEt, CHCl_3 e Hex.

6.1.2.2 Ensaios de citotoxicidade por redução mitocondrial de MTT

A redução mitocondrial, como mencionado anteriormente, é um método colorimétrico, o qual através das absorvâncias quantificadas mensura-se o percentual de viabilidade celular. Salvo modificações de experimentação, também possuem aplicabilidade para células em suspensão.

O ensaio de MTT, assim como demonstrado no ensaio de exclusão de azul de Tripan, revelou citotoxicidade do látex de *E. umbellata* para células Jurkat (Figura 21). O efeito observado para as concentrações testadas foi dose e tempo dependentes. Na concentração de 800 $\mu\text{g/mL}$ em 72 h a viabilidade encontrada para a cultura correspondeu a 6,55%.

Figura 21 - Citotoxicidade do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns avaliada por redução do MTT para células Jurkat em 24, 48 e 72 h.

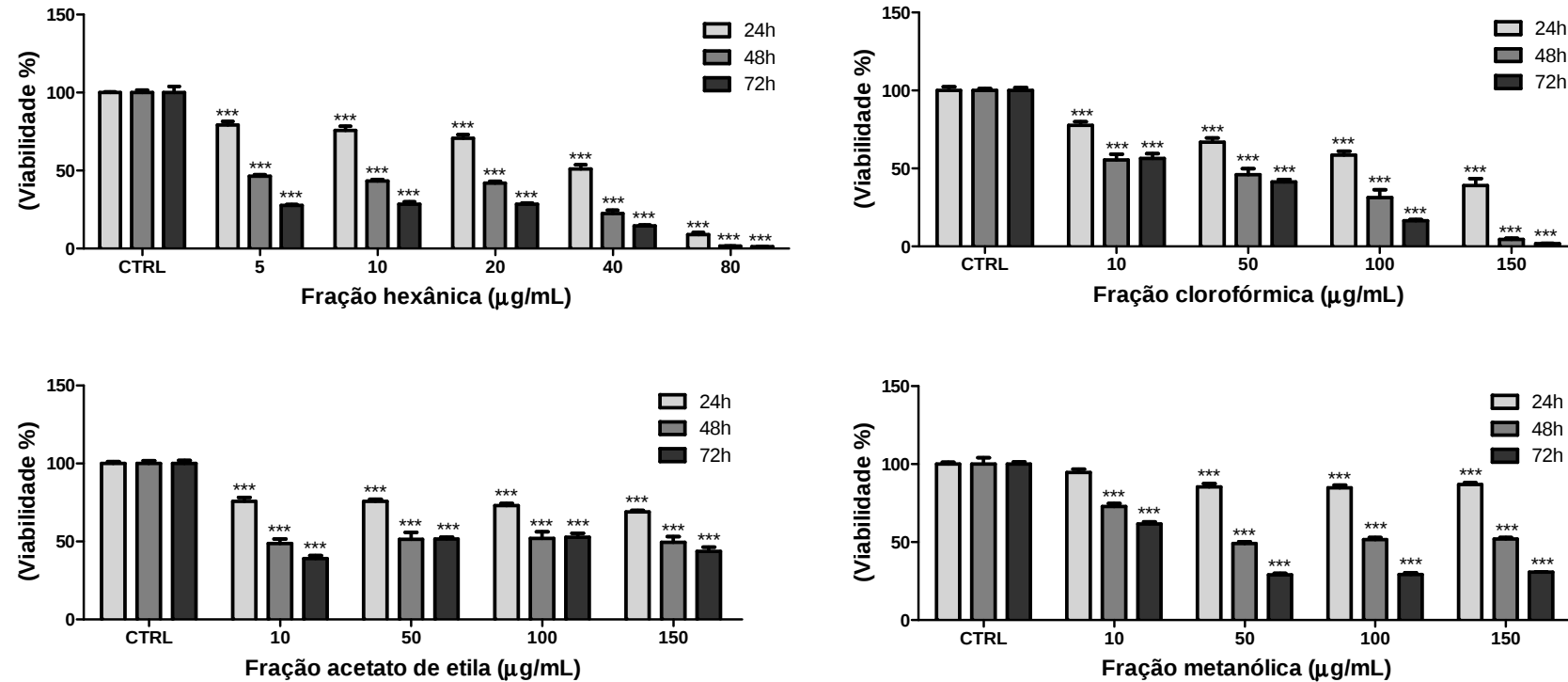


A viabilidade foi analisada pelo ensaio de redução do MTT, conforme descrito no item 4.6.2. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Os resultados são expressos em média e erro padrão da média, utilizando análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey, com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Dentre as frações analisadas, a fração Hex apresentou maior potencial citotóxico. Para a concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ houve redução pronunciada de viabilidade celular nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 h, expondo valores compreendidos entre 8,93 e 1,18%. A fração CHCl_3 embora em maior concentração (150 $\mu\text{g/mL}$) exibiu viabilidade próxima a anterior com percentual de 4,59 e 1,76% para 48 e 72 h.

As substâncias de maiores polaridades, extraídas por AcOEt e MeOH, apresentaram menor toxicidade, visualizada numericamente por 43,87% para a primeira delas, na concentração de 150 µg/mL em 72 h de tratamento enquanto que a segunda, mostrou viabilidade de 30,66% referente a mesma concentração e ao mesmo período de análise.

Figura 22 - Citotoxicidade das frações Hex, CHCl₃, AcOEt, MeOH avaliada por redução do MTT para células Jurkat em 24, 48 e 72 h.



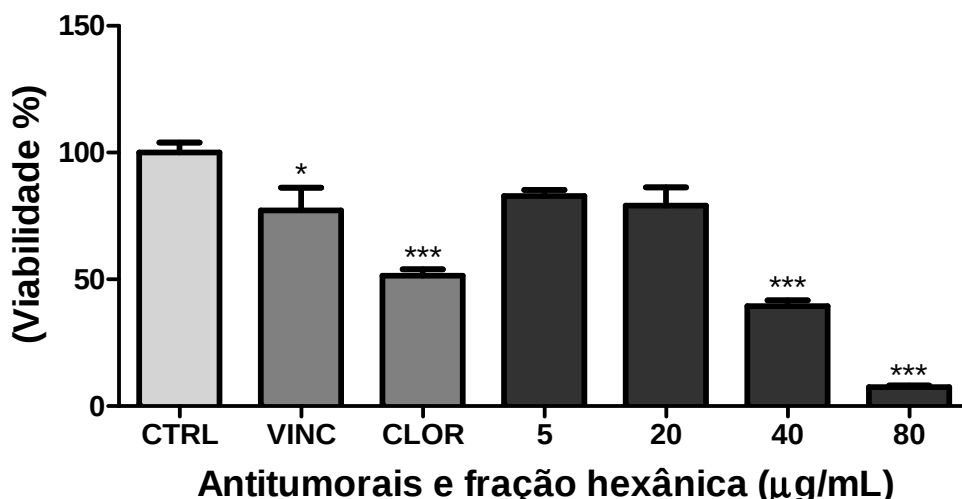
A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT, conforme descrito no item 4.6.2. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Após a normalização dos resultados que foram expressos em média e erro padrão da média, procedeu-se a análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey e as diferenças estatísticas estão demonstradas com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Os resultados anteriores mostraram a toxicidade da fração Hex sobre as células Jurkat. Porém é preciso saber também seu efeito sobre as células não neoplásicas correspondentes. Neste sentido os linfócitos humanos foram submetidos a incubação com a fração Hex e 2 antitumorais convencionais (vincristina e clorambucil).

A figura 23 revela ausência de toxicidade para a fração Hex nas concentrações de 5 e 20 $\mu\text{g/mL}$. As concentrações maiores promoveram morte celular e reduziram a viabilidade a 39,48 e 7,39%.

Quando comparados em termos de concentração, em que a vincristina utilizada a 40 nM, é convertida a 36,92 $\mu\text{g/mL}$ e o clorambucil 20 μM corresponde a 6.084 $\mu\text{g/mL}$, verifica-se maior toxicidade da vincristina sobre os linfócitos do que a fração Hex nas concentrações de 5 e 20 $\mu\text{g/mL}$. Porém, apesar do antitumoral clorambucil revelar viabilidade de 51,45%, por estar em concentração comparativamente maior que os demais compostos, não se pode afirmar que o efeito é pronunciado.

Figura 23 - Citotoxicidade da fração Hex, vincristina e clorambucil, avaliada por redução do MTT para células linfócitos humanos em 24, 48 e 72 h.



A viabilidade foi analisada pelo ensaio de redução do MTT, conforme descrito no item 4.6.2. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Após a normalização dos resultados que foram expressos em média e erro padrão da média, procedeu-se a análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey e as diferenças estatísticas estão demonstradas com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Verificando ainda a seletividade desta fração sobre células não tumorais, foi calculado o índice de seletividade (IS). Este que é obtido pelo quociente do IC₅₀ de células não neoplásica pelo IC₅₀ de células neoplásicas (relação encontrada para os linfócitos humanos e células Jurkat). Dessa forma o IS resultante foi de 5,98 (Tabela 7). Isso reforça a ideia da existência de seletividade da fração avaliada.

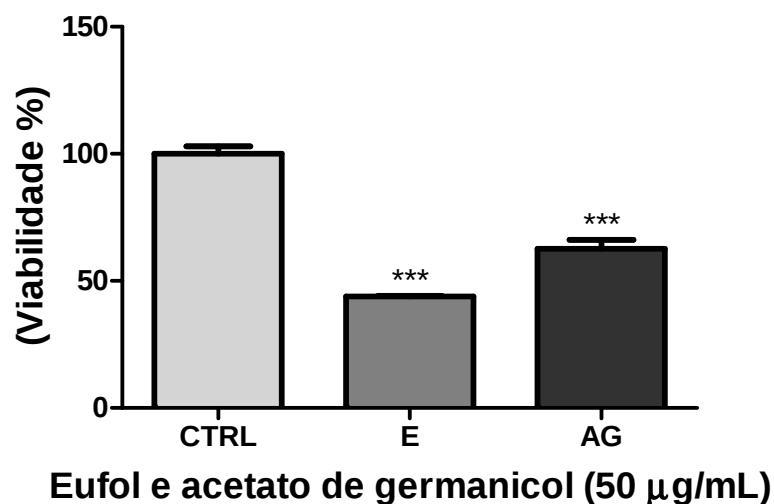
Tabela 7 - Índice de Seletividade para linfócitos humanos (células não neoplásicas).

ÍNDICE DE SELETIVIDADE		
CÉLULAS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
Jurkat	5,84	5,98
Linfócitos	34,92	

Diante dos resultados elucidados após o biomonitoramento biológico, em que a fração Hex, através dos ensaios de MTT, se mostrou citotóxica para células Jurkat e não tóxica para os linfócitos humanos; direcionou-se o estudo fitoquímico para esta fração.

