

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

LUIZA STOLZ CRUZ

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE EXTRATOS DE *Euphorbia*
umbellata (Pax) Bruyns

PONTA GROSSA
2021

LUIZA STOLZ CRUZ

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE EXTRATOS DE *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns

Tese apresentada para obtenção de título de Doutora na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

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

PONTA GROSSA
2021

C957 Cruz, Luiza Stolz
Avaliação do potencial citotóxico de extratos de *Euphorbia umbellata* (Pax)
Bruyns / Luiza Stolz Cruz. Ponta Grossa, 2021.
98 f.

Tese (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. Carla Cristine Kanunfre.

1. Eufol. 2. Terpenos. 3. Leucemia. 4. Câncer de mama. 5. Câncer colorctal.
I. Beltrame, Flávio Luís. II. Kanunfre, Carla Cristine. III. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 613.321

Ponta Grossa, 30 de julho de 2021.

**ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS -
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À
FARMÁCIA NÚMERO 09/2021 DA DOUTORANDA LUIZA STOLZ CRUZ REALIZADA NO DIA 30
DE JULHO DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.**

Ao trigésimo dia de julho de dois mil e vinte e um, às 13:30 horas, via videoconferência, na 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 tese de Doutorado em Ciências Farmacéuticas da doutoranda Luiza Stolz Cruz, na linha de pesquisa: Avaliação química e biológica de produtos naturais, constituída pelo Professor Doutor Flávio Luis Beltrame (UEPG/PR) e professora Doutora Carla Cristine Kamunfre (UEPG/PR) e demais Doutores (membros titulares): Thais Latansio de Oliveira (UNICESUMAR/PR), Michele Dietrich Moura Costa (UEPG/PR), Patricia Mathias Doll Boscardin (UEPG/PR) e Edneia Amancio de Souza Ramos Cavalieri (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 tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: "Avaliação do potencial citotóxico de extratos de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns". Encerrada a defesa, a banca considerou APROVADA a tese, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacéuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da tese de Doutorado, 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.

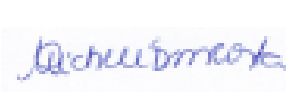
Observações (se necessário): _____

Alteração de título: ☒ não

Novo título: _____


Flávio Luis Beltrame (UEPG - PR) - Presidente


Thais Latansio de Oliveira
(UNICESUMAR/PR) - Titular


Michele Dietrich Moura Costa
(UEPG/PR) - Titular


Patricia Mathias Doll Boscardin (UEPG/PR) -
Titular


Edneia Amancio de Souza Ramos Cavalieri
(UFPR/PR) - Titular

Ponta Grossa, 30 de julho de 2021

**Dedico aos meus espelhos,
escudos e espadas,
Adriane, Jefferson e Laura.**

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por ter guiado meus passos, iluminado meus pensamentos e colocado tantas pessoas maravilhosas em minha vida;

À minha melhor amiga, conselheira, também chamada de mãe, **Adriane**, por seu amor incondicional, sua paciência infinita e sua confiança inabalável em mim;

Ao meu grande ídolo, fã e pai, **Jefferson**, por seu imenso amor, apoio e incentivo;

À minha amada irmã, **Laura**, por acreditar em mim e me ensinar a ser uma pessoa melhor;

Ao meu orientador, **professor Flávio**, pela toda confiança depositada em mim ao longo desses anos, por ser tão generoso e humilde ao trocar conhecimentos e por ter moldado a profissional que me tornei;

À minha co-orientadora, **professora Carla**, por ter me recebido em seu laboratório, por compartilhar seus conhecimentos e despertar em mim a paixão pelo mundo celular;

À família do **Lab M-23** por todos os momentos compartilhados, das frustrações com experimentos mal sucedidos às viagens para congressos, vocês tornaram tudo mais fácil e alegre;

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

Aos meus **amigos** por acreditarem em mim, pelas conversas, conselhos, apoio e, principalmente risadas;

Aos **pesquisadores** do *National Center for Natural Products Research* por terem me recebido em sua instituição e me auxiliado nas pesquisas;

Aos **voluntários** que aceitaram tão prontamente se doarem pra execução dessa pesquisa;

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao CNPq, à CAPES, à Fundação Araucária e ao *National Center for Natural Products Research* pela infraestrutura e recursos financeiros;

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

*"Eu estou entre aqueles que acham a ciência tem grande beleza.
Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico:
ele é também uma criança adiante de um fenômeno natural
que o impressiona como um conto de fadas."
Marie Curie*

RESUMO

Câncer é um grande grupo de doenças malignas caracterizadas por crescimento descontrolado de células em várias partes do corpo. Trata-se de um problema de saúde pública dada as altas taxas de mortalidade e assim, a busca de novos fármacos para o tratamento deste problema se faz necessária. Nesse sentido, o látex da espécie *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns é utilizado popularmente, na forma de garrafada, para o tratamento de câncer e são encontradas na literatura evidências do seu efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Nesse trabalho avaliou-se o potencial citotóxico de frações, subfrações e eufol, substância isolada dessa matriz vegetal. Para tanto, utilizou-se cinco linhagens tumorais, uma modelo de leucemia (K-562), duas modelos de câncer colorretal (HT-29 e HCT 116) e duas modelos de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB 231). O potencial citotóxico foi determinado a partir da viabilidade celular, empregando o método de redução de MTT. O CI_{50} (concentração inibitória 50%) e o índice de seletividade (IS) foram calculados, esse último em relação às células não neoplásicas. Além disso, buscou-se investigar possíveis mecanismos de ação associados à citotoxicidade. Os ensaios de análise de morfologia celular e de ciclo celular foram realizados para as linhagens K-562 e HL-60 e, o ensaio de ativação de caspases 3 e 7, foi realizado para as linhagens MDA-MB 231 e HL-60. A fração hexano apresentou um CI_{50} de 7,78 $\mu\text{g/mL}$, já entre as subfrações avaliadas, a melhor foi a etanol com CI_{50} = 1,26 $\mu\text{g/mL}$ e o eufol também foi citotóxico com CI_{50} = 34,44 μM , para a linhagem K-562. O estudo de seletividade revelou que a subfração diclorometano é seletiva frente a linfócitos e monócitos de sangue periférico humano, com valores de 7,42 e 9,11, respectivamente; todavia o eufol apresentou parâmetro de seletividade até 2,35. As subfrações diclorometano e etanol e o eufol ativaram as caspases 3 e 7 e alteraram a morfologia e o ciclo celular das células HL-60 e K-562. Enquanto que para as demais linhagens observou-se que a exceção da fração metanol, as frações reduziram a viabilidade celular em mais de 50%, sendo o mais baixo valor de CI_{50} (7,77 $\mu\text{g/mL}$) obtido para a linhagem MDA-MB 231 com a fração acetato de etila. As subfrações também se apresentaram citotóxicas às linhagens de câncer colorretal e de mama, sendo as células MDA-MB 231 as mais sensíveis ao tratamento com subfração diclorometano (CI_{50} = 16,76 $\mu\text{g/mL}$). O eufol foi citotóxico a todas as linhagens, destacando o valor de CI_{50} de 12,38 μM obtido para as células MDA-MB 231. Em comparações com a linhagem não tumoral HEK-293 a fração acetato de etila apresentou IS = 9,85 para a linhagem MDA-MB 231 e o eufol, IS = 6,47, para a mesma linhagem. Os tratamentos com a fração acetato de etila, a subfração diclorometano e o eufol promoveram a ativação das caspases 3 e 7 em células MDA-MB 231. Assim, tem-se que as matrizes vegetais obtidas do látex de *Euphorbia umbellata* possuem potencial citotóxico, bem como a substância isolada, eufol, e esse efeito se dá, possivelmente, pela indução da apoptose.

