

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EVELYN ASSIS DE ANDRADE

EFEITO CITOTÓXICO DO LÁTEX DE *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns
(EUPHORBIACEAE) PARA MODELO DE MELANOMA MURINO

PONTA GROSSA

2020

EVELYN ASSIS DE ANDRADE

EFEITO CITOTÓXICO DO LÁTEX DE *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns
(EUPHORBIACEAE) PARA MODELO DE MELANOMA MURINO

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame
Coorientadora: Prof^a Dr^a Kátia Sabrina Paludo

PONTA GROSSA

2020

A553 Andrade, Evelyn Assis de

Efeito citotóxico do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) para modelo de melanoma murino / Evelyn Assis de Andrade. Ponta Grossa, 2020.

68 f.

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: Profa. Dra. Kátia Sabrina Paludo.

1. Euphorbia umbellata. 2. Terpenos. 3. Melanoma. 4. Citotoxicidade. 5. Ésteres de forbol. I. Beltrame, Flávio Luís. II. Paludo, Kátia Sabrina. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615.321

Ponta Grossa, 06 de março de 2020.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 05/2020 DA MESTRANDA **EVELYN ASSIS DE ANDRADE** REALIZADA NO DIA 06 DE MARÇO DE 2020, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos seis dias de março de dois mil e vinte, às 14h30min, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor Flávio Luis Beltrame reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Evelyn Assis de Andrade, na linha de pesquisa: Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais, constituída pelo Professor Doutor Flávio Luis Beltrame (UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): Professor Doutor Airton Vicente Pereira (UEPG/PR) e Professor Doutor Francisco Filipak Neto (UFPR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: **"EFEITO CITOTÓXICO DO LÁTEX DE *Euphorbia umbellata* (PAX) BRUYNS (EUPHORBIACEAE) PARA MODELO DE MELANOMA MURINO"**

Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se favorável a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 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: _____

Flávio Luis Beltrame
Flávio Luis Beltrame 1 - (DEFAR-UEPG) - Presidente

Airton Vicente Pereira
Airton Vicente Pereira 2 - (DEFAR-UEPG) – Titular

Francisco Filipak Neto
Francisco Filipak Neto 3 - (UFPR) – Titular

AGRADECIMENTOS

A Deus, por direcionar meus caminhos e por colocar as pessoas certas nos momentos certos na minha vida.

À minha família, por me proporcionarem a melhor educação possível, por sempre acreditarem em mim e por lutarem todas as batalhas comigo.

Aos meus grandes amigos, Guilherme dos Anjos Camargo e Valter Paes de Almeida, por serem a minha companhia diária nos últimos 6 anos e compartilharem dos mesmos objetivos que eu, tornando tudo sempre mais fácil e leve.

À Maria Luiza Deschamps, minha grande amiga, por todo apoio, por se fazer presente e por transformar com entusiasmo cada mínimo detalhe em uma grande conquista.

Aos amigos Aline da Silva Justo, Bruna Mikulis Lemes, Bruno Rodrigo Minozzo e Luiza Stoltz Cruz, minha família no laboratório 23, com os quais me diverti e aprendi muito.

À minha querida aluna de iniciação científica, Isadora Machinski, que cedeu seu tempo, seus finais de semana e suas férias para me ajudar, sendo com quem pude compartilhar bons momentos e muitos aprendizados ao longo deste Mestrado.

À Lívia Eidam Camargo Luz e à Bruna Carletto, por compartilharem seus conhecimentos e me ensinarem muito do que desenvolvi neste trabalho.

Às queridas Luciane Mendes Monteiro, Elizabete Munhoz, Ely Oliveira e Marilene Terezinha Barbosa, por todos os almoços, conversar, risadas e apoio.

À profa. Dra. Jane Manfron Budel, minha primeira orientadora, com quem aprendi a amar a pesquisa científica.

Aos prof. Dr. Francisco Filipak Neto, prof. Dr. Giovani Marino Favero, prof. Dr. Bruno Rodrigo Minozzo e prof. Dr. Airton Vicente Pereira, pela disposição em contribuir construtivamente para a melhoria deste trabalho.

À profa. Dra. Kátia Sabrina Paludo, por coorientar este projeto, pelo constante sorriso no rosto e doçura nas palavras que me inspiraram e motivaram todos os dias.

Ao prof. Dr. Flávio Luís Beltrame, por ser muito mais do que um orientador científico e por contribuir com tantos ensinamentos para a minha vida, mantendo-se sempre ético e honesto, características que me fazem ter tamanha admiração e respeito.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.
(Albert Einstein)

RESUMO

Euphorbia umbellata (Pax) Bruyns é conhecida popularmente como “janaúba” e seu látex é empiricamente utilizado como uma “garrafada” para tratamento de diversas doenças, entre elas o câncer. Frente a isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade citotóxica *in vitro* e *in vivo* de compostos presentes no látex de *E. umbellata*, baseando-se em seu uso e indicação etnofarmacológica e relacionar os resultados com a composição química dessa matriz vegetal. Para tanto, o látex foi coletado e fracionado em extrator Soxhlet, do qual foram obtidas 8 frações, as quais foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade (MTT e vermelho neutro) frente à linhagem B16F10 (melanoma murino); os resultados foram utilizados para o cálculo do CI_{50} e, com base nestes, pode-se calcular o índice de seletividade (IS). Para os ensaios *in vivo*, foram utilizados 36 camundongos C57BL/6, machos, nos quais foram inoculadas as células B16F10 para formação do tumor e posteriormente estes animais foram tratados com a subfração diclorometano nas concentrações de 1 mg/kg e 10 mg/kg por 15 dias. Os resultados *in vitro* demonstraram-se pertinentes para o látex ($CI_{50} = 0,69 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$, com IS = 0,6 por MTT; e $CI_{50} = 0,02 \pm 0,004 \mu\text{g/mL}$, com IS = 6,3 por vermelho neutro) e para a fração hexano ($CI_{50} = 24,44 \pm 2,30 \mu\text{g/mL}$, com IS = 0,8, por MTT e $CI_{50} = 21,30 \pm 16,60 \mu\text{g/mL}$, com IS = 1,1 por vermelho neutro) e promissores para as subfrações éter de petróleo ($CI_{50} = 5,99 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$, com IS = 3,98, por MTT) e diclorometano ($CI_{50} = 16,20 \pm 7,33 \mu\text{g/mL}$, com IS = 0,30 por MTT). A análise espectrofotométrica das frações permitiu determinar que a subfração diclorometano apresenta maior quantidade de terpenos totais expressos em eufol. Acrescenta-se a isso o dado que a análise das frações, por CLAE-EM/EM permitiu quantificar grande quantidade de ésteres de forbois nas frações clorofórmio e acetato de etila e na subfração etanol. Com relação aos resultados *in vivo*, para o experimento realizado nesse trabalho, se verificou que a subfração diclorometano não demonstrou diferença significativa no volume do tumor nas concentrações testadas, frente ao controle negativo. Conclui-se que o látex de *E. umbellata* apresenta potencial citotóxico *in vitro* frente a linhagem B16F10, resultado esse que não foi confirmado nos experimentos *in vivo*, nesse trabalho. Ainda, pode-se inferir que essa ação pode estar relacionada a presença de terpenos na matriz vegetal.

Palavras-chave: *Euphorbia umbellata*. Terpenos. Melanoma. Citotoxicidade. Ésteres de forbol.

ABSTRACT

Euphorbia umbellata (Pax) Bruyns is popularly known as "janauba" and its latex is empirically used for the treatment of several diseases, including cancer. So, the aim of this work was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* cytotoxic activity of compounds present in *E. umbellata* latex, based on its use and ethno pharmacological indication, and correlate the results to the chemical composition of this plant. For this, the latex was collected and fractionated in Soxhlet extractor and 8 extracts (samples) were obtained. The extracts were used in the cytotoxicity assays (MTT and neutral red) against the B16F10 (murine melanoma) cell lines. The results were used to calculate the IC₅₀ and, based on these; the selectivity index (IS) was determinate. For *in vivo* assays, 36 male C57BL/6 mice were used and B16F10 cells were inoculated for tumor formation and subsequently these animals were treated with dichloromethane subfraction at concentrations of 1 mg/ml and 10 mg/ml per 15 days. *In vitro* results were pertinent for latex (IC₅₀ = 0.69 ± 0.12 µg/ml, with IS = 0.6 by MTT assay; and IC₅₀ = 0.02 ± 0.004 µg/ml, with IS = 6.3 by neutral red assay) and for the hexane fraction (IC₅₀ = 24.44 ± 2.30 µg/ml, with IS = 0.8, by MTT assay and IC₅₀ = 21.30 ± 16.60 µg/ml, with IS = 1.1 by neutral red assay); for the petroleum ether (IC₅₀ = 5.99 ± 0.23 µg/ml with IS = 3.98 by MTT) and dichloromethane (IC₅₀ = 16.20 ± 7.33 µg/ml with IS = 0.30 by MTT) subfractions the results were promising. The spectrophotometric analysis of the fractions allowed determining that the dichloromethane subfraction has the highest amount of total terpenes expressed in eufol. In addition, the analysis of fractions by the LC-MS/MS technique allowed determining that the chloroform and ethyl acetate fractions and the ethanol subfraction presented a large amount of phorbol esters in their compositions. Regarding the *in vivo* results, for the experiment carried out in this work, it was found that the dichloromethane subfraction did not show a significant difference in the tumor volume in the tested concentrations, compared to the negative control. It is concluded that *E. umbellata* latex has *in vitro* cytotoxic potential compared to the B16F10 cell, a result that was not confirmed in the *in vivo* experiments in this work; it can still be inferred that this action may be related to the presence of terpenes in the plant matrix.

Keywords: *Euphorbia umbellata*. Terpenes. Melanoma. Cytotoxicity. Phorbol Esters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Espécie <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae).....	17
Figura 2 –	Estrutura química do acetato de tetradecanoil forbol (PMA).....	22
Figura 3 –	Estrutura química do triterpeno tetracíclico eufol.....	23
Figura 4 –	Efeito do látex de <i>E. umbellata</i> na viabilidade celular das linhagens 3T3 (A e C) e B16F10 (B e D) pelos ensaios de MTT (A e B) e vermelho neutro (C e D).....	37
Figura 5 –	Efeito da fração hexano do látex de <i>E. umbellata</i> na viabilidade celular das linhagens 3T3 (A e C) e B16F10 (B e D) pelos ensaios de MTT (A e B) e vermelho neutro (C e D).....	39
Figura 6 –	Efeito da fração clorofórmio do látex de <i>E. umbellata</i> na viabilidade celular das linhagens 3T3 (A e C) e B16F10 (B e D) pelos ensaios de MTT (A e B) e vermelho neutro (C e D).....	40
Figura 7 –	Efeito da fração acetato de etila do látex de <i>E. umbellata</i> na viabilidade celular das linhagens 3T3 (A e C) e B16F10 (B e D) pelos ensaios de MTT (A e B) e vermelho neutro (C e D).....	41
Figura 8 –	Efeito da fração metanol do látex de <i>E. umbellata</i> na viabilidade celular das linhagens 3T3 (A e C) e B16F10 (B e D) pelos ensaios de MTT (A e B) e vermelho neutro (C e D).....	42
Figura 9 –	Efeito das subfrações éter de petróleo, etanol e metanol na viabilidade celular das linhagens 3T3 (A e C) e B16F10 (B e D) pelo ensaio de MTT.....	45
Figura 10 –	Efeito da subfração diclorometano na viabilidade celular das linhagens 3T3 (A e C) e B16F10 (B e D), por ensaios de MTT (A e B) e vermelho neutro (C e D).....	46
Figura 11 –	Curva de calibração para a quantificação do conteúdo total de terpenoides.....	48
Figura 12 –	Cromatograma da fração hexano.....	51
Figura 13 –	Cromatograma da subfração éter de petróleo.....	52
Figura 14 –	Cromatograma da subfração diclorometano.....	53
Figura 15 –	Cromatograma do acetato de tetradecanoil forbol (phorbol 12-myristate 13-acetate - PMA) com fragmentação à perda de água (A).....	54
Figura 16 –	Estrutura química do éster diterpênico ingenol 3-(2,4-decadienoate).....	54
Figura 17 –	Estrutura química do éster diterpênico 4-deoxyphorbol 12-acetate-13-[(2Z,4E)-2,4,6-decatrienoate].....	55

Figura 18 – Curva de calibração para quantificação de forbois.....	56
Figura 19 – Evolução do crescimento tumoral de camundongos do Grupo Controle.....	58
Figura 20 – Presença de icterícia e metástases em camundongos C57BL/6 inoculados com células B16F10, pertencentes ao grupo 1, após 15 dias de tratamento.....	59
Figura 21 – Volume do tumor dos animais após 15 dias de tratamento.....	60
Quadro 1 – Linha do tempo referente à realização dos ensaios <i>in vivo</i>	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) e IS determinados para o tratamento das linhagens celulares com o látex e as frações do látex de <i>E. umbellata</i> nos ensaios de MTT e vermelho neutro.....	43
Tabela 2 –	Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) e IS determinados para o tratamento das linhagens celulares 3T3 e B16F10 com as subfrações da fração hexano do látex de <i>E. umbellata</i> por ensaio de MTT.....	47
Tabela 3 –	Conteúdo total de terpenoides das 8 amostras obtidas após o fracionamento do látex de <i>E. umbellata</i>	49
Tabela 4 –	Quantificação de forbois em 8 extratos obtidos do látex de <i>E. umbellata</i>	56
Tabela 5 –	Peso dos camundongos antes e após o período de tratamento.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CEUA	Comitê de Ética do Uso de Animais
CG	Cromatografia Gasosa
Cl ₅₀	Concentração para inibir em 50 % o número de células viáveis
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
EM	Espectrometria de Massas
ESI	Ionização <i>Electrospray</i>
FA	Fração Acetato
FC	Fração Clorofórmio
FH	Fração Hexano
FM	Fração Metanol
g	Grama
h	Hora
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IS	Índice de Seletividade
L	Litro
Log P	Coeficiente de partição
m	Metro
M	Molar
m/z	Massa/Carga
min	Minuto
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
NAEVI	Núcleo Avançado de Estudos da Vida
NC	Não Calculado
NCI	Instituto Nacional do Câncer (<i>National Cancer Institute</i>)
p	Probabilidade de Significância

PBS	Tampão Fosfato-Salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PMA	Acetato de tetradecanoil forbol (<i>Phorbol-12-myristate 13-acetate</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDI	Subfração Diclorometano
SEP	Subfração Éter de Petróleo
SET	Subfração Etanol
SFB	Soro Fetal Bovino
SIM	Sistema De Informação sobre Mortalidade
SME	Subfração Metanol
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UI	Unidade Internacional de Medida
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
V	Volt – unidade de tensão elétrica
v	Volume
VN	Vermelho Neutro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μ	micro (10^{-6})
m	mili (10^{-3})
n	nano (10^{-9})
°	Grau
K	Quilo
$\leq$	Menor ou igual a
<	Menor que

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1	FAMÍLIA EUPHORBIACEAE	20
3.2	GÊNERO <i>Euphorbia</i>	20
3.3	ESPÉCIE <i>Euphorbia umbellata</i>	22
3.4	CÂNCER	24
3.5	MELANOMA	25
3.5.1	Melanoma murino.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	28
4.2	EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	28
4.3	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i>	28
4.3.1	Linhagens celulares	28
4.3.2	Ensaio de redução de MTT	29
4.3.3	Ensaio de Vermelho Neutro	29
4.3.4	Determinação do CI_{50}	30
4.3.5	Determinação do índice de seletividade (IS)	30
4.4	ANÁLISE QUÍMICA	30
4.4.1	Conteúdo Total de Terpenoides	30
4.4.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM)	31
4.5	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i>	32
4.5.1	Aspectos éticos	32

4.5.2	Animais	32
4.5.3	Implante das células tumorais	32
4.5.4	Grupos Experimentais	33
4.5.5	Medida dos tumores	34
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	35
5.2	ANÁLISE <i>IN VITRO</i>	36
5.3	ANÁLISE <i>IN VIVO</i>	57
6	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais antigos, comunidades tradicionais buscavam no uso de plantas uma forma de tratamento para as suas doenças. Tendo em conta que naquela época não havia informações sobre as causas das doenças ou sobre os efeitos das plantas, o uso destas baseou-se na experiência. Com o tempo, os mecanismos de ação dos vegetais medicinais foram sendo descobertos, fazendo com que, gradualmente, o uso abandonasse o empirismo e se fundamentasse em dados comprovados (PETROVSKA, 2012; SECA; PINTO, 2018).

Historicamente, os produtos naturais desempenharam um papel altamente significativo no processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos que, conjuntamente com o desenvolvimento da química orgânica, principalmente a partir do século XIX, permitiu que fossem registrados os primeiros trabalhos científicos de isolamento de princípios ativos de extratos, obtidos de espécies já conhecidas como medicinais (MONTANARI; BOLZANI, 2001; NEWMAN; CRAGG, 2012).

No século XX, o surgimento dos antibióticos aliado ao desenvolvimento marcante de fármacos sintéticos produzidos pela indústria farmacêutica foram os principais causadores do declínio do uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças e, conseqüentemente, do investimento no estudo para a descoberta de novos fármacos de origem vegetal. Nas últimas décadas, uma importante mudança no paradigma das sociedades ocidentais, atrelado a aspectos como baixa eficácia, aumento de contraindicações e efeitos colaterais – cada vez mais frequentes nas novas drogas sintéticas – fizeram com que os produtos naturais passassem novamente a ocupar papel de destaque na terapêutica (MONTANARI; BOLZANI, 2001; PETROVSKA, 2012).

