

**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**

LUIZA STOLZ CRUZ

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE SUBFRAÇÕES DO
LÁTEX DE *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns E EUFOL**

**PONTA GROSSA
2017**

LUIZA STOLZ CRUZ

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE SUBFRAÇÕES DO
LÁTEX DE *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns E EUFOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Orientador: Prof^o. Dr. Flávio Luís Beltrame
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Cristine Kanunfre

**PONTA GROSSA
2017**

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

Cruz, Luiza Stolz

C955 Avaliação da atividade citotóxica de subfrações do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns e eufol/ Luiza Stolz Cruz. Ponta Grossa, 2017.
65f.

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 Carla Cristine Kanunfre.

1.Euphorbia umbellata. 2.Leucemia. 3.Terpenos. 4.Forbol. 5.Índice de seletividade. I.Beltrame, Flávio Luís. II. Kanunfre, Carla Cristine. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 615.321

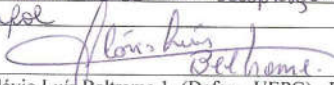
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS
APLICADAS À FARMÁCIA, NÚMERO DA ATA 01/2017, DA MESTRANDA LUIZA STOLZ
CRUZ REALIZADO NO DIA 06 DE MARÇO DE 2017, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA.

Aos seis dias de fevereiro de dois mil e dezessete, às 14h00min no Auditório do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Bloco M, sala 115, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência do Professor Doutor Flávio Luís Beltrame reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Luiza Stolz Cruz na linha de pesquisa: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia/Avaliação Química e Biológica de produtos naturais, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Kátia Sabrina Paludo (UEPG/PR) e Anderson Barison (UFPR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título do trabalho foi: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA FRAÇÃO HEXANO OBTIDA A PARTIR DO LÁTEX DE *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns E DA SUBSTÂNCIA ISOLADA EUFOL. Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se - ~~favorável a aprovação~~ a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 60 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

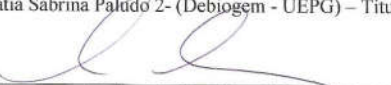
Observações (se necessário):

Alteração de título: sim ☒ não ☐

Novo título: Atividade citotóxica da subfração do látex de *Euphorbia umbellata* e eupfol


Flávio Luís Beltrame 1- (Defar - UEPG) - Presidente


Kátia Sabrina Paludo 2- (Debiogem - UEPG) - Titular


Anderson Barison 3- (Dequim - UFPR) - Titular

Ponta Grossa, 06 de março de 2017.

DEDICATÓRIA

*Dedico aos meus ídolos e fãs,
Adriane e Jefferson.
E à minha melhor metade, Laura.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus** que em Sua infinita sabedoria proveu-me com a vontade do saber, que me cerca de oportunidades e pessoas maravilhosas, proporcionando o meu crescimento e aprendizagem;

À minha amiga, conselheira, musa inspiradora, também chamada de mãe, **Adriane**, por seu amor incondicional, sua paciência infinita, seu apoio e exemplo;

Ao meu ídolo e pai, **Jefferson**, por todo seu amor, apoio e exemplo;

À minha melhor metade, **Laura**, por me ensinar a ser uma pessoa melhor;

Aos meus **avós**, presentes ou não, que sempre me incentivaram;

Ao meu orientador, profº **Flávio**, pela confiança depositada, por exemplificar o verdadeiro significado de mestre, compartilhando de forma tão generosa seus conhecimentos;

À minha co orientadora, profª **Carla**, por todos os ensinamentos e auxílio;

À **família do lab M-23** por todos os momentos compartilhados, os ensinamentos trocados, o apoio e incentivo, e, principalmente, pelas risadas;

Aos meus **amigos** pelas conversas, conselhos e carinho;

Aos **professores** do programa de pós graduação em ciências farmacêuticas pelos ensinamentos;

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao CNPq, à CAPES e à Fundação Araucária pela infra estrutura e recursos financeiros;

À todos que de alguma forma tenham contribuído para a realização desse trabalho.

*"I am among those who think that
science has great beauty. A scientist
in his laboratory is not only a technician:
he is also a child placed before natural
phenomena which impress him like a fairy tale"*

Marie Curie

RESUMO

CRUZ, Luiza Stolz. **Avaliação da atividade citotóxica de subfrações do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns e eufol.** 2017. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2017.

Euphorbia umbellata (Pax) Bruyns tem seu látex utilizado, etnofarmacologicamente, para tratamento de câncer, incluindo leucemias. Uma doença maligna que atinge os leucócitos, com alta incidência, sendo o tipo de câncer mais comum na infância. O tratamento quimioterápico é, na maioria dos casos, o mais recomendado, mas apresenta-se como terapia muito agressiva e com diversos efeitos colaterais. Por conseguinte, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o potencial citotóxico da fração hexano do látex de *Euphorbia umbellata* suas subfrações e da substância isolada, eufol, frente a linhagens modelo de leucemia. Para tanto as células, Jurkat e HL-60, foram tratadas por 72 horas com a fração hexano (1,25-75 µg/mL), subfrações éter de petróleo, diclorometano, etanol e metanol (1,25-75 µg/mL) e com o eufol (10-50 µg/mL), sendo sua viabilidade celular avaliada pelo ensaio de redução do MTT ao final deste período. Para a subfração diclorometano (mais ativa) foi avaliada a viabilidade celular no período de 24 e 48 horas, além de ter sido determinado o índice de seletividade. Cabe ressaltar que a fração hexano e as subfrações foram obtidas por fracionamento em extrator de Soxhlet, enquanto o eufol, por precipitação ácida, seguida de cromatografia em coluna, e sendo identificado por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas. A fração hexano e as subfrações resultantes foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. A avaliação cromatográfica das subfrações permitiu sugerir 10 substâncias, os triterpenos: eufol; lanosterol; cicloartenol; tirucalol; taraxasterol e lupeol, os diterpenos: forbol-12,13,20-triacetato; 4-β forbol e 3-desoxo-3-16-dihidroxi-12-desoxiforbol-3-13-16-20-tetracetato, e o esteroide sitosterol. Como resultado do ensaio citotóxico obteve-se, para a fração hexano uma CI_{50} de $0,061 \pm 1,226$ µg/mL para as células HL-60 e $4,624 \pm 1,088$ µg/mL para células Jurkat; para o eufol uma CI_{50} de $21,031 \pm 1,778$ µg/mL (HL-60) e $35,925 \pm 5,011$ µg/mL (Jurkat). Dentre as subfrações a diclorometano apresentou o melhor perfil de resposta com valores de $0,005 \pm 0,098$ µg/mL (HL-60) e $0,200 \pm 0,957$ µg/mL (Jurkat), revelando que o tratamento é tempo dependente. Ademais a subfração diclorometano mostrou-se seletiva para o tratamento de leucemia com índices de seletividade superior a 2. Portanto, conclui-se que a subfração diclorometano é a promissora para o tratamento de leucemia, possivelmente por ação sinérgica dos terpenos nela presente.

Palavras-chave: *Euphorbia umbellata*, leucemia, terpenos, forbol, índice de seletividade.

ABSTRACT

CRUZ, Luiza Stolz. **Avaliação da atividade citotóxica de subfrações do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns e eupol.** 2017. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2017.

Euphorbia umbellata (Pax) Bruyns has its latex used, ethno-pharmacologically, for the treatment of cancer, including leukemias. A malignant disease that affects leukocytes, with high incidence, being the most common type of cancer in childhood. Chemotherapy treatment is, normally, the most recommended, but it presents as very aggressive therapy and with several side effects. Therefore, the objective of this work was to evaluate the cytotoxic potential of the hexane fraction of *Euphorbia umbellata* latex, the subfraction of that and the isolated substance, euphol, against leukemia model lines. For this, the cells, Jurkat and HL-60, were treated for 72 hours with the hexane fraction (1.25-75 µg/mL), subfractions petroleum ether, dichloromethane, ethanol and methanol (1.25-75 µg/mL), and euphol (10-50 µg/mL), and their cell viability was evaluated by the assay of MTT reduction at the end of this period. For the dichloromethane subfraction (the most active), the cell viability was evaluated in the period of 24 and 48 hours, in addition, the selectivity index was determined. It should be noted that the hexane fraction and subfractions were obtained by fractionation in Soxhlet extractor, while euphol by acid precipitation, followed by column chromatography, and being identified by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. The hexane fraction was partitioned and the resulting subfractions were analyzed by gas chromatography coupled to the mass spectrometer. The chromatographic evaluation of the subfractions allowed to suggest 10 substances, the triterpenes: euphol; lanosterol; cycloartenol; tirucallol; taraxasterol and lupeol, the diterpenes: phorbol-12,13,20-triacetate; 4-β-phorbol and 3-deoxo-3-16-dihydroxy-12-deoxyphorbol-3-13-16-20-tetracetate, and the steroid sitosterol. As a result of the cytotoxic assay, an IC₅₀ of 0.061 ± 1.226 µg/mL was obtained for HL-60 cells and 4.624 ± 1.088 µg/mL for Jurkat cells; and for euphol an IC₅₀ of 21.031 ± 1.778 µg/ml (HL-60) and 35.925 ± 5.011 µg/ml (Jurkat). Among the subfractions, the dichloromethane presented the best response profile with values of 0,005±0,098 µg/mL (HL-60) and 0,200±0,957 µg/mL (Jurkat), revealing that the treatment is time dependent. In addition, the dichloromethane subfraction was selective for the treatment of leukemia with indexes of selectivity superior to 2. Therefore, it is concluded that the subfraction dichloromethane is promising for the treatment of leukemia, possibly by synergistic action of the terpenes in it.

Keywords: *Euphorbia umbellata*, leukemia, terpenes, phorbol, selective index

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Foto do método de coleta do látex de <i>Euphorbia umbellata</i>	26
Figura 2 - Cromatograma da fração hexano de látex de <i>Euphorbia umbellata</i>	32
Figura 3 - Cromatograma da fração éter.....	33
Figura 4 - Cromatograma da fração diclorometano.....	34
Figura 5 - Cromatograma da fração etanol.....	35
Figura 6 - Cromatograma da fração metanol.....	36
Figura 7 - Espectro de ^1H em CDCl_3 da fração hexano.....	37
Figura 8 - Espectro de ^1H em CDCl_3 da subfração éter.....	37
Figura 9 - Espectro de ^1H em CDCl_3 da subfração diclorometano.....	38
Figura 10 - Espectro de ^1H em CDCl_3 da subfração etanol.....	38
Figura 11 - Espectro de ^1H em CDCl_3 da subfração metanol.....	39
Figura 12 - Estruturas das substâncias sugeridas nos cromatogramas.....	40
Figura 13 - Estrutura química do eufol.....	43
Figura 14 - Espectro de ^1H em CDCl_3 da fração E1.....	43
Figura 15 - Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ em CDCl_3 da fração E1.....	44
Figura 16 - Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) em CDCl_3 da fração E1.....	45
Figura 17 - Mapa de correlação HSQC da fração E1.....	47
Figura 18 - Mapa de correlação HMBC da fração E1.....	48
Figura 19 - Cromatograma da fração E1.....	48
Figura 20 - Efeito da fração hexano do látex de <i>Euphorbia umbellata</i> na viabilidade de células leucêmicas.....	50
Figura 21 - Efeito das subfrações da fração hexano do látex de <i>Euphorbia umbellata</i> na viabilidade de células leucêmicas - Jurkat.....	51
Figura 22 - Efeito das subfrações da fração hexano do látex de <i>Euphorbia umbellata</i> na viabilidade de células leucêmicas - HL60.....	52
Figura 23 - Efeito da subfração diclorometano na viabilidade de células leucêmicas em diferentes tempos de tratamento.....	54
Figura 24 - Efeito do eufol na viabilidade de células leucêmicas.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Exemplos de patentes estatudinense contendo extratos de <i>Euphorbia</i>	20
Tabela 2 - Condição gradiente da fase móvel da cromatografia em coluna.	27
Tabela 3 - Dados do RMN de ^1H e ^{13}C experimentais e da literatura (Dutra <i>et al.</i> , 2012).	45
Tabela 4 - Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) determinado para o tratamento com as subfrações para cada linhagem celular.....	53
Tabela 5 - Valores de CI_{50} para as linhagens Jurkat e HL-60 em diferentes tempos de tratamento.	55
Tabela 6 - Valores de CI_{50} para as linhagens linfócitos, monócitos, Jurkat e HL-60, após 48 horas de tratamento com subfração diclorometano.	55
Tabela 7 - Valores de índice de seletividade para subfração diclorometano.	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

®	Marca registrada
%	Porcentagem
° C	Graus Celsius
AKT	Proteína quinase B
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD	Cluster de diferenciação (<i>Cluster of differentiation</i>)
CDK2	Quinase ciclina dependente 2 (<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>)
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CI ₅₀	Concentração inibitória 50
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a detector de massas
CKIsp21	Inibidor de quinase ciclina dependente p21 (<i>Cyclin-dependent kinase inhibitors p21</i>)
CKIsp27	Inibidor de quinase ciclina dependente p27 (<i>Cyclin-dependent kinase inhibitors p27</i>)
CL ₅₀	Concentração letal 50
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-2	Enzima ciclo-oxigenase isoforma 2
DL ₅₀	Dose letal 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERK1/2	Proteína quinases reguladas por sinalização extracelular 1 e 2 (<i>Extracellular signal-regulated protein kinases 1 e 2</i>)
g	Grama
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
h	Horas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

Hz	Hertz
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível (<i>Inducible nitric oxide synthases</i>)
IS	Índice de seletividade
J	Constante de acoplamento
kg	Quilograma
L	Litro
LLA	Leucemia linfoide aguda
LLC	Leucemia linfoide crônica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
M	Molar
min.	Minutos
mL	Mililitro
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
MS	Espectroscopia de massa (<i>Mass spectrometry</i>)
NFκB	Fator nuclear kappa B (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
NIST	Instituto nacional de norma e tecnologia (<i>National Institute of Standards and Technology</i>)
nm	Nanômetro
O	Oeste
p27^{kip1}	Inibidor da quinase ciclina dependente 1B (<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>)
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio (<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PBS	Tampão fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
ppm	Partes por milhão
PR	Paraná
Rb	Proteína retinoblastoma
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
Rt	Tempo de retenção
S	Sul

TGF-β	Fator de crescimento transformante β (<i>Transforming growth factor β</i>)
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
U	Unidade
u.m.a	Unidade de massa atômica
μg	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO.....	17
2.1 LEUCEMIA	17
2.2 FAMÍLIA EUPHORBIACEAE	18
2.3 GÊNERO <i>Euphorbia</i> Linné.	19
2.4 ESPÉCIE <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns	20
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 GERAL	24
3.2 ESPECÍFICOS.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 REAGENTES E SOLVENTES	25
4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	25
4.3 ESTUDO FITOQUÍMICO	25
4.3.1 Material vegetal.....	25
4.3.2 Fracionamento	26
4.3.3 Isolamento de compostos	26
4.3.4 Análise cromatográfica e espectroscópica	27
4.4 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA.....	28
4.4.1 Linhagens celulares e condições de cultivo celular	28
4.4.2 Ensaio de citotoxicidade por redução de azul de tetrazólio (MTT).....	28
4.5 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE.....	29
4.5.1 Isolamento de linfócitos e monócitos humanos.	29
4.5.2 Avaliação de citotoxicidade da subfração diclorometano por redução mitocondrial de MTT.	30
4.5.3 Cálculo dos índices de seletividade	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E ESPECTROCÓPICA.....	32
5.2 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS	42
5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DA FRAÇÃO HEXANO, SUBFRAÇÕES E EUFOL	49
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A leucemia é uma doença maligna que atinge os glóbulos brancos (leucócitos) e caracteriza-se pelo acúmulo de células imaturas anormais na medula óssea. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a leucemia foi responsável por 4910 mortes no ano de 2014 e apresenta uma estimativa de 10070 novos casos para o ano de 2016.

Há um grande interesse da indústria farmacêutica na busca de alternativas terapêuticas para o tratamento de neoplasias, uma vez que a doença é bastante hostil, com altos índices de morbimortalidade e incidência, prognóstico desfavorável e tratamento cirúrgico e/ou quimioterápico, o qual é invasivo, agressivo e apresenta muitos efeitos adversos (Costa-Lotufo *et al.*, 2010).

As plantas medicinais são utilizadas popularmente para o tratamento das mais diversas doenças, seja como condição profilática ou curativa. Sua ampla aplicação é devido à grande variabilidade de compostos químicos presente neste material ou em seus extratos, que despertam o interesse de pesquisadores das mais diversas áreas, conduzindo à descoberta de novas moléculas bioativas (Maciel *et al.*, 2002). Assim, estudos etnofarmacológicos, fitoquímicos e farmacológicos, associados à síntese orgânica e biotecnologia avançada possibilitam que entre 25 e 30% de todos os medicamentos prescritos no mundo sejam derivados de produtos naturais (Borges *et al.*, 2013).

A crescente pesquisa de novas moléculas com atividade citotóxica e possibilidade do uso de plantas medicinais para tal fim é corroborada pelo fato de que oito medicamentos antitumorais relevantes e amplamente utilizados na terapêutica neolásica foram obtidos de plantas medicinais. Como exemplo tem-se a vincristina, vimblastina e análogo de vinorelbina provenientes de *Cantharantus roseus*; paclitaxel e análogo de docetaxel oriundo de *Taxus brevifolia* Nutt.; análogo de teniposídeo derivado de *Podophyllum peltatum* L. e, camptotecina, topotecano e análogo de irinotecano originário de *Camptotheca acuminata* Decne. (Costa-Lotufo *et al.*, 2010).

Nesse contexto insere-se a *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, uma espécie pertencente à família Euphorbiaceae, nativa da África tropical e de ocorrência principalmente em ambientes tropicais e subtropicais. No Brasil, tem seu látex utilizado, popularmente, na forma de uma garrafada, a qual é administrada

topicamente na redução de verrugas e oralmente para o tratamento de diabetes, úlcera, desordens inflamatórias, alergia, doença de Chagas, gripe, hemorragias internas, impotência sexual, lepra, obesidade, úlcera nervosa, cólicas menstruais e dores no corpo devido ao câncer (Oliveira Jr et al., 2005; Cunha *et al.*, 2009; Munhoz *et al.*, 2014).

Em trabalhos recentes, Camargo Luz et al. (2016) observaram a atividade citotóxica do látex de *E. umbellata* frente a modelos, *in vitro*, de câncer, destacando a baixa concentração necessária para inibir o crescimento de 50% das células leucêmicas. Além disso, foi determinado um alto índice de seletividade da fração hexano do látex, fato que sugere ação contra células tumorais com menor agressão às células normais. Contudo esses estudos carecem de execução de ensaios em outras linhagens cancerígenas, além de elucidação dos mecanismos de ação, em nível molecular.