Palavras-chave: eufol. terpenos. leucemia. câncer de mama. câncer colorretal.

ABSTRACT

Cancer is a large group of diseases characterized by uncontrolled cell growth in several parts of the body. It is a public health issue given its high mortality rates, and thus, the search for new drugs for treatment of this issue is necessary. In this way, the sap of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns is popularly used, in a dilution, for cancer treatment and there are evidences in the literature of its *in vitro* e *in vivo* antitumor effect. In this study it was analyzed the cytotoxic potential of fractions, subfractions and euphol, an isolated substance of this plant matrix. For this, five cell lineages were used, a model of leukemia (K-562), two models of colorectal cancer (HT-29 and HCT 116) and two models of breast cancer (MCF-7 and MDA-MB 231). The cytotoxic potential was determinate from cell viability, using MTT reduction assay. The IC₅₀ (inhibitory concentration 50%) and the selectivity indices (SI) were calculated, the last in relation to non-plastic cells. In addition, possible mechanisms associated to the cytotoxic effect were evaluated. Morphology and cell cycle analysis were performed for HL-60 and K-562 cells, and activation of caspases 3 and 7 was evaluated in MDA-MB 231 and HL-60 cells. The hexane fraction showed IC₅₀ value of 7.78 µg/mL, meanwhile, between the subfractions evaluated, the best was ethanol subfraction with IC₅₀= 1.26 µg/mL, euphol was also cytotoxic with IC₅₀= 34.44 µM, to K-562 cells. The selectivity assay revealed that dichloromethane subfraction is selectivity compared with lymphocytes and monocytes, with values ranging of 7.42 and 9.11, respectively, on the other hand, euphol present selectivity parameter up to 2.35. The dichloromethane and ethanol subfractions, and euphol were able to activate caspases 3 and 7, to alter the cell morphology and cycle on HL-60 and K-562 cells. While, for the other cells only the methanol fraction was not able to reduce the cell viability by more than 50%. The lowest IC₅₀ (7.77 µg/mL) was obtained with MDA-MB 231 cells after of treatment with ethyl acetate fraction. The subfractions were also cytotoxic to the colorectal and breast cancer cells, the MDA-MB 231 was the most sensitive cell to the treatment with dichloromethane subfraction (IC₅₀= 16.76 µg/mL). Euphol was cytotoxic to all the cell lines, with the lowest IC₅₀ value of 12.38 µM to the MDA-MB 231 cell. In comparison with the non-plastic cell lineage, HEK-293, the ethyl acetate fraction was the most selective with IS= 9.85 for MDA-MB 231 cells and euphol showed a selectivity index of 6,47 for the same cell line. The treatments with ethyl acetate fraction, dichloromethane subfraction and euphol were able to activate caspases 3 and 7 in MDA-MB 231 cells. Thus, plant matrices obtained from *E. umbellata* latex have cytotoxic potential, as well as the isolated compound, euphol, and that this action is induced by apoptosis.

Keywords: euphol. terpenes. leukemia. breast cancer. colorectal cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Representação esquemática do processo de apoptose por via intrínseca e extrínseca.....	19
Figura 2	- Espécime de <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns e folhas (em destaque).....	37
Figura 3	- Desenho experimental da obtenção de frações e subfrações do látex de <i>Euphorbia umbellata</i>	43
Figura 4	- Estrutura química do eufol.....	44
Figura 5	- Desenho experimental da análise de viabilidade celular e efeitos associados à citotoxicidade de frações e subfrações do látex de <i>Euphorbia umbellata</i>	50
Figura 6	- Avaliação da viabilidade celular da linhagem K-562 após 72 h de tratamento com fração hexano, subfrações e eufol.....	53
Figura 7	- Efeito das subfrações diclorometano e etanol sobre a morfologia de células HL-60 coradas com alaranjado de acridina e brometo de etídio.....	57
Figura 8	- Efeito do eufol sobre a morfologia de células K-562 coradas com alaranjado de acridina e brometo de etídio.....	58
Figura 9	9 - Distribuição do ciclo celular obtido para linhagem HL-60 após 12 h de tratamento com subfrações diclorometano e etanol.....	60
Figura 10	- Distribuição do ciclo celular obtidos para linhagem K-562 após 12 h de tratamento com eufol.....	62
Figura 11	- Análise de ativação de caspases de células HL-60 após 4 h de tratamento com subfrações diclorometano e etanol.....	64
Figura 12	- Viabilidade celular das linhagens HT-29, HCT 116, MCF-7 e MDA-MB 231 após 24 h de tratamento com frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.....	65
Figura 13	- Viabilidade celular das linhagens HT-29, HCT 116, MCF-7 e MDA-MB 231 após 48 h de tratamento com frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.....	66
Figura 14	- Viabilidade celular das linhagens HT-29, HCT 116, MCF-7 e MDA-MB 231 após 24 h de tratamento com subfrações éter de petróleo, diclorometano e etanol.....	69