Em particular, os fitofármacos têm sido o pilar da quimioterapia do câncer há vários anos e mais de 3000 plantas em todo o mundo já foram relatadas devido às suas propriedades anticâncer. No entanto, na prática, um número muito maior de produtos naturais não oficiais é conhecido e utilizado pela população, e sua aplicação está fundamentada na etnofarmacologia, a qual contribuiu para a descoberta de mais de 70 % dos medicamentos em uso para o tratamento do câncer (ALVES-SILVA *et al.*, 2017; DEVIENNE; RADDI; POZETTI, 2004; MANN, 2002; PETROVSKA, 2012; TARIQ *et al.*, 2017).

Neste contexto, insere-se a espécie *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, conhecida popularmente no Brasil como “janaúba” e pertencente à família Euphorbiaceae. Esta espécie vegetal é um arbusto (Figura 1) de origem africana que se desenvolve principalmente em climas tropicais e subtropicais, a qual se adaptou muito bem às condições climáticas do Brasil e, devido a isso, foi inicialmente introduzida no país com a finalidade ornamental.

Figura 1 – Espécie *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae)



Fonte: A autora.

O látex desta espécie é popularmente utilizado na forma de um preparado caseiro (garrafada), o qual é obtido por diluição de 18 gotas do látex em 1 litro de água, tendo como dose recomendada a de um (1) cálice, três (3) vezes ao dia. Esta preparação é amplamente administrada por via oral, para o tratamento de diversas doenças, em especial o tratamento de vários tipos de câncer (COSTA *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2009; MUNHOZ *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2013; ORTÊNCIO, 1997).

Frente a isso, o presente trabalho teve como principal finalidade a comprovação da atividade citotóxica dos compostos presentes no látex da espécie *E. umbellata*, baseando-se em seu uso e indicação etnofarmacológica, visando correlacionar seus possíveis efeitos biológicos com a composição química.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* de compostos presentes no látex de *E. umbellata* (Pax) Bruyns, correlacionando com a composição química.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e fracionar o material vegetal (látex de *E. umbellata*);
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do látex de *E. umbellata* frente à linhagem de melanoma murino (B16F10);
- Calcular a concentração que induz a morte de 50 % das células (CI₅₀) a partir dos ensaios de citotoxicidade;
- Determinar o índice de seletividade (IS) do látex de *E. umbellata* frente à linhagem tumoral (B16F10) em relação a uma linhagem não-tumoral (3T3);
- Analisar quantitativamente por técnicas espectrofotométricas e espectroscópicas a classe dos terpenos e, mais especificamente, os diterpenos do tipo ésteres de forbol nas frações e subfrações obtidas do látex de *E. umbellata*;
- Avaliar o efeito antitumoral *in vivo* da subfração diclorometano do látex de *E. umbellata* utilizando um modelo experimental de melanoma murino.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FAMÍLIA EUPHORBIACEAE

A família Euphorbiaceae Juss. é considerada uma das maiores famílias pertencentes ao grupo das Angiospermas, apresentando 229 gêneros e 6.511 espécies aceitas no mundo (THE PLANT LIST, 2020a). No mesmo sentido, a Flora do Brasil (2020a) contabiliza a presença de 63 gêneros e 943 espécies aceitas no país.

Terpenos, compostos fenólicos e alcaloides são as classes de metabólitos secundários mais frequentemente relatados nas espécies pertencentes à família Euphorbiaceae, devido à alta eficácia e ao potencial farmacológico (MWINE; DAMME, 2011).

A influência do uso popular de espécies dessa família é evidenciada em diversos estudos. Entre os anos de 1980 a 2008, em diversas publicações, foram citadas 84 espécies de plantas medicinais de uso na prevenção e/ou tratamento de câncer, sendo que destas, a família Euphorbiaceae foi a mais representada (8 espécies), sendo relacionada principalmente aos gêneros *Croton* (2 espécies), *Cnidocolus* (3 espécies) e *Euphorbia* (3 espécies) (DE MELO *et al.*, 2011).

3.2 GÊNERO *Euphorbia*

Em sua classificação, o gênero *Euphorbia* L. possui 2031 espécies reconhecidas no mundo (THE PLANT LIST, 2020b), e no Brasil compreende 64 espécies aceitas (FLORA DO BRASIL, 2020b).

Dentre as várias classes de metabólitos secundários relatadas, os diterpenos destacam-se como responsáveis pela atividade citotóxica e antitumoral das espécies do gênero, com destaque aos pertencentes às classes dos jatrofanos, latiranos, tiglicanos, ingenanos e abietanos (FEI *et al.*, 2016; GAO *et al.*, 2015; LIANG *et al.*, 2019; SHI; SU; KIYOTA, 2008; VASAS; HOHMANN, 2014; WANG *et al.*, 2019).

O extrato metanólico de partes vegetativas aéreas de *Euphorbia cheiradenia* possui efeito citotóxico em várias concentrações, em especial para células Jurkat,

que apresentaram CI_{50} de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, além de indicar um tratamento dose-dependente com acúmulo de células na fase sub-G1 (AMIRGHOFRAAN *et al.*, 2006).

O extrato aquoso de folhas de *Euphorbia hirta* demonstra capacidade em induzir a apoptose na linhagem celular de mama (MCF-7) com extrato concentrado a 25 % e 50 % (BEHERA *et al.*, 2016).

O látex de *Euphorbia antiquorum* já é relatado como citotóxico, sendo dose-dependente frente a células humanas de câncer do colo do útero e com parada do ciclo celular na fase S. Além disso, diterpenos isolados desta espécie demonstraram a propriedade de inibir a geração de óxido nítrico nas células BV-2 induzidas por lipopolissacarídeos. Pesquisas adicionais sobre *docking* molecular revelaram as afinidades entre os diterpenos obtidos dessa espécie vegetal e a óxido nítrico sintase induzível (HSIEH *et al.*, 2015; LIANG *et al.*, 2019).

Além de estudos que avaliam os compostos presentes nos extratos, como demonstrado acima, alguns autores já descreveram em seus trabalhos a atividade biológica de substâncias isoladas de espécies de *Euphorbia*, como é o caso do triterpeno eufol. O eufol é a substância majoritária das espécies deste gênero, tendo sido obtido do látex de *Euphorbia tirucalli* e avaliado quanto ao seu efeito antitumoral, demonstrando efeito citotóxico contra diferentes células cancerosas (faixa de CI_{50} de 1,41 a 38,89 μM), particularmente em células escamosas esofágicas (11,08 μM) e células de carcinoma pancreático (6,84 μM), seguidas por próstata, melanoma e câncer de cólon. Adicionalmente, a substância eufol apresentou interações sinérgicas com gencitabina e paclitaxel frente às linhagens celulares pancreáticas e esofágicas, respectivamente, o que sugere um potencial anticâncer tanto como agente único quanto em combinação com quimioterápicos convencionais. Eufol de *E. tirucalli* demonstra ainda citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* contra células de glioma, incluindo a ativação da morte celular associada à autofagia (SILVA *et al.*, 2018a; SILVA *et al.*, 2018b).

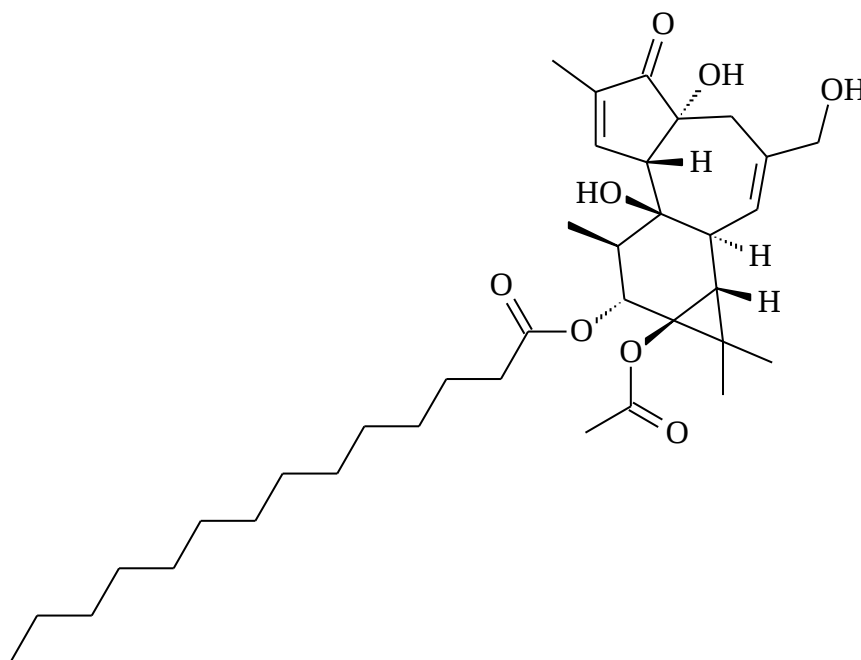
Adicionalmente, a substância ingenol-3-angelato, um éster diterpeno hidrofóbico isolado do látex de *Euphorbia peplus*, é descrita pela sua atividade pré-clínica para o tratamento do câncer de pele. Três aplicações tópicas diárias desta substância curaram uma série de tumores, sendo considerado um novo agente tópico contra câncer de pele, com mecanismo de ação que envolve a membrana plasmática e a ruptura mitocondrial e necrose primária, resultando em um excelente produto quimioterápico (OGBOURNE *et al.*, 2004).

3.3 ESPÉCIE *Euphorbia umbellata*

A espécie *E. umbellata* (Pax) Bruyns apresenta como sinônimos: *Euphorbia pseudograntii* Bruyns, *Synadenium grantii* Hook. f., *Synadenium umbellatum* Pax e *Synadenium umbellatum* var. *puberulum* (WCSP, 2018).

O látex é potencialmente tóxico, podendo ocorrer intoxicação e lesões, tanto por ingestão quanto por contato com a pele e olhos, e isto se deve pela presença, principalmente, de diterpenos do núcleo tigliano, como os ésteres de forbois (por exemplo, o acetato de tetradecanoil forbol (PMA)) (Figura 2).

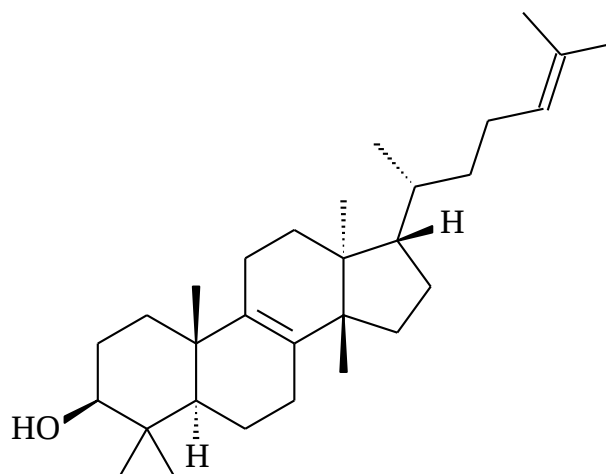
Figura 2 – Estrutura química do acetato de tetradecanoil forbol (PMA)



Fonte: A autora

Também é relatado na literatura que outras partes desta espécie vegetal possuem compostos com potencial farmacológico, dentre eles os terpenos (especialmente os triterpenos, como por exemplo, o eufol) (Figura 3) (ANDERSEN *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2012; MUNHOZ *et al.*, 2014).

Figura 3 – Estrutura química do triterpeno tetracíclico eufol



Fonte: A autora.

Estudos fitoquímicos comprovam que os terpenos são os compostos majoritários desta espécie, sendo a eles atribuída a atividade anticâncer (ORTÊNCIO, 1997).

Algumas substâncias já isoladas da espécie *E. umbellata* (eufol, acetato de germanicol e citrostadienol) foram avaliadas em diferentes estudos quanto às suas atividades citotóxicas *in vitro*. O eufol demonstra ação citotóxica contra uma variedade de células tumorais, com seletividade contra células leucêmicas, porém demonstra atividade citotóxica reduzida contra células de melanoma. O acetato de germanicol demonstra baixa atividade citotóxica contra células de linhagem HRT-18, HeLa e Jurkat. O citrostadienol apresenta atividade citotóxica reduzida contra células da linhagem B16F10 (CRUZ *et al.*, 2018; LUZ *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

As atividades citotóxicas do látex e das frações do látex de *E. umbellata* foram testadas em diferentes linhagens celulares tumorais, identificando a fração hexano como a mais citotóxica (menor CI_{50}), com consequente maior citotoxicidade e maior sensibilidade frente às linhagens até então estudadas. Para a linhagem de melanoma (B16F10) tanto o látex concentrado quanto a sua forma diluída (idêntica à de uso popular), possuem atividade citotóxica (CRUZ, 2017; LUZ *et al.*, 2015; LUZ *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Com relação aos mecanismos de morte celular, estudos demonstram fragmentação do DNA e apoptose para a fração hexano em células da linhagem Jurkat, com parada de ciclo celular na fase G0/G1. Para as células B16F10 tratadas com látex puro, identificou-se que o mecanismo de ação envolvido é o de parada do

ciclo celular na fase S-G2/M. E para o eufol, acredita-se que o mecanismo de ação envolvido, possivelmente seja de apoptose (CRUZ *et al.*, 2018; LUZ *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Ensaio *in vivo* demonstrou redução significativa da massa tumoral de melanoma em camundongos (aproximadamente 40 % de redução do tumor) tratados com a dose correspondente à utilizada popularmente (na preparação de uma garrafada, administrada 3 vezes ao dia) (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Em adição, pesquisa empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) em amostras biológicas (plasma e fígado de ratos) demonstrou certa concentração de eufol nessas matrizes (CRUZ *et al.*, 2018).

Frente a isso, os resultados apresentados na literatura demonstram o potencial citotóxico de compostos presentes no látex de *E. umbellata*, o que ressalta a importância de aprimorar os estudos científicos a respeito desta matriz, sugerindo, deste modo, o desenvolvimento de novas investigações, a fim de comprovação da viabilidade do uso desta espécie vegetal e, mais especificamente, do seu látex como agente anticâncer.

3.4 CÂNCER

Câncer é o conjunto de mais de 100 tipos de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células e por alterações da estrutura genética (mutações no DNA). No nível celular, o desenvolvimento do câncer é visto como um processo de várias etapas, envolvendo mutação e seleção de células com capacidade de proliferação, sobrevivência, invasão e metástase. Acredita-se que o início do tumor seja o resultado de uma alteração genética que leva à proliferação anormal de uma única célula. A proliferação celular leva então ao crescimento de uma população de células tumorais derivadas de forma clonal. A progressão tumoral se dá quando ocorrem mutações adicionais nas células da população tumoral. Algumas dessas mutações conferem uma vantagem seletiva à célula, tornando seus descendentes dominantes na população tumoral. A seleção clonal continua durante todo o desenvolvimento do tumor, de modo que os tumores adquirem uma malignidade cada vez mais agressiva. Embora algumas dessas mutações causadoras de câncer possam ser geneticamente herdadas, a maioria é

adquirida, principalmente por exposições ambientais (especialmente radiação e agentes químicos), estilo de vida, doenças crônicas, etc. A velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invasão em outros tecidos (formação de metástases) são as principais características que permitem a diferenciação dos diversos tipos de câncer (COOPER, 2000; INCA, 2018; WCRF, 2018).

3.5 MELANOMA

Em meio aos inúmeros tipos de neoplasias, encontram-se as neoplasias cutâneas, as quais são divididas em câncer de pele não melanoma e melanoma.

O melanoma é um tipo de câncer com origem em melanócitos transformados, que são células especializadas produtoras de melanina, substância responsável pela coloração da pele. Embora seja o mais frequente no Brasil e corresponda a 30 % de todos os tumores malignos registrados no país, o melanoma representa apenas 3 % das neoplasias deste órgão. Apesar disso, ainda é o tipo de câncer mais grave, sendo considerado o mais letal (responsável por até 70 % das mortes por câncer de pele), devido principalmente à sua alta probabilidade de ocorrer metástase. A estimativa para o ano de 2018 foi de 6.260 novos casos, sendo 2.920 em homens e 3.340 em mulheres. De acordo com o Sistema de informação sobre Mortalidade (SIM), o número de mortes em 2013 foi de 1.547, sendo 903 homens e 644 mulheres (INCA, 2018; PRADO; SVOBODA; RIGEL, 2019).

Esta neoplasia tem predominância em indivíduos adultos brancos (taxa 20 vezes maior do que para indivíduos negros). Semelhante a todos os outros tipos de câncer, o melanoma é causado por mutações no DNA que alteram a capacidade de uma célula em controlar seu crescimento. A causa mais comum de dano ao DNA nos melanócitos é a radiação ultravioleta da luz solar. Além deste, outros fatores são capazes de aumentar o risco de desenvolvimento de melanoma, como por exemplo: uso de câmaras de bronzamento artificial e, mais frequentemente, predisposição genética (INCA, 2018; O'NEIL; SCOGGINS, 2019).

Sua resistência à terapia, particularmente no que diz respeito ao tratamento quimioterápico, muitas vezes inviabilizou o desenvolvimento de novos fármacos, porém, este perfil mudou nos últimos 10 anos.