Diante do exposto, esse estudo visa ampliar os conhecimentos quanto à composição química do látex, bem como avaliar o potencial citotóxico das frações apolares e substância isolada.

2 REVISÃO

2.1 LEUCEMIA

A leucemia é uma doença complexa, heterogênea e maligna que atinge os leucócitos, caracteriza-se pelo acúmulo de células anormais na medula óssea. Sua diferenciação é baseada em parâmetros morfológicos, clínico e biológico, sendo a classificação inicial pautada na linhagem celular atingida e a evolução clínica. Com isso, há quatro tipos principais: leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica, leucemia linfoblástica aguda e leucemia linfoblástica crônica (Song *et al.*, 2014).

A leucemia mieloide aguda (LMA) é caracterizada pela proliferação exagerada e descontrolada de blastos com características mieloides. Conforme a avaliação morfológica das células da medula, a doença é subclassificada em M0 e M1, mieloblástica imatura; M2 mieloblástica madura; M3, promielocítica; M4, mielomonocítica; M5, monocítica; M6, eritroleucemia; e M7, megacariocítica (Hamerschlak, 2008).

A leucemia mieloide crônica (LMC) é derivada de uma anormalidade genética conhecida como cromossomo filadelfia, no qual há alteração nos cromossomos 9 e 22. Apesar de ter um desenvolvimento lento (crônico) há casos nos quais se acelera o processo, tornando-se uma LMA (Hamerschlak, 2008).

Diferentemente da LMA, a leucemia linfóide aguda (LLA) é devida à produção descontrolada e exagerada de blastos com características linfóides (Hamerschlak, 2008). Enquanto a leucemia linfóide crônica (LLC) é uma neoplasia de linfócitos B maduros, caracterizada pela linfocitose no sangue periférico (Kumar, 2016).

Dentre os fatores etiológicos destacam-se as translocações cromossômicas, que estão presentes na maioria das neoplasias leucocitárias. Além disso, têm-se fatores genéticos hereditários, como síndrome Down e de Bloom que estão associadas à maior incidência de leucemia. Outras causas incluem a exposição à radiação, alguns tratamentos quimioterápicos e tabagismo (Kumar, 2016).

Leucemia em todas as suas formas apresenta distribuição mundial e todas as faixas etárias são atingidas, porém é o tipo de câncer com maior incidência em crianças e adolescentes (menores de 14 anos). Dados epidemiológicos mostram que a leucemia é responsável por um terço de todas as mortes por câncer no mundo e por 6316 mortes no ano de 2013, no Brasil (Mahbub *et al.*, 2013; INCA, 2014; Rahman *et al.*, 2015). Nos Estados Unidos, é descrito como a quinta neoplasia com maior taxa de óbito em homens e a sexta, em mulheres (Ryerson *et al.*, 2016).

O tratamento é dependente do quadro clínico, incluindo o tipo de leucemia, idade do paciente e seu estado de saúde. Entre os possíveis tratamentos estão a quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, radioimunoterapia, terapia gênica e transplante de medula, sendo a quimioterapia a mais comum, principalmente na fase inicial, onde almeja-se a remissão (Mahbub *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2015).

A quimioterapia é realizada em ciclos e se utiliza diferentes medicamentos, associados ou não. Por exemplo, para a LMA o tratamento inicial, geralmente, é realizado com análogos de nucleosídeo (citarabina ou azacitidina) e antraciclinas (idarubicina ou daunorrubicina) por 7 a 10 dias em dois cursos de tratamento, a cada 28 dias. Já para a LMC são utilizados os inibidores de tirosina quinase como o imatinibe, dasatinibe e nilotinibe. O tratamento para LLA inclui além da quimioterapia (doxorubicina, asparaginase, vincristina, corticoides, metotrexato, citarabina, 6-mercaptopurina e inibidores de tirosina quinase) para remissão, a prevenção de doenças no sistema nervoso central com quimioterapia intratecal. Após a remissão da LLA, o paciente ainda realiza ciclos de manutenção por 2 a 3 anos (Hamerschlag, 2008).

Entretanto esses compostos quimioterápicos possuem alto valor agregado, dificultando sua aquisição. Soma-se, o fato de serem, para as células normais, mutagênicos, carcinogênicos ou teratogênicos, além de não serem específicas, acarretando muitos efeitos colaterais, morte de células saudáveis, bem como o desenvolvimento de fenótipos resistentes (Mahbub *et al.*, 2013; Lebogo *et al.*, 2014; Rahman *et al.*, 2015).

Com isso buscam-se alternativas farmacológicas, sendo a flora uma importante fonte de novas substâncias terapêuticas. Como exemplo tem-se a vincristina, vimblastina e análogo de vinorelbina provenientes de *Cantharantus roseus*; paclitaxel e análogo de docetaxel oriundo de *Taxus brevifolia* Nutt.; análogo de teniposídeo derivado de *Podophyllum peltatum* L. e, camptotecina, topotecano e análogo de irinotecano originário de *Camptotheca acuminata* Decne. (Costa-Lotufo *et al.*, 2010).

2.2 FAMÍLIA EUPHORBIACEAE

A família Euphorbiaceae é amplamente distribuída pelo mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (Lucena e Alves, 2010). Segundo o arranjo sistemático elaborado por Webster (1994) são descritas 5 subfamílias, 49

tribos e 317 gêneros. No Brasil encontram-se aproximadamente 1000 espécies e 70 gêneros (Lucena e Alves, 2010). Com destaque para a *Hevea brasiliensis* Willd. Ex. A. Juss (seringueira) da qual se extrai o látex, para fabricação de borracha e *Manihot esculenta* Crantz (mandioca), as quais apresentam grande interesse econômico, além da *Ricinus communis* L. (mamona) de cujas sementes se extrai o óleo de rícino (Mwine e Van Damme, 2011).

As espécies pertencentes a essa família exibem grande potencial farmacológico. Dentre as várias atividades farmacológicas relatadas a ação anticâncer é destacada, sendo relacionada aos gêneros *Cnidocolus*, *Croton*, *Jatropha* e *Euphorbia* (De Melo *et al.*, 2011).

O interesse medicinal se dá pela ampla distribuição, o que expõe a vários estímulos ambientais predispondo a produção de uma variedade de metabólitos secundários. Já foi relatada a presença de alcaloides, saponinas, terpenos e compostos fenólicos, incluindo flavonoides e taninos (Mwine e Van Damme, 2011).

2.3 GÊNERO *Euphorbia* Linné.

O gênero *Euphorbia* Linné é descrito como o terceiro maior dentre as angiospermas, possuindo 1836 espécies reconhecidas (Ernst *et al.*, 2015). As espécies variam de árvores, arbustos, plantas suculentas a ervas anuais ou perenes. Sendo caracterizadas pela presença de látex, o qual causa processos inflamatórios e urticária se em contato com pele (Ferreira *et al.*, 2014).

Apesar da toxicidade, o uso medicinal de espécies do gênero é reconhecido há muitos anos, uma vez que as propriedades medicinais do "euphorbium" (látex de *Euphorbia resinifera*) foram documentadas por Hipócrates, Galeno e Dioscórides (Ernst *et al.*, 2015). Atualmente, estudos respaldam a etnofarmacologia das espécies pertencentes ao gênero, como avaliação da atividade anticâncer de *Euphorbia cheiradenia*, *Euphorbia hirta*, *Euphorbia tirucalli*, *Euphorbia antiquorum*, *Euphorbia umbellata* (Amirghofran *et al.*, 2006; De Melo *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2015; Behera *et al.*, 2016; Camargo Luz *et al.*, 2016), anti-HIV de *Euphorbia laurifolia* (Avila *et al.*, 2010), anti-inflamatória de *Euphorbia lacteal* (Fernandez-Arche *et al.*, 2010), antioxidante de *Euphorbia tirucalli* (Munro *et al.*, 2015).

Outro indicativo do forte potencial terapêutico do gênero é observado nas patentes registradas nos Estados Unidos (Tabela 1) e a aprovação, pelo FDA, do

Picato®, medicamento para controle da queratose actínica, cujo princípio ativo é o mebutato de ingenol, um diterpeno isolado de *Euphorbia peplus* L (Reis *et al.*, 2014).

Tabela 1- Exemplos de patentes estadunidense contendo extratos de *Euphorbia*.

Nº da patente	Indicação	Espécie envolvida
US 6844013	Imuno estimulação	<i>E. peplus</i> , <i>E. hirta</i> , <i>E. drummondii</i>
US 2003/0165579A1	Inibição tumoral	<i>E. antiquorum</i>
US 6432452	Composto anticâncer	<i>E. peplus</i> , <i>E. hirta</i> , <i>E. drummondii</i>
US 2003/0171334 A1	Câncer de próstata	<i>E. aaron-rossii</i> , <i>E. tirucalli</i> , <i>E. tomentella</i> , <i>E. tomentosa</i>
US 6923993	Componentes anticâncer	<i>E. obesa</i>
US 2007/0248694 A1	Anti-inflamatório	<i>E. hirta</i>
US 2006/0198905 A1	Doenças colon-retro-anal	<i>E. prostrata</i>

Fonte: adaptado de MWINE, 2011.

As diversas atividades estão associadas aos vários metabólitos já identificados como terpenos, taninos, flavonoides, ácidos fenólicos e esteroides. Dentre as várias classes de compostos os diterpenos são destacados como constituinte característico do gênero e relatados como responsáveis pela ação anticâncer das euphorbias (Gao *et al.*, 2015; Fei *et al.*, 2016).

2.4 ESPÉCIE *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns

Espécie pertencente à família Euphorbiaceae e ao gênero *Euphorbia* possui como sinônimas *Synadenium grantii* Hook.f. e *Synadenium umbellatum* Pax (Luz *et al.*, 2015). É um arbusto nativo ou pequena árvore nativa da África centro-oriental, atinge altura de 12 pés (3,6 metros) (Hassan *et al.*, 2012), caracterizada por folhas simples pecioladas e perinervadas, de coloração verde, com a face abaxial mais clara, medindo aproximadamente 12,4 cm de comprimento e 4,7 cm de largura, com

forma de espatulada a lanceolada, ápice obtuso, base atenuada e margem inteira (Luz *et al.*, 2015).

Encontrada nas regiões sul e centro oeste do Brasil, é conhecida popularmente como janaúba, leitossinha, cancerola, avelós de folha (Giardini, 2012; Luz *et al.*, 2015). Seu uso popular se dá através de uma garrafada, a qual consiste em 18 gotas do látex diluído em 1 litro de água, sendo administrado um cálice 3 vezes ao dia. Indicado para tratamento de alergias, câncer, cólicas menstruais, doença de Chagas, diabetes, dores no corpo, gripe, hemorragia, impinge, impotência sexual, lepra, leucemia, obesidade, tumores e úlcera nervosa (Ortêncio, 1997).

Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de diversas classes de metabólitos. Por exemplo, das folhas já foram isolados antocianinas, ésteres diterpenos do tipo forbol (Andersen *et al.*, 2010; Hassan *et al.*, 2012), das cascas do caule, triterpenos (eufol, friedelina e 3 β -friedelinol) (Munhoz *et al.*, 2014). Do látex já foram identificadas proteínas, pertencentes à classe serina-protease (Badgujar, 2014), outras proteases (Menon *et al.*, 2002) e glicoproteínas (Rajesh *et al.*, 2006); ésteres diterpênicos (Kingham, 1980), triterpenos, compostos fenólicos, ácidos orgânicos e graxos (Uzabakiliho *et al.*, 1987; Costa *et al.*, 2012). Ressaltando a presença de ésteres de forbois, relatados na literatura como responsáveis pela atividade anticâncer (Costa *et al.*, 2012).

Com relação com a toxicidade, Cunha e colaboradores (2009), utilizando 52 ratas Wistar, mostraram que o látex possui baixa toxicidade aguda, enquadrando a espécie *S. umbellatum* como classe 5 (substância com DL₅₀ superior a 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg).

Costa *et al.* (2012) avaliaram a toxicidade oral do látex puro e diluído em ratas tratadas com dose única de 0,5 mL/rato. Não foram demonstradas alterações macroscópicas significativas nos órgãos. Em relação aos parâmetros bioquímicos também não houve diferença estatística, porém o látex puro apresentou valores maiores de enzimas hepáticas (ALT e AST) do que a diluição. Os autores sugerem que os efeitos do látex sejam associados à sensibilização e alergia mediada pela eosinofilia, sendo independente da concentração e acompanhada de linfopenia. Outro teste de toxicidade realizado demonstrou que o látex puro possui alta toxicidade frente *Artemia salina*, sendo o efeito dose dependente, com um CL₅₀ de 26,58 μ g/mL. Esse dado possui correlação com a atividade anti-*Trypanosoma cruzi*,

inseticida e antitumoral.

Da Mota, Benfica e Valadares (2012) analisaram a atividade pro-apoptótica das partes aéreas de *S. umbellatum* frente à linhagem K-562 (células leucêmicas humanas), demonstrando que a apoptose ocorre via aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, ao promover a despolarização mitocondrial, externalização de fosfatidilserina e ativação da caspase 9.

Resultado semelhante foi observado em outro trabalho do grupo (Da Mota, Benfica, Batista, *et al.*, 2012) no qual investigaram os mecanismos de indução da morte celular em modelos de tumor de Ehrlich pelo extrato etanólico de folhas de *S. umbellatum*. E confirmaram que a apoptose é desencadeada por aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, aumento da concentração de cálcio, alteração da função mitocondrial, externalização de fosfatidilserina resultando na ativação das caspases e morte celular. Além disso, demonstram uma seletividade do extrato às células tumorais do que a medula óssea.

Nogueira e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antitumoral e antiangiogênica do extrato etanólico das partes aéreas de *S. umbellatum*, relatando uma redução significativa na produção de fator de crescimento vascular endotelial, além de indução da apoptose.

Hassan, Mohammed e Mohamed (2012) observaram a atividade citotóxica do extrato clorofórmico das folhas de *S. grantii* frente a células de MRC-5 (fibroblastos de pulmão humano fetal). Enquanto Campos e colaboradores (2016) determinaram a atividade antiproliferativa de extratos das cascas do caule de *S. grantii* e de um éster diterpeno tipo forbol sobre diversas linhagens celulares, incluindo as células K-562. O composto isolado não apresentou resultados tão promissores quanto às frações de forma geral. Os autores propõem que a maior eficácia das frações se de por sinergismo entre os diversos compostos presentes nelas.

De Oliveira et al. (2013), em ensaios *in vitro*, demonstraram que tanto o látex concentrado de *S. grantii* como a sua forma de uso popular, diluído, possuem atividade citotóxica frente linhagem B16F10 (células de melanoma). Em ensaio *in vivo*, os autores relataram observar redução significativa do volume do tumor de melanoma em camundongos.

Kanunfre e colaboradores (2017) avaliaram o potencial citotóxico de extrato bruto e frações obtidos a partir das cascas do caule de *E. umbellata* frente a

linhagem Jurkat. Concluíram que há ação citotóxica, sendo que a fração clorofórmio apresentou-se mais eficaz, tendo como mecanismos de ação envolvidos a parada de ciclo celular e a indução da apoptose.

Luz e colaboradores (2016) determinaram a atividade citotóxica do látex de *E. umbellata* e frações (hexano, clorofórmica, acetato de etila e metanólica) frente a diferentes modelos tumorais, linhagens HeLa (adenocarcinoma cervical humano), HRT-18 (adenocarcinoma ileocecal colónretal humano) e Jurkat (leucemia linfóide aguda). A fração hexano foi a mais citotóxica, obtendo o menor CI_{50} (1,87 $\mu\text{g/mL}$) para as células Jurkat, portanto apresentando-se como efetiva e promissora fração com atividade antitumoral frente às leucemias. De fato, quando analisado a seletividade da fração, o índice foi superior a 2 ($IS=4,30$), isto é, apresenta menor toxicidade às células normais do que às cancerígenas. Esse estudo indicou, ainda, que citotoxicidade está relacionada à parada do ciclo celular e a indução de morte celular por apoptose.

Todos estes trabalhos apresentados demonstram o potencial citotóxico de compostos presentes no látex de *Euphorbia umbellata* e nas suas frações e subfrações. Desta forma se faz importante se aprimorar estudos científicos a respeito destas matrizes, sendo objetivos deste trabalho os que se apresentam a seguir.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Caracterizar a fração hexano do látex de *Euphorbia umbellata* e avaliar o potencial citotóxico da fração, subfrações e substância isolada.

3.2 ESPECÍFICOS

- Fracionar o material vegetal para obtenção dos extratos hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol;
- Refracionar a fração hexano para obtenção de subfrações éter etílico, diclorometano, etanol e metanol;
- Avaliar o perfil químico da fração hexano e subfrações obtidas;
- Isolar metabólitos do látex;
- Identificar os metabólitos isolados;
- Avaliar a citotoxicidade da fração hexano e subfrações do látex de *E. umbellata* frente a diferentes modelos de células leucêmicas;
- Avaliar a citotoxicidade do eufol frente a diferentes modelos de células leucêmicas;
- Determinar o índice de seletividade da fração mais citotóxica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLVENTES

Hexano (Vetec), clorofórmio (Vetec), acetato de etila (Vetec), metanol (Vetec), éter de petróleo (Vetec), diclorometano (Vetec), etanol (Vetec), vanilina sulfúrica (Vetec), ácido sulfúrico (Vetec), dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec), meio de cultura RPMI 1640 (Gibco), soro fetal bovino (Gibco), tampão PBS, água ultra pura, solução de antibiótico (estreptomicina-penicilina) (Sigma Aldrich), bicarbonato de sódio (Vetec), glutamina (Vetec), piruvato de sódio (Sigma Aldrich), brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich), Histopaque 1077® (Sigma Aldrich).

4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Sílica 35-70 *mesh* (Merck); manta aquecedora (Fisatom); balança analítica (Shimadzu); evaporador rotativo (Fiaston); placa de cultura de 24 poços (Kasvi), incubadora de CO₂ (Sanyo), leitor de placas (Biotec), fluxo laminar (Veco), tubos de 2 mL e 50 mL (Kasvi), vortéx (Marconi), banho térmico (Logen), micropipetas (Brand), microscópio óptico (Olympus CX31, Olympus BX41), cromatógrafo a gás Agilente 7890 (Agilent), espectro de massas Agilent 5975C (Agilent) e espectrômetros Bruker AVANCE III HD 600 e Bruker AVANCE III 400.