Figura 15	- Viabilidade celular das linhagens HT-29, HCT 116, MCF-7 e MDA-MB 231 após 48 h de tratamento com subfrações éter de petróleo, diclorometano e etanol.....	70
Figura 16	- Viabilidade celular das linhagens HT-29, HCT 116, MCF-7 e MDA-MB 231 após 24 e 48 h de tratamento com eufol.....	73
Figura 17	- Avaliação da ativação de caspases 3/7 em células MDA-MB 231 após 6 h de tratamento com fração acetato de etila e subfração diclorometano.....	77
Quadro 1	- Substâncias isoladas de <i>Euphorbias</i> e seus potenciais citotóxicos.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Taxas de mortalidade por tipo de câncer e sexo no Brasil, em 2019.....	15
Tabela 2	- Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos após tratamento por 72 h, com frações, subfrações e eufol de látex de <i>Euphorbia umbellata</i> para a linhagem K-562.....	54
Tabela 3	- Valores de CI_{50} e índice seletividade obtidos para as subfrações diclorometano e eufol de látex de <i>Euphorbia umbellata</i> , após 48 h de tratamento.....	56
Tabela 4	- Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos após tratamento, por 24 e 48 h, com frações de látex de <i>Euphorbia umbellata</i>	67
Tabela 5	- Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos após tratamento, por 24 e 48 h, com subfrações da fração hexano de látex de <i>Euphorbia umbellata</i>	71
Tabela 6	- Valores de CI_{50} (μM) obtidos após tratamento, por 24 e 48 h, com eufol.....	74
Tabela 7	- Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos para as células HEK-293 após tratamento, por 24 e 48 h, com frações, subfrações e eufol extraídos do látex de <i>Euphorbia umbellata</i>	75
Tabela 8	- Valores de índice de seletividade determinados após tratamento, por 24 e 48 h, com frações, subfrações e eufol obtidos do látex de <i>Euphorbia umbellata</i>	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	GERAL.....	14
2.2	ESPECÍFICOS.....	14
3	REVISÃO.....	15
3.1	CÂNCER.....	15
3.2	PRODUTOS NATURAIS E POTENCIAL CITOTÓXICO.....	17
3.2.1	Mecanismos de ação associados à citotoxicidade.....	18
3.3	POTENCIAL CITOTÓXICO DO GÊNERO <i>Euphorbia</i>	20
3.4	POTENCIAL CITOTÓXICO DA ESPÉCIE <i>Euphorbia umbellata</i>	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1	REAGENTES E SOLVENTES.....	41
4.2	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	41
4.3	OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES, SUBFRAÇÕES E EUFOL (SUBSTÂNCIA ISOLADA).....	42
4.4	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO.....	44
4.4.1	Cultivo celular.....	44
4.4.2	Determinação da viabilidade celular.....	44
4.4.2.1	<i>Linhagem com crescimento em suspensão.....</i>	<i>45</i>
4.4.2.2	<i>Linhagens com crescimento dependente de adesão.....</i>	<i>45</i>
4.4.2.3	<i>Cálculo da viabilidade celular e CI_{50}.....</i>	<i>45</i>
4.5	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS).....	46
4.6	INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS ASSOCIADOS A CITOTOXICIDADE.....	47

4.6.1	Avaliação de morte celular com fluoróforos.....	47
4.6.2	Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	48
4.6.3	Análise da atividade da caspases 3 e 7.....	49
4.6.3.1	<i>Linhagens com crescimento em suspensão.....</i>	49
4.6.3.2	<i>Linhagens com crescimento dependente de adesão.....</i>	49
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DA FRAÇÃO HEXANO E SUBFRAÇÕES DO LÁTEX DE <i>Euphorbia umbellata</i> E DO EUFOL NO MODELO DE LEUCEMIA.....	52
5.2	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DAS FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DO LÁTEX DE <i>Euphorbia umbellata</i> E DO EUFOL FRENTE A MODELOS DE CÂNCER COLORRETAL E DE MAMA.....	64
6	CONCLUSÕES.....	78
	REFERÊNCIAS.....	79
	APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS.....	93
	ANEXO A – PARECER COEP.....	96

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o termo genérico empregado para um grande grupo de doenças caracterizadas por crescimento anormal celular em várias partes do corpo, as quais podem invadir outros tecidos e órgãos. Outras nomenclaturas utilizadas são tumores malignos e neoplasias malignas. Trata-se de um problema de saúde pública visto que é a segunda maior causa de óbitos no mundo (WHO, 2021).

O tratamento é realizado de acordo com o diagnóstico e pode ser a associação da ressecção cirúrgica dos tumores com outros tratamentos como radioterapia, quimioterapia e imunoterapia (TRAN *et al.*, 2017). Apesar dos avanços nos protocolos quimioterápicos, os efeitos colaterais de muitos dos medicamentos usados na terapia são graves, debilitantes e as taxas de remissão e sobrevivência são insatisfatórias (YUAN *et al.*, 2017), dessa forma há necessidade de buscar novos fármacos, como alternativa aos já existentes.

Produtos naturais são uma fonte promissora de novos fármacos. De fato, quase 50% dos novos produtos aprovados entre 1981 e 2019 são de origens naturais ou semelhantes a moléculas encontradas nos mesmos (NEWMAN; CRAGG, 2020).

A *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns destaca-se como espécie promissora ao estudo citotóxico, visto que seu látex é tóxico sendo utilizado popularmente para o tratamento de diversas doenças, incluindo câncer, tendo como indicação, administração oral da garrafada (látex diluído em água), três vezes ao dia (LUZ *et al.*, 2016; ORTÊNCIO, 1997; SINGH; PANDEY; MAHESHWARI, 2020).

Estudos prévios do grupo de pesquisa realizados com essa espécie vegetal e seus extratos revelaram o potencial citotóxico do látex *in natura*, em estudos *in vitro* e *in vivo*, em melanoma (ANDRADE *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Extratos obtidos a partir do látex mostram-se ainda mais promissores e potentes frente às células de modelo de câncer de colo de útero, colorretal e, principalmente leucemia (LUZ *et al.*, 2015, 2016). Esses ensaios revelaram que extratos obtidos com solventes mais apolares (hexano e clorofórmio) são mais ativos.

A substância majoritária do látex, eufol, também já foi avaliada frente a diversas linhagens celulares, revelando ter seletividade frente a alguns tipos específicos de câncer (CRUZ *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018). Entretanto, pouco se sabe a respeito de outros derivados do látex, como subfrações da fração hexano e os possíveis mecanismos de ação associados ao potencial citotóxico

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o potencial citotóxico das frações e subfrações do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns e eufol (substância isolada) frente às diferentes linhagens celulares cancerosas, bem como investigar possíveis efeitos associados a citotoxicidade.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito citotóxico das frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) e subfrações da fração hexano (éter de petróleo, diclorometano, etanol e metanol) obtidas do látex de *E. umbellata* por meio da determinação da viabilidade celular em linhagens K-562, HT-29, HCT 116, MCF-7 e MDA-MB 231.
- Avaliar o efeito citotóxico do eufol isolado do látex de *E. umbellata* por meio da determinação da viabilidade celular em linhagens K-562, HT-29, HCT 116, MCF-7 e MDA-MB 231.
- Calcular a concentração das amostras que inibem 50% do crescimento celular (CI_{50}) em diferentes tempos de tratamento.
- Determinar o índice de seletividade (IS) pela razão entre o CI_{50} de células controle (linfócitos, monócitos e HEK-293) e células tumorais.
- Investigar os tipos de respostas relacionados à citotoxicidade do eufol, frações e das subfrações do látex de *E. umbellata*, ao avaliar morte celular com fluoróforos, alteração de ciclo celular e ativação de caspases 3 e 7.