Atualmente, a abordagem de tratamento do melanoma é baseada na gravidade ou estágio da doença. Os melanomas do estágio 0 ao estágio II estão

confinados à pele, e a maioria deles pode ser curado por retirada do tumor, principalmente se detectado precocemente. Para alguns pacientes com melanoma em estágio II, pode ser necessária a remoção de linfonodos, pois estes têm maior probabilidade de serem os primeiros afetados pelas células cancerígenas metastatizantes. Os pacientes em estágio II também podem ser tratados com terapia biológica após a remoção cirúrgica. O melanoma em estágio III é caracterizado pela formação de metástases para os linfonodos proximais, de modo que a remoção cirúrgica dos linfonodos é necessária, podendo ser acompanhado por terapia biológica ou quimioterapia. O melanoma em estágio IV se espalha para outros tecidos além dos linfonodos, sendo considerado extremamente grave. Embora nenhuma cura para o estágio IV esteja disponível, a progressão da doença pode ser retardada pela cirurgia e pela administração de quimioterapia, terapia biológica ou radioterapia (O'NEIL; SCOGGINS, 2019; SCHADENDORF; SCHLAG, 2014; SCHADENDORF *et al.*, 2018).

Novas abordagens para o tratamento do melanoma em estágio avançado (IV) têm incluído terapias de combinação de diferentes fármacos, capazes de atuar em diferentes alvos. Como a incidência de melanoma continua a aumentar, principalmente devido à resistência aos tratamentos farmacológicos existentes, a compreensão e aplicação de novas abordagens no tratamento deste tipo de câncer tornam-se cada vez mais importantes no contexto clínico (DA SILVA *et al.*, 2013; INCA, 2018; O'NEIL; SCOGGINS, 2019; PRADO, SVOBODA, RIGEL, 2019).

Embora, atualmente, não exista cura para o melanoma em estágios avançados, há possibilidades que visam aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente. Com isso, é fundamental o desenvolvimento de pesquisas que viabilizem um melhor tratamento aos pacientes.

3.5.1 Melanoma murino

A linhagem celular de melanoma murino, denominada B16F10, foi obtida e estudada por Fidler (1973). Para isso, esse pesquisador coletou de um tumor subcutâneo de camundongo C57BL/6, uma linhagem que havia se desenvolvido espontaneamente, a qual foi cultivada em meio de cultura, sendo chamada de B16-F0. Isolaram-se diversas sublinhagens, até que, após uma das inoculações feitas nos camundongos C57BL/6, identificou-se a presença de pigmentos de melanina

nos pulmões destes animais, o que deu origem então à linhagem B16-F1. Este processo foi repetido até que se obteve a seleção da linhagem B16-F10, caracterizada por ser altamente agressiva e invasiva, possuindo um potencial metastático muito superior à linhagem B16-F0 de surgimento espontâneo.

A linhagem B16F10 tem sido considerada um dos principais modelos de melanoma murino, sendo amplamente utilizado em âmbito laboratorial, devido às suas características histológicas serem muito semelhantes às do melanoma humano e também devido a sua disponibilidade para uso em camundongos e geração de metástases pulmonar a partir de inoculação subcutânea primária (BOIA-FERREIRA, 2014; DA SILVA *et al.*, 2013; OVERWIJK; RESTIFO, 2001).

A alta gravidade do melanoma e a urgência na busca por tratamentos farmacológicos mais eficazes e resolutivos, principalmente para os estágios avançados da doença, reforçam a aplicabilidade da linhagem B16F10 em diferentes estratégias experimentais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo considerado um modelo de qualidade, com características fidedignas ao que ocorre de forma patológica em seres humanos, permitindo a avaliação da atividade citotóxica do látex de *E. umbellata* nesta pesquisa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O látex de *E. umbellata* foi coletado na cidade de Ponta Grossa – PR, (25°4'24" S 50°9'53" O), em outubro e dezembro de 2018, por meio de incisões em pecíolos e caule da espécie vegetal, sendo armazenado sob refrigeração (5 °C) até o momento do uso ou fracionamento.

4.2 EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O fracionamento foi realizado em extrator *Soxhlet*, pelo método de extração contínua à quente. Para tanto, o látex (11,3 g) foi adsorvido em sílica e colocado no equipamento, com adição de 200 mL de cada solvente extrativo (hexano (Log P = 3,9), clorofórmio (Log P = 2,3), acetato de etila (Log P = 0,7) e metanol (Log P = -0,77)), adicionados subsequentemente. Uma amostra da fração hexano (1,5 g) foi submetida a fracionamento, utilizando da mesma metodologia descrita acima, porém com os solventes: éter de petróleo (Log P = 4,66), diclorometano (Log P = 1,25), metanol (Log P = -0,77) e etanol (Log P = -0,31). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo, sob pressão reduzida e, após a concentração, armazenadas sob refrigeração (5 °C).

4.3 AVALIAÇÃO *IN VITRO*

4.3.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas células de melanoma murino (B16F10) (Banco de Células do Rio de Janeiro, código 0342) e de fibroblasto murino (3T3) (Banco de Células do Rio de Janeiro, código 0017). As culturas celulares foram mantidas por expansão contínua em meio RPMI® 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 100 µg/L de estreptomicina e 100 UI/L de penicilina (meio de cultura completo), em estufa a 37 °C com atmosfera umidificada a 5 % de CO₂.

4.3.2 Ensaio de redução de MTT

Foram semeadas 3×10^3 células por poço em placas de 96 poços. Posteriormente, o meio de cada poço foi removido e substituído por meio de cultura completo contendo diferentes concentrações das diferentes amostras (látex, frações do látex e subfrações da fração hexano) e as células foram tratadas por um período de 48 horas. As faixas de concentrações testadas foram de: 0,012 a 0,9 $\mu\text{g/mL}$ para o látex; de 0,2 a 100 $\mu\text{g/mL}$ para as frações do látex; e de 3,125 a 100 $\mu\text{g/mL}$ para as subfrações da fração hexano. Para a leitura, o meio foi descartado e substituído pelo reagente MTT (0,5 mg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C, por um período de 1 a 2 horas. Os cristais de formazan resultantes foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi quantificada a 570 nm, em espectrofotômetro UV/Vis. O controle negativo foi realizado com as células incubadas com RPMI® 1640 suplementado com 10 % Soro Fetal Bovino (SFB), 100 $\mu\text{g/L}$ de estreptomicina e 100 UI/L de penicilina apenas ou com DMSO 0,1 % (para as frações e subfrações que utilizavam esse solvente como diluente). O branco foi obtido procedendo-se a técnica de MTT em um poço sem células. Todas as amostras foram testadas em triplicata e repetidas de duas a quatro vezes. Antes da adição do MTT, todos os poços eram analisados em microscópio invertido para visualização da morfologia celular para posterior comparação com o resultado do MTT. As absorbâncias obtidas foram transformadas em % de viabilidade celular de acordo com a fórmula seguinte:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{absorbância do poço tratado} - \text{absorbância do branco} / \text{absorbância da média dos poços controle negativo} - \text{absorbância do branco}) \times 100.$$

4.3.3 Ensaio de Vermelho Neutro

As células foram semeadas na concentração de 3×10^3 células por poço, em placas de 96 poços e mantidas sob incubação por 24 horas. Após esse período, o meio de cada poço foi removido e substituído por meio de cultura completo contendo a amostra escolhida (látex, frações do látex e subfração diclorometano), em diferentes concentrações (vide tópico 4.3.2) e incubados por 48 horas. Após o período de incubação, todos os poços foram lavados com meio RPMI e na

sequência foram adicionados 200 µL de solução de vermelho neutro (40 µg/mL de vermelho neutro em meio RPMI) e as placas incubadas por um período de 1 a 2 horas, a 37 °C. Após, a solução de vermelho neutro foi removida e as células foram então fixadas com 0,5 % de formaldeído + 1 % CaCl₂ em PBS, por 1 minuto, seguido por diluição com 200 µL de reagente solubilizante de vermelho neutro (50 % de etanol e 1 % de ácido acético em PBS). A absorbância foi determinada a 520 nm, em espectrofotômetro UV/Vis. Os controles foram realizados da mesma forma como descrito para o MTT, assim como o cálculo da % de viabilidade celular.

4.3.4 Determinação do CI₅₀

Os resultados de viabilidade celular obtidos nos ensaios de MTT e vermelho neutro foram utilizados para o cálculo do CI₅₀ das células tratadas, expressando-se a citotoxicidade pela concentração da amostra que induziu inibição celular em 50 % das células. O CI₅₀ foi calculado a partir de uma curva de regressão não linear onde o eixo X era constituído pelas concentrações de tratamento em escala logarítmica e o eixo Y as porcentagens de viabilidade celular. Foi utilizado o programa GraphPad Prism® (versão 6.01), seguindo tutorial fornecido pela GraphPad Software®.

4.3.5 Determinação do índice de seletividade (IS)

Foram utilizados os valores de CI₅₀ obtidos no ensaio de redução de MTT e de vermelho neutro, sendo o IS calculado a partir da razão entre os valores de CI₅₀ calculado para células não tumorais pelo CI₅₀ calculado para células tumorais.

4.4 ANÁLISE QUÍMICA

4.4.1 Conteúdo Total de Terpenoides

Foi determinado por técnica colorimétrica com o auxílio de um espectrofotômetro, utilizando o procedimento proposto por Fan e He (2006). Resumidamente, 10 mg de cada uma das 8 amostras (4 frações do látex e 4 subfrações da fração hexano) foram ressuspensas individualmente em 1 mL de

metanol. Em seguida, 100 µL de cada uma dessas soluções foram misturados com 150 µL de solução de vanilina em ácido acético glacial (5 % p/v) e 500 µL de solução de ácido perclórico. As soluções com as amostras foram aquecidas por 45 minutos a 60 °C e depois resfriadas em banho de água gelada à temperatura ambiente. Após a adição de 2,25 mL de ácido acético glacial, a absorbância de cada amostra foi medida a 548 nm, usando um espectrofotômetro UV/vis. O triterpeno eufol foi usado como padrão, sendo a curva realizada na faixa de 0,05 a 1 mg/mL, em metanol. Os resultados foram expressos em equivalentes de miligrama de eufol (mg de eufol / g de extrato).

4.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM)

Utilizou-se uma coluna C₁₈ (Acquity BEH HSS T3 (1,8 µm, 2,1 x 50 mm)) e uma condição de eluição em gradiente com metanol: ácido fórmico (99,9 : 0,1, v/v, fase B) em água: ácido fórmico (99,9 : 0,1, v/v, fase A) com as seguintes etapas: 50 % a 75 % de B durante 2,0 min; aumento de 75 % para 90 % de B em 2,4 min; mantido em 90 % de B durante 2,0 min; aumentado para 100 % de B durante 1,0 min; mantido corrida isocrática a 100 % de B por 1 min e aplicado gradiente reverso para 50 % de B (0,01 min). Manteve-se sob condição isocrática por 4 minutos antes de cada nova injeção. As frações foram ressuspensas em acetonitrila (1 mg/mL) e filtradas (filtro de seringa com membrana de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílico 0,22 µm e pré-filtro de polipropileno (PP)) antes da injeção. O volume injetado foi de 5 µL e a vazão foi de 0,3 mL/min. A detecção foi realizada por ionização *electrospray* (ESI) em modo positivo; para a qual foram utilizadas as seguintes condições de probe: temperatura da fonte de 150 °C, capilar de 2,5 KV, cone de 25V, energia de colisão de 15 eV, fluxo de gás de dessolvatação de 700 L/h e temperatura de dessolvatação 500 °C. A análise MRM permitiu monitorar: m/z 433,4 → 311; 499,23 → 311; 501,27 → 311; 519,28 → 311; 517,27 → 311; 539,26 → 311; 545,4 → 311; 617,8 → 311; 653,42 → 311; 655,44 → 311; 669,47 → 311 e 311 → 293. O acetato de tetradecanoil forbol (PMA) foi usado como controle positivo e para preparo de uma curva de calibração, a qual foi traçada através da plotagem da área de pico do fragmento de forbol em relação à concentração do composto. O PMA (27,6 mg) foi

precisamente pesado e dissolvido em metanol (6 mL), obtendo-se uma solução estoque de 4,6 mg/mL. Alíquotas da solução-mãe foram pipetadas e completadas até 2 mL de volume para obter as soluções de calibração de metanol (230 a 4600 µg/mL). As soluções da curva de calibração foram preparadas em triplicata.

4.5 AVALIAÇÃO *IN VIVO*

4.5.1 Aspectos éticos

O protocolo experimental foi previamente submetido à análise e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG), sob número de registro 06476/2019.

4.5.2 Animais

Foram utilizados 36 camundongos C57BL/6, machos, com aproximadamente 25 g e 60 dias de vida. Os animais foram mantidos no Núcleo Avançado de Estudos da Vida da Universidade Estadual de Ponta Grossa (NAEVI-UEPG), em temperatura de 22 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas controlado automaticamente e com livre acesso à água e ração.

4.5.3 Implante das células tumorais

As células B16F10 foram cultivadas de acordo com o descrito no item 4.3.1. Culturas com aproximadamente 50 % de confluência foram incubadas com tripsina/EDTA. As células foram coletadas, lavadas com meio completo, centrifugadas e contadas em câmara de Neubauer. Destas, 1×10^5 células foram inoculadas subcutaneamente na região dorsal de camundongos C57BL/6 (OVERWIJK; RESTIFO, 2001). Após 10 dias de inoculação das células e visualização da formação de um tumor palpável, os animais foram divididos nos grupos experimentais.

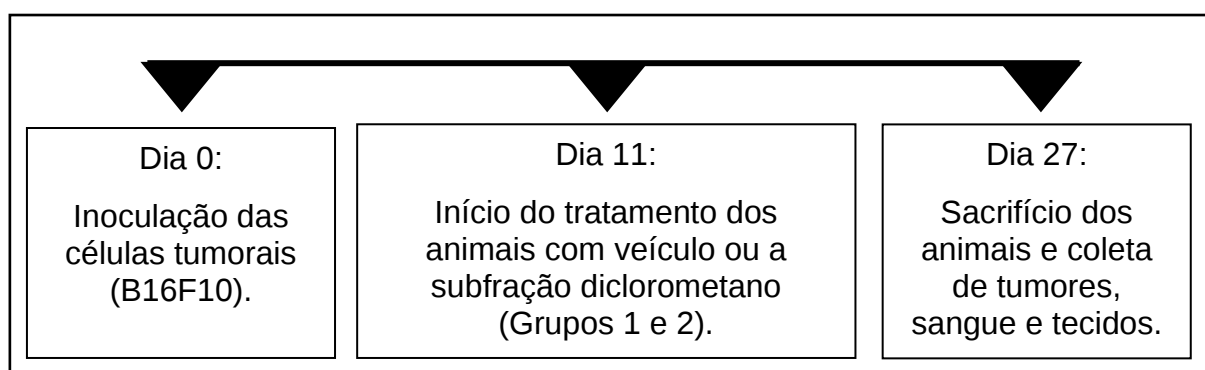
4.5.4 Grupos Experimentais

O tratamento foi realizado uma vez ao dia, no período da manhã, via gavagem (100 µL por animal). Os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo Controle: veículo (suspensão de solução salina + DMSO (0,1%).
- Grupo 1: tratamento com a subfração diclorometano, dose de 1 mg / kg do animal / por dia.
- Grupo 2: tratamento com a subfração diclorometano, dose de 10 mg / kg do animal / por dia.

Os animais foram acompanhados por um período de 25 dias após a inoculação das células tumorais (10 dias da inoculação + 15 dias de tratamento) e após este período foram sacrificados (anestesia inalatória com Isoflurano®) para retirada dos tumores, sangue e órgãos (coração, pulmões, rins e fígado) (Quadro 1). Diariamente os animais eram observados para detecção de sinais físicos e comportamentais característicos de sofrimento (irritabilidade, imobilidade, pouca ingestão de água e alimentos, extravasamento de pus e/ou sangue do local de inoculação). Se uma ou mais características fossem detectadas, o animal seria imediatamente sacrificado por overdose de anestésico.

Quadro 1 – Linha do tempo referente à realização dos ensaios *in vivo*



Fonte: A autora.

4.5.5 Medida dos tumores

Após sacrifício dos animais, o tumor foi retirado para realização das medidas necessárias para cálculo de seu volume, com o auxílio de um paquímetro, para posterior cálculo em mm³, segundo a equação abaixo (CARLETTO, 2015):

$$\text{Volume tumoral (mm}^3\text{)} = \text{medida longitudinal (mm)} \times \text{medida transversal}^2(\text{mm}) \times 0,52$$

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism® (versão 6.01) e expressos como média $\pm$ erro padrão da média, com nível de significância de 5 % ($p \leq 0,05$). Para os ensaios *in vitro* e *in vivo*, os resultados obtidos foram submetidos ao teste de distribuição normal de Shapiro-Wilk e Bartlette, quando paramétricos, foram avaliados por análise de variância (ANOVA de uma via), seguido de pós-teste de Tukey, quando não-paramétricos, foram analisados por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Extração é um termo farmacêutico utilizado para descrever o processo de separação de metabólitos secundários por meio de solventes seletivos, tendo como principais objetivos o isolamento e a identificação dos metabólitos presentes nas espécies vegetais e, em especial, a obtenção de frações enriquecidas em compostos bioativos de interesse. Para isso, faz-se necessária a realização de um procedimento utilizando solventes capazes de separar os compostos desejados, considerando a solubilidade e o coeficiente de partição destes em diferentes solventes, os quais devem ser selecionados com base em seu grau de polaridade crescente (HANDA *et al.*, 2008; SIMÕES *et al.*, 2017).