4.3 ESTUDO FITOQUÍMICO

4.3.1 Material vegetal

O látex foi coletado por meio de cortes transversais no caule de *Euphorbia umbellata* (Figura 1), na cidade de Ponta Grossa (PR) (975 metros de altitude, 25° 05'38'' S de latitude, 50° 09'30'' O de longitude) em outubro de 2015. Sendo que sua identificação havia sido realizada em fevereiro de 2014. Uma exsicata foi depositada e registrada no Herbário Maria Eneida P. Kauffmann Fidalgo, do Instituto de Botânica de São Paulo, sob número de registro SP453920.

Figura 1 - Foto do método de coleta do látex de *Euphorbia umbellata*.



Fonte: a autora.

4.3.2 Fracionamento

O fracionamento foi realizado utilizando um extrator de Soxhlet (capacidade de 250 mL) com solventes de polaridade crescente. Para tanto 40,383 g de látex foram adsorvidos em quantidade suficiente de sílica 35-70 *mesh* (aproximadamente 28 g) e deixado em contato com cada um dos solventes por 5 horas, sendo na sequência, o solvente com o extrativo retirado e substituído por um de maior polaridade, segundo a sequência: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. As quatro frações foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C. Estas foram mantidas sob refrigeração até o momento do uso.

Parte da fração hexano (7,427 g) foi fracionada seguindo o mesmo protocolo executado para o látex *in natura*, entretanto os solventes utilizados foram éter de petróleo, diclorometano, etanol e metanol. Para este segundo fracionamento os mesmos volumes de solvente e tempos de extração foram utilizados.

4.3.3 Isolamento de compostos

O látex *in natura* (19,521 g) foi submetido a um processo de precipitação ácida. O procedimento consiste na adição do látex em 100 mL água acidificada (1%

ácido sulfúrico), seguido da adição de 100 mL de éter de petróleo, sob agitação, e filtração do precipitado. Este foi armazenado sob refrigeração até momento do uso.

Parte do precipitado (2,98 g) foi aplicada a uma cromatografia em coluna (CC) eluída de modo gradiente utilizando hexano e acetato de etila (Tabela 2). Resultando em 666 frações que foram estudas por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo a vanilina sulfúrica o revelador.

Tabela 2 - Condição gradiente da fase móvel da cromatografia em coluna.

Frações	Solvente	Volume (L)
1-117	Hexano: acetato de etila (95:5)	3
118-203	Hexano: acetato de etila (92,5:7,5)	2
204-297	Hexano: acetato de etila (90:10)	2
298-378	Hexano: acetato de etila (85:15)	2
379-454	Hexano: acetato de etila (75:25)	2
455-544	Hexano: acetato de etila (65:35)	1
545-666	Hexano: acetato de etila (50:50)	1,8

Fonte: A autora.

As frações semelhantes, conforme o fator de retenção (R_f), foram agrupadas. Desse processo, se obteve a fração E1 (junção das frações 244-255), a qual foi submetida à análise de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H), carbono (^{13}C), DEPT 135, HSQC e HMBC, análise cromatográfica e a identificação realizada a partir de comparação com a literatura.

4.3.4 Análise cromatográfica e espectroscópica

A análise cromatográfica da fração hexano e subfrações foi realizada em equipamento de cromatografia gasosa Agilent 7890 equipada com auto injetor. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna capilar (30 m x 25 mm diâmetro interno) de sílica fundida, recoberta por um filme (0,25 μm) de (5%-fenil)-metilpolisiloxano. Hélio foi usado como gás de arraste num fluxo de 1,0 mL/min.

A condição otimizada do forno foi 250 °C até 300 °C, em uma taxa de acréscimo de 5,0 °C/min., sendo a temperatura final mantida por 15 min. A temperatura do injetor foi 280 °C, e o volume de injeção 2 μL . A espectroscopia de massas foi determinada por um equipamento Agilent 5975C, quadrupólo simples. A

ionização na fonte ocorreu a 70 eV e os espectros obtidos no modo scan na faixa de m/z entre 40 a 600 u.m.a.. A temperatura da fonte do MS foi ajustada para 230 °C, a temperatura do quadrupólo em 150 °C e a temperatura da linha de transferência em 280 °C. O software utilizado foi Agilent Enhanced MDS Productivity ChemStation software (versão E.02.02, Santa Clara, CA, USA). As bibliotecas Wiley e NIST (version 2.0g) foram utilizadas a fim de auxiliar a identificação de substâncias.

Enquanto análise espectroscópica se deu em espectrômetro Bruker AVANCE III HD 600 e Bruker AVANCE III 400. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado e espectros de ^1H foram obtidos. Os resultados foram comparados com a literatura.

4.4 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA

A avaliação citotóxica foi determinada para a fração hexano, subfrações (éter de petróleo, diclorometano, etanol e metanol) e para a substância eufol conforme procedimentos descritos abaixo.

4.4.1 Linhagens celulares e condições de cultivo celular

Foram utilizadas células de diferentes linhagens de leucemias humanas como Jurkat (leucemia linfóide aguda de células T) e HL-60 (leucemia pró mielocítica aguda), as quais foram gentilmente cedidas pelo Prof^o Dr. Rui Curi do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

O cultivo celular se deu, em suspensão, em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 20 mM de bicarbonato de sódio, 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sódio e 1% da solução de penicilina-estreptomicina (100000 U/mL-10 mg/mL respectivamente) em estufa a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 .

4.4.2 Ensaio de citotoxicidade por redução de azul de tetrazólio (MTT)

As células foram semeadas na concentração de 1×10^5 células/mL em placas de 24 poços, sendo adicionados 500 μL /poço ($0,5 \times 10^5$ células/poço). Após 24 horas aplicou-se o tratamento, em concentrações variando de 1,25 a 75 $\mu\text{g/mL}$ (fração hexano e subfrações) e 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$ (eufol), obtidas a partir de uma solução estoque de 25 mg/mL em DMSO P.A.. Como controle negativo foi utilizado solução de DMSO em concentração igual à obtida em cada tratamento, sendo 0,25% para a fração hexano e subfrações e 0,4% para o eufol. Decorrido o tempo de tratamento -

72 horas - as células foram homogeneizadas e transferidas para tubos de 2 mL, centrifugadas a 220 g por 5 minutos, o sobrenadante foi removido. Sobre as células foi adicionado 400 µL do reagente azul de tetrazólio (MTT) na concentração de 0,5 mg/mL (diluído em meio de cultivo), seguido de ressuspensão e incubação por 30 minutos em estufa mantida a 37 °C e 5% de CO₂. Após esse período as células foram novamente centrifugadas, porém a 900 g por 5 minutos, retirou-se o sobrenadante e adicionou 300 µL DMSO P.A. para que houvesse solubilização dos cristais de formazan formados. As soluções foram transferidas para placas de 96 poços e as absorbâncias determinadas em espectrômetro a 550 nm. A fração mais potente, diclorometano, foi avaliada pelo período de 24 e 48 horas, afim de avaliar tempo dependência do tratamento.

4.5 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE

4.5.1 Isolamento de linfócitos e monócitos humanos.

Primeiramente, o isolamento de linfócitos humanos, foi submetido e aprovado o projeto junto ao Comitê de Ética (número 1.026.524). Amostra de sangue (40 mL) foi coletada em tubos a vácuo contendo anticoagulante (EDTA).

Para o isolamento de linfócitos foi utilizado o reagente Histopaque 1077[®]. O sangue total foi diluído em volume igual de PBS pH 7,4, o qual foi homogeneizado lentamente. Sobre o reagente Histopaque foi adicionado o sangue diluído, na proporção 1 mL de reagente para cada 2 mL de sangue diluído. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 500 g por 30 min. Após a centrifugação observa-se a separação do plasma (menor densidade), linfócitos e monócitos (densidade intermediária) e hemácias e neutrófilos (maior densidade).

Os linfócitos e monócitos foram coletados, diluídos em volume igual de PBS pH 7,4 e novamente centrifugados a 500 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado, o resíduo celular ressuspendido em 24 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). A suspensão celular foi plaqueada em placas de 24 poços e mantida por 2 h na incubadora de CO₂.

4.5.2 Avaliação de citotoxicidade da subfração diclorometano por redução mitocondrial de MTT.

Os monócitos são células aderentes, enquanto os linfócitos permanecem em suspensão. Após as 2 h, o meio, contendo os linfócitos, foi retirado das placas, reunido em tubo e centrifugado a 220 g por 5 min.. O pellet celular foi resuspenso em 5 mL de meio de cultura e contados em câmara de Neubauer. Sobre os monócitos aderidos foi adicionado meio de cultura. Posteriormente à contagem foi plaqueado 500 µL de uma suspensão celular a 1×10^6 células/mL, ou seja $0,5 \times 10^6$ células/poço.

Aguardou-se 1 h para estabilização celular e na sequência foram adicionadas diluições da subfração diclorometano nas concentrações de 5 a 200 µg/mL. Em 48 h de análise foi realizada a redução mitocondrial por MTT, para os linfócitos o procedimento foi semelhante ao descrito no item 4.5.2, porém com período de incubação superior, sendo de 2 horas.

Para os monócitos, o protocolo determina a retirada do meio de cultura, a adição de 400 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura), seguida da incubação por 4 horas em estufa mantida a 37 °C e 5% de CO₂. Decorrido o tempo, retira-se novamente o meio, adiciona 300 µL de DMSO P.A., solubiliza os cristais de formazan, transfere para placa de 96 poços e procede-se a leitura das absorbâncias em espectrômetro a 550 nm.

4.5.3 Cálculo dos índices de seletividade

O índice de seletividade é o quociente do CI₅₀ de células não neoplásica pelo CI₅₀ de células neoplásicas determinado pela equação.

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ células não neoplásicas}}{CI_{50} \text{ células neoplásicas}}$$

Para tanto foi estabelecido os valores de CI₅₀ para as linhagens cancerígenas Jurkat e HL-60, bem como para as células não neoplásicas linfócito e monócito tratadas com a subfração diclorometano pelo período de 48 horas.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram normalizados e analisados pelo programa estatístico *Graph Pad Prism* (versão 5). Executando-se análise de variância (ANOVA) de uma via, com pós-teste de Tukey, considerando $p < 0.05$. Sendo os resultados expressos em média + desvio padrão. Para determinação do CI_{50} foi utilizado o software *StatPlus* (versão 5.9.8), a análise de sobrevivência pela regressão de Probit, método de Finney (Finney, 1971). Os resultados foram expressos em $CI_{50} \pm$ erro padrão da média.

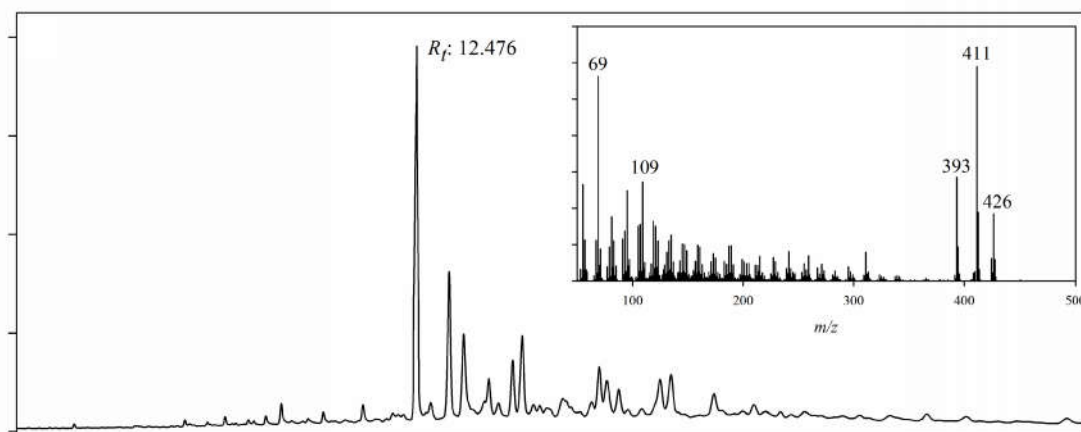
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E ESPECTROCÓPICA

A fração hexano e suas subfrações foram analisadas por CG/EM conforme descrito no item 4.3.4. Os cromatogramas são apresentados nas Figuras 2 a 6.

Dentre os diversos compostos observados na fração hexano a banda com tempo de retenção 12,476 min. destaca-se como o majoritário. O espectro de massas desta banda apresentou o pico em m/z 426, referente ao íon molecular $[M^+]$ e o pico base em m/z 411, fragmento referente à perda de grupamento metila, além do pico em m/z 393, associado à perda de água (Figura 2).

Figura 2 - Cromatograma da fração hexano de látex de *Euphorbia umbellata*.



Destaque para o espectro de fragmentação para a substância com tempo de retenção de 12,476 min. Fonte: a autora.

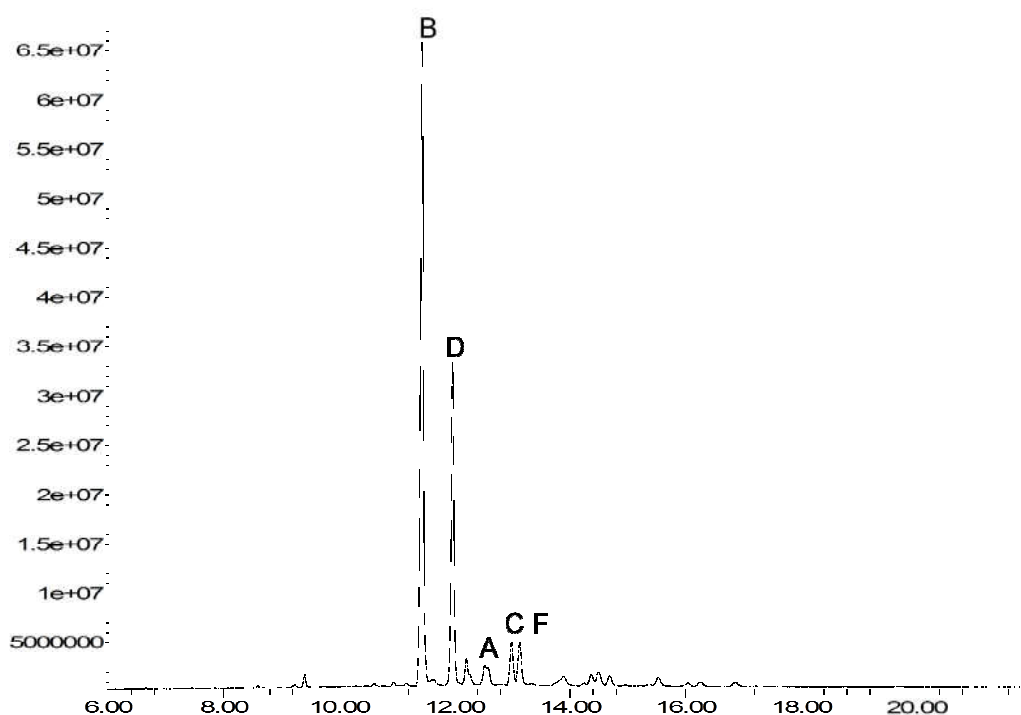
Da fração hexano do látex de *E. umbellata* já foi isolado eufol, conforme descrito por Camargo Luz e colaboradores (2016) assim como o acetato de germanicol, um triterpeno que apresenta potencial citotóxico quando comparado ao controle negativo, porém menos ativo do que o eufol. Além de terpenos, já foram isolados esteroides, como o citrostadienol, outra classe associada a atividades antitumorais (De Oliveira *et al.*, 2013).

De forma mais ampla já foram identificados terpenos (Costa *et al.*, 2012), proteínas (Menon *et al.*, 2002), glicoproteínas (Rajesh *et al.*, 2006), alcaloides, glicosídeos cianogênicos, fenólicos, saponinas (Badgujar, 2014), alcanos e ácidos graxos (Uzabakiliho *et al.*, 1987) no látex de *E. umbellata*.

Observa-se nos cromatogramas das subfrações a presença de terpenos amplamente descritos na literatura pra o gênero *Euphorbia*.

A subfração éter (Figura 3) apresentou perfil químico mais simples que a fração hexano analisada anteriormente (14 bandas cromatográficas, sendo destacada 5 bandas referentes aos componentes majoritários da subfração) e com as demais subfrações; foi possível observar, principalmente, substâncias da classe dos terpenos (triterpenos).

Figura 3 - Cromatograma da fração éter.

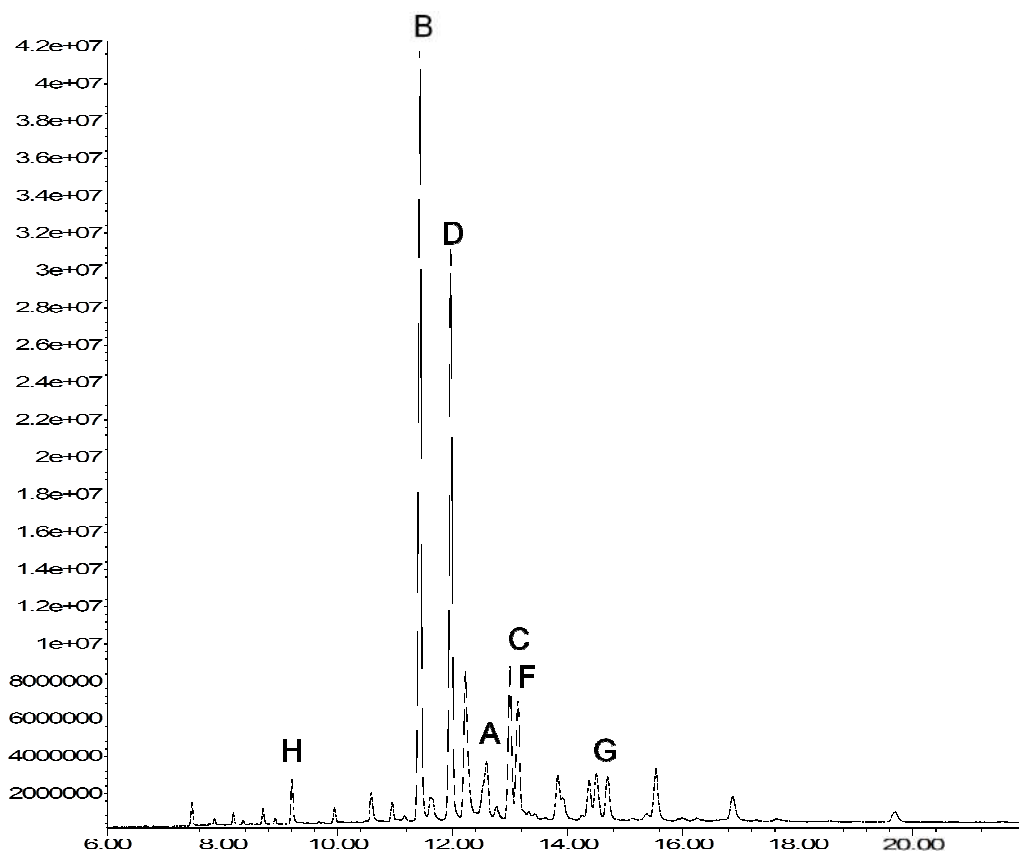


Substâncias sugeridas através do espectro de massas comparado a biblioteca de espectros NIST e Wiley: B Lanosterol (Rt: 11.444 min.); D Tirucalol (Rt: 11.974 min.); A Eufol (Rt: 12.581 min.); C Cicloartenol (Rt: 12.991 min.); F Taraxasterol (Rt: 13.131 min.).