Através deste estudo, foram isoladas 2 substâncias terpênicas, denominadas por acetato de germanicol e eufol (conforme descrito no item 7). Os triterpenos, ambos na concentração de 50 µg/mL evidenciaram toxicidade significativa em comparação ao grupo controle. Houve redução mitocondrial das células Jurkat na ordem de 62,68% para o acetato de germanicol e 43,81% para o eufol após 72 h de exposição às substâncias (Figura 24).

Figura 24 - Citotoxicidade do eufol e acetato de germanicol, isolados da fração Hex, avaliada por redução do MTT para células Jurkat em 72 h.



A viabilidade foi analisada pelo ensaio de redução do MTT, conforme descrito no item 4.6.2. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Após a normalização dos resultados que foram expressos em média e erro padrão da média, procedeu-se a análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey e as diferenças estatísticas estão demonstradas com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A partir de diversas espécies de Euphorbiaceae e de diferentes órgãos e estruturas já foram avaliadas o potencial da atividade antitumoral, através de ensaios de citotoxicidade, antiproliferação, mecanismo de morte celular e ensaios *in vivo*.

De Oliveira e colaboradores (2013), por exemplo, evidenciaram citotoxicidade desta matriz complexa para células B16F10 (mieloma murinho), do qual relataram inibição de viabilidade na ordem de 64% para o látex e 40% para a garrafada.

Tal toxicidade foi verificada para células leucêmicas HL-60, as quais tiveram viabilidade mitocondrial reduzida, após serem incubadas com 50 µg/mL da fração acetônica, etérea e aquosa, obtidas a partir do extrato bruto das folhas de *Eugenia jambos* L. (Myrtaceae), com percentual de inibição variando de 85,3 a 100 µg/mL.

Uthaisang e colaboradores (2004) mostraram a ação do peptídeo VR-3848 isolado de Euphorbiaceae sobre células Jurkat-neo, que causou inibição de aproximadamente 100% de viabilidade, na concentração de 100 nM.

Porém ao avaliar a citotoxicidade de compostos em células cancerígenas se faz necessário também analisar a toxicidade em células não neoplásicas, através do índice de seletividade. Com base neste estudo, Suffness e Pezzuto (1991) relataram

que o IS é significativo quando o valor obtido é igual ou superior a 2,0. Informação que corrobora aos estudos realizados, em que observou-se IS das células Jurkat para fração Hex de 5,98.

6.1.2.3 Avaliação de citotoxicidade por cálculo de IC₅₀

O látex de *E. umbellata* conforme mostrado anteriormente promoveu toxicidade para as células Jurkat assim como as frações particionadas e com base nos ensaios de redução do MTT calculou-se a IC₅₀ (Tabela 8). O valor obtido foi de 108,28 µg/mL e mesmo sendo inferior ao IC₅₀ das células HeLa e HRT-18, não é tido como promissor fitocomplexo antineoplásico por ser superior a 30 µg/mL. Porém a fração Hex se evidenciou com um potencial agente no tratamento de leucemia, com base em que o IC₅₀ elucidado é inferior ao recomendado para substâncias isoladas.

Tabela 8 - Avaliação da citotoxicidade do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns e frações particionadas sobre células Jurkat, através do cálculo de IC₅₀. O cálculo do IC₅₀ para as amostras foi realizado por análise de Probit, método de Finney, utilizando o Software estatístico StatPlus versão 5.8.4.

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE POR VALORES DE IC ₅₀		
CÉLULAS	AMOSTRA	IC ₅₀ (µg/mL)
Jurkat	Látex	108,28
	Fração Hex	1,87
	Fração CHCl ₃	17,68
	Fração AcOEt	132,57
	Fração MeOH	19,13

Extrato bruto das partes aéreas de *E. umbellata* promoveu morte de 50% das células ascíticas tumorais de Ehrlich na concentração de 101 µg/mL, o que não a torna um antitumoral potencial (MOTA *et al.*, 2012). Porém com este mesmo extrato Mota, Benfica e Valadares (2012), relataram IC₅₀ para os extratos nas linhagens leucêmicas Jurkat e K-562 como sendo 41 e 73 µg/mL, respectivamente.

Além de *E. umbellata* outras espécies de Euphorbiaceae foram avaliadas quanto a citotoxicidade sendo calculados o IC₅₀. Neste sentido, Assaf e colaboradores (2013), mostraram a citotoxicidade de folhas e tubérculos de 3 espécies medicinais tradicionais na Jordânia e dentre elas *Mercurialis annua* L.

(Euphorbiaceae) que gerou redução de viabilidade das células U266 (mieloma), com IC_{50} de 103,2 $\mu\text{g/mL}$.

Por outro lado, estudos *in vitro* revelam que substâncias purificadas podem ser mais nocivas às células cancerígenas em comparação ao extrato bruto. Ruphin e colaboradores (2013) confrontaram os IC_{50} e encontraram valores crescentes para compostos isolados e as frações particionadas da casca de *Salacia leptoclada* Tul. (Celastraceae).

Com base nisto é que as substâncias isoladas são constantemente e preferencialmente estudadas. Zhang e colaboradores (2012) verificaram a toxicidade de triterpenoides pentacíclicos, os quais se mostraram antitumorais promissores, com concentração inibitória mínima de 13 à 25 $\mu\text{g/mL}$. Enquanto que Ruphin e colaboradores (2013) evidenciaram IC_{50} de 0,035 $\mu\text{g/mL}$ para o triterpeno pentacíclico quinona.

6.1.2.4 Quantificação do conteúdo de DNA por DNA-DPA e Iodeto de propídio

Análises de quantificações de DNA quer empregando o reagente DPA ou o iodeto de propídio são técnicas que também permitem verificar a citotoxicidade de um composto quando testado em cultura celular. Estes ensaios podem ser diferenciados pela forma de detecção, pois enquanto que a primeira resulta em coloração visível, a segunda é quantificada por unidade de fluorescência.

Confrontando os métodos experimentais, percebe-se melhor desempenho do ensaio com o fluoróforo do que a técnica de quantificação do conteúdo DNA-DPA. Esta última metodologia necessita de maior densidade celular para visualização do efeito enquanto a segunda utiliza pequena população de células para ilustrar o efeito procurado.

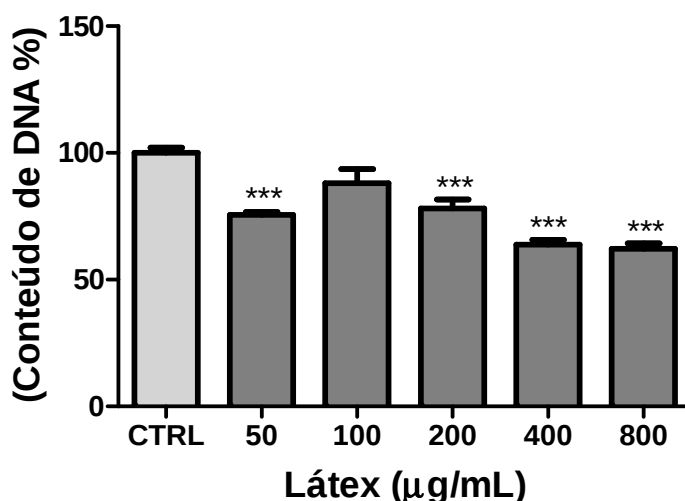
O tratamento das células Jurkat com o látex permitiu notar redução do conteúdo de DNA em relação ao controle negativo (Figura 25). Com a realização da análise empregando-se iodeto de propídio, este efeito foi corroborado (Figura 26).

A maior sensibilidade da metodologia de quantificação por fluorescência pode ser percebida pelo percentual de redução do conteúdo de DNA encontrado. O látex de *E. umbellata* para a concentração de 800 $\mu\text{g/mL}$, resultou nos valores de 62,24% para a técnica de DPA e 24,14% para a que empregou-se iodeto de propídio.

As quatro frações avaliadas tiveram efeito citotóxico. A fração Hex nas concentrações de 40 e 80 µg/mL reduziu o conteúdo de DNA para 58,94 e 27,66% respectivamente, quando avaliadas pela técnica colorimétrica e estas concentrações variam de 26,26 a 18,33%, quando avaliadas pela técnica fluorimétrica.

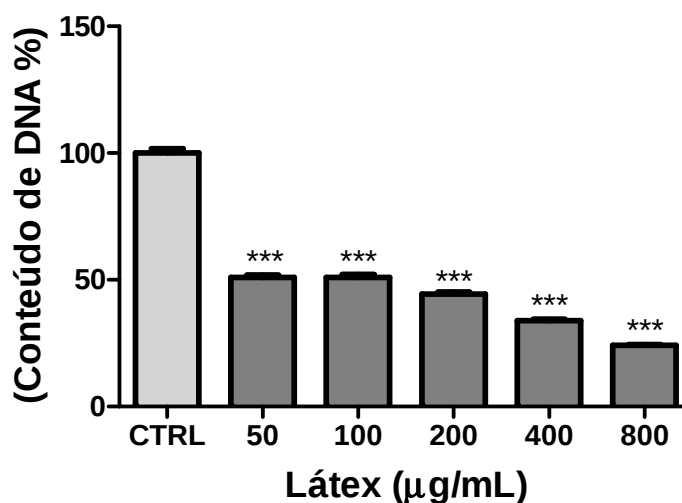
Percentual semelhante foi apresentado para o tratamento com a fração CHCl_3 e MeOH a 150 µg/mL cuja mensuração por DPA obtida foi de aproximadamente 50%. Coerentemente com as demais análises realizadas, a menor redução de conteúdo de DNA foi visualizada pela fração AcOEt, em que a quantificação de DNA foi na ordem de 80,03% para a maior concentração.

Figura 25 - Quantificação do conteúdo de DNA por DNA-DPA das células Jurkat após incubação com o látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns em 48 h.