O processo extrativo realizado permitiu a obtenção de 8 diferentes amostras, sendo 4 frações do látex de *E. umbellata* e 4 subfrações da fração hexano do látex. Estas amostras foram obtidas a fim de concentrar os compostos, de acordo com a afinidade pelos solventes propostos, para utilização nos tratamentos *in vitro* e *in vivo*.

Extratos de *E. umbellata* obtidos por Luz *et. al.* (2016) com solventes apolares (hexano e clorofórmio) apresentaram maior atividade contra diferentes células tumorais do que os extratos obtidos com solventes polares (acetato de etila e metanol), demonstrando que o efeito citotóxico pode estar relacionado a composição química dos compostos presentes nessas frações.

Subfrações da fração hexano do látex de *E. umbellata* foram analisadas contra células leucêmicas e a subfração obtida com o solvente diclorometano demonstrou resultados significativos em comparação com os demais solventes (éter de petróleo, etanol e metanol). Tais achados podem ser associados à seleção de substâncias de interesse com ações específicas em células neoplásicas devido ao refractionamento e à diferença de polaridade dos solventes (CRUZ, 2017).

5.2 ANÁLISE *IN VITRO*

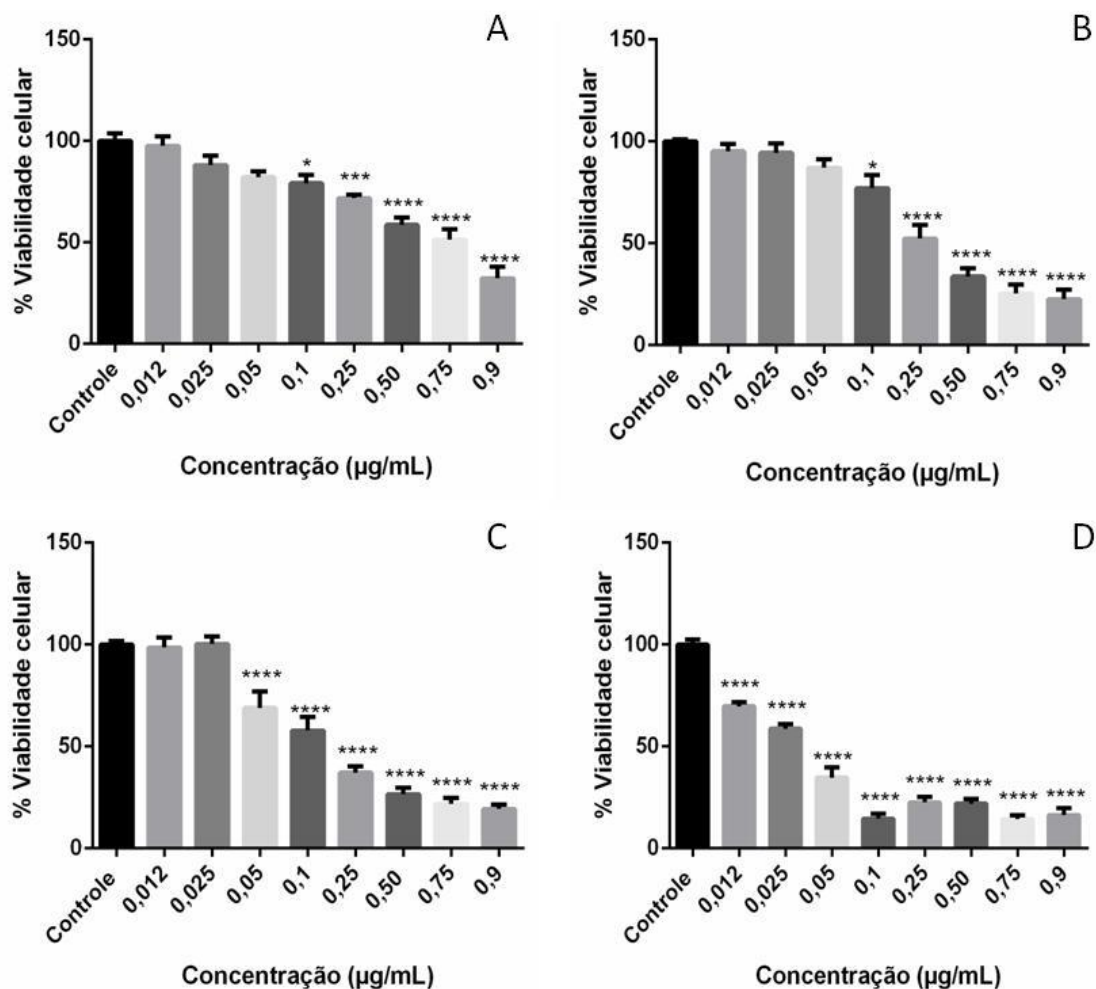
O ensaio de MTT permite a quantificação de viabilidade e proliferação celular por meio de uma análise colorimétrica rápida, baseando-se na redução do sal amarelo de tetrazólio (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio) a um cristal insolúvel de coloração roxa (formazan). Esta reação de redução ocorre em células viáveis com metabolismo ativo (MOSMANN, 1983; RISS *et al.*, 2004).

Em contrapartida, o ensaio de vermelho neutro quantifica a viabilidade celular com base na atividade lisossomal. Células viáveis com lisossomos funcionalmente ativos retêm o vermelho neutro dentro destas estruturas, o que permite uma análise colorimétrica do mesmo (TRIGLIA *et al.*, 1991).

O emprego destas duas técnicas permite avaliar a viabilidade celular com base em diferentes organelas e mecanismos, sendo importante o comparativo dos resultados para que fique clara a influência ou não das amostras testadas no metabolismo.

Assim, na Figura 4 se pode observar a redução de viabilidade celular das linhagens 3T3 e B16F10, tratadas com diferentes concentrações (0,012 a 0,9 µg/mL) do látex de *E. umbellata* pelos ensaios de MTT e vermelho neutro, de modo que, para ambas as linhagens, quanto maior a concentração testada, maior a redução de viabilidade celular.

Figura 4 – Efeito do látex de *E. umbellata* na viabilidade celular das linhagens 3T3 (A e C) e B16F10 (B e D) pelos ensaios de MTT (A e B) e vermelho neutro (C e D)



Fonte: A autora.

Legenda: A = 3T3/MTT; B = B16F10/MTT; C = 3T3/VN; D = B16F10/VN; *($p < 0,05$), ***($p < 0,001$) e ****($p < 0,0001$) em relação ao controle (meio RPMI).

Nota: Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média, considerando 4 experimentos independentes. Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey.

O efeito citotóxico do látex de *E. umbellata* já é relatado na literatura para as linhagens HeLa (câncer de colo de útero) e HRT-18 (câncer de colon retal), sob tempo de tratamento de 48 horas, nas concentrações de 100 a 1000 µg/mL, por ensaios de MTT e vermelho neutro (LUZ *et al.*, 2015).

No presente estudo, as concentrações entre o intervalo de 0,1 a 0,9 µg/mL são as que apresentaram os maiores efeitos citotóxicos para as linhagens 3T3 e B16F10, em ambos os ensaios, sendo estatisticamente significativos em relação ao controle. A faixa de concentração utilizada permite inferir que a linhagem de melanoma demonstra uma sensibilidade muito maior frente aos compostos

presentes no látex de *E. umbellata* quando comparado com as linhagens testadas por Luz *et al.* (2015), o que demonstra um efeito potencial desta matriz vegetal contra a linhagem de melanoma.

Apesar de terem sido utilizadas as mesmas condições de cultivo (linhagem celular, método, tempo de tratamento e concentração testada), pode-se considerar que neste estudo obteve-se uma maior porcentagem de inibição da viabilidade celular, uma vez que esta se demonstrou acima de 60 % para a garrafada (0,9 µg/mL) enquanto Oliveira *et al.* (2013) descrevem resultados acima de 40 %.

Sabe-se que as espécies vegetais devem ser coletadas quando contiverem quantidade máxima de seus constituintes. A estação do ano em que cada espécie é coletada é importante, pois a quantidade e, às vezes, a natureza dos constituintes ativos pode ser alterada ao longo do ano (SHAH; SETH, 2010). Considerando isso, podemos justificar a diferença dos resultados obtidos em relação à literatura devido à diferença do período de coleta do látex, uma vez que Oliveira *et al.* (2013) realizaram a coleta em abril e neste estudo realizamos a coleta em outubro. Porém, a ausência de valores de CI₅₀ e IS no trabalho citado inviabilizam maiores discussões.

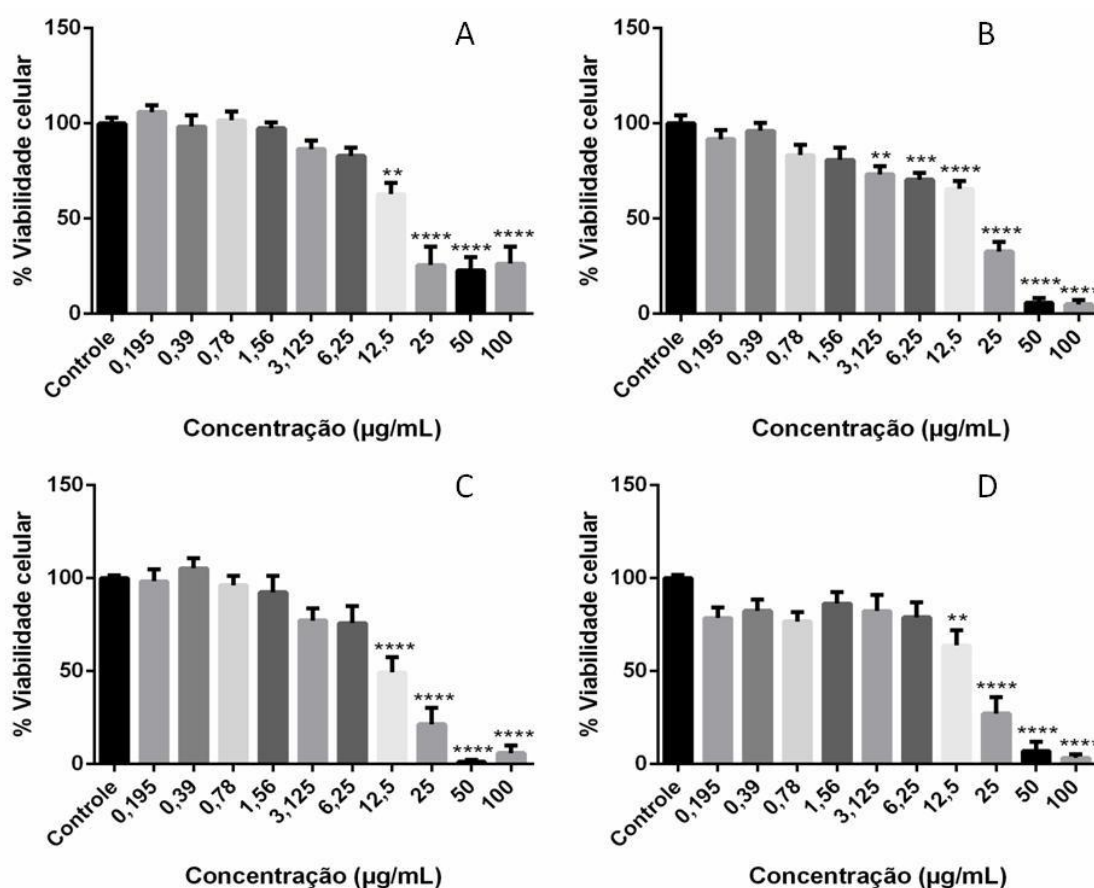
Diante do que foi observado para a concentração de 0,9 µg/mL (Figura 4), a qual corresponde à concentração equivalente àquela utilizada popularmente na forma de garrafada, pode-se inferir que o efeito citotóxico do látex de *E. umbellata* na linhagem B16F10 tem correlação com seu uso etnofarmacológico, embora seja difícil relacionar concentrações de ensaios *in vitro* com efeitos sistêmicos.

Devido aos resultados citotóxicos promissores obtidos para o látex de *E. umbellata*, indicando que seus compostos possivelmente apresentem uma atividade biológica relevante, a etapa seguinte do presente estudo foi realizar a separação dos constituintes dessa matriz vegetal em diferentes frações, visando sua extração conforme as características químicas.

Para tanto, empregou-se a técnica de extração contínua a quente, por Soxhlet. Esta, em comparação a outros métodos extrativos, tem como vantagem a separação de grandes quantidades de compostos do material vegetal com uma pequena quantidade de solventes, o que contribui em sua escolha, atrelada à economia de tempo, energia e consequentemente de matéria-prima (SIMÕES *et al.*, 2017).

Nas figuras 5 a 8 é possível analisar a influência do processo extrativo e dos diferentes solventes utilizados no perfil de viabilidade celular das linhagens 3T3 e B16F10 em tratamento com diferentes concentrações (de 0,195 a 100 µg/mL) das 4 frações extraídas do látex de *E. umbellata*. Destas, a fração hexano foi a que demonstrou os melhores resultados, por apresentar um perfil de diminuição da viabilidade celular com o aumento das concentrações testadas, com resultados mais significativos nas maiores concentrações, para ambos os ensaios (Figura 5).

Figura 5 – Efeito da fração hexano do látex de *E. umbellata* na viabilidade celular das linhagens 3T3 (A e C) e B16F10 (B e D) pelos ensaios de MTT (A e B) e vermelho neutro (C e D)



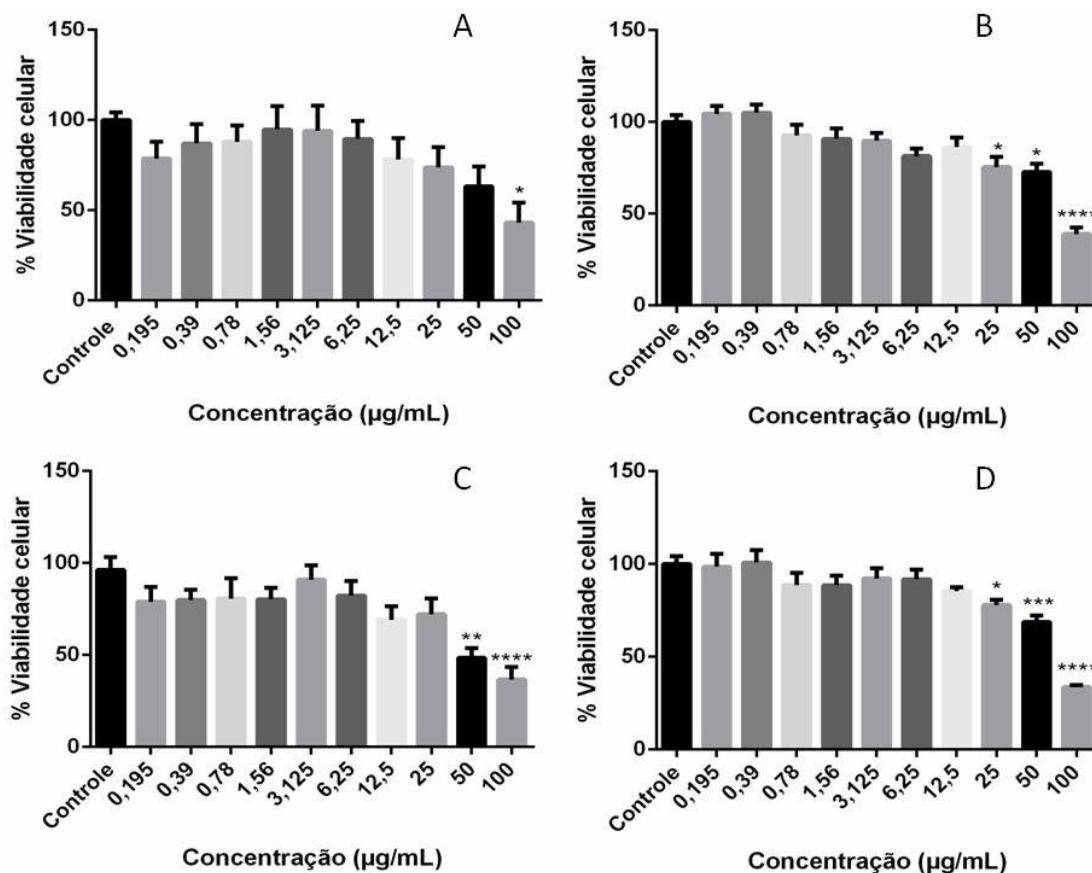
Fonte: A autora.

Legenda: A = 3T3/MTT; B = B16F10/MTT; C = 3T3/VN; D = B16F10/VN; **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$) e ****($p < 0,0001$) em relação ao controle (meio RPMI + 0,1% DMSO).

Nota: Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média, considerando 3 experimentos independentes. Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey.

A fração clorofórmio do látex (Figura 6) demonstrou uma queda significativa da viabilidade celular, para ambas as linhagens, nas maiores concentrações testadas.