Fonte: a autora.

A subfração diclorometano (Figura 4) apresentou um aumento no número de bandas cromatográficas (23 bandas cromatográficas, sendo destacada 7 bandas majoritárias), quando comparada a fração éter, sendo possível observar também a presença de possíveis compostos triterpênicos, além do diterpeno forbol-12,13,20-triacetato, já identificado no gênero *Euphorbia* (Costa *et al.*, 2012).

Figura 4 - Cromatograma da fração diclorometano.

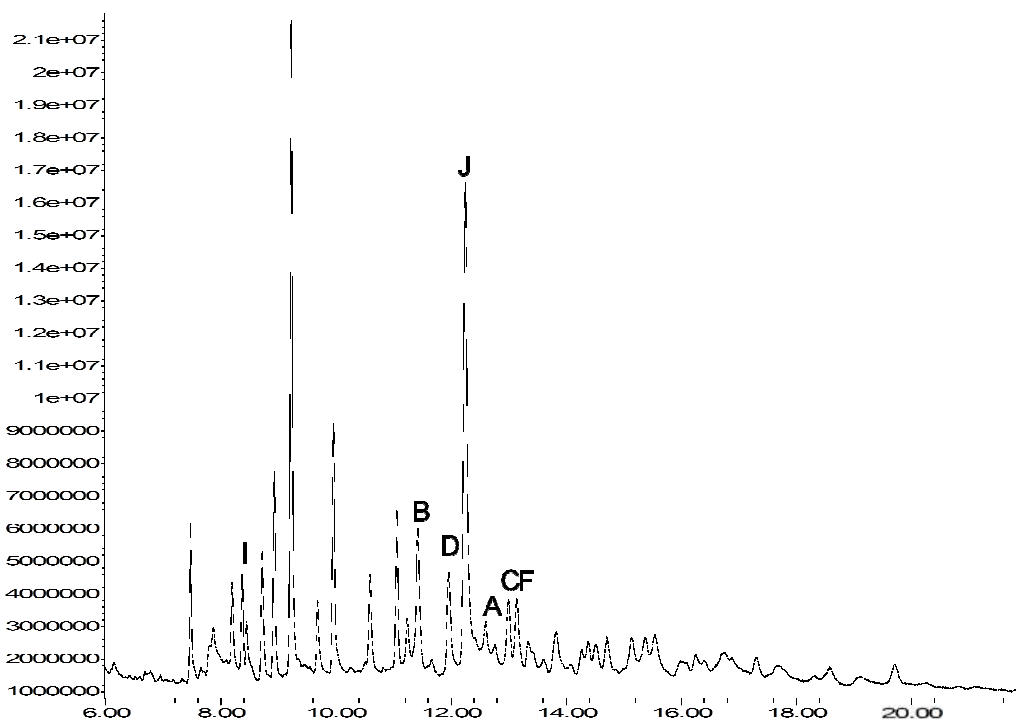


Substâncias sugeridas através do espectro de massas comparado a biblioteca de espectros NIST e Wiley: H Forbol-12,13,20-triacetato (Rt: 9.213 min.); B Lanosterol (Rt: 11.439 min.); D Tirucalol (Rt: 11.974 min.); A Eufol (Rt: 12.591 min.); C Cicloartenol (Rt: 13.001 min.); F Taraxasterol (Rt: 13.141 min.); G Lupeol (Rt: 14.501 min.).

Fonte: a autora.

A subfração etanol (Figura 5) também apresentou um incremento no número de bandas cromatográficas (59 bandas, destacando 7 bandas) sendo possível se observar uma predominância qualitativa de triterpenos e a presença de dois diterpenos pertencentes a classe tigliano.

Figura 5 - Cromatograma da fração etanol.

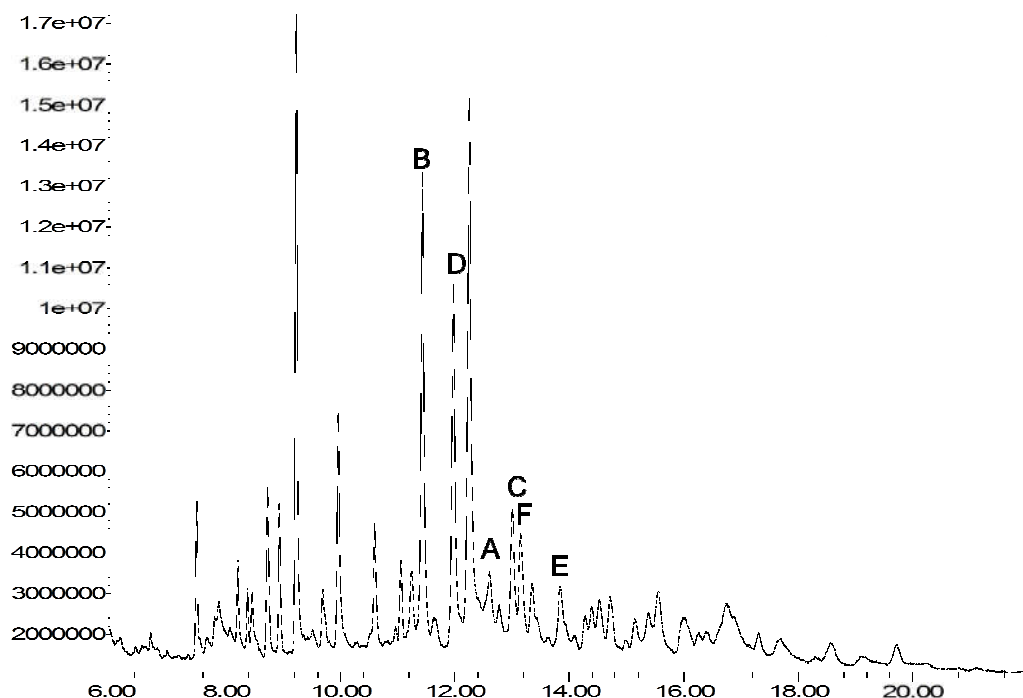


Substâncias sugeridas através do espectro de massas comparado a biblioteca de espectros NIST e Wiley: I 4- β -forbol (Rt: 8.196 min.); B Lanosterol (Rt: 11.424 min.); D Tirucalol (Rt: 11.963 min.); J 3-desoxo-3,16-dihidroxi-12-desoxiforbol-3,13,16,20-tetraacetato (Rt: 12.249 min.); A Eufol (Rt: 12.602 min.); C Cicloartenol (Rt: 13.001 min.); F Taraxasterol (Rt: 13.141 min.).

Fonte: a autora.

A subfração metanol mostrou-se mais complexa de todas as subfrações avaliadas, com 69 bandas, das quais se destacaram 6, referentes a triterpenos e esteroides.

Figura 6 - Cromatograma da fração metanol.



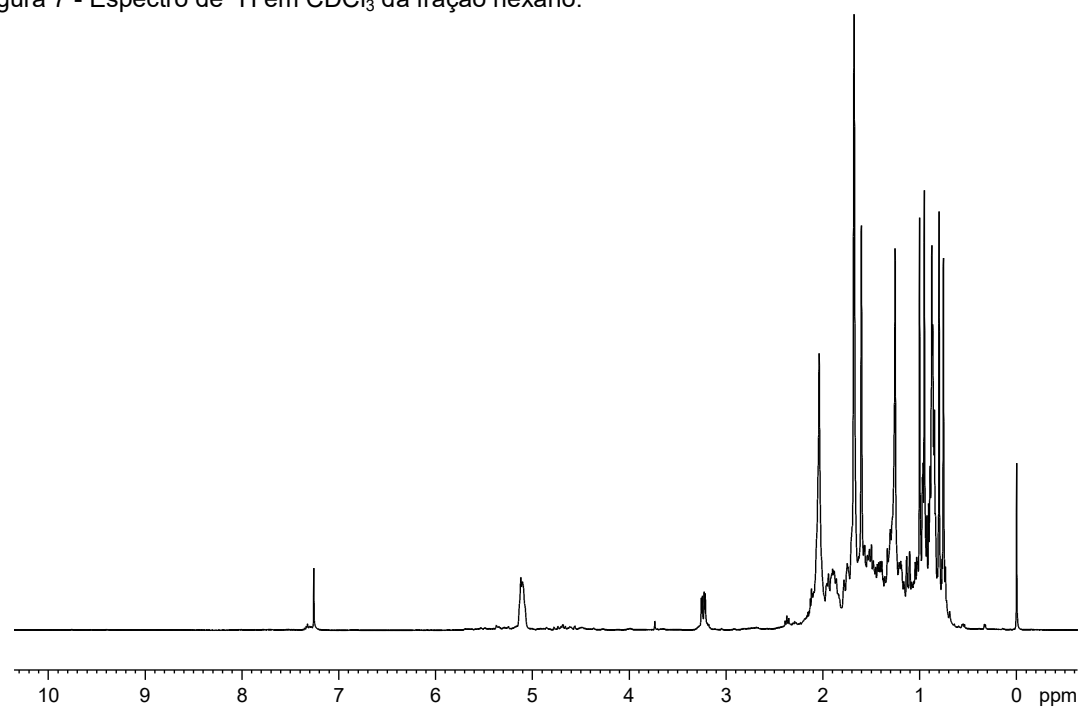
Substâncias sugeridas através do espectro de massas comparado a biblioteca de espectros NIST e Wiley: B Lanosterol (Rt: 11.434 min.); D Tirucalol (Rt: 11.974 min.); A Eufol (Rt: 12.607 min.); C Cicloartenol (Rt: 13.001 min.); F Taraxasterol (Rt: 13.151 min.); E Sitosterol (Rt: 13.847 min.).

Fonte: a autora.

A fração hexano e subfrações, após análise cromatográfica, foram estudadas empregando-se a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , anteriormente descrito e os espectros são apresentados nas figuras de números 7 a 11.

O espectro de RMN ^1H da fração hexano (Figura 7) apresentou diversos sinais na região entre 0 e 2 ppm referente a grupamentos metílicos presentes nas substâncias constituintes da fração. Destacaram-se os sinais com deslocamentos nas regiões de 3 ppm e 5 ppm observados em compostos da classe dos terpenos e esteroides, associados ao H_3 do carbono ligado à hidroxila e ao hidrogênio ligado ao carbono de dupla ligação, respectivamente (Salimikia et al., 2016; Dutra et al., 2012).

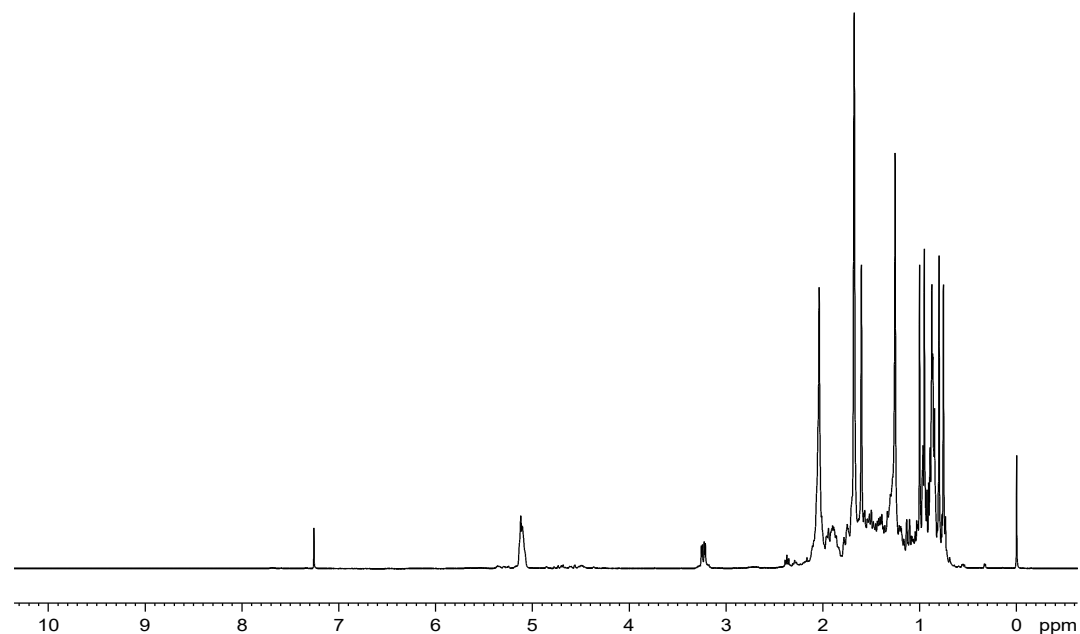
Figura 7 - Espectro de ^1H em CDCl_3 da fração hexano.



Fonte: a autora.

A subfração éter apresentou perfil espectroscópico (Figura 8) semelhante à fração hexano, no qual se observa diversos sinais na região de 0-2 ppm, além dos sinais em 3 e 5 ppm.

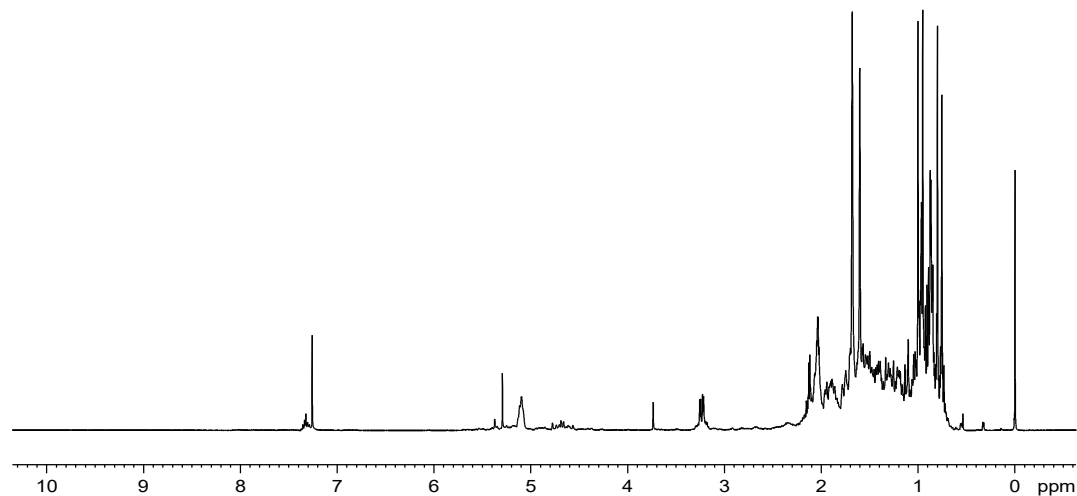
Figura 8 - Espectro de ^1H em CDCl_3 da subfração éter.



Fonte: a autora.

A subfração diclorometano (Figura 9), por sua vez, apresentou um aumento de sinais na região entre 3 e 6 ppm, tais sinais podem ser associados com a classe dos diterpenos tiglianos (Wang et al., 2015).

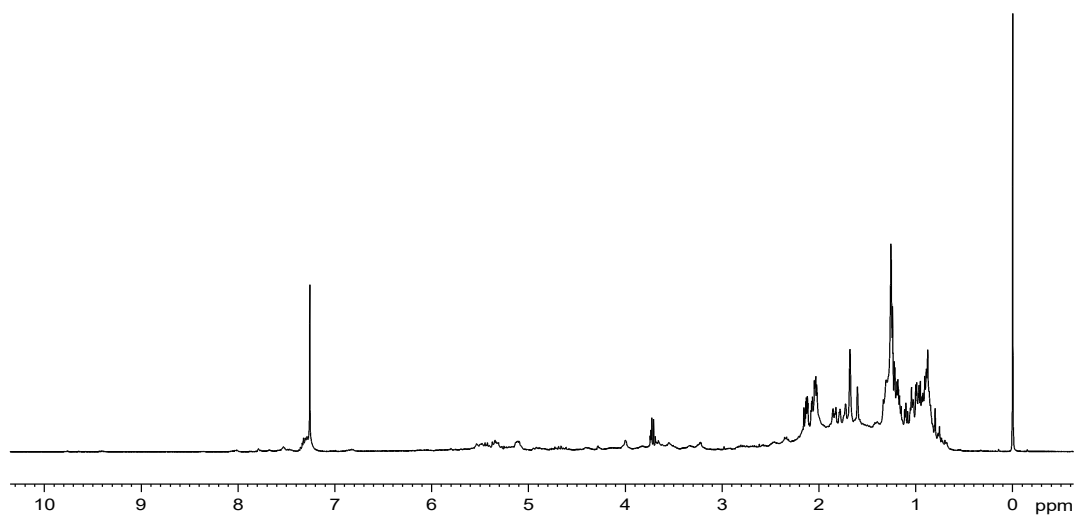
Figura 9 - Espectro de ^1H em CDCl_3 da subfração diclorometano.



Fonte: a autora.

No espectro da subfração etanol (Figura 10) observou-se uma redução nos sinais na região de 0 a 2 ppm referentes aos grupamentos metílicos. Entretanto houve aumento dos sinais na região entre 3 e 6 ppm, associado aos diterpenos da classe tigliano e compostos hidroxilados, além dos sinais com deslocamento próximo a 8 ppm característicos de compostos aromáticos.