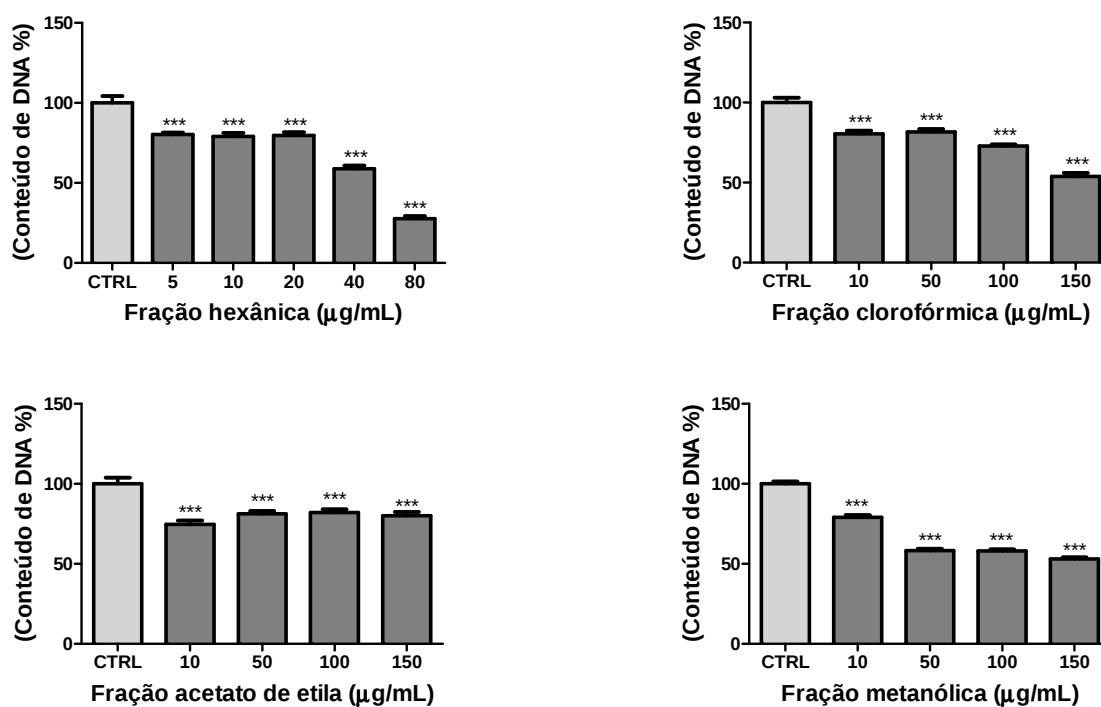
O conteúdo de DNA foi avaliado pela determinação do conteúdo de DNA utilizando o reagente DPA, conforme descrito no item 4.6.3. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Após a normalização dos resultados que foram expressos em média e erro padrão da média, procedeu-se a análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey e as diferenças estatísticas estão demonstradas com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 26 - Quantificação do conteúdo de DNA por iodeto de propídio das células Jurkat após incubação com o látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns em 72 h.



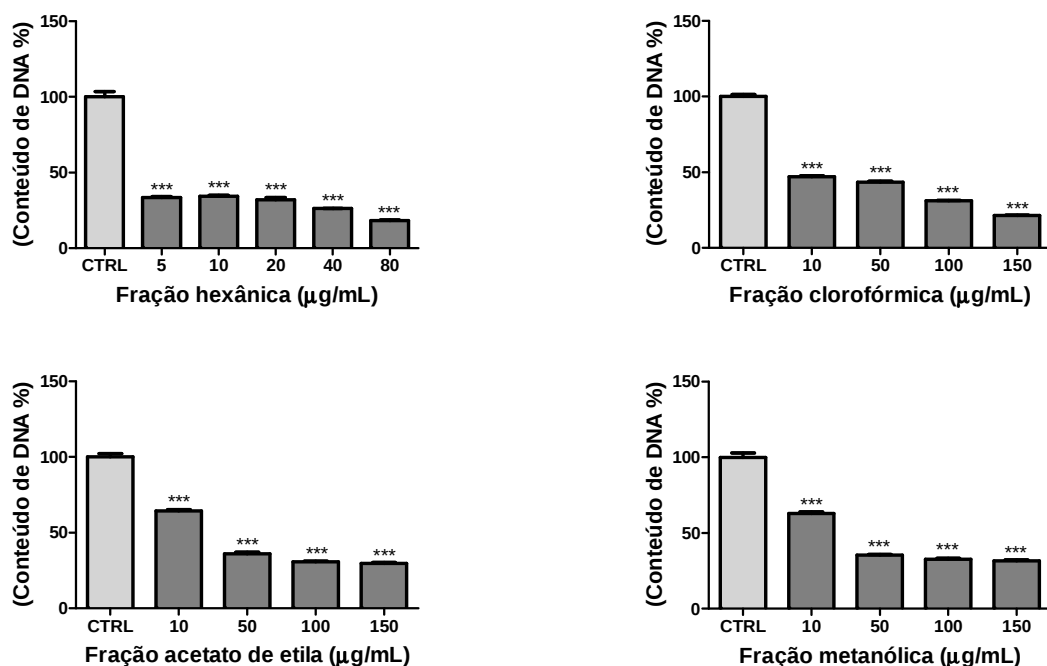
O conteúdo de DNA foi avaliado pela determinação do conteúdo de DNA utilizando o reagente iodeto de propídio, conforme descrito no item 4.6.4. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Após a normalização dos resultados que foram expressos em média e erro padrão da média, procedeu-se a análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey e as diferenças estatísticas estão demonstradas com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 27 - Quantificação do conteúdo de DNA por DNA-DPA das células Jurkat após incubação com as frações Hex, CHCl_3 , AcOEt e MeOH em 48 h.



O conteúdo de DNA foi avaliado pela determinação do conteúdo de DNA utilizando o reagente DPA, conforme descrito no item 4.6.3. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Após a normalização dos resultados que foram expressos em média e erro padrão da média, procedeu-se a análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey e as diferenças estatísticas estão demonstradas com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 28 - Quantificação do conteúdo de DNA por iodeto de propídio das células Jurkat após incubação com as frações Hex, CHCl₃, AcOEt e MeOH em 72 h.



O conteúdo de DNA foi avaliado pela determinação do conteúdo de DNA utilizando o reagente iodeto de propídio, conforme descrito no item 4.6.4. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Após a normalização dos resultados que foram expressos em média e erro padrão da média, procedeu-se a análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey e as diferenças estatísticas estão demonstradas com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Células HL-60 tiveram a quantificação do conteúdo de DNA avaliadas pelo emprego do reagente DPA após o contato por três períodos de tempos diferentes com o diterpeno dihidro crotonina e seu derivado isolados da casca de *Croton cajucara*, (ANAZETTI *et al.*, 2003). Neste estudo os autores puderam verificar o aumento da fragmentação do material genético (redução do conteúdo de DNA), com diferenças mais pronunciadas entre 24 e 48 h do que em relação aos períodos de 48 e 72 h. Apesar de ter realizado experimentos distintos, os resultados que se obtém são semelhantes e passíveis de comparação.

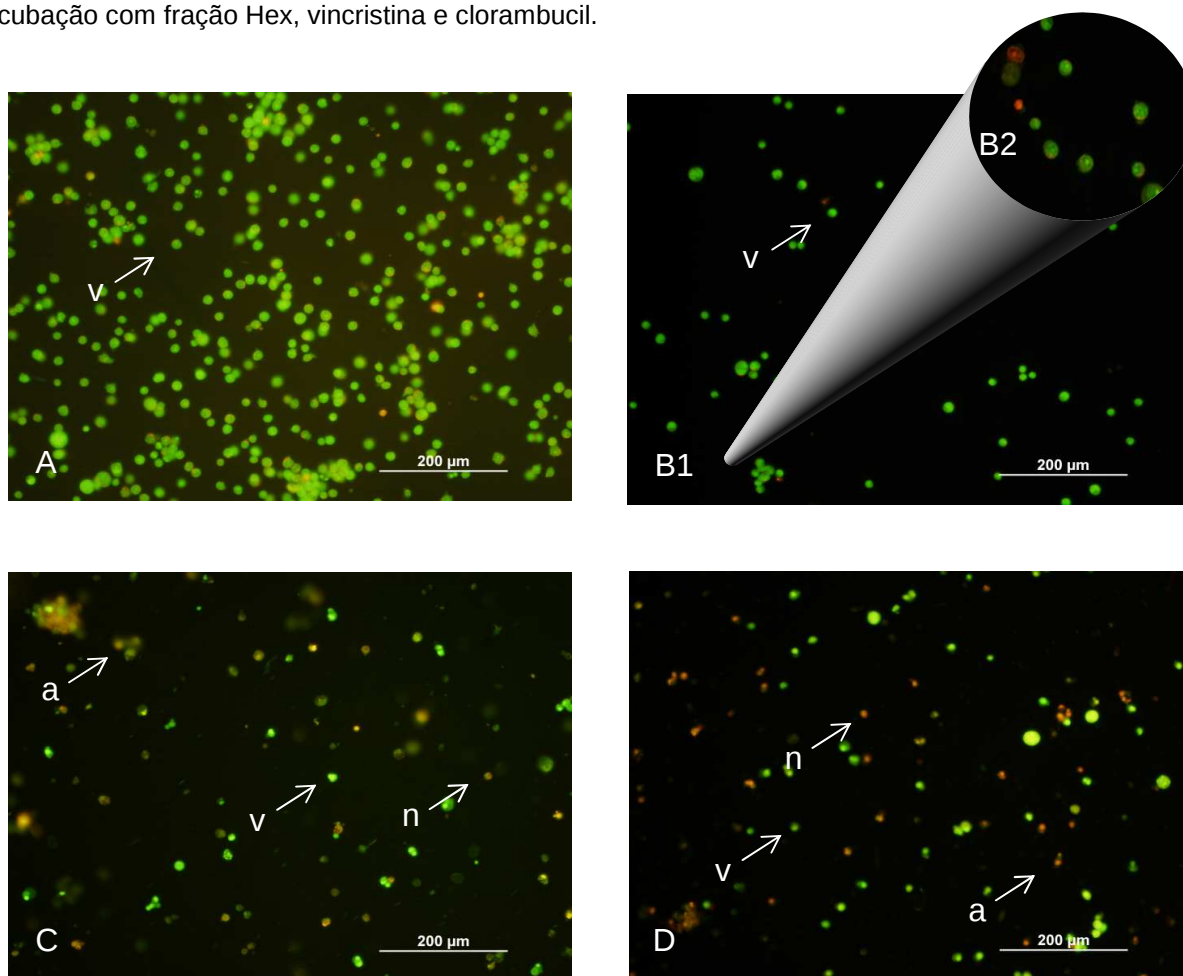
De acordo com Boscardin e colaboradores (2012) as células Jurkat foram sensíveis aos terpenos extraídos de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage (Myrtaceae). A mensuração foi feita conforme citado acima, com redução do conteúdo de DNA e aumento de fragmentação celular após tratamento.

6.1.2.5 Avaliação morfológica celular por meio do emprego do corante alaranjado de acridina e brometo de etídio.

A morfologia analisada com o emprego do corante alaranjado de acridina e brometo de etídio é referenciada como técnica de detecção de eventos apoptóticos e necróticos (RIBBLE, 2005). Células normais são ilustradas com coloração verde, com estruturas organizadas; células em apoptose apresentam cromatina condensada ou fragmentada na coloração verde ou alaranjada; e células necróticas são detectadas por coloração alaranjada (RIBBLE, 2005).