3 REVISÃO

3.1 CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças no qual há crescimento celular descontrolado com potencial de espalhar para outros tecidos e órgãos (DUTTA *et al.*, 2019; SHARIFI-RAD *et al.*, 2019).

Entre as causas destacam-se exposição ocupacional aos compostos tóxicos (arsênico, asbesto, benzeno, além de radiação x, ultravioleta e nuclear), hábitos de vida (fumar tabaco, alimentação inadequada, ausência de exercícios físicos, obesidade e consumo de álcool), infecção por vírus (HTVL-1, HIV, HBV, papiloma vírus, hepatite C e Epstein-barr) e tratamentos medicamentosos (radioisótopos, tamoxifeno, clorambucil, ciclosporina, ciclofosfamida, fenacetina, azatioprina, clornafazina e hormônios) (BLACKADAR, 2016).

Todos esses fatores podem causar diversas alterações genéticas que levam à ativação de oncogenes através de distúrbios genéticos que incluem translocação cromossômica, mutação pontual, deleção, amplificação e inserção. Também podem desencadear alterações moleculares as quais se destacam as mutações nos genes TP53, presente em 60% dos cânceres (HASSANPOUR; DEGHANI, 2017).

Câncer é um problema de saúde pública mundial, visto que é a segunda maior causa de mortalidade no mundo, responsável por aproximadamente 10 milhões de mortes em 2020 (WHO, 2021). As taxas de mortalidade por tipo de câncer e sexo no Brasil, em 2019 estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Taxas de mortalidade por tipo de câncer e sexo no Brasil, em 2019.

HOMENS			MULHERES		
Localização Primária	Óbitos	%	Localização Primária	Óbitos	%
Traqueia, brônquios e pulmões	16.733	13,8	Mama	18.068	16,4
Próstata	15.983	13,1	Traqueia, brônquios e pulmões	12.621	11,4
Cólon e reto	10.191	8,4	Cólon e reto	10.385	9,4
Estômago	9.636	7,9	Colo do útero	6.596	6,0
Esôfago	6.802	5,6	Pâncreas	5.893	5,3
Fígado e vias biliares	6.317	5,2	Estômago	5.475	5,0
Pâncreas	5.905	4,9	Sistema nervoso central	4.663	4,2
Cavidade oral	5.120	4,2	Fígado e vias biliares	4.584	4,2
Sistema nervoso central	5.049	4,1	Ovário	4.123	3,7
Leucemia	4.014	3,3	Leucemia	3.356	3,0
Todas as neoplasias	121.686	100,0	Todas neoplasias	110.344	100,0

Fonte: INCA, 2021.

Em relação à incidência no Brasil estimava-se, que em 2020, a ocorrência de 626.030 novos casos de câncer sendo que os cânceres de próstata (65.840 mil) em homens e mama (66.280 mil) em mulheres seriam os mais frequentes. À exceção do câncer de pele não melanoma, os tipos de câncer mais incidentes em homens serão próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), traqueia, brônquios e pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%); nas mulheres, os cânceres de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,5%), traqueia, brônquios e pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) figurariam entre os cinco mais incidentes (INCA, 2021).

A terapêutica do câncer depende de vários fatores como o tipo de câncer, estágio, características histológicas e genéticas, e terapias prévias (AMBROGGI *et al.*, 2015). De forma geral, pode ser associado à ressecção cirúrgica dos tumores, acompanhado ou não de tratamento radioterápico, e/ou a quimioterapia (TRAN *et al.*, 2017).

Fármacos quimioterápicos são tóxicos às células em proliferação, dessa forma atingem células neoplásicas em maior proporção, visto que a replicação acelerada é uma das principais características do câncer. Porém, as células saudáveis também são atingidas, em especial as com alta taxa de replicação, tais como os folículos pilosos, intestino, sangue, implicando em efeitos colaterais indesejáveis (VIANA *et al.*, 2017). Entre esses efeitos estão nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, depressão hematopoiética, redução de massa corpórea, neuropatia periférica tóxica, alopecia, diarreia, náuseas, vômito, retração do baço e imunossupressão (CAETANO *et al.*, 2018).

Apesar dos avanços na quimioterapia, as taxas de remissão e sobrevivência são insatisfatórias, devido em parte à seleção de fenótipos resistentes. Essa resistência aos medicamentos pode ser classificada em duas categorias: intrínseca e adquirida. As células com resistência intrínseca mostram um fenótipo resistente previamente à quimioterapia, sendo o tratamento ineficaz. Enquanto que as células com resistência adquirida podem inicialmente responder à quimioterapia, mas depois tornar-se insensível a fármacos similares. A resistência multidroga limita a eficácia da quimioterapia e é um grande desafio no tratamento do câncer (YUAN *et al.*, 2017). Assim há a necessidade de pesquisas e desenvolvimento de fármacos/quimioterápicos mais específicos às células cancerosas, com moléculas diferentes/novas para se tentar diminuir a incidência de resistência e minimizar os efeitos adversos dos tratamentos atuais.

3.2 PRODUTOS NATURAIS E POTENCIAL CITOTÓXICO

Produtos naturais especialmente provenientes da flora são utilizados desde os primórdios da humanidade como fonte de medicamentos, gerando bases para a medicina tradicional. Como exemplo têm-se registros mesopotâmicos (2600 a.C.); o *Eber papyrus* (1500 a.C.); matéria médica chinesa (1100 a.C.) e o sistema ayurvédico indiano (1000 a.C.) que listam centenas de substâncias derivadas de plantas que deveriam ser utilizadas para tratamento de diversas enfermidades. Assim, a flora é uma fonte importante de novos fármacos. (CRAGG; NEWMAN, 2013).

A descoberta de fármacos com base em produtos naturais está relacionada a alguns desafios, como a dificuldade na coleta de espécimes silvestres, caracterização química e identificação de compostos bioativos, e incompatibilidade de produtos naturais com triagem de alto rendimento (DUTTA *et al.*, 2019). Ainda assim, quase um quarto dos fármacos aprovados entre 1981 e 2019 são de origem natural (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Ao acrescentar os produtos de origem natural, mas com modificações sintéticas, os produtos sintéticos com grupo farmacofórico derivado de produtos naturais e compostos sintéticos que imitam produtos naturais essa porcentagem passa a ser de 50%. A respeito, especificamente de fármacos anticancerígenos, tem-se que 185 novos fármacos foram aprovados entre 1981 e 2019, isto é, retirando-se as moléculas não biológicas e as vacinas. Destes, 62 são de origem natural, 94 sintéticos, mas baseados em produtos naturais e apenas 29 são obtidos completamente por síntese (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Dentre os antitumorais de origem vegetal destacam-se o paclitaxel e seus análogos docataxel e cabazitaxel provenientes de *Taxus brevifolia* Nutt.; camptotecina e os análogos belotecano, topotecano e irinotecano obtidos de *Camptotheca accuminata* Decne.; a vimblastina, a vincristina e os análogos vindesina, e vinorelbina provenientes da *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo e teniposídeo extraídos de *Podophyllum peltatum* L. (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010; SHARIFI-RAD *et al.*, 2019).