Figura 6 – Efeito da fração clorofórmio do látex de *E. umbellata* na viabilidade celular das linhagens 3T3 (A e C) e B16F10 (B e D) pelos ensaios de MTT (A e B) e vermelho neutro (C e D)



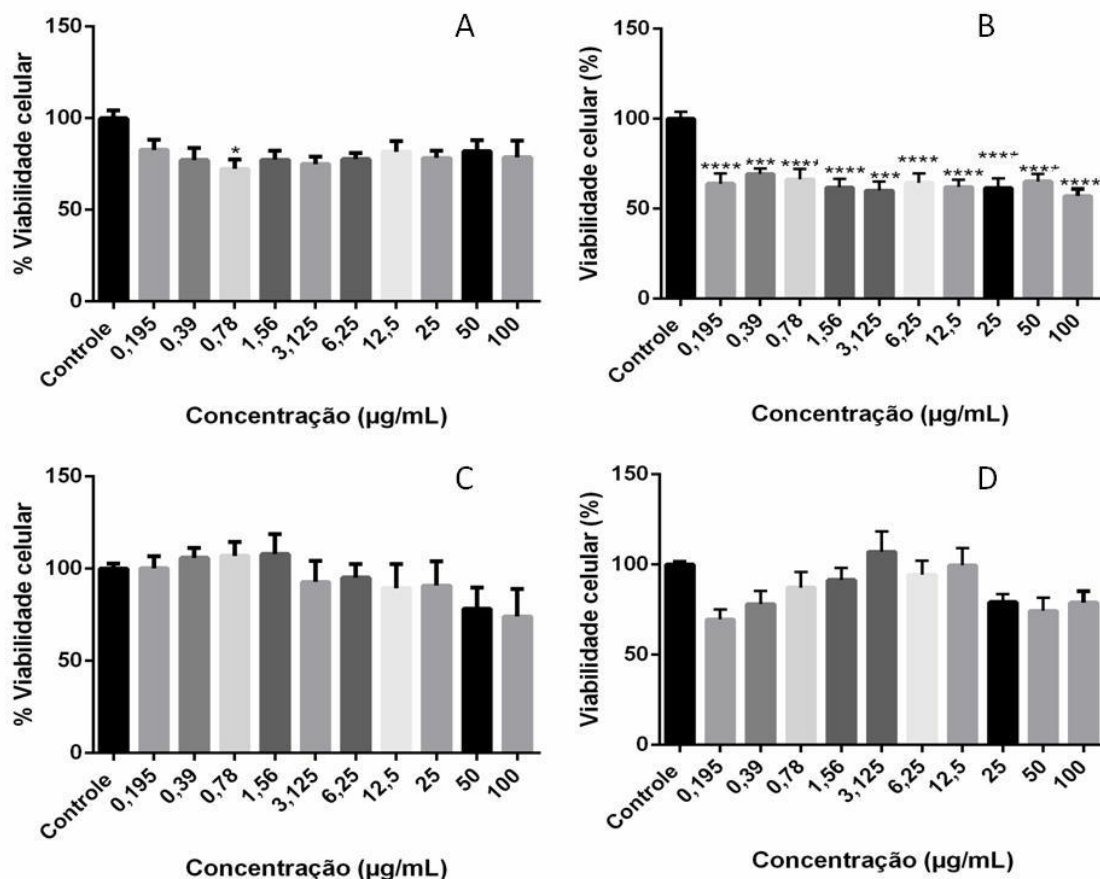
Fonte: A autora.

Legenda: A = 3T3/MTT; B = B16F10/MTT; C = 3T3/VN; D = B16F10/VN; *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$) e ****($p < 0,0001$) em relação ao controle (meio RPMI + 0,1% DMSO).

Nota: Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média, considerando 3 experimentos independentes. Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey.

A fração acetato de etila (Figura 7) não provocou redução da viabilidade celular para nenhuma das linhagens quando comparada ao controle. O ensaio de MTT para a fração acetato de etila, para a linhagem B16F10, foi repetida pelo menos 5 vezes e não se conseguiu responder o porquê da perda de aproximadamente metade da absorbância em todas as concentrações testadas.

Figura 7 – Efeito da fração acetato de etila do látex de *E. umbellata* na viabilidade celular das linhagens 3T3 (A e C) e B16F10 (B e D) pelos ensaios de MTT (A e B) e vermelho neutro (C e D)



Fonte: A autora.

Legenda: A= 3T3/MTT; B = B16F10/MTT; C = 3T3/VN; D = B16F10/VN; ***($p < 0,001$) e ****($p < 0,0001$) em relação ao controle (meio RPMI + 0,1% DMSO).

Nota: Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média, considerando 5 experimentos independentes. Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey.

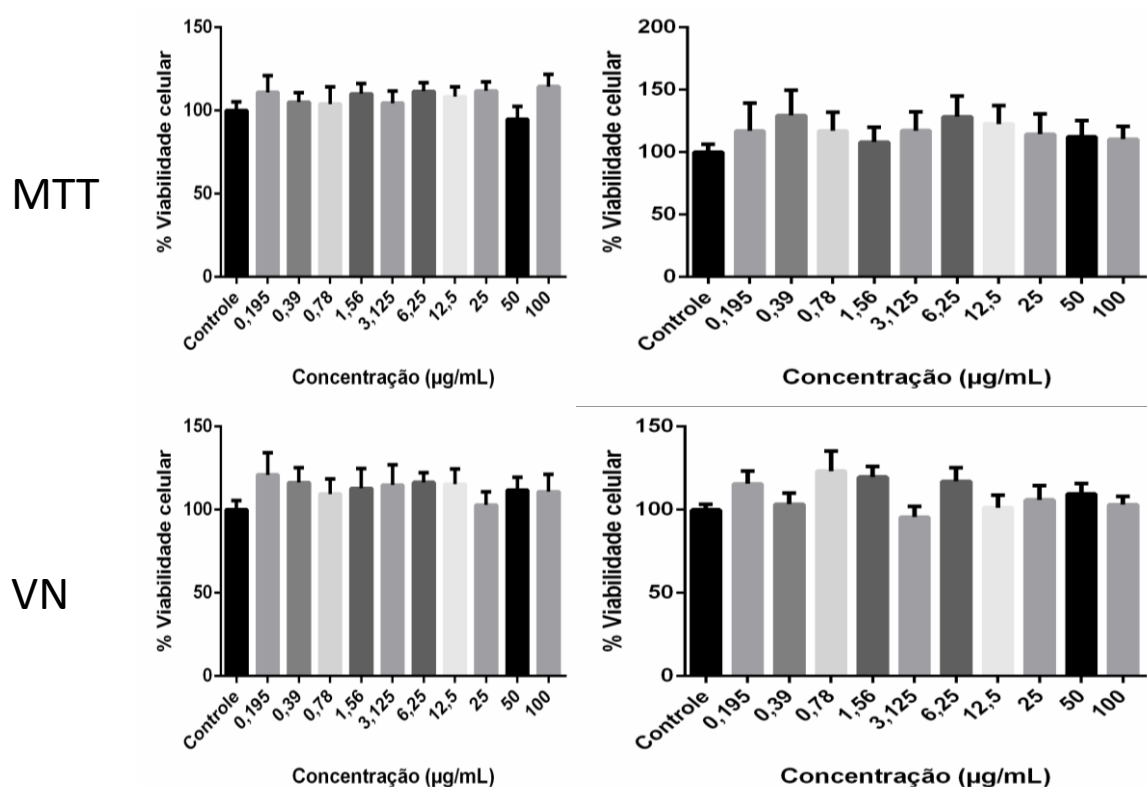
A fração metanol (Figura 8) não apresentou característica citotóxica para as linhagens 3T3 e B16F10 nas concentrações testadas.

Resultados de Luz *et al.* (2016) demonstraram que todas as frações apresentaram citotoxicidade tempo e dose dependentes frente às linhagens HeLa, HTR-18 e Jurkat, porém, os autores utilizaram concentrações de 50 a 800 µg/mL para fração hexano e de 100 a 1500 µg/mL para clorofórmio, acetato de etila e metanol, o que consideramos muito superiores às propostas neste estudo (0,195 a 100 µg/mL).

Com isso, pode-se sugerir que seriam necessárias concentrações superiores às frações clorofórmio, acetato de etila e metanol para início de alterações na viabilidade celular, porém, para a finalidade proposta neste estudo – que é a de

realizar um *screening* para seleção dos extratos com maior potencial citotóxico que justifiquem a continuação dos estudos e posterior refinamento – não seria interessante o uso de concentrações superiores a 100 µg/mL. Ademais, o NCI (*American National Cancer Institute*) preconiza como interessante os extratos com CI_{50} inferiores a 30 µg/mL (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990).

Figura 8 – Efeito da fração metanol do látex de *E. umbellata* na viabilidade celular das linhagens 3T3 (A e C) e B16F10 (B e D) pelos ensaios de MTT (A e B) e vermelho neutro (C e D)



Fonte: A autora.

Legenda: A = 3T3/MTT; B = B16F10/MTT; C = 3T3/VN; D = B16F10/VN

Nota: Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média, considerando 3 experimentos independentes. Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey.

Os dados de % de viabilidade celular obtidos para o látex e as frações do látex anteriormente demonstrados foram utilizados para o cálculo de CI_{50} (correspondente à concentração capaz de inibir a viabilidade celular em 50 %) e os valores obtidos são apresentados na Tabela 1. Com os valores de CI_{50} calculou-se o índice de seletividade (IS) correspondente a cada tratamento, que também são apresentados na referida Tabela.

Tabela 1 – Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) e IS determinados para o tratamento das linhagens celulares com o látex e as frações do látex de *E. umbellata* por ensaios de MTT e vermelho neutro

	MTT			Vermelho Neutro		
	3T3	B16F10		3T3	B16F10	
		CI_{50}	IS		CI_{50}	IS
L	$0,41 \pm 0,21$	$0,69 \pm 0,12$	0,6	$0,12 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,004$	6,3
FH	$20,80 \pm 10,10$	$24,44 \pm 2,30$	0,8	$22,90 \pm 16,80$	$21,30 \pm 16,60$	1,1
FC	>100	$79,40 \pm 11,80$	>1	>100	$75,8 \pm 9,80$	>1
FA	>100	>100	NC	>100	>100	NC
FM	>100	>100	NC	>100	>100	NC

Fonte: A autora.

Legenda: L= látex; FH = fração hexano; FC = fração clorofórmio; FA = fração acetato de etila; FM = fração metanol; NC = não calculado.

Nota: Dados expressos em valor de $CI_{50} \pm$ erro padrão da média.

Extratos obtidos de plantas medicinais são considerados como matrizes citotóxicas de interesse quando apresentam valores de CI_{50} abaixo de $30 \mu\text{g/mL}$ frente a diferentes células tumorais (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2012 apud LUZ *et al.*, 2016), e o índice de seletividade (IS) é um indicativo da seletividade de um composto, comparando uma linhagem não tumoral com uma linhagem tumoral (neste estudo, 3T3 e B16F10, respectivamente), isto é, quanto maior o IS de um extrato, mais interessante ele se torna, por ser mais citotóxico para uma linhagem tumoral em relação à normal.

Levando tudo isso em consideração, o látex e a fração hexano apresentaram os resultados mais interessantes, pois os valores de CI_{50} ficaram abaixo de $30 \mu\text{g/mL}$ para ambas as linhagens testadas, tanto por MTT quanto por vermelho neutro. Além disso, ainda apresentaram os maiores valores de índice de seletividade.

Luz *et al.* (2015) obtiveram valores de CI_{50} acima de $30 \mu\text{g/mL}$ para o látex de *E. umbellata* ($252,58 \pm 18,51 \mu\text{g/mL}$ e $263,42 \pm 15,92 \mu\text{g/mL}$ para linhagens HeLa e HRT-18, respectivamente, por MTT; e $250,18 \pm 19,48 \mu\text{g/mL}$ e $430,56 \pm 19,71 \mu\text{g/mL}$ para linhagens HeLa e HRT-18, respectivamente, por vermelho neutro). No presente estudo, o látex apresentou valores de CI_{50} ainda menores para o látex, sendo $CI_{50} = 0,69 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ por MTT e $0,02 \pm 0,004 \mu\text{g/mL}$ por vermelho neutro, o que reafirma o pressuposto de que a linhagem B16F10 apresenta maior sensibilidade aos compostos presentes no látex de *E. umbellata*.

Para a linhagem B16F10, obtiveram-se com a fração hexano valores de CI_{50} de $24,44 \pm 2,30 \mu\text{g/mL}$ por MTT e $21,30 \pm 16,60 \mu\text{g/mL}$ por vermelho neutro. Em estudos com as frações do látex de *E. umbellata*, Luz *et al.* (2016) obtiveram valores de CI_{50} para a fração hexano frente às linhagens HeLa ($30,50 \pm 77,42 \mu\text{g/mL}$) e HRT-18 ($26,16 \pm 9,94 \mu\text{g/mL}$). Já em relação à linhagem Jurkat, os autores obtiveram menores valores de CI_{50} para as frações hexano e clorofórmio ($1,87 \pm 2,22 \mu\text{g/mL}$ e $17,68 \pm 9,09 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). Cruz (2017) obteve CI_{50} de $0,06 \pm 1,23 \mu\text{g/mL}$ para a linhagem HL-60.

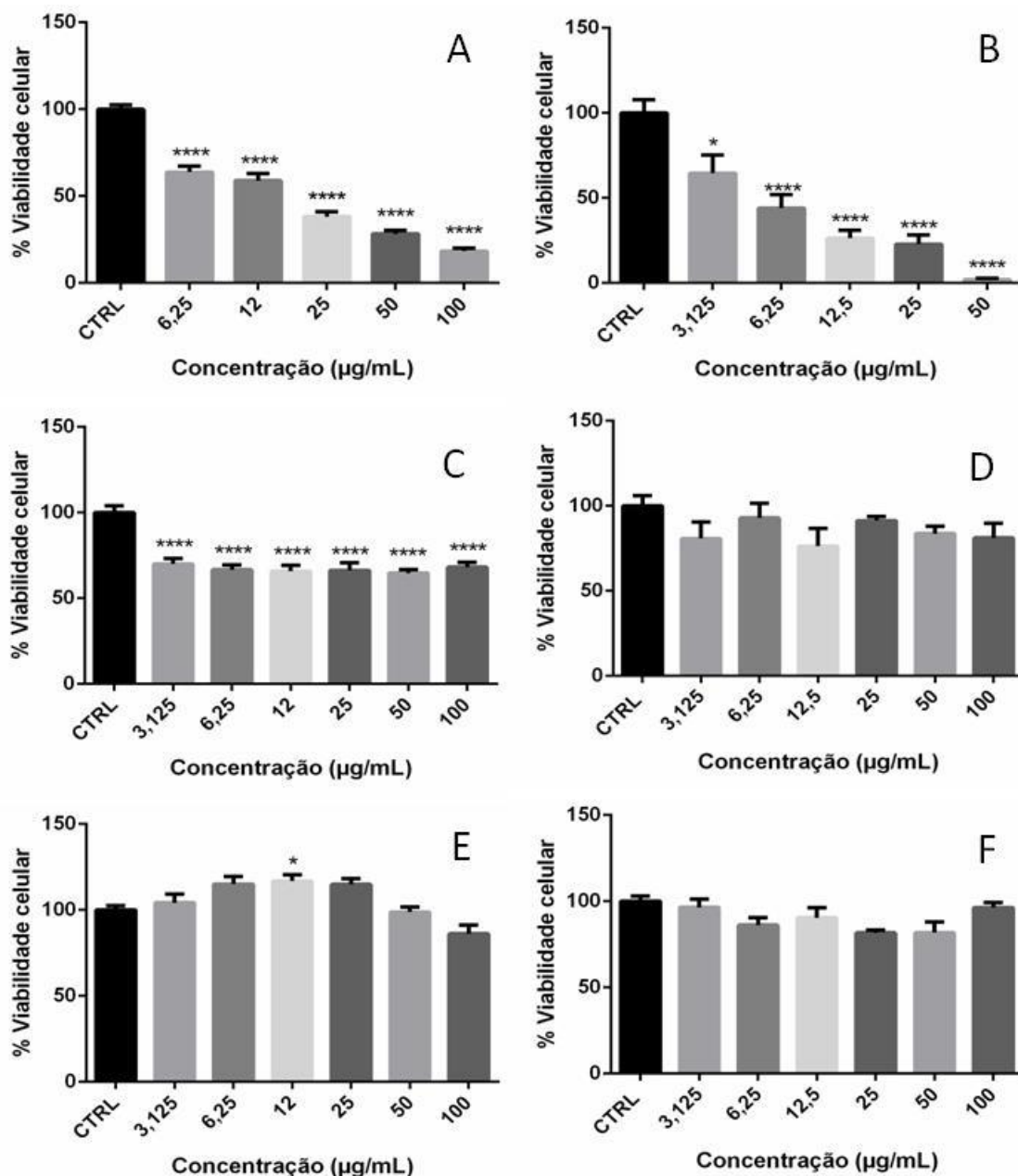
Devido ao potencial citotóxico observado para a fração hexano, o estudo prosseguiu com o fracionamento desta, a fim de selecionar ou até mesmo concentrar os compostos responsáveis pelos efeitos citotóxicos observados. O fracionamento da fração hexano deu origem a 4 novas amostras, as quais denominou-se: subfrações éter de petróleo, diclorometano, etanol e metanol, devido aos solventes que foram utilizados para sua extração.

Nas figuras 9 e 10 podemos observar a influência dos compostos presentes nas subfrações da fração hexano do látex de *E. umbellata* nas linhagens celulares 3T3 e B16F10, respectivamente, testadas em diferentes concentrações (de 3,125 a 100 $\mu\text{g/mL}$), por ensaios de MTT e vermelho neutro.

Das subfrações testadas, éter de petróleo e diclorometano demonstraram diminuição da viabilidade celular com o aumento das concentrações testadas, sendo que em ambos os casos, as viabilidades celulares apresentaram-se inferiores a 50 % em concentrações acima de 50 $\mu\text{g/mL}$ para as duas linhagens celulares, por ensaio de MTT.