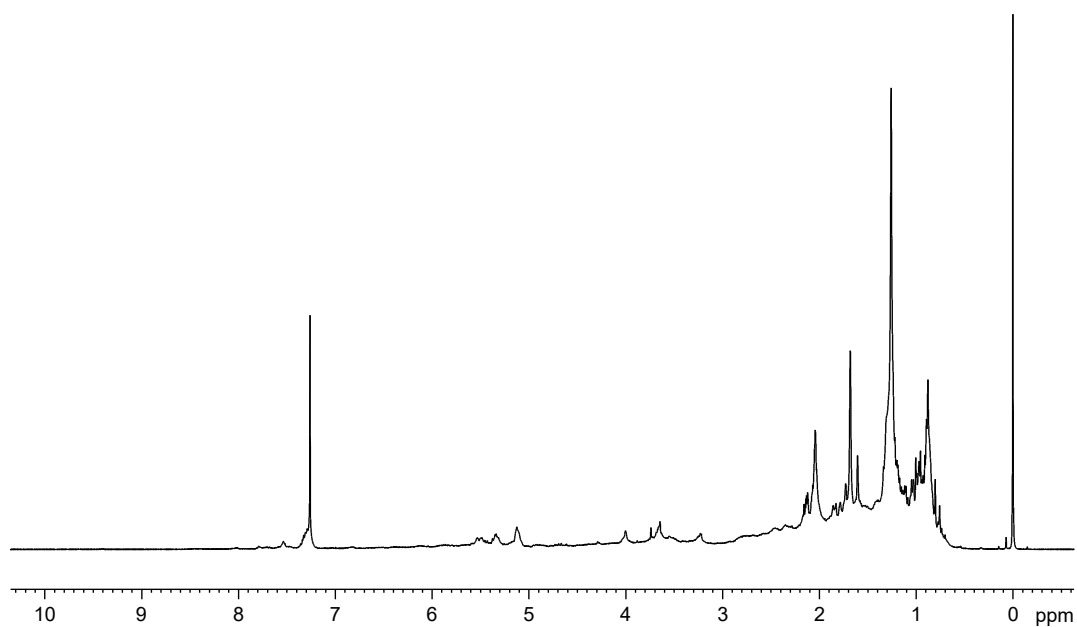
Figura 10 - Espectro de ^1H em CDCl_3 da subfração etanol.



Fonte: a autora.

A subfração metanol apresentou perfil espectroscópico semelhante ao da subfração etanol, no qual se observaram sinais de presentes em diterpenos e compostos aromáticos.

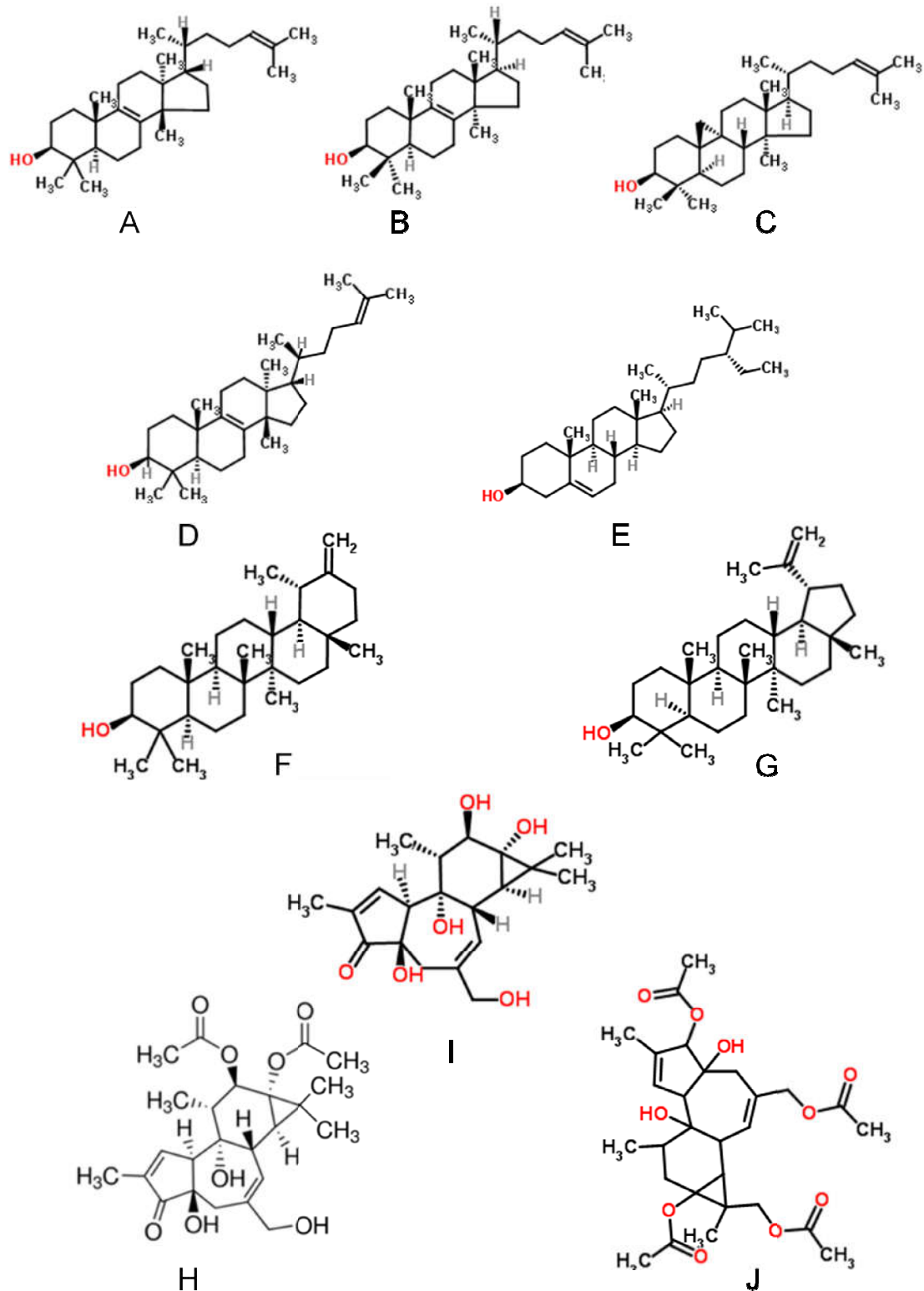
Figura 11 - Espectro de ^1H em CDCl_3 da subfração metanol.



Fonte: a autora.

Ao comparar os dados obtidos pela cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas com a literatura foi possível sugerir 10 compostos, cujas estruturas estão representadas na Figura 12.

Figura 12 - Estruturas das substâncias sugeridas nos cromatogramas.



Eufol (A); Lanosterol (B); Cicloartenol (C); Tirucalol (D); Sitosterol (E); Taraxasterol (F); Lupeol (G); Forbol-12,13,20-triacetato (H); 4-β forbol (I); 3-desoxo-3-16-dihidroxi-12-desoxiforbol-3-13-16-20-tetracetato (J).

Fonte: a autora.

As substâncias sugeridas (Figura 12) são majoritariamente pertencentes à classe dos terpenos, sendo subdivididos em triterpenos (eufol, lanosterol, cicloartenol, tirucalol, taraxasterol e lupeol) e diterpenos (forbol-12,13,20-triacetato, 4- β forbol e 3-desoxo-3-16-dihidroxi-12-desoxiforbol-3-13-16-20-tetracetato). Resultado compatível com a literatura que caracteriza os terpenos como a classe majoritária da espécie e os diterpenos, especificamente, como marcadores taxonômicos da família, dada sua baixa ocorrência e ampla diversidade estrutural (Uzabakiliho *et al.*, 1987; Vasas e Hohmann, 2014).

Estes possuem diversas ações biológicas documentadas, entre elas anti-inflamatória, vasodilatadora, imunomodulatória, neuroprotetora, anti-hiperglicêmica, antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antiviral, antiproliferativa, antitumoral, reversora da resistência múltipla a fármacos (Paduch *et al.*, 2007; Vasas e Hohmann, 2014).

O eufol e seus isômeros - lanosterol; cicloartenol; tirucalol; taraxasterol e lupeol - já foram identificados e/ou isolados de euphorbias (Haines e Warren, 1949; Ilyas *et al.*, 1998; Haba *et al.*, 2007; Ragasa e Cornelio, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

Dutra e colaboradores (2015) demonstraram que o eufol inibe a dor neuropática em doses de 30 mg/kg, administradas por via oral. O lanosterol, por sua vez, inibe a agregação proteica nas lentes oculares reduzindo a formação da catarata, sendo comercializado sob marca Lanomax® para o tratamento de cataratas em cachorros e gatos (Zhao *et al.*, 2015).

Há estudos destacando as propriedades anti-inflamatórias como o conduzido por Wang e colaboradores (2016) que concluíram que o taraxasterol possui ação contra artrite através, possivelmente, da redução da infiltração celular, inibição de fatores pró-inflamatórios.

Fernandez-Arche *et al.* (2010) observaram a atividade anti-inflamatória do tirucalol, sendo essa provavelmente relacionada a inibição da migração neutrofílica e/ou redução dos níveis de óxido nítrico por inibição da expressão da enzima iNOS.

O lupeol apresentou efeito protetor ao processo inflamatório, quando aplicado topicamente em orelha de ratos antes da aplicação de TPA, exibindo decréscimo da hiperplasia da pele e expressão de proteína COX-2, um marcador clássico de inflamação e promoção tumoral. Além disso, o triterpeno foi citotóxico para células de carcinoma de bexiga, através da inativação do NF- κ B (Prabhu *et al.*, 2016). Resultados semelhantes foram obtidos por Rauth e colaboradores (2016), que

concluíram que o lupeol suprime a proliferação de células tumorais (UPCI:SCC131 e UPCI:SCC084) de forma dose e tempo dependente. Além de inibir a fosforilação de EGFR e, conseqüentemente, a ativação de AKT, IκB, NF-κB e COX-2.

De espécies de euphorbias já foram isolados diversos diterpenos de várias classes, com destaque para os pertencentes às classes dos jatrofanos, latiranos e tiglianos (Vasas e Hohmann, 2014). Os diterpenos identificados nas frações são classificados como tiglianos e, apenas, o forbol-12,13,20-triacetato já foi identificado na espécie (Costa *et al.*, 2012).

Zolfaghari et al. (2016) obtiveram um valor de 16,1 μM de Cl_{50} quando avaliaram a viabilidade celular da linhagem Jurkat tratada com um diterpeno tigliano isolado de *E. sogdiana*. Sendo que esse composto foi o mais ativo quando comparado a diterpenos de diferente classe estrutural.

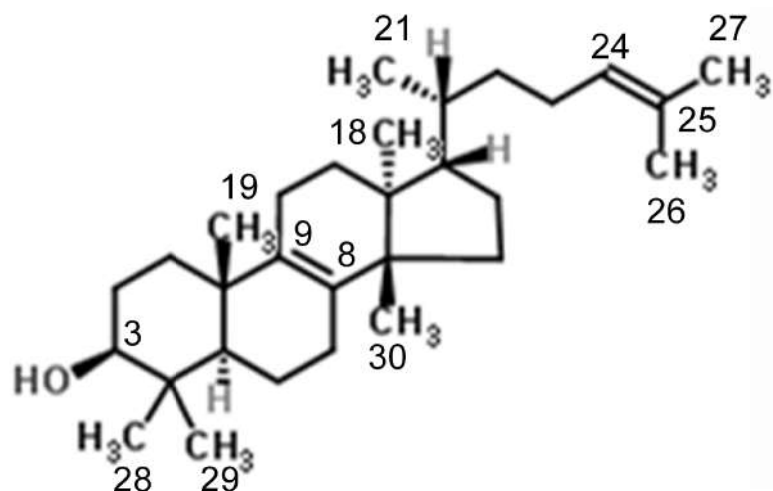
Wang e colaboradores (2015) descreveram resultados semelhante, ao testarem 14 compostos isolados de *E. dracunculoides*. Utilizaram as seguintes linhagens celulares: HL-60, SMMC-7721 (hepatoma humano), A-549 (adenocarcinoma humano células epiteliais alveolares basais), MCF-7 (câncer de mama), e SW480 (adenocarcinoma cólon-retal). E o único composto que apresentou atividade citotóxica é um diterpeno tigliano.

Além dos terpenos descritos, foi identificado o sitosterol, um composto classificado como esteroide. Fitoesteroides possuem propriedades anticâncer e antiproliferativa, através da inibição enzimática, efeitos antiestrogênicos e antiprogesterona (Gupta *et al.*, 2013).

5.2 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS

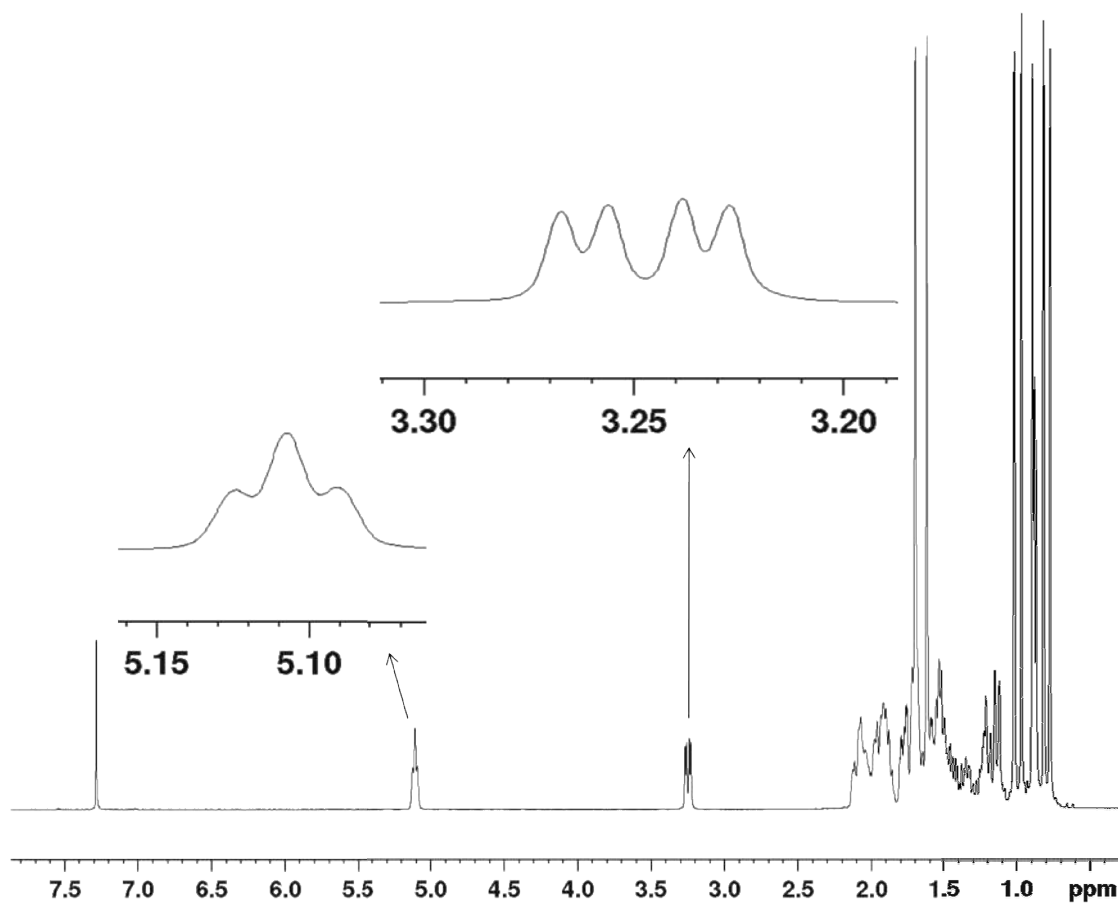
Devido à determinação de substâncias pertencentes principalmente as classes dos terpenos e esteroides, decidiu-se iniciar a pesquisa fitoquímica pela fração hexano. Assim procedimentos cromatográficos foram realizados conforme descrito no item 4.3.3 com reunião das frações obtidas conforme semelhança de R_f . A fração nomeada E1 (solvente hexano: acetato de etila (9:1)) foi analisada por ressonância magnética nuclear (Figuras 14-18). Os dados de deslocamentos e acoplamentos foram comparados com a literatura (Tabela 3), identificando a substância eufol.

Figura 13 - Estrutura química do eufol.



Fonte: a autora.

Figura 14 - Espectro de ^1H em CDCl_3 da fração E1.

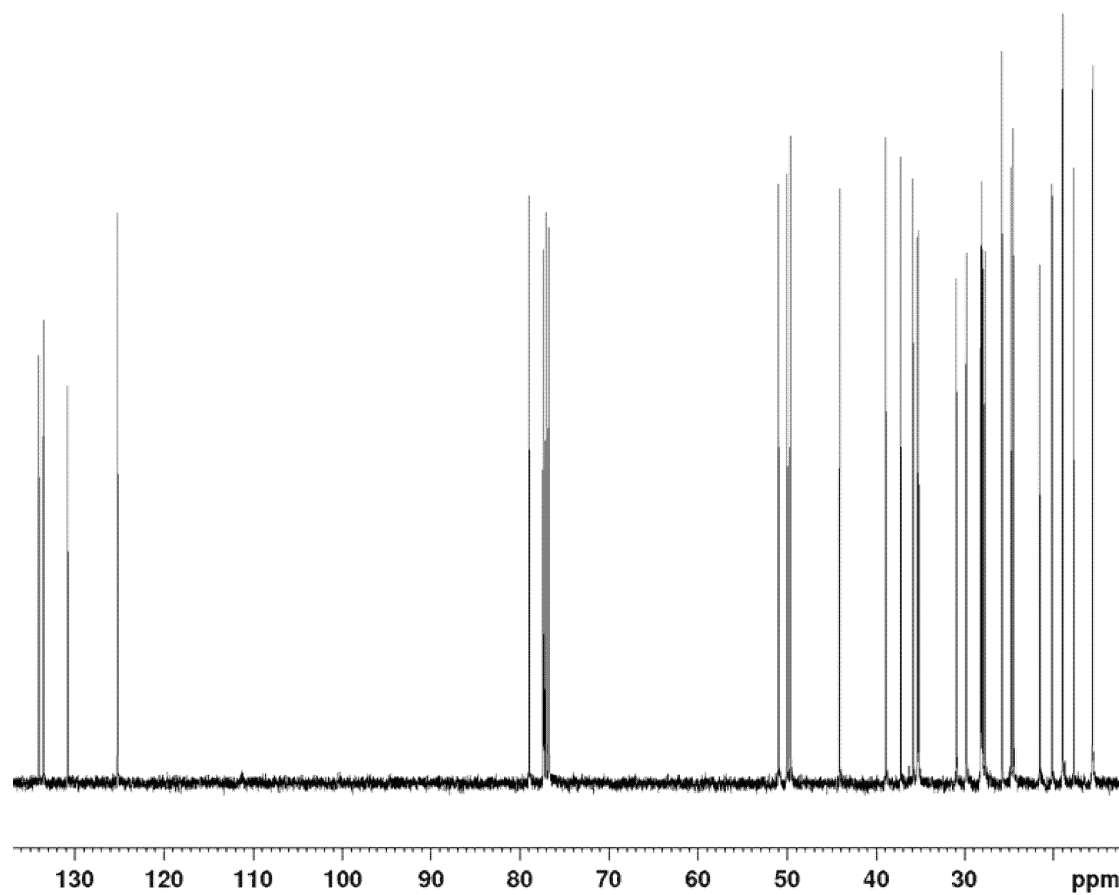


Ampliação dos sinais com deslocamento 3,24 ppm, demonstrando o duplo dubleto ($J = 11,66$ Hz) referente ao H_3 e 5,10 ppm, demonstrando o triploto referente ao H_{24} .