Em relação às classes de metabólitos, alcaloides, flavonoides, fenilpropanoides, saponinas, fenois e terpenos já foram descritos como promissores para estudos citotóxicos (AHMED; ISHIBASHI, 2016; GUO *et al.*, 2017; YUAN *et al.*, 2017). Havendo, inclusive, substâncias que estão em fase clínica de estudos, como a

curcumina, epigallocatequina-3-galato, quercetina, resveratrol, berberina (FANG *et al.*, 2017).

3.2.1 Mecanismos de ação associados à citotoxicidade

Os mecanismos de ocorrência e progressão do câncer ainda não são totalmente compreendidos, mas sabe-se que a progressão ocorre em parte pela habilidade das células cancerosas em evitar a apoptose. Por isso, compostos capazes de modular e induzir a apoptose são alvo de inúmeras pesquisas (ICHIM; TAIT, 2016; KIM; KIM, 2018).

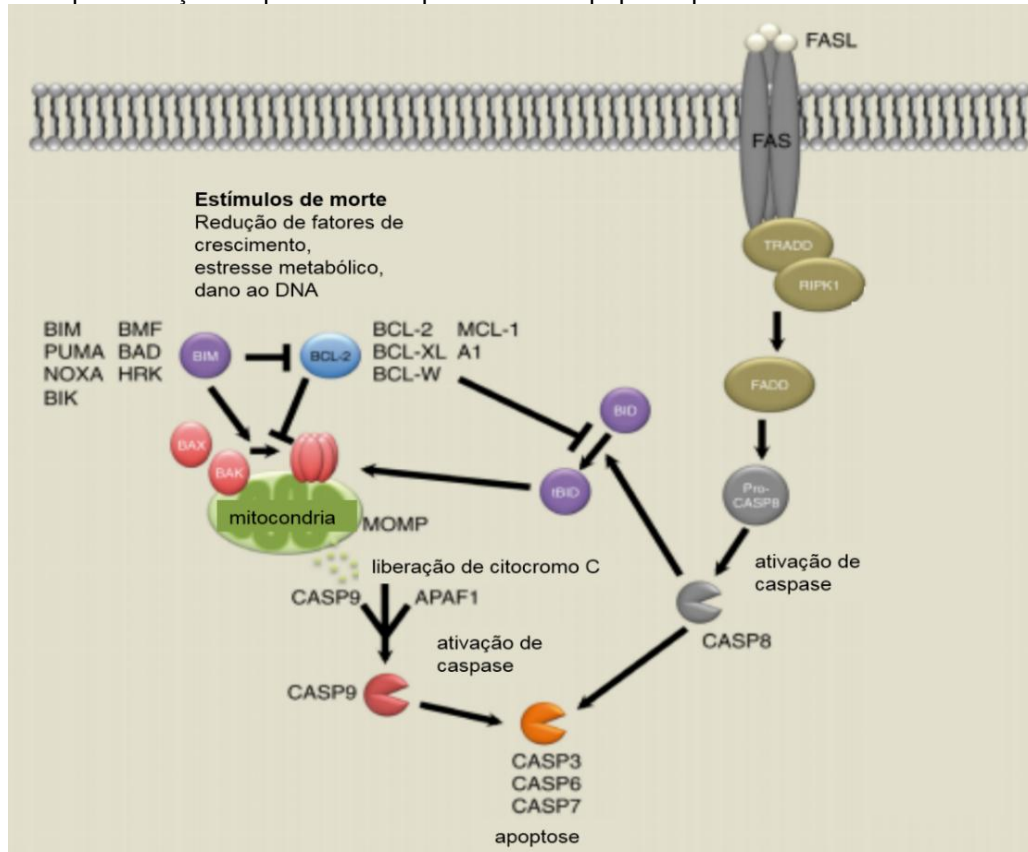
Apoptose é um processo altamente regulado e natural de morte celular programada, essencial para o desenvolvimento, homeostase e funcionamento do sistema imune. Esse processo é iniciado por fatores intracelulares ou extracelulares, denominadas de vias intrínseca e extrínseca de morte celular, respectivamente (Figura 1) (ICHIM; TAIT, 2016; PFEFFER; SINGH, 2018).

A via intrínseca é estimulada por falta de fatores de crescimento, excesso de íons de cálcio, moléculas danificadoras de DNA, oxidantes e fármacos que ajam sobre os microtúbulos. A via é regulada pelas proteínas da família Bcl-2, que uma vez estimuladas irão ativar as proteínas Bax e Bak. Quando ativadas essas se oligomerizam e aumentam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria. Esse aumento de permeabilidade permite a liberação de proteínas intramembranares como o citocromo C. Uma vez liberado, forma-se um apoptossoma composto por citocromo C, protease apoptótica ativadora fator 1 (APAF-1 - *apoptotic protease-activating factor 1*), dATP e pro-caspase 9. Dentro do apoptossoma a procaspase 9 é ativada e, assim, inicia-se a via comum da apoptose com a ativação das caspases (PFEFFER; SINGH, 2018; VOSS; STRASSER, 2020).

Já a via extrínseca depende de sinais extracelulares. Os sinais de morte celular, como os ligantes Fas (FASL, o indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL - *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) e o fator de necrose tumoral (TNF - *tumor necrosis factor*), se ligam aos receptores de morte da família de receptores de fator de necrose tumoral. Para que ocorra a sinalização é necessário o recrutamento de adaptadores proteicos para os receptores. Entre os adaptadores proteicos estão o domínio de morte associado ao Fas (FADD - *Fas-associated death domain*) e o domínio de morte associado ao receptor TNF (TRADD - *TNF receptor-associated death domain*).

Iniciadores como as pro-caspase 8 e 10 se ligam aos adaptadores proteicos formando o complexo de sinalização indutor de morte (DISC - *death-inducing signaling complex*). Este, por sua vez, ativa as pro-caspases, iniciando, assim, a via comum da apoptose (PFEFFER; SINGH, 2018; VOSS; STRASSER, 2020).

Figura 1- Representação esquemática do processo de apoptose por via intrínseca e extrínseca.



Fonte: Adaptado de VOSS; STRASSER, 2020.