A subfração etanol apresentou diferença significativa quando comparada com o controle somente para a linhagem 3T3 (porém sem diferença estatística entre as concentrações testadas). Além disso, não houve variação da viabilidade celular entre as concentrações testadas. Efeito semelhante foi observado para a linhagem B16F10 tratada com a fração acetato de etila (Figura 7). A subfração metanol não apresentou efeito citotóxico frente às linhagens testadas em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 9 – Efeito das subfrações éter de petróleo (A e B), etanol (C e D) e metanol (E e F) na viabilidade celular das linhagens 3T3 (A, C e E) e B16F10 (B, D e F) pelo ensaio de MTT



Fonte: A autora.

Legenda: A = SEP/3T3; B = SEP/B16F10; C = SET/3T3; D = SET/B16F10; E = SME/3T3; F = SME/B16F10; *($p < 0,05$) e ****($p < 0,0001$) em relação ao controle (meio RPMI + 0,1% DMSO).

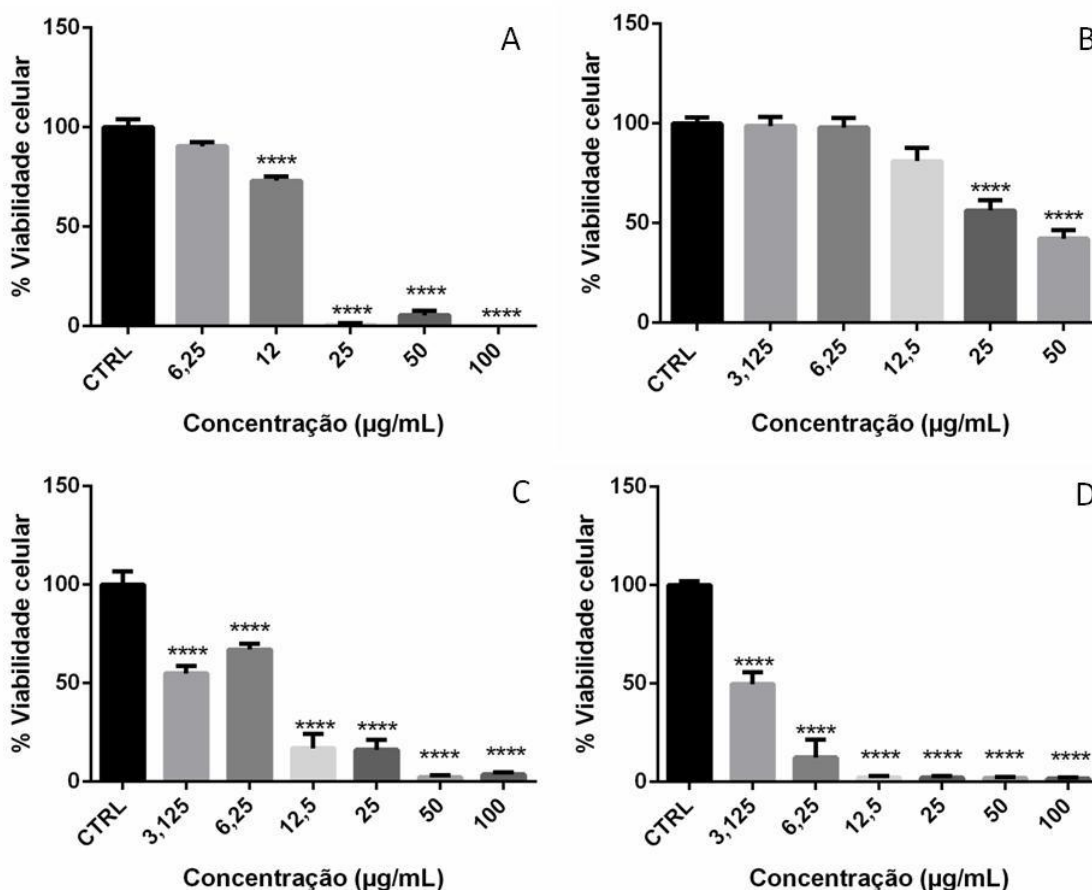
Nota: Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey.

Adicionalmente, a citotoxicidade observada para as subfrações correlaciona-se com o coeficiente de partição ($\log P$) dos solventes utilizados na extração, de modo que quanto maior o $\log P$, mais lipofílica a substância, o que corresponde à uma maior afinidade da substância pela fase orgânica, facilitando esta a atravessar as bicamadas lipídicas das membranas biológicas. Com base nisto, os resultados

obtidos até então para as subfrações éter de petróleo, etanol e metanol pelo ensaio de MTT (Figura 9) correlacionam-se bem com as características dos solventes extrativos (éter de petróleo (Log P = 4,66), metanol (Log P = -0,77) e etanol (Log P = -0,31)) utilizados para a obtenção destas amostras.

Na figura 10 destacou-se a subfração diclorometano, uma vez que esta, diferentemente das demais subfrações, foi avaliada quanto à alteração na viabilidade celular por ambos os ensaios, de MTT e vermelho neutro. Com base na figura, pode-se observar a ocorrência de diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração testada.

Figura 10 – Efeito da subfração diclorometano na viabilidade celular das linhagens 3T3 (A e C) e B16F10 (B e D), por ensaios de MTT (A e B) e vermelho neutro (C e D)



Fonte: A autora.

Legenda: A = 3T3/MTT; B = B16F10/MTT; C = 3T3/VN; D = B16F10/VN; ****(p<0,0001) em relação ao controle (meio RPMI + 0,1% DMSO).

Nota: Dados expressos em média ± erro padrão da média. Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey.

A partir das porcentagens de viabilidade celular calcularam-se os valores de Cl_{50} correspondentes às subfrações da fração hexano do látex e, conseqüentemente os IS, dados os quais se encontram na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$) e IS determinados para o tratamento das linhagens celulares 3T3 e B16F10 com as subfrações da fração hexano do látex de *E. umbellata* por ensaio de MTT

	MTT			Vermelho Neutro		
	3T3	B16F10		3T3	B16F10	
	Cl_{50}		IS	Cl_{50}		IS
SEP	$23,84 \pm 7,43$	$5,99 \pm 0,23$	3,98			
SDI	$4,81 \pm 0,18$	$16,20 \pm 7,33$	0,30	$9,60 \pm 0,13$	$2,82 \pm 0,88$	3,40
SET	>100	>100	NC			
SME	>100	>100	NC			

Fonte: A autora.

Legenda: SEP = subfração éter de petróleo; SDI = subfração diclorometano; SET = subfração etanol; SME = subfração metanol; NC = não calculado.

Nota: Dados expressos em valor de $Cl_{50} \pm$ erro padrão da média.

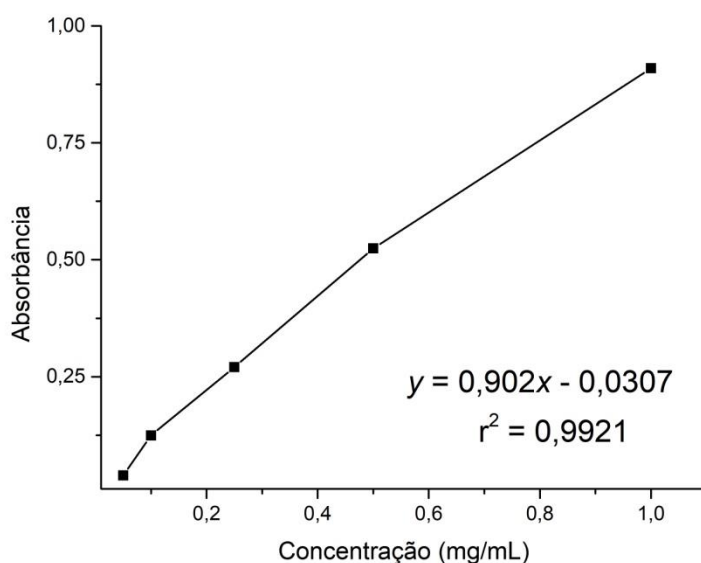
A literatura descreve que valores de IS superiores a 2 sugerem tratar-se de uma matriz vegetal segura e com potencial antitumoral (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990). Considerando isso, dos valores de IS obtidos para as subfrações da fração hexano do látex de *E. umbellata*, destacam-se a subfração éter de petróleo, a qual apresentou IS = 3,98 por ensaio de MTT e a subfração diclorometano, com IS = 3,40 considerando o ensaio de vermelho neutro.

Reforçando a premissa de que quanto menor o valor de Cl_{50} maior é a ação de determinado extrato em uma linhagem celular, tem-se uma maior citotoxicidade da fração hexano e das subfrações éter de petróleo e diclorometano, o que pode ser justificado pela composição química destas subfrações. As substâncias apolares, em especial a classe dos terpenos, podem ser responsáveis pelos efeitos citotóxicos observados para esta e outras espécies do gênero *Euphorbia*, conforme já proposto por outros autores (COSTA *et al.*, 2012; JADRANIN *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013; RUPHIN *et al.*, 2013; VASAS *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012).

Com isso, pretendeu-se realizar a quantificação dos terpenos totais nas amostras em estudo para certificar-se que os resultados obtidos até o momento

poderiam ser correlacionados. Para tanto, inicialmente optou-se pela realização de uma curva de calibração com a substância eufol, a qual foi utilizada para a determinação dos terpenos totais nas amostras obtidas do látex de *E. umbellata* (Figura 11).

Figura 11 – Curva de calibração para a quantificação do conteúdo total de terpenoides



Fonte: A autora.

Os dados obtidos demonstram que, de todas as amostras testadas, a subfração diclorometano foi a que apresentou maior conteúdo total de terpenoides, o que corrobora a contribuição dos terpenos já descritos na literatura pela sua influência na atividade citotóxica (VASAS; HOHMANN, 2014).

A Tabela 3 apresenta o conteúdo total de terpenoides das 8 amostras obtidas (4 frações do látex e 4 subfrações da fração hexano), com quantidades variando de 0,3 a 13,9 mg de eufol / g de extrato.

Tabela 3 – Conteúdo total de terpenoides de 8 extratos do látex de *E. umbellata*

AMOSTRA	mg eufol / g de extrato
FH	6,8 ± 3,6
FC	10,2 ± 0,8
FA	8,0 ± 1,3
FM	0,3 ± 0,1
SEP	13,9 ± 0,4
SDI	5,5 ± 1,213
SET	3,3 ± 0,6
SME	0,4 ± 0,2

Fonte: A autora.

Nota: FH = fração hexano; FC = fração clorofórmio; FA = fração acetato de etila; FM = fração metanol; SEP = subfração éter de petróleo; SDI = subfração diclorometano; SET = subfração etanol; SME = subfração metanol.

Dados expressos em média ± desvio padrão para três replicatas.

Tendo em vista os valores de IS = 1,1 para a fração hexano e IS = 3,98 para a subfração éter de petróleo, correlacionando com o conteúdo de terpenoides de 6,8 ± 3,6 mg de eufol/ g de extrato para a fração hexano e de 13,9 ± 0,4 mg de eufol/ g de extrato para a subfração éter de petróleo, pode-se inferir que o fracionamento da fração hexano foi capaz de aumentar a seletividade da matriz vegetal, possivelmente devido à maior concentração dos compostos terpênicos.

Estudos com a fração hexano do látex de *E. umbellata* e suas subfrações demonstram a presença de compostos amplamente descritos para o gênero *Euphorbia*, como por exemplo, eufol e acetato de germanicol; ressaltando que a presença dos terpenos (triterpenos) podem contribuir para a atividade anticâncer (COSTA *et al*, 2012; CRUZ, 2017; LUZ *et al.*, 2016).

Entretanto, artigos da literatura também correlacionam a ação anticâncer à subclasse de diterpenos do tipo ésteres de forbois.

Buscando investigar de forma mais aprofundada a característica química dos terpenos nas amostras, foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de espectrometria de massas (CLAE-EM/EM), para tentar qualificar quais tipos de compostos terpênicos poderiam estar presentes nessas amostras.

A cromatografia é um método físico-químico de separação, baseado na distribuição de um composto entre duas fases imiscíveis (fase móvel e fase estacionária). O acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas dá origem a uma ferramenta analítica versátil e com grande potencial na análise qualitativa e quantitativa, pois confere resolução cromatográfica, alta seletividade,

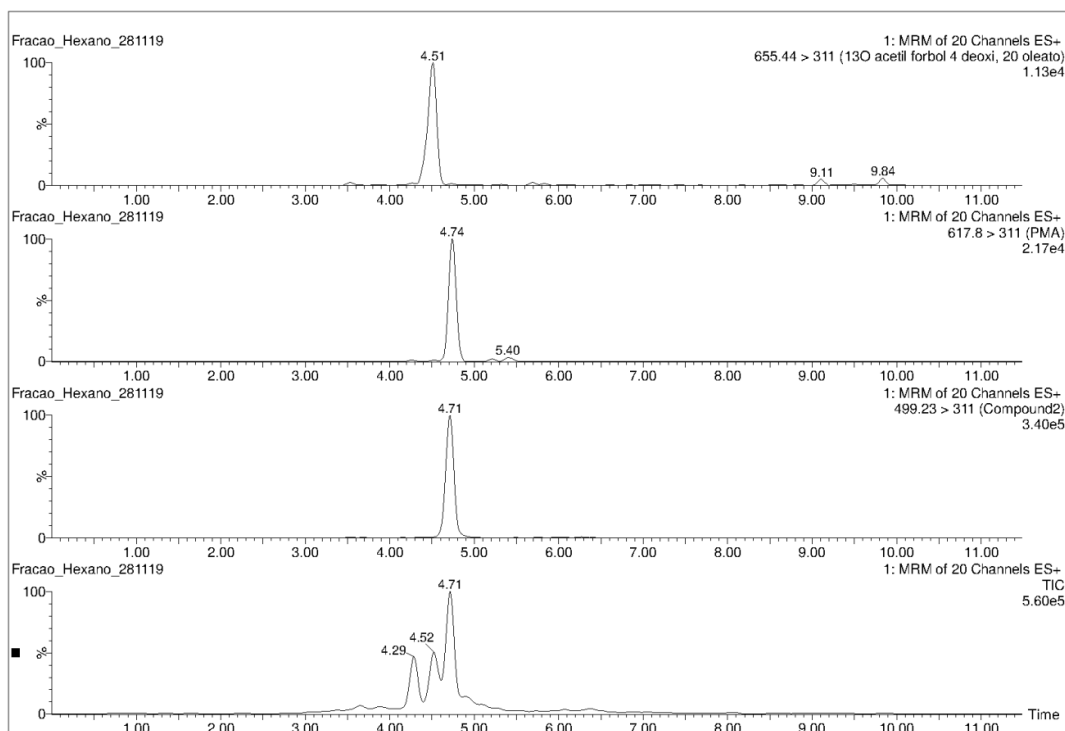
sensibilidade de detecção e capacidade de identificação de compostos não voláteis ou termicamente instáveis. Adicionalmente, o avanço desta técnica possibilita o estudo de misturas complexas (como por exemplo, extratos brutos) sem realização de isolamento das substâncias (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; LANÇAS, 2009; SOUZA, 2019).

Os ésteres de forbol apresentam características de estrutura incomuns que sofrem perda neutra de mono ou diésteres por diferentes mecanismos de fragmentação, produzindo o íon m/z 311 relacionado ao esqueleto básico de forbol e a transição m/z 311 $\rightarrow$ 293 que normalmente está relacionada à perda de uma molécula de água devido à presença de grupos hidroxila na estrutura do forbol (WANG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2012).

A análise sugeriu a presença de estruturas de forbois nas frações do látex de *E. umbellata*. As Figuras 12, 13 e 14 apresentam os cromatogramas obtidos para a fração hexano, subfração éter de petróleo e subfração diclorometano, respectivamente, a partir do monitoramento MRM, para os íons selecionados.

Os dados de monitoramento MRM obtidos para a fração hexano e subfrações éter de petróleo e diclorometano sugerem que as estruturas dos ésteres de forbol perderam suas cadeias acilas (BALDINI *et al.*, 2014; NOTHIAS-SCAGLIA *et al.*, 2015).

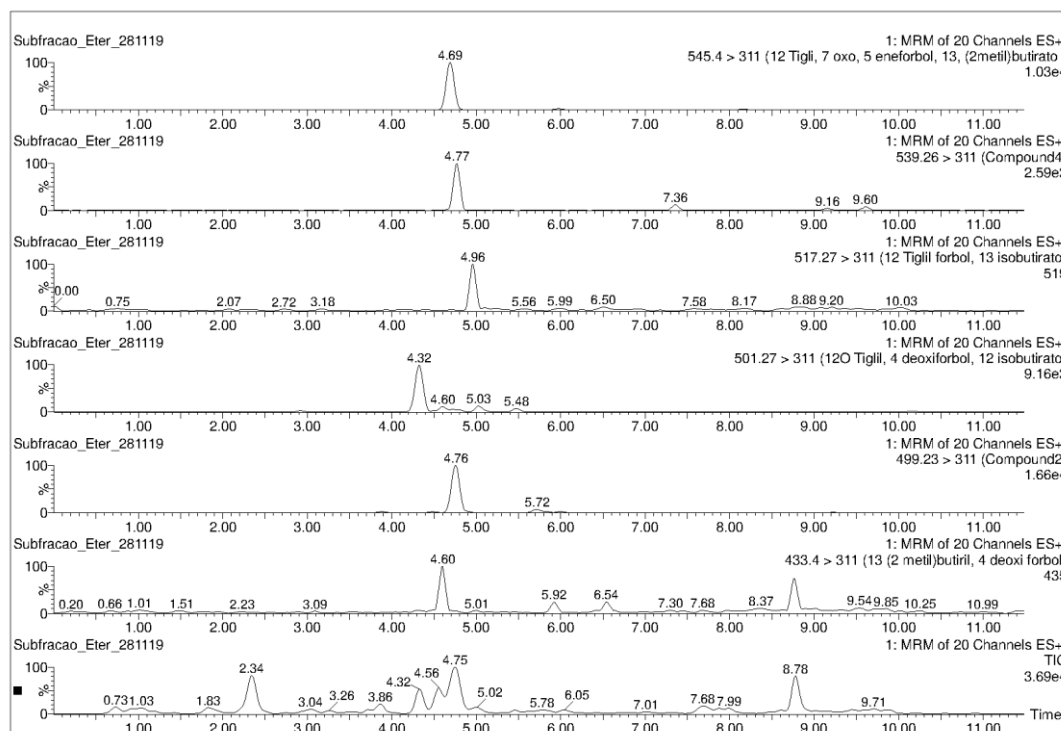
Figura 12 – Cromatograma da fração hexano



Fonte: A autora.