Fonte: a autora.

No espectro de RMN de hidrogênio (^1H) da fração E1 identifica-se um duplo dubleto em δ 3,24 ppm referente ao hidrogênio H_3 . Em δ 5,10 ppm há um triplo multipeto atribuído ao H_{24} . Também, é possível observar vários deslocamentos químicos na região de δ 0,7 - 1,7 ppm associados aos hidrogênios das metilas C_{18} , C_{19} , C_{21} , C_{26} , C_{27} , C_{28} , C_{29} e C_{30} presentes na estrutura (Tabela 3).

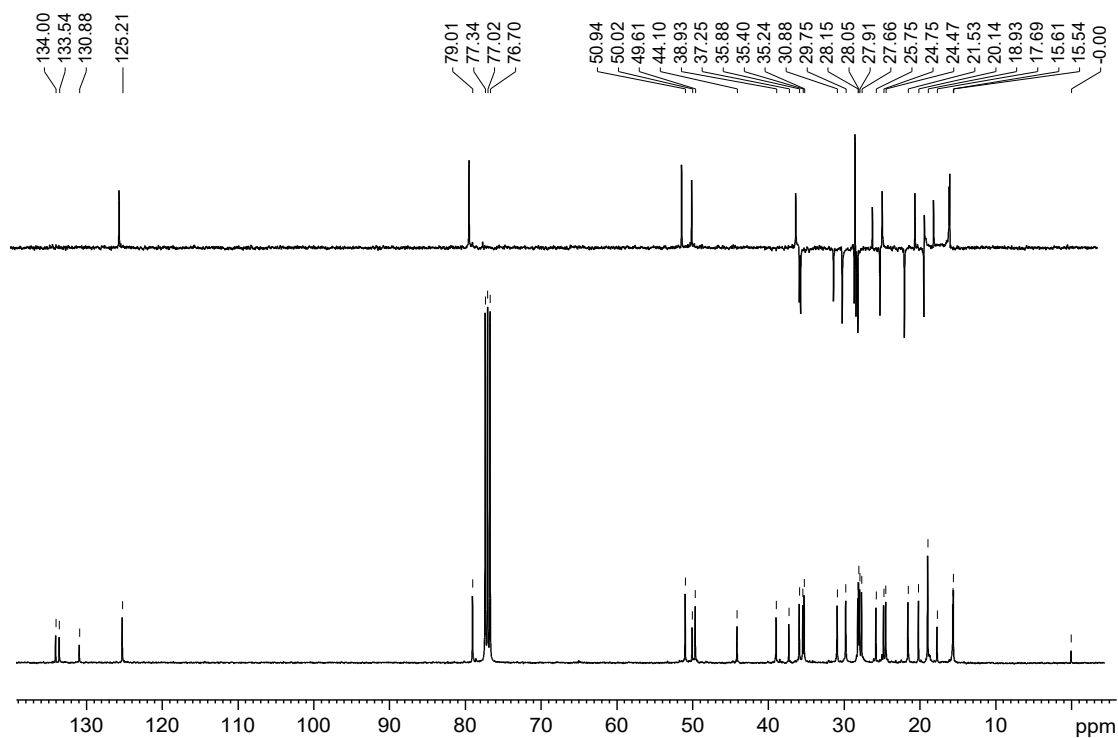
Figura 15 - Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ em CDCl_3 da fração E1.



Fonte: a autora.

No espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ é possível observar a presença de 29 sinais, destacando os sinais com deslocamento químico em δ 134,0 e δ 133,5 ppm os quais se referem aos carbonos 8 (C_8) e 9 (C_9), e aos deslocamentos em δ 125,2 e δ 130,8 ppm atribuídos aos carbonos 24 (C_{24}) e 25 (C_{25}). Caracterizando as duplas ligações presente na estrutura (Tabela 3).

Figura 16 - Espectro de RMN de ^{13}C (abaixo) e DEPT 135 (acima) em CDCl_3 da fração E1.



Fonte: a autora.

Ao comparar o espectro de $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ com o DEPT nota-se dois sinais com deslocamento de 18,93 ppm, comprovando a existência de 30 sinais de carbono referentes a estrutura triterpênica do eufol.

Tabela 3 - Dados do RMN de ^1H e ^{13}C experimentais e da literatura (Dutra *et al.*, 2012).

(Continua)

Posição	Experimental		Literatura	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1		35,2		35,4
2		27,9		28,0
3	3,24 dd $J = 11,66 \text{ Hz}$ e $4,6 \text{ Hz}$	78,9	3,23 dd	79,2
4		38,9		39,2
5		50,9		51,2
6		18,9		19,2
7		27,6		28,0
8		134,0		134,3
9		133,5		133,8
10		37,2		37,5

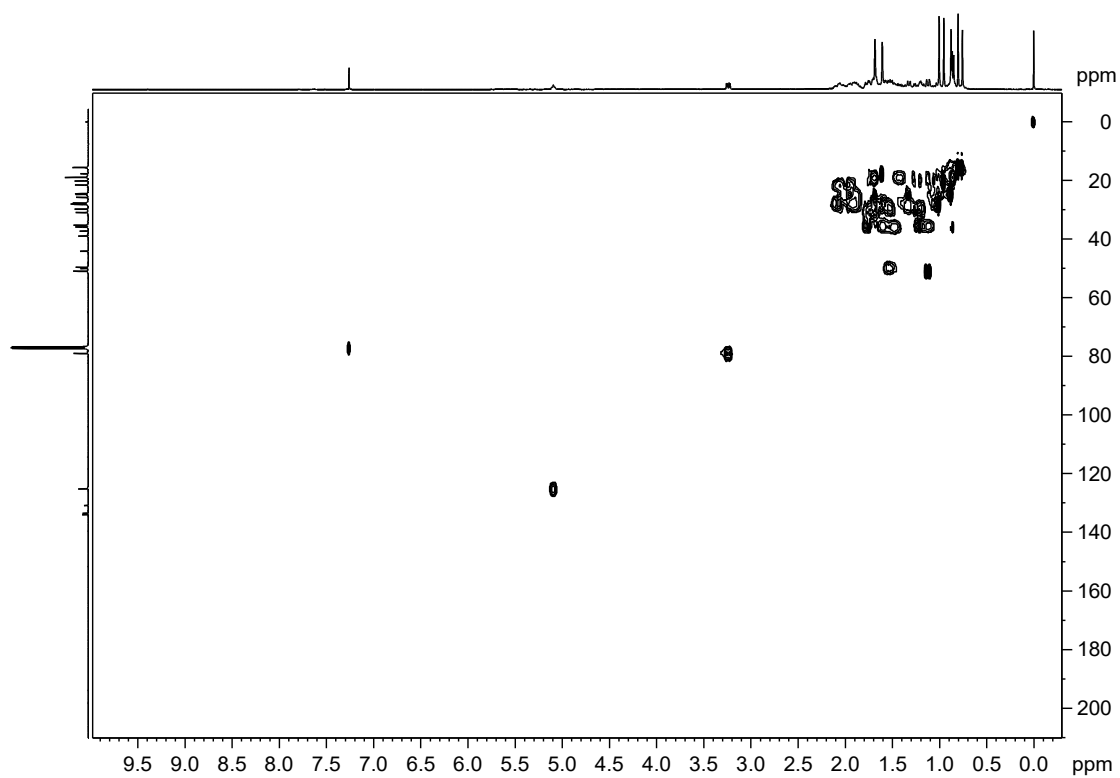
(conclusão)				
11		21,5		21,7
12		30,9		31,1
13		44,1		44,3
14		50,0		50,2
15		29,7		30,0
16		28,1		28,3
17		49,6		49,9
18	0,77 s	15,6	0,75 s	15,8
19	0,96 s	20,1	0,95 s	20,4
20		35,8		36,1
21	0,87 d $J = 6,1$ Hz	18,9	0,85 d	19,1
22		35,4		35,7
23		24,7		25,0
24	5,10 tm	125,2	5,09 t	125,4
25		130,8		131,1
26	1,62 s	17,7	1,50 s	17,9
27	1,69 s	25,7	1,68 s	25,9
28	1,00 s	28,0	1,00 s	28,2
29	0,81s	15,5	0,80 s	15,7
30	0,89 s	24,4	0,87 s	24,9

s-singlete, d- duplete, dd- duplo dublete, tm- triplo multiplete.

Fonte: a autora.

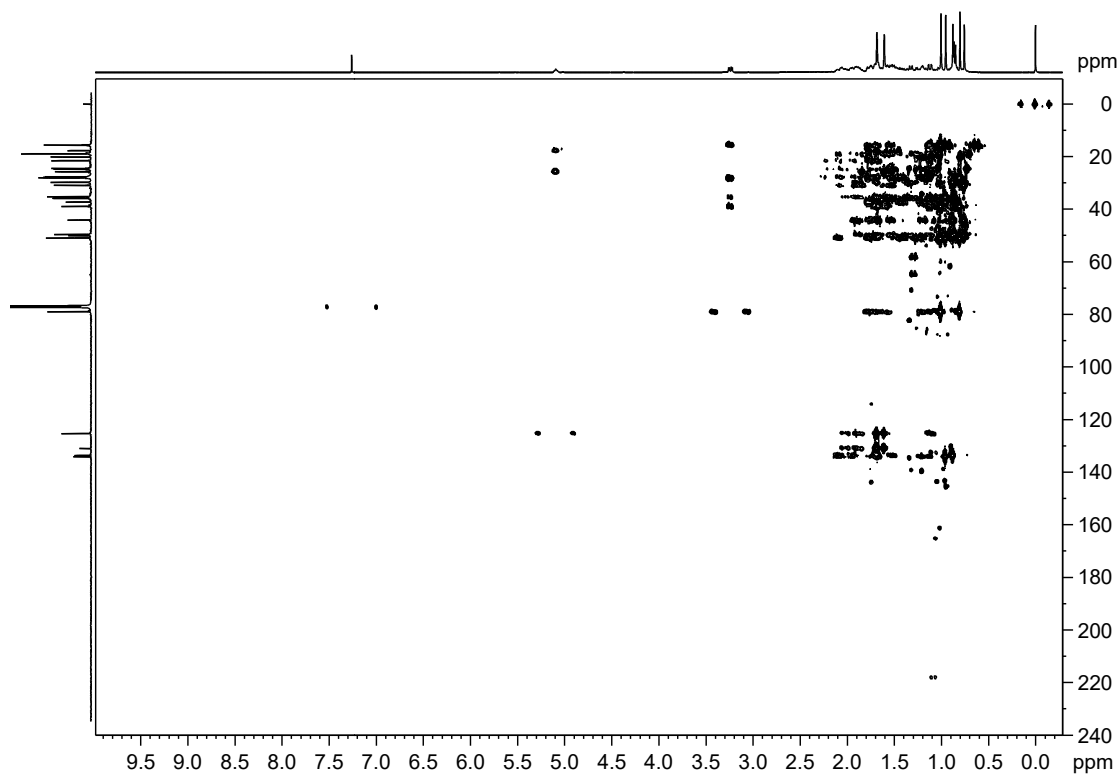
As análises de RMN de correlação (Figura 17 e 18) corroboram a atribuição de sinais, enfatizando os sinais referentes ao C_3 (78,9 ppm) e C_{24} (125,2 ppm) em correlação direta com os sinais 3,24 e 5,10 ppm presentes no espectro de hidrogênio.

Figura 17 - Mapa de correlação HSQC da fração E1.



Fonte: a autora.

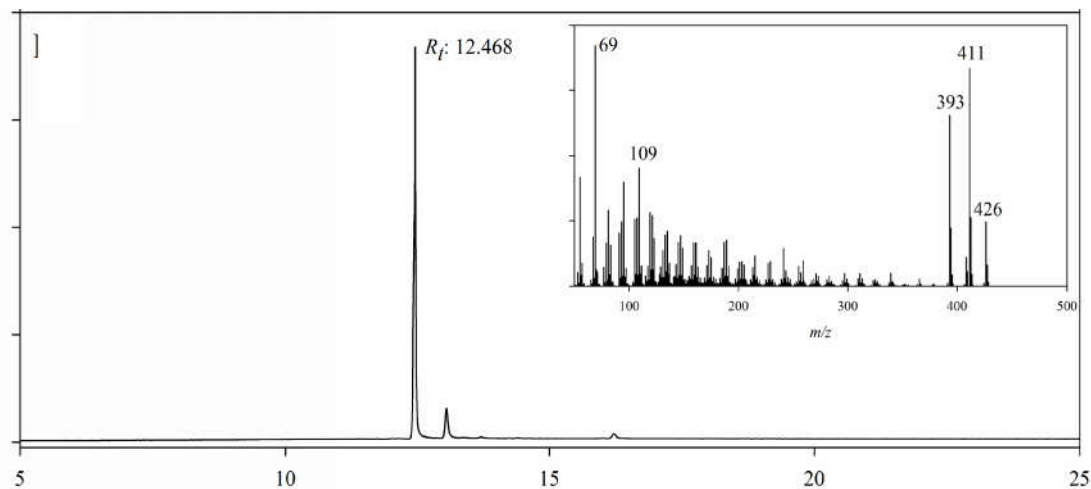
Figura 18 - Mapa de correlação HMBC da fração E1.



Fonte: a autora.

A análise de CG/EM da fração E1 (Figura 19) apresentou uma banda cromatográfica com tempo de retenção de 12,468 min. e um perfil de fragmentação no qual foi possível observar o íon molecular (m/z 426) e o pico base (m/z 69).

Figura 19 - Cromatograma da fração E1.



Em destaque espectro de massas referente ao pico com Rt: 12.476 min com m/z 426.

Fonte: a autora.

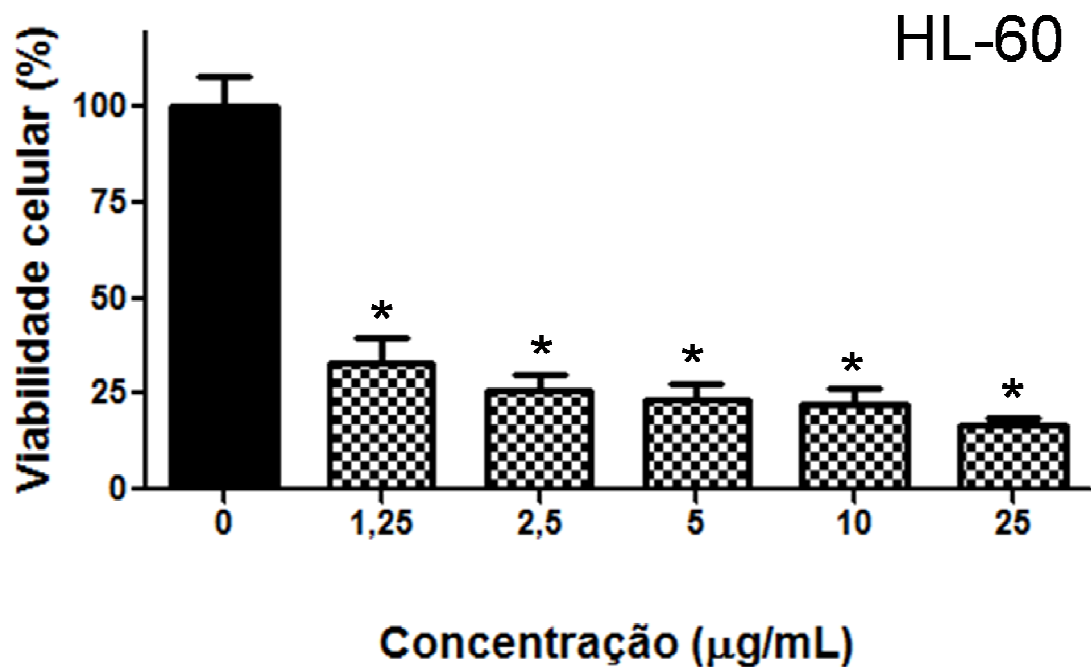
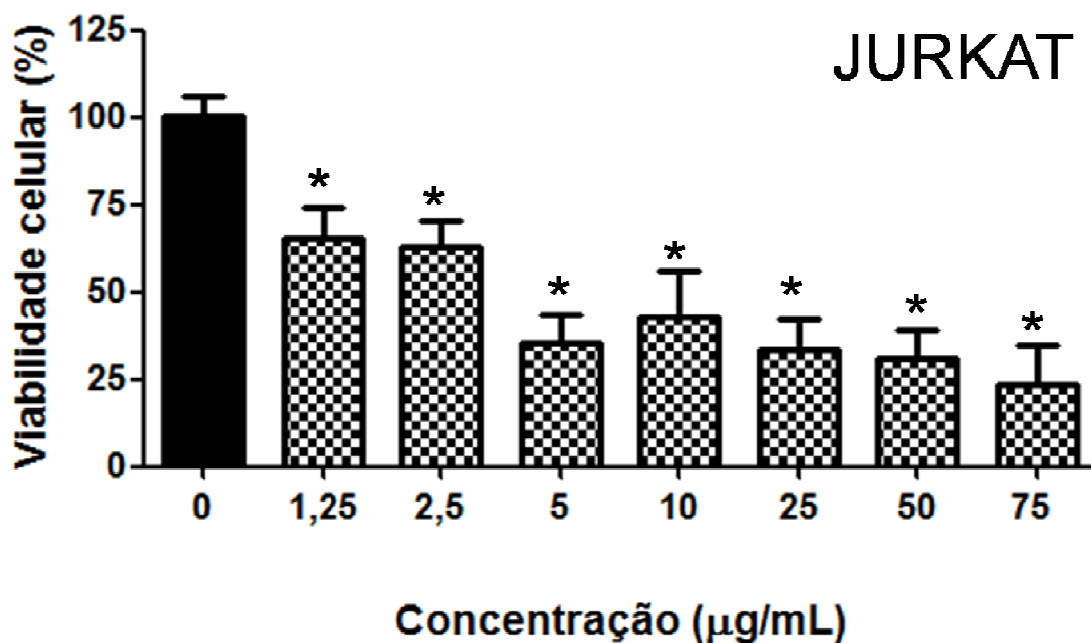
Os dados de RMN e massas para a fração E1 associados aos dados da literatura permitiram identificar como eufol a substância da fração E1.

5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DA FRAÇÃO HEXANO, SUBFRAÇÕES E EUFOL

Desenvolvido em 1980 por Mosmann, o ensaio de citotoxicidade por redução de azul de tetrazólio (MTT) se tornou o método padrão para determinação de viabilidade celular (Van Tonder *et al.*, 2015). Células viáveis com metabolismo ativo, em especial o mitocondrial, reduzem o MTT a um cristal roxo (formazan) com absorção máxima próxima a 570 nm. Logo, para células em fase *log* de crescimento a concentração de formazan formado é proporcional ao número de células viáveis (Riss *et al.*, 2004).