A ação citotóxica de produtos naturais está associada à modulação das vias de morte celular, principalmente, mas não exclusivamente a apoptose (GUAMÁN-ORTIZ; ORELLANA; RATOVIISKI, 2017; LIN *et al.*, 2017). Por exemplo, berberina, um alcaloide encontrado em *Coptis japonica*, *Coptis chinensis* e *Berberis aristata*, age por apoptose e autofagia. Molecularmente esses efeitos se dão por meio da indução de citocromo C e caspases, clivagem de PARP-1 e Bax, e inibição da Bcl-2 (DUTTA *et al.*, 2019). Além da ativação de intermediários de autofagia, BECN1, ATG5 e conversão LC3B-I/-II (GUAMÁN-ORTIZ; ORELLANA; RATOVIISKI, 2017). Outros compostos e fármacos naturais exercem ação por meio de outros alvos moleculares, como via Wnt (ISHIBASHI, 2019; LIU *et al.*, 2019), topoisomerases (JAIN; MAJUMDER; ROYCHOUDHURY, 2017), histonas deacetilases (MERARCHI *et al.*, 2019), destacando a regulação da expressão de Bax e Bcl-2, clivagem de caspases e

ação sobre ciclinas (DUTTA *et al.*, 2019). Há ainda substâncias capazes de alterar o microambiente tumoral (PARK; SURH, 2017) e inibir a defesa antioxidante de células neoplásicas (SZNARKOWSKA *et al.*, 2017).

Vale ressaltar que compostos de origem vegetal apresentam outras vantagens no combate às neoplasias. Estudos revelam que diversas substâncias isoladas de extratos vegetais podem ser coadjuvantes na quimioterapia ao apresentarem efeito sinérgico com quimioterápicos sintéticos, havendo alguns estudos de associação em fase clínica (LIN *et al.*, 2020), ademais podem reduzir a toxicidade dos quimioterápicos ao proteger células não tumorais dos efeitos oxidantes dos mesmo (PRŠA *et al.*, 2019).

3.3 POTENCIAL CITOTÓXICO DO GÊNERO *Euphorbia*

O gênero *Euphorbia*, descrito por Lineu, pertencente à família Euphorbiaceae e configura entre os mais diversos gêneros, com distribuição cosmopolita, estudos estimam que tenha surgido no continente africano a mais de 48 milhões de anos e dispersado à América a 30-25 milhões de anos (ERNST *et al.*, 2019). A este gênero são atribuídas pelo menos 2000 espécies as quais apresentam uma ampla variedade morfológica, existindo desde ervas até árvores, mas todas as espécies desse gênero secretam látex, geralmente leitoso e tóxico, quando são danificadas. Quimicamente já foram identificados diversos metabólitos secundários tais quais flavonoides, polifenóis, esteroides, taninos e terpenos, sendo que os diterpenos são considerados marcadores taxonômicos do gênero (PASCAL *et al.*, 2017; VASAS; HOHMANN, 2014).

Quanto ao potencial citotóxico, há uma variedade de estudos que analisaram extratos de diferentes espécies; da espécie *Euphorbia cheiradenia* Boiss. & Hohen. o extrato metanol de partes aéreas foi avaliado frente a linhagens HeLa, A549, Fen, K-562 e Jurkat demonstrando que as linhagens K-562 e Jurkat foram mais sensíveis com CI_{50} de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (AMIRGHOFRAH *et al.*, 2006).

O extrato metanol de látex de *Euphorbia antiquorum* L. induziu a apoptose de células HeLa com valor de CI_{50} próximo a 2 $\mu\text{g/mL}$ (HSIEH *et al.*, 2011), com alteração de ciclo celular, havendo aumento da população celular em fase S, possivelmente pela via ATM/ATR-p38 MAPK (HSIEH *et al.*, 2014).

O potencial citotóxico de frações de partes aéreas e látex oriundos de *Euphorbia macroclada* Boiss. foram analisados contra linhagem de câncer de mama (MDA-MB 468), relatando que as frações diclorometano e acetato de etila foram citotóxicas na concentração de 30 e 50 µg/mL, respectivamente. Já a fração metanol e o látex não foram capazes de reduzir a viabilidade celular em 50% nem nas maiores concentrações testadas (100 e 200 µg/mL, respectivamente) (SADEGHI-ALIABADI; SAJJADI; KHODAMORADI, 2009).

Amirghofran *et al.* (2011) determinaram o potencial citotóxico de extrato metanol e subfrações (hexano, acetato de etila e butanol) obtidos de partes aéreas de cinco diferentes espécies de *Euphorbias* (*Euphorbia petiolata* Banks & Sol., *Euphorbia hebecarpa* Boiss., *Euphorbia osyridea* Boiss., *Euphorbia microsciadia* Boiss. e *Euphorbia heteradenia* Jaub & Spach) nas linhagens tumorais HeLa, MCF-7, Fen, K-562 e Jurkat. Para o extrato metanol os valores de CI_{50} variaram de 2,5 a mais de 200 µg/mL, sendo o menor valor obtido para extrato de *E. osyridea* e linhagem Fen. Em relação às subfrações, a hexano foi a que apresentou os menores valores de CI_{50} , sendo de 19 a 79,4 µg/mL. Além do potencial citotóxico, os autores demonstraram que o extrato metanol induziu a proliferação linfocitária.

O efeito citotóxico de frações éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila e butanol de *Euphorbia helioscopia* L. foi estudado frente às linhagens SMMC-7721, SW-480, BEL-7402, HepG2 e SGC-7901. Após 24 h de tratamento, a fração acetato de etila foi a mais ativa independente da linhagem celular. Entretanto, só houve redução da viabilidade celular maior que 50% nas células SMMC-7721. Com o aumento do tempo de tratamento (48 e 72 h) há aumento do efeito citotóxico, sendo a redução da viabilidade celular maior que 50% observada em todas as linhagens testadas. A fração acetato de etila causa parada de ciclo celular em fase G1 e apoptose de células SMMC-7721 (WANG *et al.*, 2012).

O extrato aquoso de *Euphorbia formosana* Hayata reduziu a viabilidade de células THP-1 e HL-60, induziu apoptose por via mitocondrial e alterou o ciclo celular da linhagem THP-1 com aumento da população em fase S em baixas concentrações (50 e 100 µg/mL), enquanto as maiores concentrações (200 e 400 µg/mL) aumentaram a população G0/G1 em relação ao controle (HSIEH *et al.*, 2013). Esse extrato vegetal também induziu a morte celular de células DU145 via parada de ciclo celular em fase S, indução da apoptose por estresse oxidativo e ativação de caspases (YANG *et al.*, 2016).

O extrato aquoso obtido de folhas e caules de *Euphorbia peplus* L. apresentou-se citotóxico à linhagem MCF-7 após 48 h de tratamento, com valor de CI_{50} de 30,32 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, a análise estrutural em microscopia eletrônica revelou sinais de apoptose, com a formação intensa de *blebs* na membrana celular com perda das microvilosidades de superfície, utofagossomas e alterações nucleares como encolhimento e condensação de cromatina (AL-EMAM *et al.*, 2019). Ao avaliarem extrato hidroalcolólico (70%) de *E. peplus*, observou-se que 25 $\mu\text{g/mL}$ inibiu quase 50% (48,55%) da população de células de baço removidas de ratos, após 72 h de tratamento (GHRAMH; KHAN; IBRAHIM, 2019).