Dessa forma a incubação celular com alaranjado de acridina possibilitou visualizar núcleo organizado nas células viáveis (controle negativo) (Figura 29A), redução de células viáveis e presença de células em apoptose tardia quando tratadas com fração Hex (Figura 29B1 e 29B2), células apoptóticas e necróticas após tratamento com vincristina (Figura 29C) e células apoptóticas e elevado percentual de células necróticas quando submetidas a fração ao antitumoral clorambucil (Figura 29D).

Figura 29 - Avaliação morfológica por alaranjado de acridina das células Jurkat após 24 h de incubação com fração Hex, vincristina e clorambucil.



A morfologia foi avaliada pela técnica descrita no item 4.6.6. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. (A) controle negativo, aumento de 20x; (B1) fração Hex 10 µg/mL, aumento de 20x; (B2) fração Hex 10 µg/mL, aumento de 40x; (C) vincristina 40 nM, aumento de 20x; (D) clorambucil 20 µM, aumento de 20x. v: células viáveis; a: células apoptóticas; n: células necróticas.

Yang e colaboradores (2014), com a utilização do corante alaranjado de acridina, verificaram indução de apoptose de células A549, quando incubadas com ácido gálico isolado das partes aéreas de *Euphorbia tibetica* Boiss.

Neste sentido Sandoval e colaboradores (2002), também notaram efeito apoptótico do látex avermelhado de *Croton palanostigma* Klotzsch em células de câncer gastrointestinal (AGS, HT29 e T84).

6.1.2.6 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica rápida capaz de quantificar organelas e componentes celulares e dentre eles, o DNA (SPYRATOS, 1993). Sua mensuração

ocorre através do auxílio de fluoróforos, que se ligam ao DNA e emitem fluorescência proporcional ao conteúdo genético presente nas fases do ciclo celular das células em análises (JAYAT; RATINAUD, 1993). Estas são didaticamente classificadas em Sub G0, G0/G1, S e G2/M, representando estado de repouso, síntese de componentes; síntese de DNA; pré divisão e divisão respectivamente (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

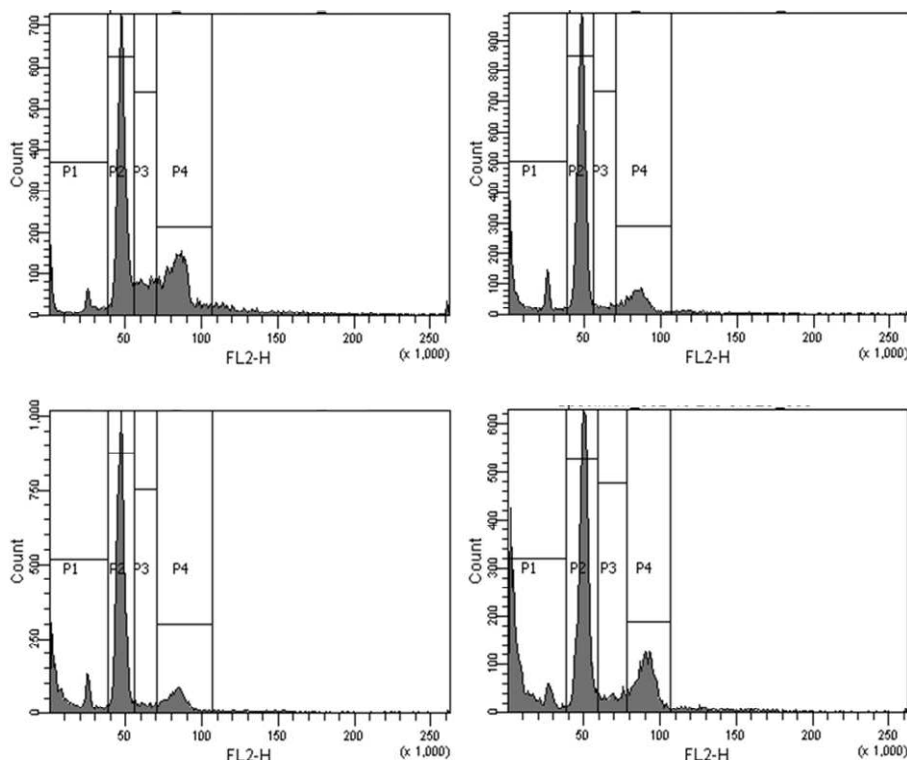
Na oncologia a citometria é amplamente empregada no desenvolvimento de novos medicamentos, identificação de células neoplásicas, bem como no auxílio de diagnóstico e monitoramento do tratamento (JAYAT; RATINAUD, 1993).

Na tabela 9 está demonstrado o resultado obtido neste experimento. As células Jurkat incubadas por 24 h com a fração Hex apresentaram aumento no número de células fragmentadas em relação ao grupo controle (Figura 30). As concentrações de 2 e 20 µg/mL promoveram acréscimo da população celular na fase G0/G1 e redução nas fases S e G2/M o que demonstra parada de ciclo, ou seja, diminuição da proliferação de células leucêmicas.

Tabela 9 - Distribuição do ciclo celular das células Jurkat após tratamento com a fração hexânica. A análise do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo, conforme descrito no item 4.6.7. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média, utilizando análise de variância ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey, com significância de ***p<0,001.

DISTRIBUIÇÃO CICLO CELULAR					
AMOSTRAS		SUB G0	G0/G1	S	G2/M
CTRL		10,06 ± 0,33	46,68 ± 0,75	10,88 ± 0,21 ***	26,20 ± 0,86
FRAÇÃO Hex (µg/mL)	2	16,54 ± 0,77 ***	60,90 ± 0,64 ***	4,020 ± 0,09 ***	14,94 ± 0,29 ***
	20	21,40 ± 0,66 ***	57,26 ± 0,48 ***	4,680 ± 0,22 ***	13,34 ± 0,63 ***
	40	26,66 ± 1,14 ***	45,32 ± 0,98	6,080 ± 0,28	17,48 ± 0,45 ***

Figura 30 - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.



P1, P2, P3 e P4 representam as fases do ciclo celular correspondendo respectivamente a Sub G0, G0/G1, S e G2/M. (A) controle negativo; (B) fração Hex 2 µg/mL; (C) fração Hex 20 µg/mL; (D) fração Hex 40 µg/mL.

De Oliveira e colaboradores (2013) verificaram redução da quantidade de células B16F10 nas fases S-G2/M, após serem tratadas com o látex de *E. umbellata* nas concentrações de 1,22; 2,44 e 4,88 mg/mL. Mota, Benfica e Valadares (2012) mostraram a influência do extrato bruto das partes aéreas sobre a linhagem leucêmica K-562, a qual causou alteração no ciclo celular, evidenciando aumento no percentual das células nas fases G0/G1 e G2/M; e diminuição da fase S. Este mesmo extrato na concentração de 60 µg/mL, ao ser incubado com células ascíticas tumorais de Ehrlich, refletiu aumento da fase G1 e diminuição da fase S (MOTA *et al.*, 2012).

Somado a este resultado, os autores também avaliaram o mecanismo de morte celular, com auxílio dos fluoróforos anexina V e iodeto de propídio. Dessa forma, observaram decréscimo de células viáveis, concomitantemente a ocorrência de células em apoptose tardia e em menor proporção, células necróticas (MOTA *et al.*, 2012).

Porém a técnica permite ir além dos extratos brutos, conforme analisado por Acqua e colaboradores (2011), que após isolarem ésteres de deucanos, submeteram a avaliação em células Jurkat. Com isso verificaram aumento celular da fase sub G0 para células Jurkat (ACQUA *et al.*, 2011). Para esta mesma linhagem celular, o alcaloide haemantamina induziu modificações no ciclo celular, com aumento da fase G1 e diminuição das fases S e G2 (HAVELEK *et al.*, 2014).

FITOQUÍMICA

7 FITOQUÍMICA

7.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

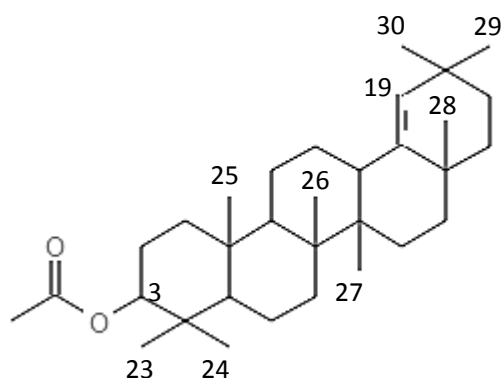
7.1.1 Procedimento extrativo e caracterização das substâncias isoladas

A avaliação fitoquímica auxilia a identificação das substâncias de interesse, a qual é precedida pelas etapas de coleta, estabilização e secagem, moagem, extração, fracionamento, isolamento, purificação e por fim a elucidação estrutural de substâncias originárias do metabolismo secundário vegetal (BRAZ FILHO, 2010; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

É um estudo que pode ser direcionado utilizando informações etnofarmacológicas ou biomonitorado por ensaios biológicos; por meio dos quais se faz a purificação da matriz vegetal bruta, objetivando o isolamento das substâncias de interesse farmacológico (GOMES, 2010).

As frações Hex, CHCl_3 , AcOEt e MeOH apresentaram rendimento de 23,08%, 20,31%, 0,27% e 3,54% respectivamente. A subfração 16 foi isolada a partir da fração Hex particionada do látex. Esta substância foi identificada como sendo acetato de germanicol (Figura 31), através da interpretação dos dados espectrais de RMN e comparação com resultados encontrados na literatura (GONZÁLEZ *et al.*, 1981).

Figura 31 - Acetato de germanicol: estrutura química.

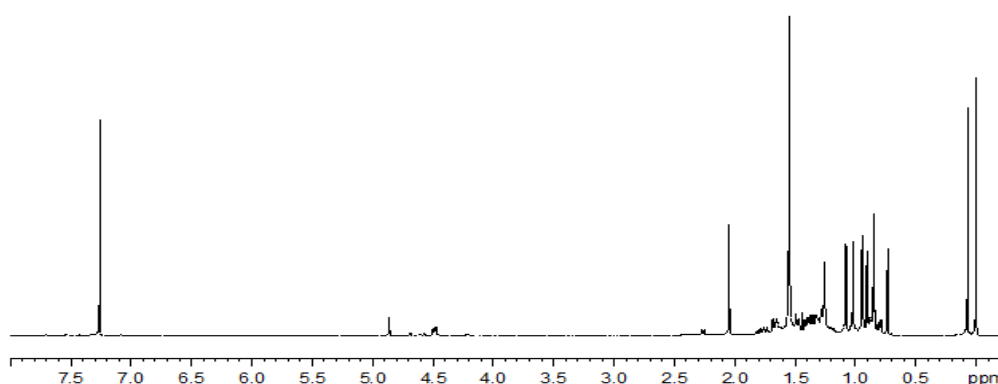


González e colaboradores (1981) demonstraram os deslocamentos químicos para a substância germanicol. Como não há relatos do isolamento do acetato de germanicol, o grupamento acetato pôde ser confirmado através dos dados literários

descritos por Alves e colaboradores (2001). Os autores isolaram o triterpeno butirospermol, que por sua vez é acetilado, sendo os dados espectrais próximos aos apresentados para o carbono carbonílico e aquele ligado a metila do acetato de germanicol.