A Figura 20 demonstra a responsividade das células Jurkat e HL-60 ao tratamento com a fração hexano do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. Analisando os resultados observa-se que há decréscimo da viabilidade celular com o aumento da concentração do tratamento aplicado.

Figura 20 - Efeito da fração hexano do látex de *Euphorbia umbellata* na viabilidade de células leucêmicas.



Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via e pós teste de Dunnet, com nível de significância de 99%. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes e em quadruplicata. O símbolo * representa diferença estatística ($p < 0,001$) em relação ao controle negativo (meio RPMI + DMSO 0,25%).

Para critério de comparação foram calculados os valores de CI_{50} para as duas linhagens testadas, as quais comprovaram que a linhagem HL-60 (CI_{50} 0,061 $\pm$ 1,226 μ g/mL) é mais suscetível ao tratamento com a fração hexano do que a linhagem de células Jurkat (CI_{50} 4,624 $\pm$ 1,088 μ g/mL).

Resultados semelhantes foram obtidos em trabalhos prévios do grupo (Camargo Luz *et al.*, 2016), onde a linhagem de células Jurkat tratada com a fração hexano do látex de *E. umbellata* apresentou um CI_{50} menor que 2 μ g/mL, quando avaliado pelo ensaio de redução de MTT, após 72 horas de tratamento.

Da Mota, Valadares e Benfica (2012), estudando outras partes (partes aéreas) da mesma espécie, avaliaram o potencial citotóxico do extrato hidroalcolico (95%) frente às linhagens Jurkat e K-562, concluindo que as duas linhagens foram sensíveis ao tratamento, entretanto as células Jurkat mostram-se mais resistentes. A maior resistência da linhagem Jurkat não foi observada no estudo conduzido por Amirghofran *et al.* (2006) os quais observaram que as células K-562 foram mais resistentes ao tratamento com extrato de partes aéreas de *E. cheiradenia*. Ainda, estes pesquisadores observaram que as linhagens modelo de leucemia foram mais sensíveis que as demais linhagens analisadas no estudo (HeLa, A549 e Fen) .

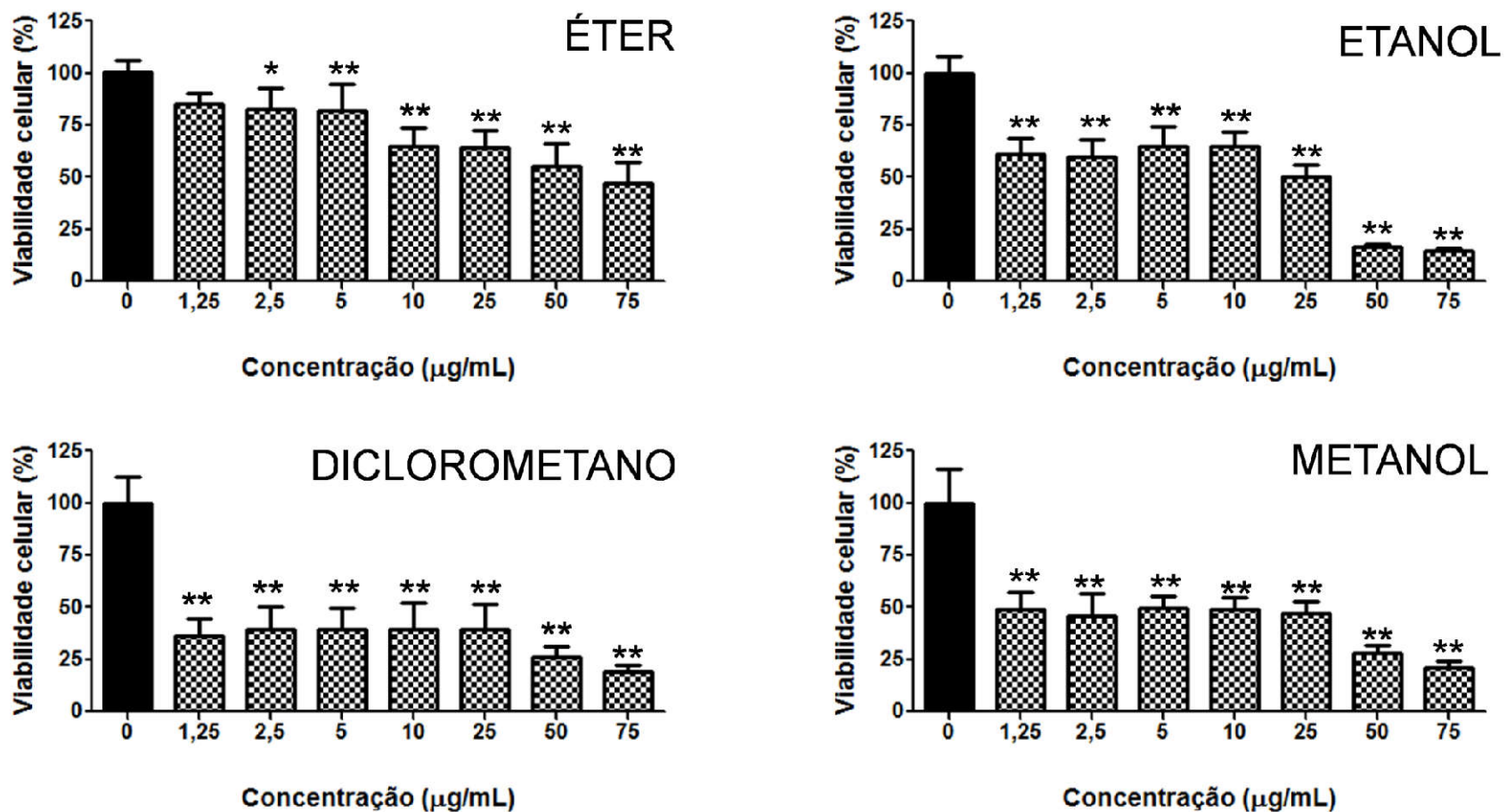
Nogueira e colaboradores (2008) ao avaliarem a ação citotóxica dos extratos bruto, clorofórmico e hexânico de partes aéreas de *E. umbellata* frente a linhagem K-562 obtiveram CI_{50} de 0,4; 0,1 e 0,08 mg/mL, respectivamente, demonstrando que a fração hexano foi mais potente dentre as frações.

Hsieh *et al.* (2013) observaram que extrato de raiz de *E. formosana* possui efeito antiproliferativo em células HL-60 e THP-1(leucemia monocítica aguda), com taxas de inibição de 30% e 40%, respectivamente. Os autores atribuem os resultados a parada de ciclo celular e indução de apoptose causadas pelo extrato.

Um experimento com o extrato de partes aéreas de cinco diferentes espécies de *Euphorbia* (*E. petiolata*, *E. hebecarpa*, *E. osyridea*, *E. microciadia*, e *E. heteradenia*) demonstrou o efeito antiproliferativo em células Jurkat e K-562, com destaque para a fração hexano de *E. heteradenia* a qual apresentou um valor de CI_{50} inferior ao controle positivo (cis-platina) para a linhagem K-562 (Amirghofran *et al.*, 2011).

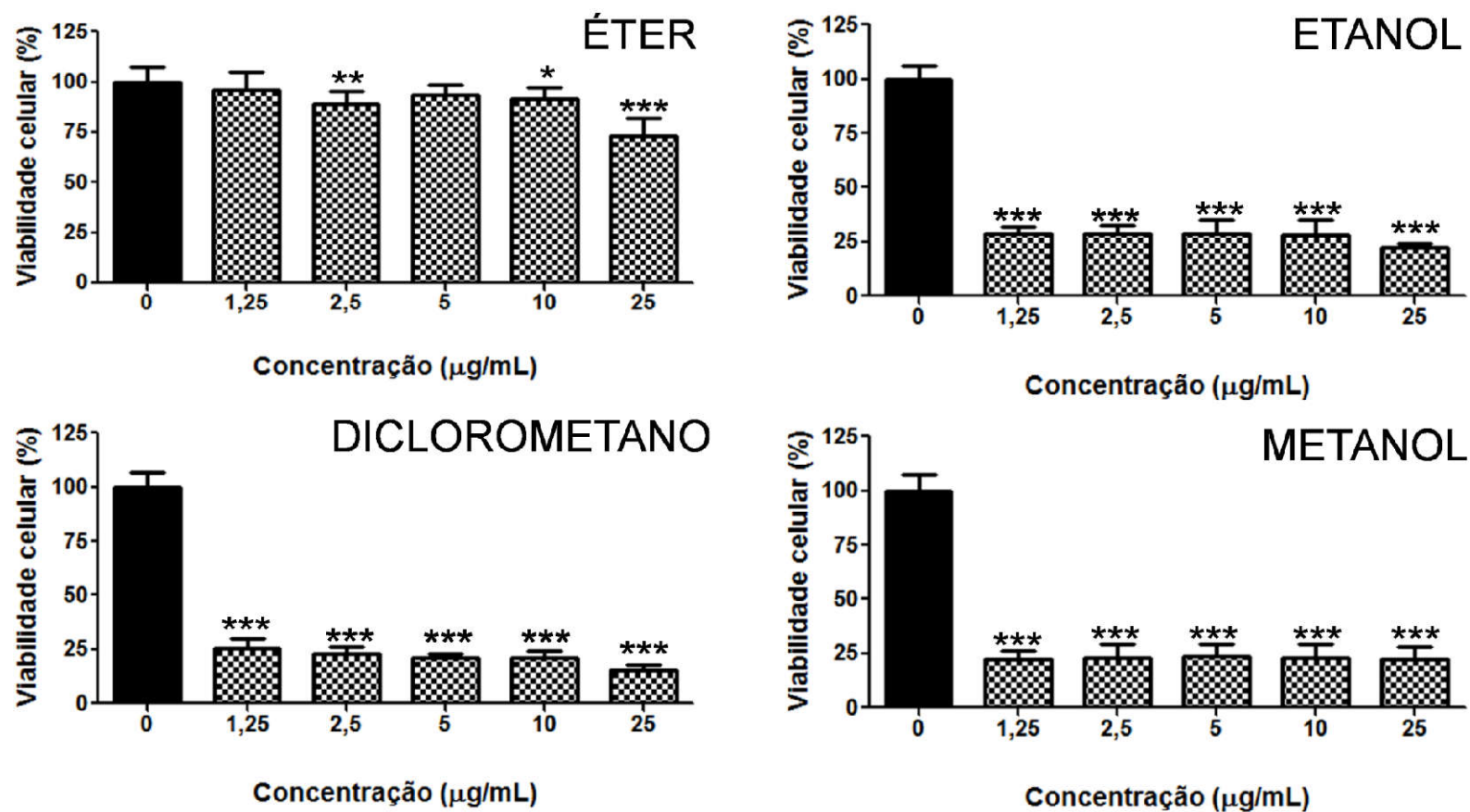
Dado o potencial citotóxico promissor da fração hexano, as suas subfrações também foram avaliadas em relação ao potencial citotóxico (Figura 21 e 22).

Figura 21 - Efeito das subfrações da fração hexano do látex de *Euphorbia umbellata* na viabilidade de células leucêmicas - Jurkat.



Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via e pós teste de Dunnet, com nível de significância de 99%. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes e em quadruplicata. Os símbolos * e ** representam diferença estatística ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) em relação ao controle negativo (meio RPMI + DMSO 0,25%).

Figura 22 - Efeito das subfrações da fração hexano do látex de *Euphorbia umbellata* na viabilidade de células leucêmicas - HL60.



Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via e pós teste de Dunnet, com nível de significância de 99%. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes e em quadruplicata. Os símbolos *, ** e *** representam diferença estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) em relação ao controle negativo (meio RPMI + DMSO 0,25%).

Observa-se, assim como para a fração hexano, uma maior responsividade da linhagem HL-60 quando comparada a linhagem Jurkat. Em relação às subfrações, a diclorometano destaca-se como mais eficaz, pois apresentou menores valores de CI_{50} para a linhagem Jurkat e menores valores de viabilidade celular quando comparada a média obtida para cada concentração testada, seguida da subfração etanol (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) determinado para o tratamento com as subfrações para cada linhagem celular

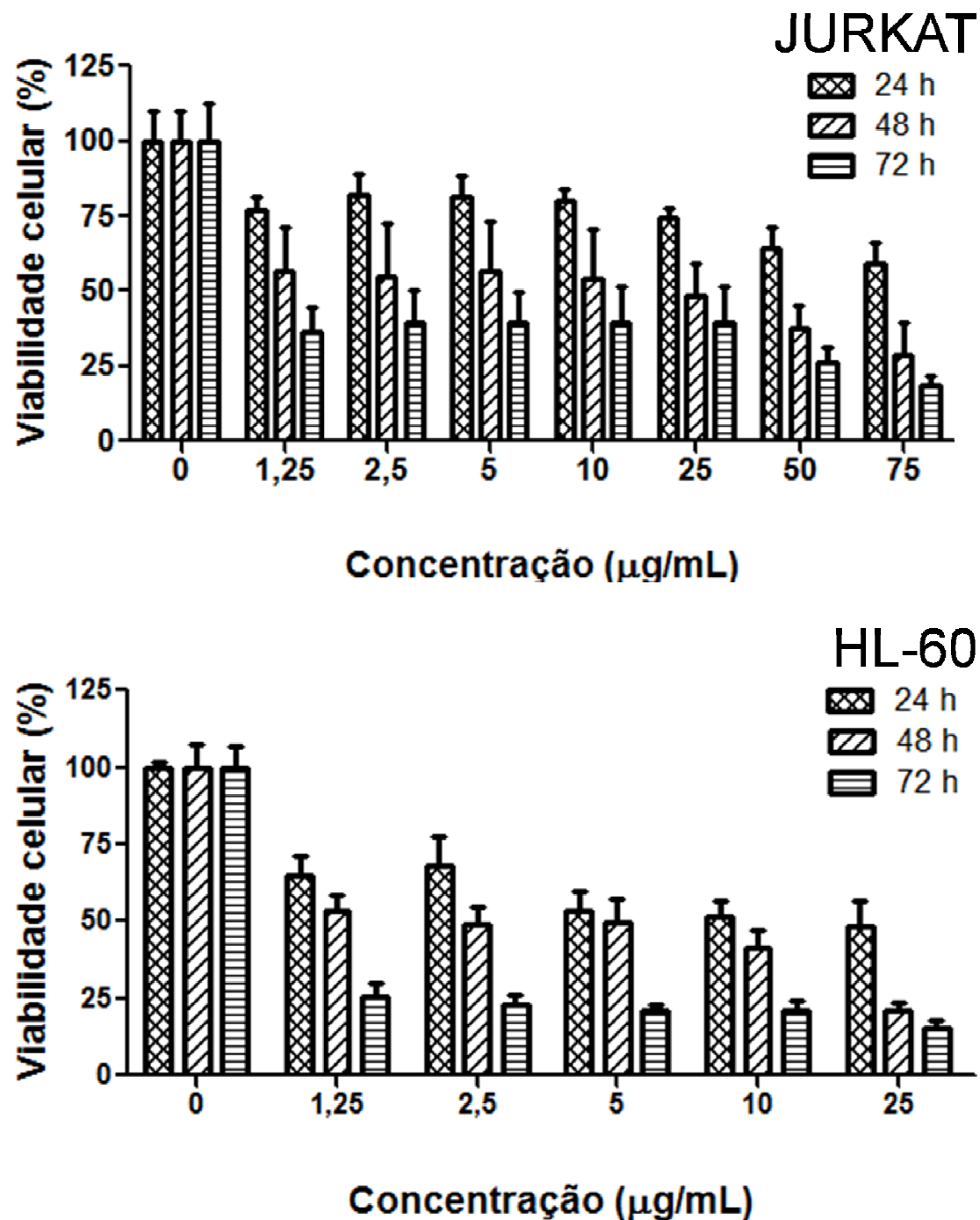
	Jurkat	HL-60
Éter	70,336 $\pm$ 22,113	>25
Diclorometano	0,200 $\pm$ 0,957	0,005 $\pm$ 0,098
Etanol	8,314 $\pm$ 7,934	0,004 $\pm$ 0,987
Metanol	2,581 $\pm$ 185,053	ND

Dados expressos em valor de $CI_{50} \pm$ erro padrão da média, obtidos através da análise de Probit, método de Finney. ND - não definido.

Os resultados promissores das subfrações diclorometano e etanol podem estar associados à composição química, uma vez que além de possuírem os triterpenos comuns ao gênero *Euphorbia* possuem diterpenos do tipo forbol, descritos na literatura como substâncias citotóxicas (Vasas e Hohmann, 2014).

Analisando os valores de CI_{50} para ambas as linhagens celulares e a viabilidade celular na maior concentração testada, tem-se a subfração diclorometano como a mais potente. Assim, essa subfração foi selecionada para avaliação de tempo-dependência de tratamento (Figura 23), bem como determinação do índice de seletividade.

Figura 23 - Efeito da subfração diclorometano na viabilidade de células leucêmicas em diferentes tempos de tratamento.



Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via e pós teste de Dunnet, com nível de significância de 99%. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes e em quadruplicata.

Com base nos gráficos apresentados é possível observar um perfil de tempo dependência de tratamento uma vez que houve diferença estatística entre os

tempos avaliados para todas as concentrações. Tal observação é corroborada pelos valores de CI_{50} , os reduzem com o aumento do tempo de tratamento (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de CI_{50} para as linhagens Jurkat e HL-60 em diferentes tempos de tratamento.

	Jurkat	HL-60
24 horas	>75	15,6367±12,3773
48 horas	7,614±2,6474	2,5256±0,7656
72 horas	0,200±0,957	0,005±0,098

Dados expressos em valor de $CI_{50} \pm$ erro padrão da média, obtidos através da análise de Probit, método de Finney.

O índice de seletividade (IS) é a razão entre o CI_{50} de células não neoplásicas e o CI_{50} de células neoplásicas. Os valores de CI_{50} estão apresentados na Tabela 6, enquanto dos de IS, na Tabela 7.

Tabela 6 - Valores de CI_{50} para as linhagens linfócitos, monócitos, Jurkat e HL-60, após 48 horas de tratamento com subfração diclorometano.

	CI_{50}
Linfócitos	53,04±22,81
Monócitos	79,08±20,75
Jurkat	7,61±2,65
HL-60	2,52±0,76

Dados expressos em valor de $CI_{50} \pm$ erro padrão da média, obtidos através da análise de Probit, método de Finney.

Tabela 7 - Valores de índice de seletividade para subfração diclorometano.