O extrato metanol de partes aéreas de *Euphorbia hirta* L. foi analisado frente às linhagens Vero, MCF-7, HT-29 e HeLa. Os valores de CI_{50} , após 24 h de tratamento, foram determinados como $122,85 \pm 4,60$ (VERO), >200 (HeLa), $25,26 \pm 0,18$ (MCF-7) e $136,00 \pm 1,56$ (HT-29) $\mu\text{g/mL}$. Análise morfológica revelou sinais de apoptose, já a análise de ciclo celular, sugeriu parada de ciclo celular com aumento de população em fase S (KWAN *et al.*, 2016). Outro estudo realizado com extrato aquoso de folhas de *E. hirta* revelou indução da apoptose de linhagens MCF-7 e MDA-MB 231 (BEHERA *et al.*, 2016). Já Sharma *et al.* (2014) avaliaram extrato etanólico de *E. hirta* frente a linhagens RAW 264.7 e HL-60, e constataram que o extrato foi citotóxico apenas para a linhagem HL-60, sendo que a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de reduzir a viabilidade celular em mais de 50%.

O potencial citotóxico dos extratos aquoso e etanol de folhas de *Euphorbia cyparissias* L. foi determinado em relação às linhagens MDA-MB 231 e HCT 116, sendo que o extrato aquoso apresentou porcentagens de inibição da viabilidade celular de 57,5% (MDA-MB 231) e 71,0% (HCT 116), já o extrato etanólico, 5,5% (MDA-MB 231) e 20,5% (HCT 116). Todos os resultados foram obtidos após 48 h de tratamento com 100 $\mu\text{g/mL}$ de cada extrato (ALONAZI *et al.*, 2020).

Choene e Motadi (2016) estudaram o potencial citotóxico de extratos de caule de *Euphorbia tirucalli* L. frente às linhagens MCF-7, MDA-MB 231 e MRC-5. A inibição da proliferação variou de 30-100 $\mu\text{g/mL}$ e 50-100 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens MCF-7 e MDA-MB 231, respectivamente. Os autores observaram ainda parada de ciclo celular em fase G0/G1 e indução da apoptose. Em outra pesquisa 50 $\mu\text{g/mL}$ de extratos aquoso e metanol de caule e folhas dessa mesma espécie vegetal reduziu a viabilidade de células MiaPaCa2 em 50% (MUNRO *et al.*, 2015). Um extrato bruto obtido do látex de *E. tirucalli* apresentou efeito citotóxico a partir de 25 $\mu\text{g/mL}$ para

linhagens HeLa, PC-3, MDA-MB 231 e MCF-7, sendo que as últimas duas foram mais suscetíveis ao extrato com 47,9 e 56,9% de morte celular (PALHARINI *et al.*, 2017). Já um extrato fenólico, padronizado em equivalente de ácido gálico (EAG), obtido a partir do látex de *E. tirucalli* demonstrou-se citotóxico as linhagens MCF-7, A549 e HL-60 com valores de CI_{50} de 31,65 $\mu\text{g EAG/mL}$, 35,36 $\mu\text{g EAG/mL}$ e 22,76 $\mu\text{g EAG/mL}$, respectivamente (ABDEL-ATY *et al.*, 2019). O látex *in natura*, por sua vez, foi citotóxico a linhagem AGS, após 48 h de tratamento com valor de CI_{50} de 69,43 $\mu\text{g/mL}$ (SOUZA *et al.*, 2019).

O potencial citotóxico de látex de *Euphorbia bicolor* Engelm. & A.Gray foi determinado em linhagens modelo de câncer de mama (MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 e MDA-MB-468), o tratamento foi realizado por 72 h e os resultados obtidos foram de 498,7 $\mu\text{g/mL}$ (MCF-7), 315,7 $\mu\text{g/mL}$ (T47D), 258,3 $\mu\text{g/mL}$ (MDA-MB-231) e 499 $\mu\text{g/mL}$ (MDA-MB-468) (BASU *et al.*, 2019).

Extratos obtidos a partir das partes aéreas de *Euphorbia turcomanica* Boiss. foram avaliados em células HeLa e HT-29, apresentando valores de CI_{50} entre 43 e 390 $\mu\text{g/mL}$, para as frações metanol/água e heptano, respectivamente (ALIOMRANI; JAFARIAN; ZOLFAGHARI, 2017).

Jannet *et al.* (2017) estudaram os efeitos das frações apolar (clorofórmio) e polar (metanol) de *Euphorbia paralias* L. e *Euphorbia terracina* L. em linhagem THP-1, Caco-2, monócitos CD14⁺ e IEC-6. Só houve citotoxicidade para a linhagem THP-1, após 48 h de tratamento, com valores de CI_{50} de 54,58 e 2,08 $\mu\text{g/mL}$ para as frações polares de *E. paralias* e *E. terracina*, enquanto que as frações apolares apresentaram atividade em valores superiores a 100 e 14,43 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Outro estudo realizado com extrato acetato de etila de partes aéreas de *E. paralias* demonstrou citotoxicidade frente a linhagem HepG2, com valor de CI_{50} de $26,4 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ (AL-YOUSEF *et al.*, 2021).

A fração metanol de *Euphorbia triaculeata* Forssk. foi citotóxica às linhagens MCF-7, PC-3 e HEPG2 apresentando valores de CI_{50} de 26 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem MCF-7, 48 $\mu\text{g/mL}$ para PC-3, enquanto a maior concentração testada (50 $\mu\text{g/mL}$) não apresentou efeito citotóxico na linhagem HEPG2, demonstrando maior sensibilidade da linhagem modelo de câncer de mama ao tratamento (AL-FAIFI *et al.*, 2017).

No mesmo sentido, o extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *Euphorbia szovitsii* Fisch. & C.A.Mey. também foi citotóxico em modelo de câncer de mama (MDA-MB 231), com valores de CI_{50} de 76,78 $\mu\text{g/mL}$ e 59,71 $\mu\text{g/mL}$, após 24 e 48 h

de tratamento. Foi demonstrado que tal efeito é de natureza apoptótica com alteração do ciclo celular (com aumento da população em fase G1) (ASADI-SAMANI *et al.*, 2019).

O látex de *Euphorbia esula* L. reduziu a viabilidade celular de SGC-7901 de forma tempo e concentração dependente, além de causar condensação e marginalização de cromatina, redução do volume celular, *blebs*, aumento do pico sub G0 do ciclo celular, ativação de caspases 3 e 8, e aumento da expressão gênica de Bax e redução da expressão de Bcl-2, todos indicativos de processo apoptótico (FU *et al.*, 2016).