O espectro de RMN ^1H em clorofórmio deuterado (CDCl_3) referente ao acetato de germanicol (Figura 32) evidencia sinais correspondentes aos hidrogênios das metilas, hidrogênio olefínico (s) na região de δ_{H} 4,8 e um duplo dubleto em δ_{H} 4,5.

Figura 32 - Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , para o acetato de germanicol.



O duplo dubleto em δ_{H} 4,5 foi atribuído ao H_3 da estrutura elucidada e um singlete em δ_{H} 4,8 referente ao H_{19} (Figura 33). Os deslocamentos químicos na região de δ_{H} 0,7 a 1,6 aproximadamente correspondem aos hidrogênios das metilas em C_{17} , C_{23} , C_{24} , C_{25} , C_{27} , C_{29} e C_{30} (Figura 34).

Figura 33 - Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , para o acetato de germanicol com detalhamento dos sinais em δ_{H} 4,5 e 4,8..

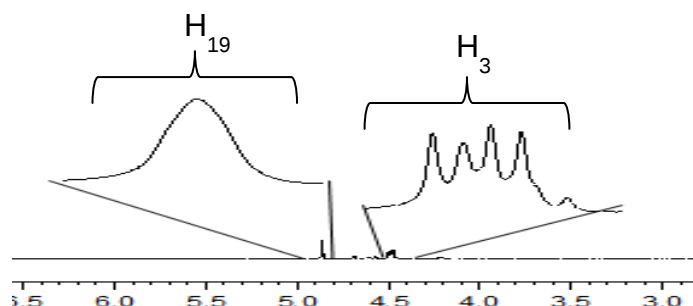
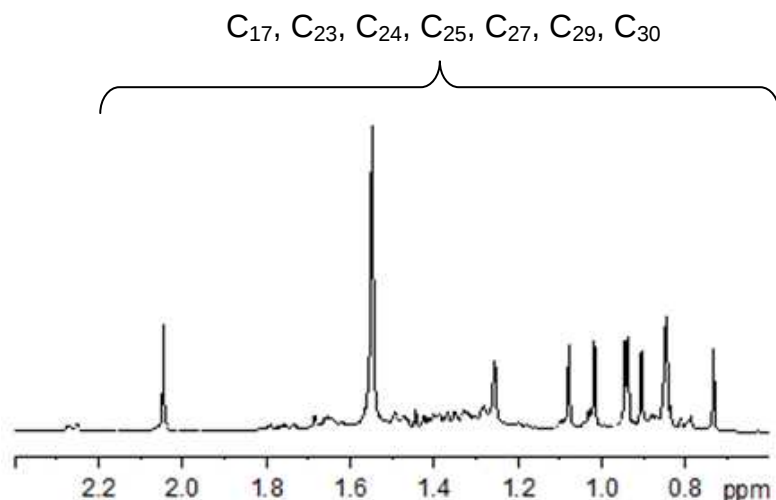


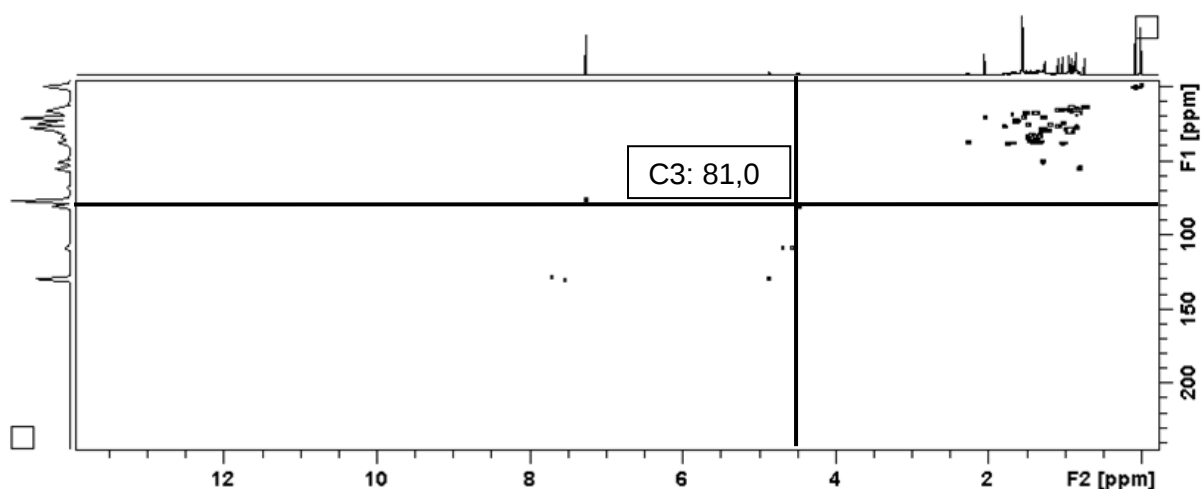
Figura 34 - Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , para o acetato de germanicol com detalhamento dos sinais em δ_{H} 0,7 a 1,6.



O espectro de RMN ^{13}C (DEPT) apresentou 32 sinais de deslocamentos químicos (Tabela 10) atribuídos aos carbonos do acetato de germanicol.

Nota-se na região de δ_{C} 129,7 e 142,7 sinais atribuídos aos carbonos olefínicos. Percebe-se ainda um sinal na região de δ_{C} 81,0, referente ao deslocamento químico do carbono carbinólico. Os demais sinais de deslocamento dos carbonos estão de acordo com dados da referência, confirmando, portanto se tratar do acetato de germanicol (HSQC, Figura 35).

Figura 35 - Espectro de RMN de HSQC.



Na região de δ_C 170,9 observa-se um sinal atribuído ao carbono carbonílico do grupamento acetato ligado ao oxigênio do C_3 (HMBC ,Figura 36). Observa-se também na região de δ_C 21,4 um sinal conferido ao carbono metilênico ligado ao carbono carbonílico, confirmando a presença do grupamento acetato presente na estrutura (não demonstrado).

Figura 36 - Espectro de RMN de HMBC.

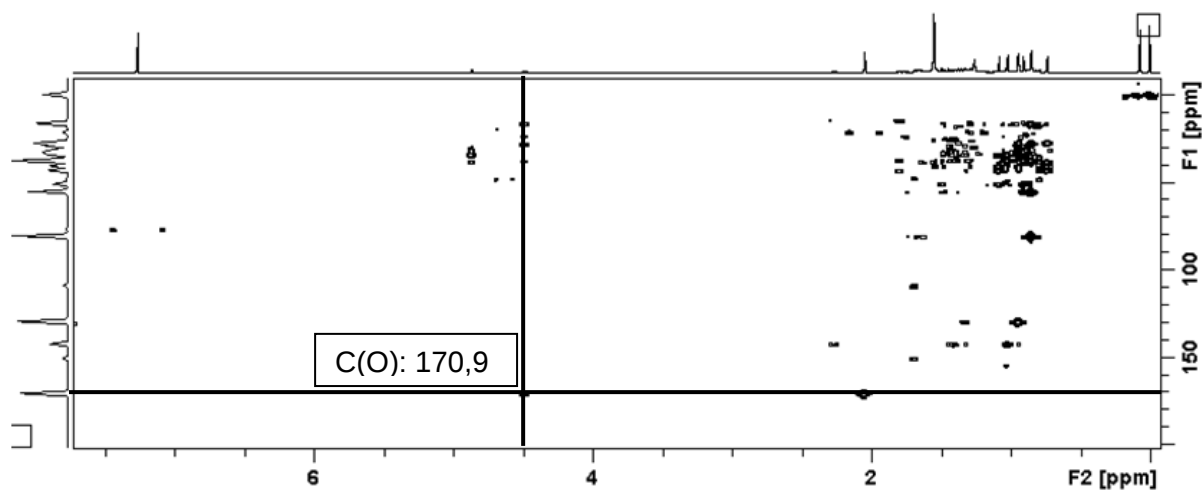


Tabela 10 - Dados de RMN para o acetato de germanicol em comparação com dados da literatura (A - GONZÁLEZ *et al.*, 1981, B - ALVES *et al.*, 2001).

DADOS DE RMN PARA O ACETATO DE GERMANICOL			
Carbono	d _C Multiplicidade ^{α,β}	Dados da literatura - A	Dados da literatura - B
1	38,2, CH ₂	38,5	36,9
2	23,7, CH ₂	23,8	24,3
3	81,0, CH	81,0	81,2
4	37,9, qC	37,9	37,9
5	55,5, CH	55,7	50,9
6	18,1, CH ₂	18,2	23,8
7	34,5, CH ₂	34,6	117,6
8	40,9, qC	40,9	146,0
9	51,1, CH	51,2	48,9
10	37,1, qC	37,3	34,9
11	21,2, CH ₂	21,2	18,1
12	26,2, CH ₂	26,1	33,8
13	38,4, CH	38,7	43,7
14	43,3, qC	43,4	51,4
15	27,5, CH ₂	27,6	34,0
16	37,2, CH ₂	37,7	28,5
17	34,3, qC	34,4	53,3
18	142,7, qC	142,7	13,2
19	129,7, CH	129,8	22,1
20	32,2, qC	32,4	35,8
21	33,2, CH ₂	33,4	18,6
22	37,8, CH ₂	37,5	35,3
23	27,9, CH ₃	28,0	25,4
24	16,5, CH ₃	16,5	125,2
25	16,8, CH ₃	16,1	130,9
26	16,2, CH ₃	16,8	18,7
27	14,6, CH ₃	14,5	27,7
28	25,3, CH ₃	25,3	27,6
29	31,3, CH ₃	31,3	27,4
30	29,2, CH ₃	29,2	15,9
C(O)	170,9, qC	-----	170,9
C(O)CH ₃	21,4, CH ₃	-----	21,7

Os resultados observados indicam maior concentração de compostos de baixa polaridade no látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. Assim como verificado por Costa e colaboradores (2012), os quais confirmaram dentre os metabólitos secundários, a presença de majoritária de terpenos. Classe metabólica esta também encontrada em outras espécies de Euphorbiaceae. Outros trabalhos também descrevem o isolamento de terpenos de diversas espécies de

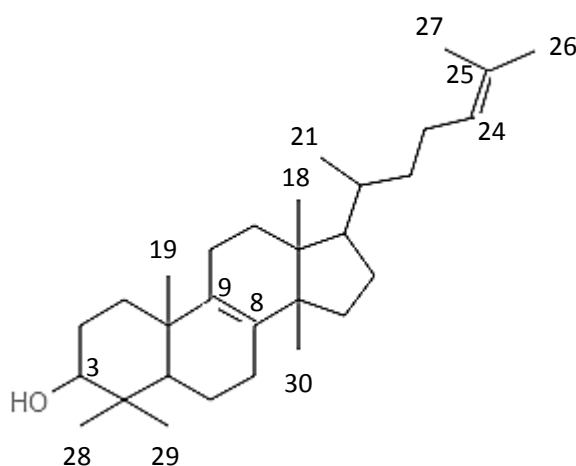
Euphorbiaceae, conforme Fernandes e colaboradores (2013) ao isolarem das raízes de *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill., moléculas de jatrofano; bem como Zhang e colaboradores (2012), que a partir das raízes de *E. kansuensis* extraíram terpenos (ZHANG *et al.*, 2012).