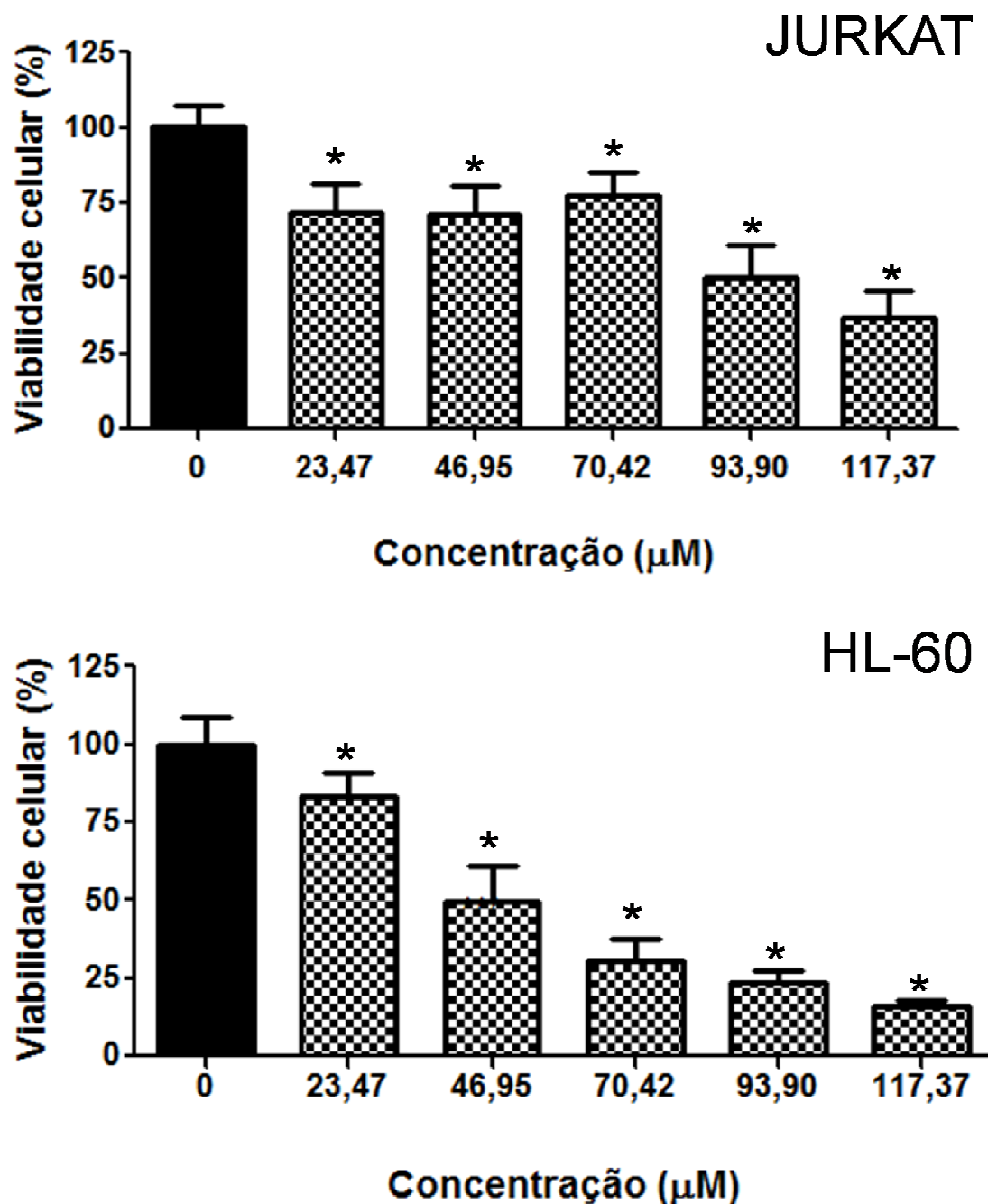
	Linfócito	Monócito
Jurkat	6,96	10,39
HL-60	21,05	31,38

A literatura descreve que valores de IS inferiores a 2 indicam toxicidade geral não específica (Ayesh, Abed e Faris, 2014). Luz e colaboradores (2016) ao determinarem o índice de seletividade para fração hexano de látex de *E. umbellata* quando comparada a linfócitos, obtiveram 4,30, revelando a seletividade da fração hexano. Comparando os valores obtidos nesse trabalho, nota-se que o fracionamento da fração hexano aumenta a seletividade da matriz vegetal, principalmente por reduzir a toxicidade ao linfócito, demonstrada com o aumento do

valor de IS. Tal resultado pode ser associado à seleção de substâncias que ajam de forma mais específica em células neoplásica, reduzindo, assim toxicidade da fração em relação às células normais, possivelmente diminuindo, também, os efeitos colaterais do tratamento quimioterápico.

A citotoxicidade do eufol, composto majoritário do látex de *E. umbellata*, também foi avaliado pela técnica de redução de MTT. A viabilidade celular é apresentada na Figura 24. Assim como os resultados obtidos para a fração hexano a linhagem HL-60 (CI_{50} 49,3651 $\pm$ 2,7648 μ M) é mais responsiva ao tratamento quando comparada às células Jurkat (CI_{50} 84,3331 $\pm$ 11,7647 μ M).

Figura 24 - Efeito do eufol na viabilidade de células leucêmicas.



Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via e pós teste de Dunnet, com nível de significância de 99%. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes e em quadruplicata. O símbolo * representa diferença estatística ($p < 0,001$) em relação ao controle negativo (meio RPMI + DMSO 0,4%).

Camargo Luz e colaboradores (2016) já haviam relatado o potencial citotóxico do eufol ao testá-lo na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ por 72 horas em células Jurkat.

Todavia no presente estudo, foi possível estabelecer a relação de dose dependência no tratamento.

Wang et al. (2013) demonstraram atividade antiproliferativa do eufol para linhagem T47D (câncer de mama), incluindo a descrição do mecanismo envolvido. Segundo os autores o eufol gera a redução de ciclina D1, B1 e A; regulação negativa da CDK2; hiperfosforilação da proteína Rb e indução de CKIs p21 e p27.

Resultados semelhantes foram observados em células de CS12 (câncer gástrico humano) para as quais o eufol promoveu a apoptose com indução da p27^{kip1} e inibição da ciclina B1 (Lin *et al.*, 2012). Os autores também relataram ativação da caspase 3 por via intrínseca e envolvimento de ERK1/2 no processo antiproliferativo e apoptótico.

Chen e colaboradores (2015) concluíram que o eufol possui potencial para o tratamento do câncer uma vez que suprime a sinalização do TGF- β , caracterizada pela fosforilação do Smad2 e a transcrição do PAI-1.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A utilização da técnica de extração por *Soxhlet* é viável mesmo tratando-se de matriz vegetal líquida;
- O fracionamento da fração hexano gera subfrações com diferenças químicas quantitativas e qualitativas;
- A análise química da fração hexano e subfrações permitiu a sugestão de 10 substâncias, majoritariamente terpenos;
- O eufol foi isolado e identificado, sendo caracterizado como substância majoritária da fração hexano;
- A fração hexano, subfrações e eufol foram capazes de reduzir a viabilidade celular;
- O fracionamento da fração hexano aumenta o potencial citotóxico e o índice de seletividade;
- A subfração diclorometano apresentou melhores resultados no ensaio de citotoxicidade, além de perfil de tempo dependência de tratamento;
- O eufol, como substância pura e com valores de CI_{50} superiores aos das matrizes vegetais, se mostra pouco promissor ao tratamento de leucemia;
- A maior eficácia das matrizes vegetais quando comparada a substância isolada sugerem ação sinérgica entre os diversos compostos presentes na mistura fitoquímica.

REFERÊNCIAS

- AMIRGHOFRAH, Z. et al. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by *Linum persicum* and *Euphorbia cheiradenia*. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 132, n. 7, p. 427-432, 2006.
- AMIRGHOFRAH, Z. et al. Inhibition of tumor cells growth and stimulation of lymphocytes by *Euphorbia* species. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 33, n. 1, p. 34-42, 2011.
- ANDERSEN, O. M. et al. Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). **Phytochemistry**, v. 71, n. 13, p. 1558-1563, 2010.
- AVILA, L. et al. Effects of diterpenes from latex of *Euphorbia lactea* and *Euphorbia laurifolia* on human immunodeficiency virus type 1 reactivation. **Phytochemistry**, v. 71, n. 2-3, p. 243-248, 2010.
- AYESH, B. M., ABED, A. A., FARIS, D. M.. *In vitro* inhibition of human leukemia THP-1 cells by *Origanum syriacum* L. and *Thymus vulgaris* L. extracts. **BMC Research Notes**, v. 7, p. 612, 2014
- BADGUJAR, S. B. Evaluation of hemostatic activity of latex from three Euphorbiaceae species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 733-739, 2014.
- BEHERA, B. et al. Apoptosis and Necrosis of Human Breast Cancer Cells by an Aqueous Extract of *Euphorbia hirta* leaves. **Journal of Young Pharmacists**, v. 8, n. 3, p. 186-193, 2016.
- BORGES, R. et al. Antinociceptive and Anti Inflammatory Activities of the Ethanolic Extract from *Synadenium umbellatum* Pax. (Euphorbiaceae) Leaves and Its Fractions. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 9, 2013.
- CAMARGO LUZ, L. E. et al. Cytotoxic biomonitoring study of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 29-37, 2016.
- CAMPOS, A. et al. Antiproliferative Effect of *Synadenium grantii* Hook f. stems (Euphorbiaceae) and a Rare Phorbol Diterpene Ester. **International Journal of Toxicology**, p.1-6, 2016.
- CHEN, C.-L. et al. Euphol from *Euphorbia tirucalli* Negatively Modulates TGF-beta Responsiveness via TGF-beta Receptor Segregation inside Membrane Rafts. **Plos One**, v. 10, n. 10, 2015.
- COSTA, L. L. G. et al. Anti-ulcer activity of *Synadenium grantii* latex. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 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.

CUNHA, L. C. et al. Acute and subacute toxicity studies of the latex and of the ethanolic extract of the leaves of *Synadenium umbellatum* Pax in rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2A, p. 403-411, 2009.

DA MOTA, M. F. et al. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 319-329, 2012.

DA MOTA, M. F.; 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, n. 3, p. 497-505, 2012.

DE MELO, J. G. et al. Medicinal Plants Used as Antitumor Agents in Brazil: An Ethnobotanical Approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-14, 2011.

DE OLIVEIRA, T. L. et al. Antitumoural effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae) latex. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 263-269, 2013.

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.

DUTRA, R. C. et al. The antinociceptive effects of the tetracyclic triterpene euphol in inflammatory and neuropathic pain models: the potential role of pkc epsilon. **Neuroscience**, v. 303, p. 126-137, 2015.

ERNST, M. et al. Global medicinal uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 90-101, 2015.

FEI, D.-Q. et al. Euphorikanin A, a Diterpenoid Lactone with a Fused 5/6/7/3 Ring System from *Euphorbia kansui*. **Organic Letters**, v. 18, n. 12, p. 2844-2847, 2016.

FERNANDEZ-ARCHE, A. et al. Topical anti-inflammatory effect of tirucallol, a triterpene isolated from *Euphorbia lactea* latex. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 146-148, Feb 2010.

FERREIRA, M. J. U. et al. *Euphorbia* and *Momordica* metabolites for overcoming multidrug resistance. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 4, p. 915-935, 2014.

GAO, J. et al. 3-O-(2'-E,4'-Z-decadienoyl)-20-O-acetylingenol induces apoptosis in intestinal epithelial cells of rats via mitochondrial pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 331-338, 2015.

GIARDINI, I. J. M.. **Atividade antiproliferativa in vitro do látex, de extratos brutos e de frações obtidas a partir do *Synadenium grantii* hook. F.**. 2012. Dissertação (Mestrado Odontologia) - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2012

GUPTA, A.; KUMAR, B. S.; NEGI, A. S. Current status on development of steroids as anticancer agents. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 137, p. 242-270, 2013.

HABA, H. et al. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 9, p. 1255-1260, 2007.

HAINES, D. W.; WARREN, F. L. The euphorbia resins .2. the isolation of taraxasterol and a new triterpene, tirucallol, from *E. tirucalli*. **Journal of the Chemical Society**, n. Oct, p. 2554-2556, 1949.

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **Jornal De Pediatria**, v. 84, n. 4, p. S52-S57, 2008.

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, n. 3, p. 255-262, 2012.

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**, v. 30, n. 10, p. 1205-1215, 2015.

HSIEH, Y. J. et al. *Euphorbia formosana* Root Extract Induces Apoptosis by Caspase-Dependent Cell Death via Fas and Mitochondrial Pathway in THP-1 Human Leukemic Cells. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1949-1962, 2013.

ILYAS, M.; PARVEEN, M.; AMIN, K. M. Y. Neriifolione, a triterpene from *Euphorbia neriifolia*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 3, p. 561-563, 1998.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, p. 44, 2014.

KANUNFRE, C.C et al. *Euphorbia umbellata* bark extracts – an in vitro cytotoxic study. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2017.

KINGHORN, A. D. Major skin-irritant principle from *Synadenium grantii*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 12, p. 1446-1447, 1980.

KUMAR, V. Robbins & Cotran, patologia: bases patológicas das doenças. 9ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro, p. 606-633, 2016.

LEBOGO, K. W. et al. Semi-purified extracts of *Commelina benghalensis* (Commelinaceae) induce apoptosis and cell cycle arrest in Jurkat-T cells. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, 2014.

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, n. 12, p. 4333-4339, 2012.

LUCENA, M. D. F. D. A.; ALVES, M. Taxonomic notes for Euphorbiaceae s.l. from northeastern Brazil **Hoehnea**, v. 37, n. 1, p. 71-85, 2010.

LUZ, L. E. C. et al. Cytotoxicity of latex and pharmacobotanical study of leaves and stem of *Euphorbia umbellata* (Janauba). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 4, p. 344-352, 2015.

MACIEL, M. A. M. et al. Medicinal plants: The need for multidisciplinary scientific studies. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAHBUB, A. A. et al. Differential Effects of Polyphenols on Proliferation and Apoptosis in Human Myeloid and Lymphoid Leukemia Cell Lines. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 1601-1613, 2013.

MENON, M. et al. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, 'f'. **Plant Science**, v. 163, n. 1, p. 131-139, 2002.

MUNHOZ, A. C. M. et al. Chemical and Pharmacological Investigation of the Stem Bark of *Synadenium grantii*. **Planta Medica**, v. 80, n. 6, p. 458-464, 2014.

MUNRO, B. et al. Phytochemical, Antioxidant and Anti-Cancer Properties of *Euphorbia tirucalli* Methanolic and Aqueous Extracts. **Antioxidants**, v. 4, n. 4, p. 647-661, 2015.

MWINE, J. T.; VAN DAMME, P. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p. 652-662, 2011.

NOGUEIRA, I. A. L. et al. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 474-478, 2008.

OLIVEIRA Jr., R.J.; RODRIGUES, C.S.; LACERDA, E. P. S. Avaliação da atividade antitumoral do látex bruto de *Synadenium grantii* Hook. f. DL 50 e o tratamento *in vivo* via oral. in: Reunião Anual da SBPC, 57, 2005, Fortaleza. **Anais...** Disponível em: <http://www.medicinacomplementar.com.br/tema9551210cex.asp>.

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

PADUCH, R. et al. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007.

PRABHU, B.; BALAKRISHNAN, D.; SUNDARESAN, S. Antiproliferative and anti-inflammatory properties of diindolylmethane and lupeol against N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine induced bladder carcinogenesis in experimental rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 685-692, 2016.

RAGASA, C. Y.; CORNELIO, K. B. Triterpenes from *Euphorbia hirta* and their cytotoxicity. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 5, p. 528-533, 2013.

RAHMAN, H. S. et al. Antileukemic effect of zerumbone-loaded nanostructured lipid carrier in WEHI-3B cell-induced murine leukemia model. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1649-1666, 2015 2015.

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, n. 10, p. 1313-1322, 2006.

RAUTH, S. et al. Lupeol evokes anticancer effects in oral squamous cell carcinoma by inhibiting oncogenic EGFR pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 417, n. 1-2, p. 97-110, 2016.

REIS, M. A. et al. Diterpenes from *Euphorbia piscatoria*: Synergistic Interaction of Lathyranes with Doxorubicin on Resistant Cancer Cells. **Planta Medica**, v. 80, n. 18, p. 1739-1745, 2014.

RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G. S.; GAL-EDD, N., et al (Ed.). **Assay Guidance Manual**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.

RYERSON, A. B. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer. **Cancer**, v. 122, n. 9, p. 1312-1337, 2016.

SALIMIKIA, I. et al. Phytochemical Analysis and Antioxidant Activity of *Salvia chloroleuca* Aerial Extracts. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 18, n. 8, 2016.

SONG, H. et al. Cytotoxic Effects of Tetracycline Analogues (Doxycycline, Minocycline and COL-3) in Acute Myeloid Leukemia HL-60 Cells. **Plos One**, v. 9, n. 12, p. 19, 2014.

UZABAKILIHO, B.; LARGEAU, C.; CASADEVALL, E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *Euphorbia grantii*, *Euphorbia tirucalli* and *Synadenium grantii*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 11, p. 3041-3045, 1987.

VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **Bmc Research Notes**, v. 8, p. 10, 2015.

VASAS, A.; HOHMANN, J. *Euphorbia* Diterpenes: Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis (2008-2012). **Chemical Reviews**, v. 114, n. 17, p. 8579-8612, 2014.

WANG, J. F. et al. Five new phorbol esters with cytotoxic and selective anti-inflammatory activities from *Croton tiglium*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 9, p. 1986-1989, 2015.

WANG, L. et al. Structurally diversified diterpenoids from *Euphorbia dracunculoides*. **Tetrahedron**, v. 71, n. 34, p. 5484-5493, 2015.

WANG, L. et al. Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 4, p. 1279-1285, 2013.

WANG, S. S. et al. Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of taraxasterol on adjuvant-induced arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 187, p. 42-48, 2016.

WEBSTER, G. L.. Systematics of the *Euphorbiaceae*. Annals of the Botanical Garden. Califórnia, EUA, v.81, n.1, p.144, 1994

ZHANG, P. X. et al. Ultrasonic-Assisted Nebulization Extraction Coupled with SPE and HPLC for the Determination of Triterpenoids in Root of *Euphorbia pekinensis* Rupr. **Chromatographia**, v. 76, n. 15-16, p. 967-974, 2013.

ZHAO, L. et al. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. **Nature**, v. 523, n. 7562, p. 607, 2015.

ZOLFAGHARI, B. et al. Cyclomyrsinane and premyrsinane diterpenes from *Euphorbia sogdiana* Popov. **Tetrahedron**, v. 72, n. 35, p. 5394-5401, 2016.