Nota: m/z 499,23 = Ingenol 3-(2,4-decadienoate); m/z 617,8 = phorbol-12-miristato-13-acetato; m/z 655,44 = 13-o-acetilforbol-4-deoxi-forbol-20-oleato.

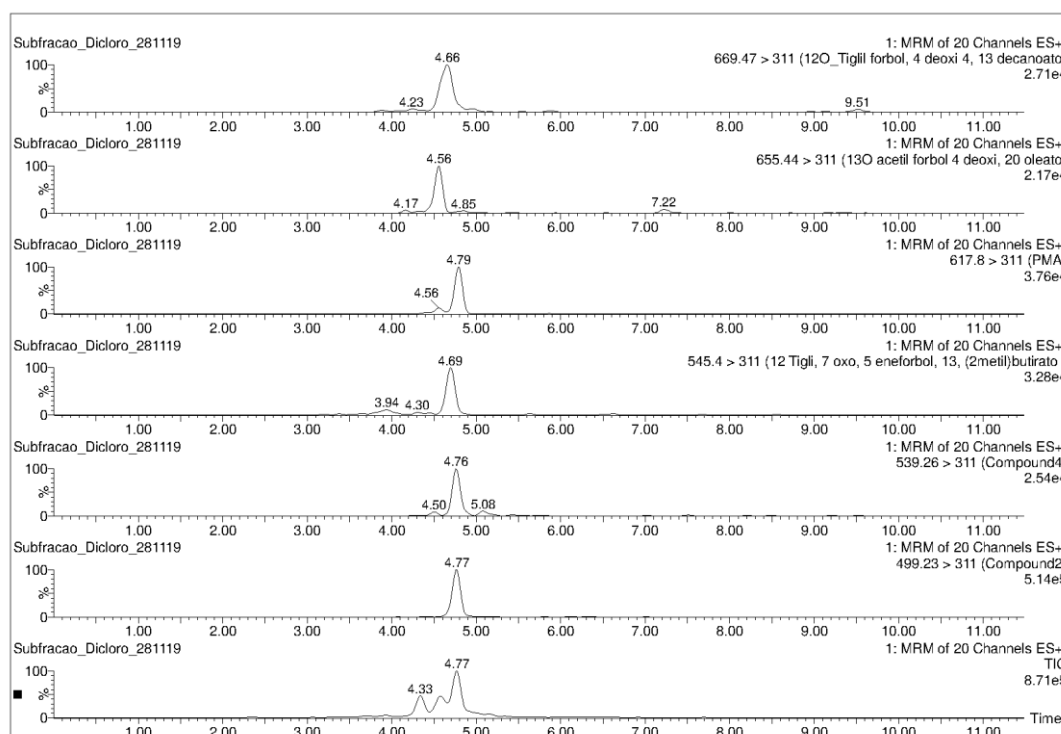
Figura 13 – Cromatograma da subfração éter de petróleo



Fonte: A autora.

Nota: m/z 433,4 = 13-o-(2metilbutiril)4deoxy-forbol; 499,23 = Ingenol 3-(2,4-decadienoate); m/z 501,27 = 12-o-tigilil-4-deoxiforbol-13-isobutirato; 517,27 = 12-tigililforbol-13-isobutirato; 539,26 = 4deoxyphorbol 12-acetate-13-[(2Z,4E)-2,4,6-decatrienoate]; 545,4 = 12-tigilil-7oxo-5eneforbol-13(2metil)butirato.

Figura 14 – Cromatograma da subfração diclorometano

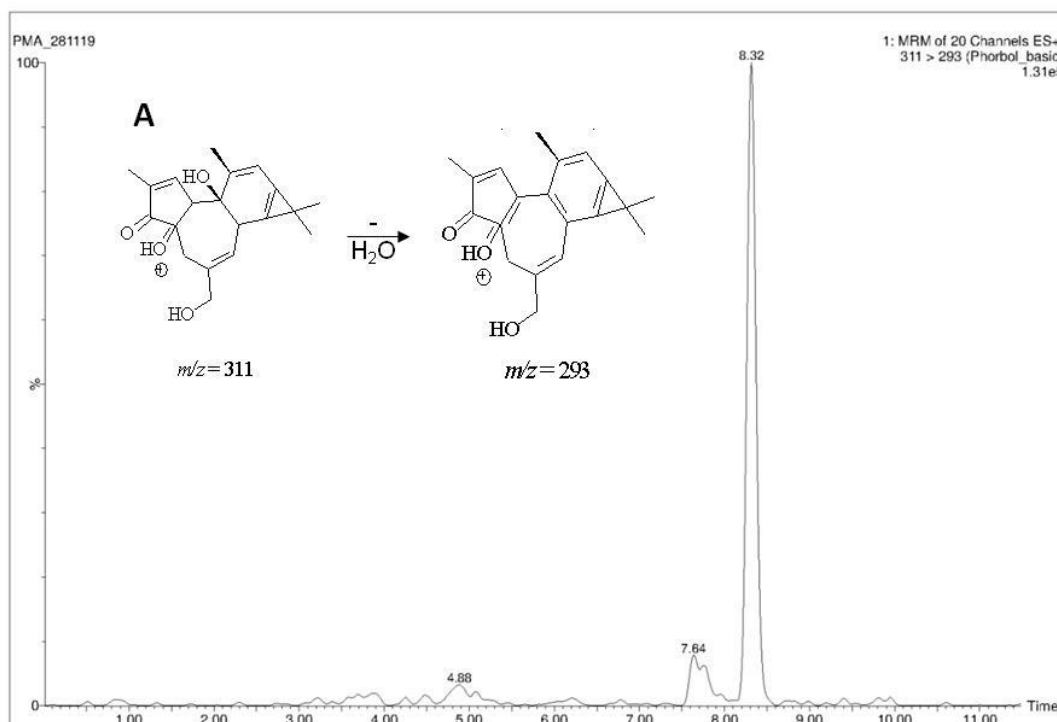


Fonte: A autora.

Nota: m/z 499,23 = Ingenol 3-(2,4-decadienoate); 539,26 = 4deoxyphorbol 12-acetate-13-[(2Z,4E)-2,4,6-decatrienoate]; 545,4 = 12-tigllil-7oxo-5eneforbol-13(2metil)butirato, 617,8 = phorbol-12-miristato-13-acetato; 655,44 = 13-o-acetilforbol-4-deoxi-forbol-20-oleato; 669,47 = 12-o-tigllilforbol-4-deoxi-4-forbol-13-hexadecanoato.

O íon em m/z 311 observado é característico do núcleo de forbol à perda de uma molécula de água ($311 \rightarrow 293$) também esperado devido à presença de hidroxilas no núcleo de forbol. O cromatograma apresentado na Figura 15 corresponde à fragmentação do íon m/z $311 \rightarrow 293$ para o acetato de tetradecanoil forbol (phorbol 12-myristate 13-acetate - PMA).

Figura 15 – Cromatograma do acetato de tetradecanoil forbol (phorbol 12-myristate 13-acetate - PMA) com fragmentação à perda de água (A)

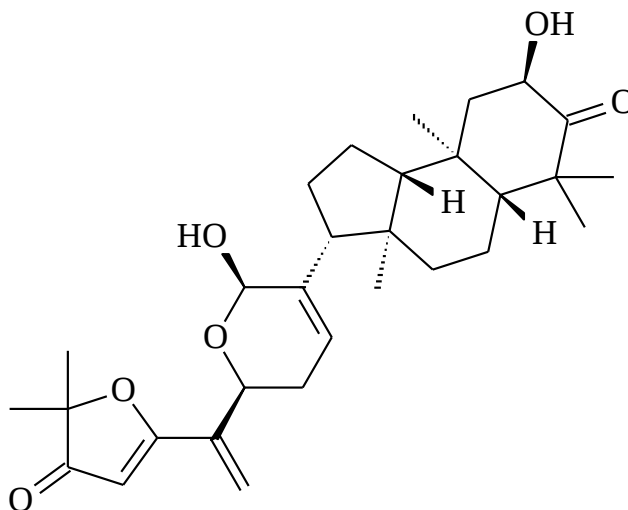


Fonte: A autora.

Legenda: A – Fragmentação do núcleo de forbol à perda de água.

Para todas as frações e subfrações foi possível observar o íon m/z 499,23, referente possivelmente ao ingenol 3-(2,4-decadienoate) (Figura 16), um éster diterpênico de núcleo ingenano (FURSTENBERGER; HECKER, 1986 apud SOUZA, 2019).

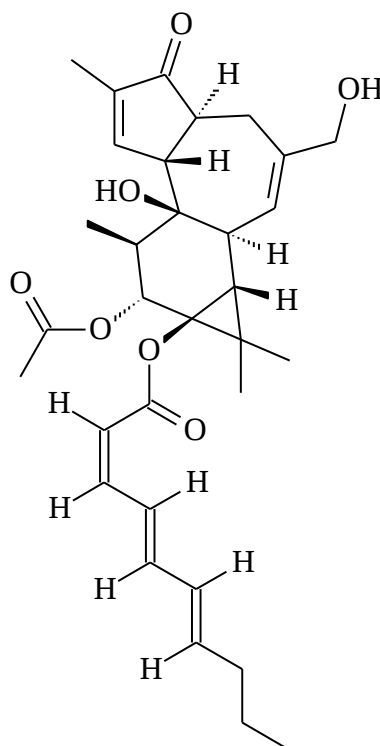
Figura 16 – Estrutura química do éster diterpênico ingenol 3-(2,4-decadienoate)



Fonte: A autora.

Para as subfrações da fração hexano, observou-se nos cromatogramas de todas as amostras o íon m/z 539,26, referente à substância 4-deoxyphorbol 12-acetate-13-[(2Z,4E)-2,4,6-decatrienoate] (Figura 17), um éster diterpênico de núcleo tigliano (FURSTENBERGER; HECKER, 1977 apud SOUZA, 2019). Ambas as substâncias já foram observadas em análise do perfil químico de *E. tirucalli* (SOUZA, 2019). A presença destas e das demais substâncias nos cromatogramas confirma, portanto, a presença de ésteres de forbois nas amostras, as quais possivelmente podem estar relacionadas à atividade biológica observada.

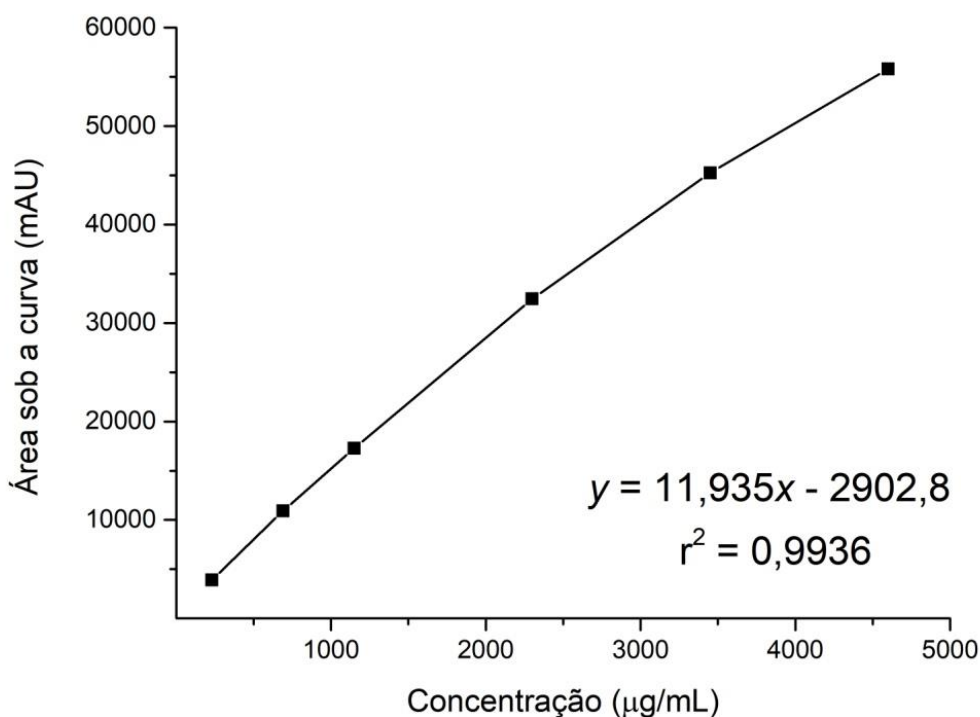
Figura 17 - Estrutura química do éster diterpênico 4-deoxyphorbol 12-acetate-13-[(2Z,4E)-2,4,6-decatrienoate]



Fonte: A autora.

A partir desta análise química qualitativa, realizou-se uma curva de calibração com PMA (Figura 18), a fim de quantificar os forbois nos extratos obtidos do látex de *E. umbellata* para verificar a correlação destas substâncias com a atividade biológica previamente observada.

Figura 18 – Curva de calibração para quantificação de forbois



Fonte: A autora.

A Tabela 4 apresenta os dados referentes à quantificação de forbois, com resultados em equivalentes de mg de forbol / g de extrato, para cada extrato em relação à concentração do composto.

Tabela 4 – Quantificação de forbois em 8 extratos obtidos do látex de *E. umbellata*

AMOSTRA	mg/g
FH	3239
FC	4791
FA	8092
FM	ND
SEP	123
SDI	6270
SET	11845
SME	350

Fonte: A autora.

Nota: FH = fração hexano; FC = fração clorofórmio; FA = fração acetato de etila; FM = fração metanol; SEP = subfração éter de petróleo; SDI = subfração diclorometano; SET = subfração etanol; SME = subfração metanol; ND = não determinado.

Com base nos dados acima, é possível observar uma maior quantidade de forbois nas frações clorofórmio e acetato de etila, frações as quais não apresentaram atividade biológica significativa neste estudo.

Das subfrações da fração hexano, as que apresentaram maior concentração destes compostos foram as subfrações diclorometano e etanol. Estas amostras são representativas de extratos obtidos com solventes de polaridade intermediária, os quais são conhecidos e utilizados para extração de diterpenos, como os forbois e compostos fenólicos.

A avaliação desses dados, associados aos dados de determinação de terpenos totais permite sugerir que a atividade biológica não pode ser atribuída somente aos diterpenos do tipo ésteres de forbois e sim possivelmente a um efeito sinérgico de outros compostos presentes nessas amostras vegetais, destacando-se os outros terpenos presentes nessa matriz biológica.

Um fitocomplexo é representado pelo conjunto de todas as substâncias, originadas do metabolismo primário ou secundário, responsáveis em conjunto pelos efeitos biológicos de uma planta medicinal ou de seus derivados (ANVISA, 2014).