Ragasa e Cornélio (2013) isolaram do extrato bruto de *E. hirta* triterpenos pentacíclicos como taraxerona, α -amirina e β -amirina. Os dados espectrais mostraram deslocamento de 217,6 para o carbono carbonílico (C₃) presente para substância taraxerona, bem como valores de δ_C 117,2 a 157,6 para carbonos insaturados (C₁₄, C₁₅) em taraxerona e (C₁₂, C₁₃) para α,β -amirina. Ainda para as substâncias α,β -amirina pôde-se observar deslocamento na região de 79,1, correspondendo ao carbono ligado ao grupamento hidroxila (C₃).

Além de Euphorbiaceae, outras famílias podem apresentar substâncias triterpênicas e neste sentido Ruphin e colaboradores (2013) isolaram a quinona triterpênica a partir do caule de *Salacia leptoclada* Tul. (Celastraceae). Por espectros de RMN verificou-se dois carbonos carbonílicos com deslocamento de δ_C 178,3 (C₂₉) e δ_C 178,7 (C₂), 8 carbonos insaturados com sinais na região de δ_C 117,1 a δ_C 170.

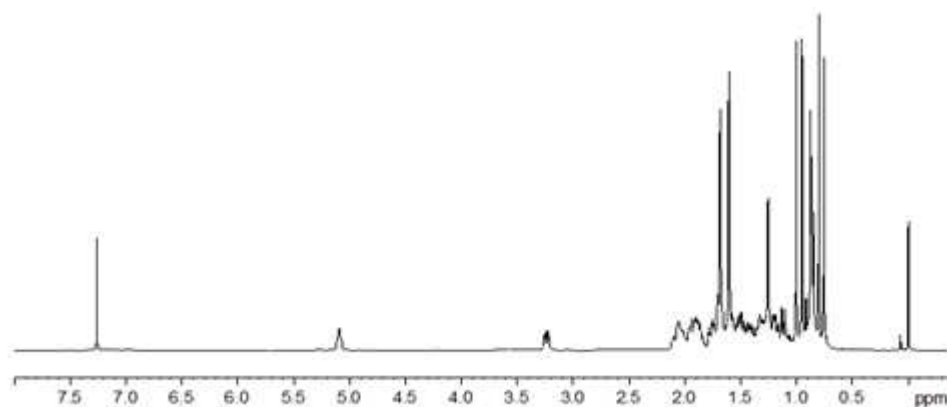
A subfração 27-39, também isolada a partir da fração Hex, revelou substância pura (cristais) que foi identificada como sendo o eufol (Figura 37).

Figura 37 - Eufol: estrutura química.



A estrutura foi definida através da interpretação dos dados espectrais de RMN ^1H (Figura 38), ^{13}C (DEPT) e comparação dos dados da literatura (DUTRA *et al.*, 2012; TSOPMO; KAMNAING, 2011).

Figura 38 - Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 para o eufol.



O duplo dubleto em 3,3 foi atribuído ao H_3 (Figura 39) da estrutura proposta e os deslocamentos químicos na região de 0,7 a 1,7 atribuído aos hidrogênios das metilas (Figura 40). O multiplete em δ_{H} 5,1 foi atribuído ao H_{24} da estrutura proposta.

Figura 39 - Detalhamento dos sinais em δ_{H} 3,3 e 5,1.

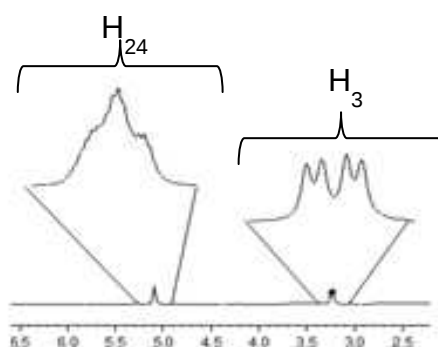
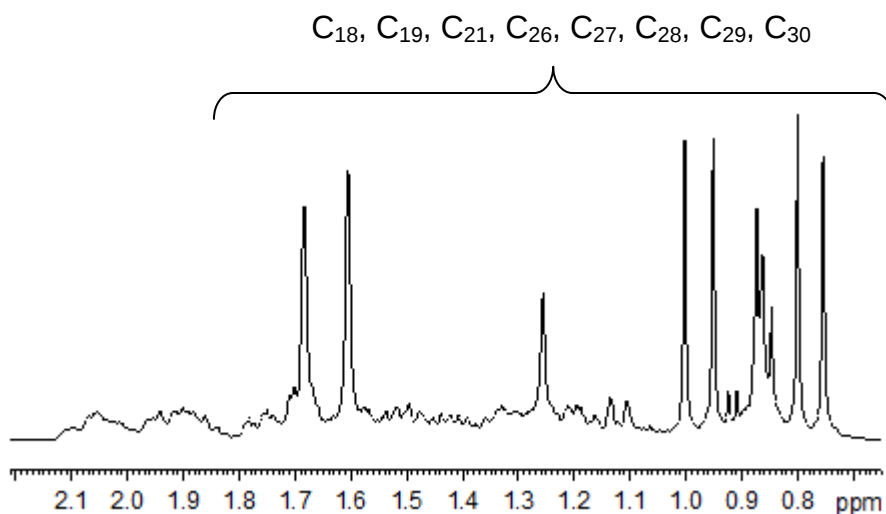


Figura 40 - Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 para o eufol com detalhamento dos sinais em δ_{H} 0,7 a 1,7.



Os sinais de deslocamentos químicos na região e 0,8 a 1,8 aproximadamente são referentes aos hidrogênios das metilas em C_{18} , C_{19} , C_{21} , C_{26} , C_{27} , C_{28} , C_{29} , C_{30} . O espectro de RMN ^{13}C (DEPT) em CDCl_3 para o eufol (Figura 41 e tabela 11) foi comparado com dados existentes da literatura .

Figura 41 - Espectro de DEPT (A) e RMN ^{13}C (B) em CDCl_3 para o eufol com detalhamento dos sinais em δ_{C} 125,2 a 130,8.

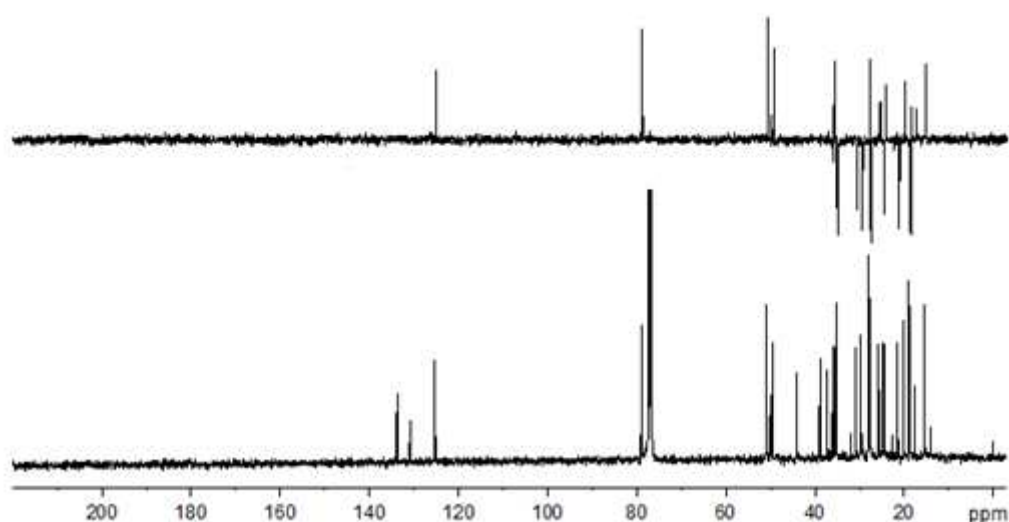


Tabela 11 - Dados de RMN para o eufol em comparação com dados da literatura (DUTRA *et al.*, 2012).

DADOS DE RMN PARA O EUFOL		
Carbono	d _C Multiplicidade ^{α,β}	Dados da literatura
1	35,2 CH ₂	35,4
2	27,9** CH ₂	28,0
3	79,0, CH	79,2
4	38,9 qC	39,2
5	50,9 CH	51,2
6	18,9 CH ₂	19,2
7	27,6** CH ₂	28,0
8	134,0 CH	134,3
9	133,5, CH	133,8
10	37,2 qC	37,5
11	21,5 CH ₂	21,7
12	30,9 CH ₂	31,1
13	44,1 qC	44,3
14	50,0 qC	50,2
15	29,7 CH ₂	30,0
16	28,1 CH ₂	28,3
17	49,6 CH	49,9
18	15,6 CH ₃	15,8
19	20,1 CH ₃	20,4
20	36,3 CH	36,1
21	18,7 CH ₃	19,1
22	35,2 CH ₂	35,7
23	24,7, CH ₂	25,0
24	125,2, CH	125,4
25	130,8 qC	131,1
26	17,7 CH ₃	17,9
27	25,7 CH ₃	25,9
28	28,0 CH ₃	28,2
29	15,5 CH ₃	15,7
30	24,5 CH ₃	24,9

** intercambiáveis

O eufol, assim como o acetato de germanicol são terpenos, com a diferença que a primeira substância é um terpeno tetracíclico e o segundo, pentacíclico.

Trabalhos anteriores isolaram este terpeno do látex e casca de *E. umbellata* (MUNHOZ *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013). Em diferentes espécies de *Euphorbia* já foram identificados o eufol: *E. lathyris* L. (KOOPS; BAAS e GROENVELD, 1991) *E. tirucalli* (DUTRA *et al.*, 2012), *E. resinifera* O. Berg (MAZOIR

et al., 2008), *E. sapinii* De Wild. (TSOPMO; KAMNAING, 2011), *E. kansui* (PENG *et al.*, 2012a).

Triterpenos tetracíclicos (3 α -hidroxitirucala-8,24-dien-21-óico e 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-óico) foram encontrados em *Protium heptaphyllum* March (Bourseraceae), em que o espectro de RMN de ^{13}C de ambas as substâncias apresentaram deslocamento químico na região de δ_{C} 75,58 e 75,96 correspondente ao carbono ligado ao grupamento hidroxila (MAIA *et al.*, 2000). Porém, por se tratarem de substâncias diferentes, dados específicos foram mostrados para os carbonos C₇, C₈, C₉, C₂₄ e C₂₅.

Ragasa e Cornélio (2013) extraíram de *E. hirta* as substâncias (25-hidroperoxicicloart-23-en-3 β -ol e 24-hidroperoxicicloart-25-en-3 β -ol, caracterizadas como triterpênicas. Para a o triterpeno hidroperoxicicloart-23-en-3 β -ol ficou evidenciado sinais em 78,8 para o C₃, de 130,7 e 134,4 para os carbonos C₂₃ e C₂₄, ligados por instauração. Enquanto a outra estrutura de diferencia pelos carbonos C₂₄ e C₂₅, por estes fazerem parte da dupla ligação.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- ✓ A identificação botânica juntamente com a análise morfoanatômica permitiu confirmar a sinonímia das espécies conhecidas regionalmente como *Synadenium grantii* e *Synadenium umbellatum*, as quais tem como nomenclatura aceita *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns.
- ✓ A interpretação morfoanatômica bem como a presença de látex, compostos lipofílicos, fenólicos, amido, mucilagem e compostos nitrogenados, favoreceram a padronização da espécie para o controle de qualidade da matéria prima vegetal.
- ✓ Os ensaios biológicos mostraram a existência de fundamentação científica sobre o conhecimento etnofarmacológico de *E. umbellata*. Neste sentido o látex foi citotóxico para células HeLa, HRT-18 e Jurkat em maior ou menor proporção. O direcionamento biomonitorado favoreceu a descoberta da fração com melhor potencial citotóxico. Dentre as partições analisadas (Hex, CHCl₃, AcOEt e MeOH) a fração Hex foi a que conferiu resultado promissor. Em relação aos tratamentos avaliados, as células leucêmicas foram as que sofreram maior influência do látex e da fração Hex. Esta evidenciou IC₅₀ de 1,87 µg/mL.
- ✓ Ao compará-la com células não neoplásica, verificou-se seletividade superior a 2; o que traduz seletividade efetiva e menor toxicidade para células normais em comparação às cancerígenas.
- ✓ A morfologia fluorescente revelou indícios de que o processo de morte celular ocorreu principalmente por apoptose e não necrose.
- ✓ Por citometria de fluxo foi demonstrado a existência de parada de progressão celular, através do aumento percentual da população de células na fase Sub G0, G0/G1 e redução nas fases S, G2/M.
- ✓ A investigação fitoquímica biomonitorada possibilitou o isolamento de 2 substâncias, identificadas por análise espectrais de RMN como acetato de germanicol e eufol.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ACQUA, S. D. *et al.* Natural daucane sesquiterpenes with antiproliferative and proapoptotic activity against human tumor cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 5876–5885. 2011.
- ALONSO-CASTRO, A. J. *et al.* Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 945–972. 2011.
- ALONSO-CASTRO, A. J. *et al.* Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 438–442. 2012.
- ALVARENGA, Érika C. *et al.* Potenciais alvos terapêuticos contra o câncer. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 66, 2014.
- ALVES, C. C. F. *et al.* Triterpenos, esteroide glicosilado e alcaloide isolados de *Simira glaziovii*. **Floresta e Ambiente**, v. 8, p. 174-179. 2001.
- ANAZETTI, M. C. *et al.* Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, p. 261-274. 2003.
- ANDERSEN, O. M. *et al.* Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). **Phytochemistry**, v. 71, p. 1558-1563. 2010.
- ANDRADE, C. A. DE. *et al.* Ensaios biológicos utilizados na pesquisa de produtos naturais. In SOUZA, G. H. B.de; MELLO, J. C. P.de; LOPES, N. P.(Org.) **Farmacognosia Coletânea Científica**. Ouro Preto: UFOP, 2012.
- ASSAF, A. M. *et al.* Anti-cancer, anti-inflammatory and anti-microbial activities of plant extracts used against hematological tumors in traditional medicine of Jordan. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 728–736. 2013.
- ATCC. Disponível em <http://www.atcc.org/>. Acesso em 20 de agosto de 2014.
- ÁVILA, L. *et al.* Effects of diterpenes from latex of *Euphorbia lactea* and *Euphorbia laurifolia* on human immunodeficiency virus type 1 reactivation. **Phytochemistry**, v. 71, p. 243-248. 2010.
- AYATOLLAHI, A. M. *et al.* Two new lathyrane type diterpenoids from *Euphorbia aellenii*. **Fitoterapia**, v. 81, p. 891–893. 2010.
- AZMIR, J. *et al.* Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426–436. 2014.
- BAGAVATHI, R.; SORG, B.; HECKER, E. Tiglane-type diterpene esters from *Synadenium grantii*. **Planta Medica**, v. 54, p. 506-510, 1988.

BARRETINA, J. The cancer cell line encyclopedia enables predictive modeling of anticancer drug sensitivity. **Nature**, v. 483, p. 603-607. 2012.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. Técnicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976, v.1.

BERLYN, G. P.; MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976.

BHANOT, A; MALLESHAPPA, R. S.; NOOLVI, N. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, p. 09-26. 2011.

BIESKI, I. G. C. *et al.* Ethnopharmacology of medicinal plants of the Pantanal region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-36, 2012.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**, v. 24, p. 119-124. 1985.

BOSCARDIN, P. M. D. *et al.* In Vitro Cytotoxic Potential of Essential Oils of *Eucalyptus benthamii* and Its Related Terpenes on Tumor Cell Lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-8. 2012.

BRANDÃO, H. N. *et al.* Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, p. 1359-1369. 2010.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, p. 229-239, 2010.

BRITO, C. J. F. A.; ALQUINI, Y. A new method for staining botanical material embedded in glycol methacrylate (GMA). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, p. 949-951, 1996.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CIMANGA, R. K. *et al.* In vitro antiplasmodial activity of callus culture extracts and fractions from fresh apical stems of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae): part 2. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 399-404. 2004.

CINGI, M. R. *et al.* Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicenter approach. **Toxicology in Vitro**, v. 5, p. 119-125. 1991.

CORDEIRO, T. *et al.* Euphorbiaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB113>>. Acesso em: 05 de novembro de 2014.

COSTA, L. L. G. *et al.* Anti-ulcer activity of *Synadenium grantii* latex. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 5, p. 1070-1078. 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, p. 47-58. 2010.

CRUZ, M. *et al.* Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 15, p.1-5. 2009.

CUTTER, E.G. **Anatomia vegetal: células e tecidos**. 2 ed. São Paulo: Roca, 1986.

DE ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p.118-129. 2005.

DE OLIVEIRA, T. L. *et al.* Antitumoural effect of *Synadenium grantii* Hook f.(Euphorbiaceae) latex. **Journal of Ethnopharmacology**, v.150, p. 263–269. 2013.

DURMIC, Z., BLACHE, D. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 150-162. 2012.

DUTRA, R. C. *et al.* Euphol, a tetracyclic triterpene produces antinociceptive effects in inflammatory and neuropathic pain: The involvement of cannabinoid system. **Neuropharmacology**, v. 63, p. 593-605. 2012.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. C.de. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In SIMÕES *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2010. cap. 6. p. 107-122.

ESAÚ, K. Anatomia de Plantas com Sementes. Editora Edgard Blucher. 1974

FALKENBERG, M. DE. B., SANTOS, R. I. DOS., SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In SIMÕES *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2010. cap. 10. p. 229-246.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. In SIMÕES *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2010. cap. 10. p. 229-246.

FERREIRA, E. A. *et al.* Plantas medicinais utilizadas popularmente no Brasil para o tratamento do câncer. In SOUZA, G. H. B. de; MELLO, J. C. P. de; LOPES, N. P. **Farmacognosia coletânea científica**. Ouro Preto: UFOP, 2012. p. 319-338.

FILHO, C. S. *et al.* Agentes antineoplásicos. In SILVA, P. **Farmacologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 1055-1070.

FOLQUITO, D. G. *et al.* Analytical micrography and preliminary phytochemistry of the leaves and stems of *Lobelia exaltata* Pohl. (Campanulaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 33, p. 245-250. 2014.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2nd ed. Princeton: D. Van Nostrand. 1949.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters** v. 160, p. 171-177. 2006.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. Wiley, 2005. 580p.

GALES, R. C.; TOMA, C. Histo-anatomical data of some *Euphorbia* species from the romanian flora. **Biologie vegetală**, p. 5-12. 2006.

GALES, R. C.; TOMA, C. Researches regarding the morphology, structure and distribution of vegetative organs of some *Euphorbia* species from Romania's flora. **Biologie vegetală**, 40-45. 2007.

GOMES, E. T. Etnobotânica e etnofarmacologia. In: CUNHA, P. DA. Farmacognosia e fitoquímica. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010. cap. 3. p. 38-55.

GOMES, M. J. V. de M.; REIS, A. M. M. **Ciências Farmacêuticas: Uma Abordagem em Farmácia Hospitalar**. 1. ed São Paulo: Atheneu, 2011. cap. 24. p. 429-448.

GOYAL, M; NAGORI, B. P.; SASMAL, D. Wound healing activity of latex of *Euphorbia caducifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.144, p. 786–790. 2012.

GONZÁLEZ, A. G., *et al.* ^{13}C NMR Spectra of olean-18-ene derivatives. **Phytochemistry**, v. 20, p. 1919-1921. 1981.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. cap. 1. p. 13-28.

HAGEL, J. M.; YEUNG, E. C.; FACCHINI, P. J. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Science**, v. 13, p. 631-639. 2008.

HAO, B. A.; WU, J. L. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid. **Annals of Botany**, v. 85, p. 37-43, 2000.

HARISH, R.; SHIVANANDAPPA, T. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. **Food Chemistry**, v. 95, p. 180-185. 2006.

HASSAN, E. M.; MOHAMMED, M. M. D.; MOHAMED, S. M. Two new phorbol-type diterpene esters from *Synadenium grantii* Hook f. leaves. **Records of Natural Products**, v. 6, p. 255-262, 2012.

HAVELEK, R. et al. The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. **Phytomedicine**, v. 21, p. 479-490. 2014.

HSIEH, W. T. et al. Latex of *Euphorbia Antiquorum* Induces Apoptosis in Human Cervical Cancer Cells via c-Jun N-terminal Kinase Activation and Reactive Oxygen Species Production. **Nutrition and Cancer**, v. 63, p. 1339–1347. 2011.