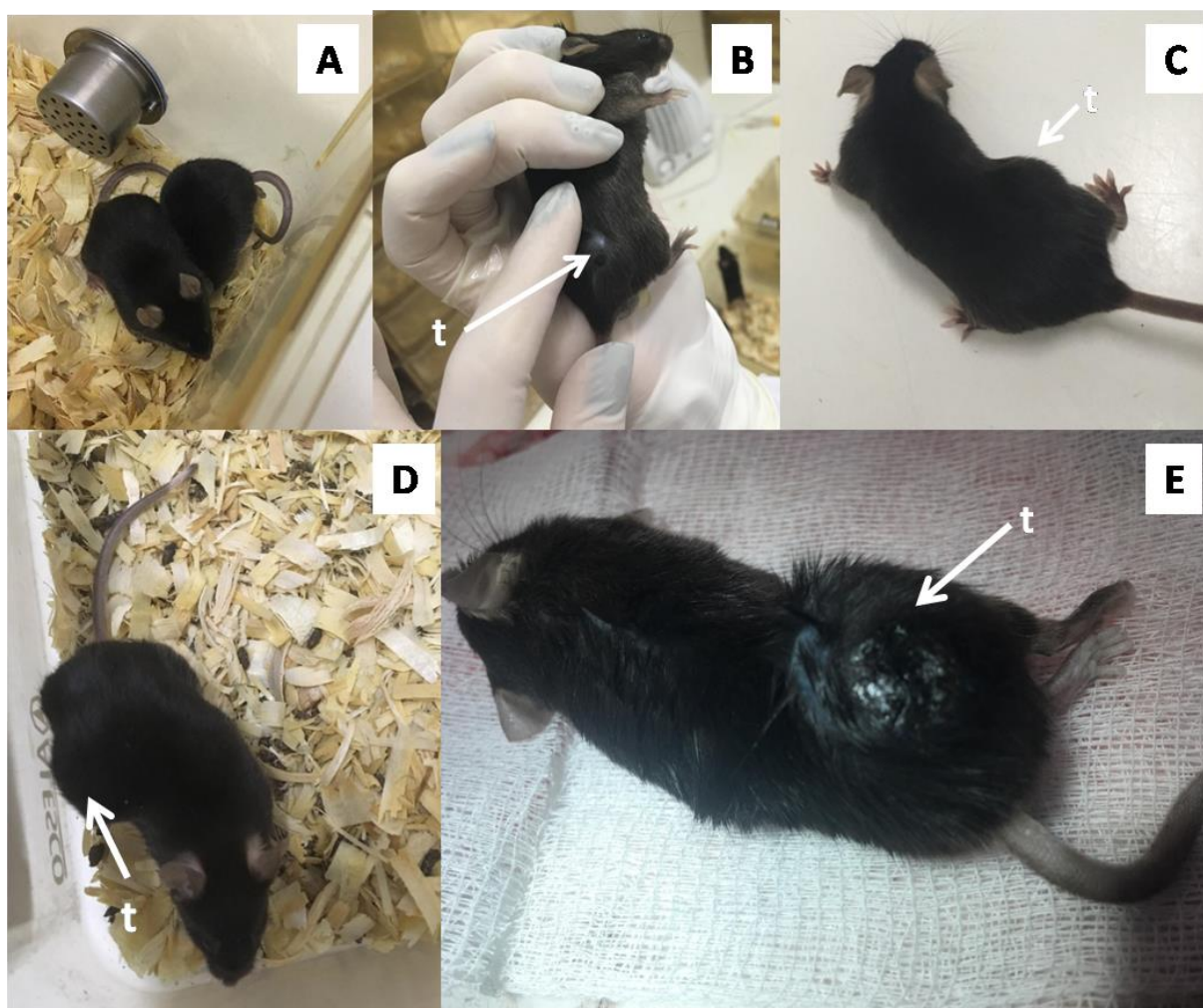
Dessa forma, apesar dos resultados promissores devido aos fracionamentos e isolamentos que vem sendo realizados em nosso grupo de pesquisa, a quantificação expressiva de terpenos totais e dos ésteres de forbois em frações e subfrações de polaridade intermediária nos levam a ressaltar a importância de entender o material vegetal em estudo como um fitocomplexo, tido em conta a relevância do sinergismo dos compostos presentes no látex da espécie *E. umbellata*.

5.3 ANÁLISE *IN VIVO*

Sabe-se que o látex de *E. umbellata* possui, majoritariamente, em sua constituição compostos da classe dos terpenos e que estes estão relacionados à atividade anticâncer (triterpenos e diterpenos) (ORTÊNCIO, 1997). Atrelado a isso, resultados prévios do grupo de pesquisa demonstraram-se promissores com a fração hexano (LUZ *et al.*, 2015; LUZ *et al.*, 2016) e a subfração diclorometano (CRUZ, 2017) frente a diferentes células tumorais. Considerando isso, atrelado aos valores de CI_{50} , quantificação de terpenos e forbois, a subfração diclorometano foi escolhida para a realização dos experimentos *in vivo*.

Analizou-se inicialmente a evolução do crescimento dos tumores nos camundongos do grupo controle, para acompanhamento da evolução do tumor e definição do dia da eutanásia, como ilustrado na Figura 19. Observou-se que a partir do 17º dia (10 dias de inoculação e 6 dias de tratamento) (Figura 19B) o tumor já era visível, evoluindo gradativamente até o dia da eutanásia (Figura 19E), no qual foi possível observar um crescimento expressivo do tumor, com aspecto ulcerativo e, eventualmente, sangramento. O animal também apresentou dificuldades de locomoção, alimentação e ingestão de água. Com isso, optou-se pela eutanásia no 26º dia (após 10 dias de inoculação e 15 dias de tratamento), a fim de respeitar os preceitos éticos de experimentação animal.

Figura 19 – Evolução do crescimento tumoral de camundongos do Grupo Controle



Fonte: A autora.

Legenda: A= dia 15; B= dia 16; C= dia 19; D= dia 21; E= dia 26; t= tumor.

Nota: Todos os animais são pertencentes ao grupo controle.

No dia da eutanásia, durante o processo de retirada dos órgãos e tumor, observou-se aspectos macroscópicos diferenciados nos animais do grupo 1, os quais apresentaram tumores com aspecto gelatinoso e de fácil desintegração, além da presença de coloração amarelada, caracterizando icterícia (Figura 20A). Complementarmente, em todos os grupos experimentais foi observada a presença de pontos enegrecidos em alguns órgãos (como por exemplo, baço, linfonodos e fígado) inferindo a possibilidade de ocorrência de metástases (Figura 20B).

Figura 20 – Presença de icterícia e metástases em camundongos C57BL/6 inoculados com células B16F10, pertencentes ao grupo 1, após 15 dias de tratamento



Fonte: A autora.

Legenda: A= Camundongo com icterícia; B= camundongo com metástases; i=icterícia; m= metástase; t= tumor.

Neste estudo, os pesos dos tumores retirados de todos os grupos experimentais encontraram-se na faixa de 3 a 8 g. Adicionalmente, todas as amostras de tumores foram medidas com o auxílio de um paquímetro, para posterior cálculo do volume dos tumores.

A massa corporal é um critério importante na avaliação do desenvolvimento do tumor, de modo que através dela pode-se acompanhar, por exemplo, a ocorrência de caquexia (OTAKE *et al.*, 2010).

Estatisticamente, o peso dos animais não apresentou diferença significativa entre antes e após a inoculação do tumor (peso inicial corresponde ao dia da inoculação e peso final ao dia da eutanásia) (Tabela 5), porém, se levarmos em consideração o peso dos tumores, houve uma redução de até 20 % no peso dos animais, provavelmente por influência do crescimento da massa tumoral.

Tabela 5 – Peso dos camundongos antes e após o período de tratamento

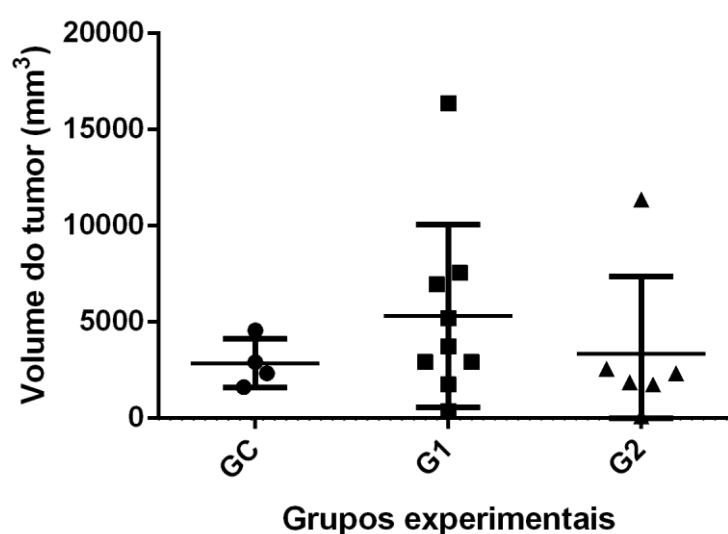
	PESO INICIAL (G)	PESO FINAL (G)
GRUPO CONTROLE	22,40 ± 0,88	25,37 ± 1,01
GRUPO 1	26,23 ± 0,27	29,25 ± 0,65
GRUPO 2	24,83 ± 0,51	27,04 ± 0,68

Fonte: A autora.

Nota: Dados expressos em média ± erro padrão da média. Grupo controle, n = 4; grupo 1, n = 11; grupo 2, n = 6.

Em análise estatística do volume dos tumores não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados em relação ao grupo controle, porém ao observar a dispersão dos tumores na Figura 21, podemos observar que há uma maior dispersão do volume dos tumores dos animais pertencentes ao grupo 1.

Figura 21 – Volume do tumor dos animais após 15 dias de tratamento



Fonte: A autora.

Legenda: GC = Grupo controle (n = 4); G1 = grupo 1 (n = 9); G2 = grupo 2 (n = 6).

Esse experimento foi realizado apenas em uma ocasião e carece de repetições e uso de outras concentrações da subfração para a sua confirmação. Oliveira *et al.* (2013), após tratar camundongos C57BL6 por sete dias, por via oral, 3 vezes ao dia, com solução correspondente ao uso popular (garrafada) do látex de *E. umbellata*, observou a ocorrência de uma inibição de 40 % do crescimento tumoral em comparação com o grupo controle não tratado.

Ressaltamos novamente a importância do fracionamento para a obtenção de extratos com maior seletividade e toxicidade para as células B16F10. A análise conjunta dos ensaios citotóxicos e químicos auxilia na identificação dos compostos de interesse em comparativo com a ação biológica observada. Adicionalmente, o fracionamento realizado permite observar a influência do processo extrativo e de separação dos compostos, ocasionando um aumento no CI_{50} das subfrações quando comparado com as frações.

Por outro lado, a atividade antitumoral deve ser criteriosamente avaliada. Não podemos desconsiderar o relevante resultado citotóxico *in vitro* observado para a subfração éter de petróleo e a presença de grande quantidade de ésteres de forbois nas subfração etanol, as quais também poderão ser testadas em um próximo experimento *in vivo*; assim como os resultados promissores obtidos por Oliveira *et al.* (2013) na diminuição do tumor de camundongos tratados com a formulação popularmente usada (garrafada), o que nos leva a enfatizar mais uma vez a importância da matriz vegetal como um fitocomplexo, considerando a influência de diferentes compostos para o entendimento da atividade anticâncer de *E. umbellata*.

6 CONCLUSÃO

Com base nas análises *in vitro* realizadas para o látex, frações e subfrações, conclui-se que essa matriz vegetal apresentou potencial citotóxico frente à linhagem B16F10, com resultados relevantes para o látex, para a fração hexano e para as subfrações éter de petróleo e diclorometano.

A análise do conteúdo total de terpenoides e a quantificação de forbois permitiram determinar que essa classe de metabólitos secundários está presente em grandes quantidades nas frações/subfrações mais ativas corroborando a importante relação dos terpenos com a atividade citotóxica observada nos experimentos *in vitro*.

Com relação aos resultados *in vivo*, a subfração diclorometano não demonstrou diferença significativa no volume do tumor nas condições experimentais e concentrações testadas, porém aspectos macroscópicos dos tumores, resultados promissores *in vitro* para a subfração éter de petróleo e concentrações de forbois na subfração etanol apresentam-se como achados relevantes à continuidade do estudo.

Com isso, os resultados até aqui dão suporte para a caracterização do potencial antitumoral do látex de *E. umbellata*, em especial permitindo a correlação entre as atividades biológicas e componentes químicos da matriz vegetal, sendo importante a continuidade de análises e aprofundamento da avaliação química e biológica desta espécie em relação ao câncer de pele do tipo melanoma.

REFERÊNCIAS

- ALVES-SILVA, J. M. *et al.* North African medicinal plants traditionally used in cancer therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 383, p. 1-24, 2017.
- AMIRGHOFRA, 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.
- 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.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - **RDC nº 26**, de 13 de maio de 2014. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf> Acesso em: fevereiro de 2020.
- BALDINI, M. *et al.* Determination of phorbol esters in seeds and leaves of *Jatropha curcas* and in animal tissue by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Industrial Crops and Products**. v. 59, p. 268–276, 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.
- BOIA-FERREIRA, M. **Avaliação do papel da proteína TCTP em melanoma murino (B16-F1 e B16-F10)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- CARLETO, B. **Avaliação antitumoral *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de PCL contendo resveratrol em modelo de melanoma murino**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.
- COOPER, G. M. **The Cell: A Molecular Approach**. Ed. 2. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.
- 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.
- CRUZ, L. S. **Avaliação da atividade citotóxica de subfrações do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns e euphol**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2017.
- CRUZ, L. S. *et al.* Pharmacokinetics and cytotoxic study of euphol from *Euphorbia umbellata* (Bruyns) Pax latex. **Phytomedicine**, 2018.

CUNHA, L. C. *et al.* Acute and sub acute 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 SILVA, C. F. N. Modelos experimentais de melanoma murino *in vivo*. **Biosaúde**, v. 15, n. 2, 2013.

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.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.

DEVIEENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 11-14, 2004.

FAN, J. P.; HE, C. H. Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diosporys kaki* by high-performance liquid chromatography method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 3, p. 950-956, 2006.

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.

FIDLER, I. J. Selection of successive tumor lines for metastasis. **Nature**, v. 241, p. 148-148, 1973.

FLORA DO BRASIL, 2020a. Euphorbiaceae. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113>>. Acesso em: fev. 2020.

FLORA DO BRASIL, 2020b. *Euphorbia*. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17561>>. Acesso em: fev. 2020.

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

HANDA, S. S. *et al.* **Extraction technologies for medicinal and aromatic plants**. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 2008, 260 p.

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.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. **Pele - Melanoma**. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao+>. Acesso em: 20 jun. 2018.

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

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LIANG, Y. *et al.*, Bioactive diterpenoids from the stems of *Euphorbia antiquorum*. **Journal of Natural Products**, v. 82, p. 1634–1644, 2019.

LIN, J. *et al.*, Chemical composition, antimicrobial and antitumor activities of the essential oils and crude extracts of *Euphorbia macrorrhiza*. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 5030-5039, 2012.

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.

LUZ, L. E. *et al.* Cytotoxic biomonitored study of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 29-37, 2016.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n.2, p. 143–148, 2002.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, pg. 105-111, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

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.

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 plant research**, v. 5, n. 5, p. 652-662, 2011.

NEWMAN; D. J., CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–315, 2012.

NOTHIAS-SCAGLIA, L. F. *et al.* Antiviral activity of diterpene esters on Chikungunya virus and HIV replication. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 6, p. 1277-1283, 2015.

O'NEIL, C. H.; SCOGGINS, C. R. Melanoma. **Journal of Surgical Oncology**, v.120, p. 873-881, 2019.

OGBOURNE, S. M.*et al.*, Antitumor activity of 3-ingenyl angelate: plasma membrane and mitochondrial disruption and necrotic cell death. **Cancer Research**, v.64, p. 2833-2839, 2004.

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.

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

OTAKE, A. H. *et al.* Inibition of angiotensin II receptor 1 limits tumor associated angiogenesis and attenuates growth of murine melanoma. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 66, p. 79-87,2010.

OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. B16 as a mouse model for human melanoma. **Current Protocols in Immunology**, cap. 20, un. 20.1, 2001.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, ed. 11, 2012.

PRADO, G.; SVOBODA, R. M.; RIGEL, D. S. What's new in Melanoma. **Dermatologic Clinics**, v. 37, p. 159-168, 2019.

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.

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

SCHADENDORF, D. *et al.* Melanoma. **Lancet**, v. 392, p. 971-984,2018.

SCHADENDORF, D.; SCHLAG, P. M. Malignes Melanom. **Onkologe**, v. 20, p. 530-532, 2014.

SECA, A. M. L.; PINTO, D. C. G. A. Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 263, p. 1-22, 2018.

SHAH, B. N.; SETH, A. K. **Textbook of pharmacognosy and phytochemistry**. Elsevier - A division of reed Elsevier India private limited, 2010, 587 p.

SHI, Q.; SU, X.; KIYOTA, H. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. **Chemical Reviews**,v. 108, p. 4295-4327, 2008.

SILVA, V. A. O. *et al.*, 2018a. *In vitro* screening of cytotoxic activity of euphol from *Euphorbia tirucalli* on a large panel of human cancer-derived cell lines. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 16, n. 2, p. 557-566, 2018.

SILVA, V. A. O. *et al.*, 2018b. Euphol, a tetracyclic triterpene, from *Euphorbia tirucalli* induces autophagy and sensitizes temozolomide cytotoxicity on glioblastoma cells. **Invest new drugs**, v. 37, n. 2, p. 223-237, 2018.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 7 ed., Porto Alegre: Artmed, 2017, 848 p.

SOUZA, L. S. **Metodologias analíticas para determinação do perfil químico, atividade imunomoduladora e citotóxica do látex de *Euphorbia tirucalli* L.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2019.

SUFFNESS, M; PEZZUTO, J. M. Assays related to câncer drug discovery. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.), **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**. Academic Press, London, p. 71–133, 1990.

TARIQ, A. *et al.* A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 2, p. 202-264, 2017.

THE PLANT LIST, 2020a. **Euphorbiaceae**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Euphorbiaceae/>>. Acesso em: fev. 2020.

THE PLANT LIST, 2020b. **Euphorbia**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Euphorbiaceae/Euphorbia/>>. Acesso em: fev. 2020.

TRIGLIA, D. *et al.* *In vitro* toxicity of various classes of test agents using the neutral red assay on a human three-dimensional physiologic skin model. **In Vitro Cell & Developmental Biology**, v. 27A, p. 239–244, 1991.

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

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, P. *et al.* Bioactive diterpenoids from the stems of *Euphorbia royleana*. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 2, p. 183-193, 2019.

WCRF – World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Continuous update project expert report. **The cancer process**. 2018.

WCSP - World Checklist of Selected Plant Families. **Euphorbiaceae**. Facilitated by Royal Botanic Gardens. Disponível em: <<http://wcsp.science.kew.org/>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

ZHANG, B. B. *et al.* Triterpenoids of *Euphorbia kansuensis* Proch. **Fitoterapia**, v. 3, n. 7, p. 1242-1247, 2012.