HSIEH, W. T. et al. Latex of *Euphorbia antiquorum*-induced s-phase arrest via active ATM kinase and MAPK pathways in human cervical cancer HeLa cells. **Environmental Toxicology**, p.1-11. 2014.

HUANG, Y.F. et al. Application of morphoanatomy and microscopy in authentication of three species of traditional Chinese herbs of *Moghania*. **Pharmacognosy Journal**, v. 5, p. 30-40. 2013.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 124p. 2014.

IVANOVA, L. UHLIG, S. A bioassay for the simultaneous measurement of metabolic activity, membrane integrity, and lysosomal activity in cell cultures. **Analytical Biochemistry**, v. 376, p. 16-19. 2008.

JADRANIN, M. et al. Jatrophan diterpenoids from the latex of *Euphorbia dendroides* and their anti-P-glycoprotein activity in human multi-drug resistant cancer cell lines. **Phytochemistry**, v. 86, p. 208-217. 2013.

JAYAT, C., RATINAUD, M. H. Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications. **Biol Cell**, v. 78, p. 15-25. 1993.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, 1940.

KOOPS, A. J., BAAS, W. J., GROENVELD, H. W. The composition of phytosterols, latex triterpenols and wax triterpenoids in the seedling of *Euphorbia lathyris* L. **Plant Science**, v. 74, p. 185-191. 1991.

KUETE, V. et al. Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae). **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 536-542. 2010.

LAGE, H. et al. Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells. **Phytomedicine**, v. 17, p. 441–448. 2010.

LAVOR, A. K. L. S. *et al.* Association between drugs and herbal products: In vitro enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae) **European Journal of Integrative Medicine**, v. 6, p. 301-306. 2014.

LEE, D, E. *et al.* Euphorbiaceae: Acalyphoideae fossils from early Miocene New Zealand: *Mallotus–Macaranga* leaves, fruits, and inflorescence with in situ *Nyssapollenites endobalteus* pollen. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 163, p. 127–138. 2010.

LIMA, C. A. H. *et al.* Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 229-234. 2000.

LIN, M. W. *et al.* Euphol from *Euphorbia tirucalli* selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 4333-4339. 2012a.

LIN, J. *et al.*, Chemical Composition, Antimicrobial and Antitumor Activities of the Essential Oils and Crude Extracts of *Euphorbia macrorrhiz*. **Molecules**, v. 17, p. 5030-5039. 2012b.

LIU, C. *et al.* Two new diterpene derivatives from *Euphorbia lunulata* Bge and their anti-proliferative activities. **Fitoterapia**, v. 96, p. 33-38. 2014.

LUKOVIC', J. *et al.* Anatomical characteristics and antioxidant properties of *Euphorbia nicaeensis* ssp. *glareosa*. **Central European Journal of Biology**, v. 4, p. 214-223. 2009.

MADUREIRA, A. M. *et al.* Euphoportlandols A and B, Tetracyclic Diterpene Polyesters from *Euphorbia portlandica* and Their Anti-MDR Effects in Cancer Cells. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 950-953. 2006.

MAIA, R. M. *et al.* Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Bourseraceae): caracterização em misturas binárias. **Química Nova**, v. 23, p. 623-626. 2000.

MANNHEIM, B. **Apoptosis and Cell Proliferation**. 2ed. Biochemica, 1998. 139p.

MANOSROI, J. *et al.* Anti-proliferative activities on HeLa cancer cell line of Thai medicinal plant recipes selected from MANOSROI II database. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 422-431. 2012.

MAZOIR, N. *et al.* Bioactive triterpene derivatives from latex of two *Euphorbia* species. **Phytochemistry** v. 69, p. 1328-1338. 2008.

MEER, F. J. VAN DER. *et al.* Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. **Lasers Med Sci**, v. 25, p. 259–267. 2010.

MENON, M. *et al.* Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex

of *Synadenium grantii* Hook, 'f'. **Plant Science** v. 163, p. 131-139. 2002.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. Anatomy of the Dicotyledons, Systematic Anatomy of the leaf and stem. v.1. 2 Ed. Clarendon Press, Oxford, 1957.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Trib. Farm.**, v. 4, p. 1-19. 1979.

MOREIRA, J. *et al.* Anti-hyperalgesic activity of corilagin a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 318-323. 2013.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTA, M, F, DA. *et al.* Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 319– 329. 2012.

MOTA, M. F. DA., BENFICA, P. L., VALADARES, M. C. *Synadenium umbellatum* Pax. promotes cell cycle arrest and induces apoptosis in K-562 leukemia cells. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 497-506. 2012.

MUNHOZ, A. C. M. *et al.* Chemical and Pharmacological Investigation of the Stem Bark of *Synadenium grantii*. **Planta Med**, v. 80, p. 458-464. 2014.

NIELSEN, P. E. *et al.* Steroids from *Euphorbia* and other latex-bearing plants. **Phytochemistry**, v. 18, p. 103-104. 1979.

NOBILI, S. *et al.* Natural compounds for câncer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 365-378. 2009

NOGUEIRA, I. A. L. *et al.* Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 474-478. 2008.

NOGUEIRA, D. R. *et al.* Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for in vitro cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, p. 51-58. 2011.

NOLDIN, V.F.; ISAIAS, D.B.; CECHINEL FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: Importância Química e Farmacológica. **Química Nova**, v. 29, p. 549-554, 2006.

NOSÁL'OVÁ, G.; MOKRÝ, J.; HASSAN, K. M. T. Antitussive activity of the fruit extract of *Embllica officinalis* Gaertn. (Euphorbiaceae). **Phytomedicine**, v. 10, p. 583-589. 2003.

OCHWANG'I, D. O. *et al.* Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County, Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 1040-1055. 2014.

OLIVEIRA, F.; AKISUE G. **Fundamentos de farmacobotânica**. Rio de Janeiro (RJ): Editora Atheneu, 1989.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo (SP): Editora Atheneu, 2005.

OLIVEIRA JR, R. J. *et al.* Viabilidade celular e citotoxicidade de células neoplásicas de camundongos tratadas com látex de *Synadenium grantii* Hook. **Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC** - Fortaleza, 2005.

OLOWOKUDEJO, J. D. Comparative epidermal morphology of west African species of *Jatropha* L. (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 111, p. 139-154. 1993.

ORTÊNCIO, W. B. **Medicina popular do Centro-Oeste**. 2nd edition. Thesaurus, Brasília, 322p. 1997.

PENG, Q. *et al.* Chemical constituents of *Euphorbia kansui*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p. 64-66. 2012a.

PENG, F. *et al.* Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant effects of isolated phenolic compounds from fresh ginger. **Fitoterapia**, v. 83, p. 568–585. 2012b.

PESIC, M. New anti-cancer characteristics of jatrophone diterpenes from *Euphorbia dendroides*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 3165–3173. 2011.

RAGASA, C. Y.; CORNELIO, K. B. Triterpenes from *Euphorbia hirta* and their cytotoxicity. **Chinese Journal of Natural Medicines** v. 11, p. 528-533. 2013.

RAJESH, R. *et al.* Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. **Biochimie** v. 88, p. 1313-1322. 2006.

RIBBLE, D. *et al.* A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC Biotechnology**, v. 5, p. 1-7, 2005.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, p. 33-36, 1972.

RUPHIN, F. P. *et al.* Antiplasmodial, cytotoxic activities and characterization of a new naturally occurring quinone methide pentacyclic triterpenoid derivative isolated from *Salacia leptoclada* Tul. (Celastraceae) originated from Madagascar. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, p. 780-784. 2013.

SANDOVAL, M. *et al.* Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 121-129. 2002.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2nd ed. Ames: Iowa State College. 1951.

SAWADOGO, W. R. *et al.* Traditional west african pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 1225-1240. 2012.

SHI, Q. W.; SU, X. H.; KIYOTA, H. Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus *Euphorbia*. **Chem. Rev.**, v. 108, p. 4295-4327. 2008.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J.; KLEIN, R. M. Euforbiáceas. Itajaí, 1988.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, p. 1-44. 1998.

SPYRATOS, F. DNA content and cell cycle analysis by flow cytometry in clinical samples: application in breast cancer. **Biol Cell**, v. 78, p. 69-72. 1993.

STOCKERT, J. C. *et al.* MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica** v. 114, p. 785-796. 2012.

SUFFNESS, M., PEZZUTO J.M. **Assays for Bioactivity. In Methods in Plant Biochemistry**. K. Hostettmann (Editor). London Academic Press; 1991.

TABCHY, A. *et al.* Systematic Identification of Combinatorial Drivers and Targets in Cancer Cell Lines. **PLoS ONE**, v. 8, 2013.

THE PLANT LIST. Disponível em <http://www.theplantlist.org/>. Acesso em 25 de agosto de 2014.

TSOPMO, A., KAMNAING, P. Terpenoids constituents of *Euphorbia sapinii*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 218-221. 2011.

TRÓPICOS. Disponível em <http://www.tropicos.org/>. Acesso em: 25 de agosto de 2014.

UTHAISANG, W. *et al.* VR-3848, a novel peptide derived from Euphobiaceae, induces mitochondria-dependent apoptosis in human leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 208, p. 171-178. 2004.

UZABAKILHO, B.; LARGEAU, C.; CASADEVALL, E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli*, *Synadenium grantii*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 3041-3045. 1987.

VARGAS-CORTES, M; HELLSTROM, U; PERLMAN, P. Surface markers of human natural killer cells as analyzed in a modified single cell cytotoxicity assay on poly-g-lysine coated cover slips. **Journal of Immunological Methods**, v. 62, p. 87-99. 1983.

VASAS, A. *et al.* Cyclomyrsinane and premyrsinane diterpenes from *Euphorbia falcata* modulate resistance of cancer cells to doxorubicin. **Tetrahedron**, v. 68, p. 1280-1285. 2012.

WAKJIRA, K.; NEGASH, L. Germination responses of *Croton macrostachyus* (Euphorbiaceae) to various physico-chemical pretreatment conditions. **South African Journal of Botany**, v. 87, p. 76-83. 2013.

WANG, S.; YU, H.; WICKLIFFE, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 2147-2151. 2011.

WHELAN, L. C.; RYAN, M. I. Ethanolic extracts of *Euphorbia* and other ethnobotanical species as inhibitors of human tumour cell growth. **Phytomedicine**, v. 10, p. 53-58. 2003.

WHO. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em 19 de fevereiro de 2014.

YANG, S. DA *et al.* Chemical constituents from *Euphorbia stracheyi* and their biological activities. **Fitoterapia**, v. 97, p. 211-218. 2014.

YOUSSEF, J. *et al.* *Gochnatia polymorpha*: macro- and microscopic identification of leaf and stem for pharmacognostic quality control. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, p. 585-591. 2013.

ZHANG, B. B. *et al.* Triterpenoids of *Euphorbia kansuensis* Proch. **Fitoterapia**, v. 83, p. 1242-1247. 2012.