O potencial citotóxico da fração hexano de partes aéreas de *Euphorbia lunulata* Bunge foi avaliado frente à linhagem resistente à adriamicina SGC-7901/ADR. A fração inibiu a proliferação celular em 80% na maior concentração avaliada (80 mg/L), reduziu a migração e invasão celular, alterou o ciclo celular com acúmulo significativo de células em fase S, ativou caspases 3, 8 e 9, desencadeou a liberação de citocromo C ao citosol, reduziu a expressão de Bcl-2 e aumentou a expressão de Bax, causando apoptose dessas células (FU *et al.*, 2018).

Extrato hexano obtido das partes aéreas de *Euphorbia balsamifera* Aiton foram avaliados frente às linhagens HCT 116 e HepG2, os valores de CI_{50} foram 76,2 $\mu\text{g/mL}$ e 54,7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (ALJUBIRI *et al.*, 2021).

O extrato etanol de sementes de *Euphorbia lathyris* L. mostrou-se citotóxica as células T84, HCT 115, CCD18, SF-268, SK-N-SH, A-172, LN-229, PANC-1, MCF-7 com valores de CI_{50} de 16,3 $\mu\text{g/mL}$, 72,9 $\mu\text{g/mL}$, 266,0 $\mu\text{g/mL}$, 39,3 $\mu\text{g/mL}$, 71,4 $\mu\text{g/mL}$, 18,6 $\mu\text{g/mL}$, 70,5 $\mu\text{g/mL}$, 185,8 $\mu\text{g/mL}$, 89,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O extrato ainda causou alteração do ciclo celular e redução da migração celular (MESAS *et al.*, 2021). Enquanto isso, extrato metanol de raiz de *E. lathyris* em concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a viabilidade celular de linhagens DU-145, HeLa, MCF-7, MDA-MB-231 e H2347 com as seguintes proporções: 24,4%, 57,0%, 66,9%, 38,1% e 70,6%, respectivamente (RICIGLIANO *et al.*, 2020).

Já o extrato rico em polifenóis (84,4% de quercetina e campferol) obtido de *Euphorbia supina* Raf. reduziu de forma concentração dependente a viabilidade de células U937 (CI_{50} = 38 $\mu\text{g/mL}$), com aumento significativo do pico sub G0 na análise do ciclo celular, condensação e fragmentação de cromatina (sinais de apoptose) (HAN *et al.*, 2016). Em células MDA-MB-231, concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ desses extrato rico em polifenóis reduziram significativamente a viabilidade celular, o extrato

também suprimiu o processo de metástase, possivelmente por regular a adesão celular ao inibir a expressão de VCAM-1 de células endoteliais (KO *et al.*, 2015).

Além de extratos e frações, diversas substâncias, majoritariamente diterpenos, já foram isoladas de diferentes espécies de *Euphorbia* e seus potenciais citotóxicos foram avaliados. Os resultados são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Substâncias isoladas de *Euphorbias* e seus potenciais citotóxicos.

(Continua)

Espécie	Substância	Linhagem	Cl ₅₀	Referência
<i>E. alata</i> Boiss.	Alatavniol A	HeLa	61,05 µM	ROZIMAMAT; HU; AKBER, 2018
		MCF-7	14,33 µM	
		A549	12,03 µM	
	Alatavniol B	HeLa	54,80 µM	
		MCF-7	79,99 µM	
		A549	47,11 µM	
	Alatavniol C	HeLa	62,91 µM	
		MCF-7	81,96 µM	
		A549	51,27 µM	
	Alatavniol D	HeLa	41,42 µM	
		MCF-7	63,11 µM	
		A549	78,61 µM	
	Helioscopinolídeo A	HeLa	23,80 µM	
		MCF-7	33,48 µM	
		A549	121,21 µM	
	Helioscopinolídeo E	HeLa	59,01 µM	
		MCF-7	41,80 µM	
		A549	78,17 µM	
<i>E. boetica</i> Boiss.	Euphoboetirane B	HeLa	47,23 µM	NETO <i>et al.</i> , 2019
		MCF-7	76,58 µM	
		A549	49,16 µM	
		HeLa	44,82 µM	
	Jolkinolídeo E	MCF-7	22,07 µM	
		HeLa	104,82 µM	
<i>E. ebracteolata</i> Hayata	Suremulídeo A	MCF-7	63,41 µM	SHI <i>et al.</i> , 2005
		A549	66,57 µM	
		HeLa	15,2 µM	
	Euphoboetirane A	L5178/MDR	18,2 µM	
		Colo205	23,1 µM	
		Colo320	25,4 µM	
		L5178Y/PAR	18,6 µM	
		L5178/MDR	16,0 µM	
		Colo205	55,0 µM	
<i>E. fisheriana</i> Steud.	Yuexiandajisu D	ANA 1	2,88x10 ⁻¹ µM	DU <i>et al.</i> , 2020
		Jurkat	4,48 µM	
	Jolkinolídeo B	ANA 1	4,46x10 ⁻² µM	
		B16	4,48x10 ⁻² µM	
		Jurkat	6,47x10 ⁻² µM	
	Ent-11α-hidroxiabieta-8(14),13(15)-dien-16,12α-olídeo	ANA 1	7,12x10 ⁻³ µM	
		B16	23 µM	
<i>E. fisheriana</i> Steud.	Prostratine 20-O-(6'- acetato)-β-D-glicopiranosídeo	Jurkat	1,79x10 ⁻² µM	
		AGS	40,56 µM	
	Langduine A6	HepG2	27,97 µM	
		AGS	32,05 µM	
<i>E. fisheriana</i> Steud.	Langduine A6	HepG2	13,42 µM	
		HepG2	13,42 µM	

Quadro 2 - Substâncias isoladas de *Euphorbias* e seus potenciais citotóxicos.

(Continuação)

Espécie	Substância	Linhagem	Cl ₅₀	Referência	
<i>E. fisheriana</i>	2-hidroxi-6-metoxiacetofenona-4-O-(6'-acetato)-β-D-glicopiranosídeo	AGS	39,85 μM	DU <i>et al.</i> , 2020	
		HepG2	35,06 μM		
<i>E. fischeriana</i>	Fischdiabietane A	T47D	6,51 μM	HE <i>et al.</i> , 2021	
		MDA-MB 231	13,49 μM		
		MCF-7	24,02 μM		
		BV173	13,09 μM		
		U937	15,56 μM		
		NALM6	7,49 μM		
		HepG2	14,28 μM		
		BEL-7402	21,75 μM		
		A549	21,94 μM		
		BGC823	22,50 μM		
		PANC-1	26,02 μM		
	11β-hidroxi-8,14-epoxi-ent-abieta-13(15)-en-16,12-olídeo	BEL7402	33,01 μg/mL	WANG,Hong-Bing <i>et al.</i> , 2013	
		HCT 116	86,63 μg/mL		
		MDA-MB 231	49,52 μg/mL		
	Isopimara-9(11),15-diene-3,19-diol	MDA-MB 231	55,76 μg/mL		
	Ent-kaur-16-en-14-ol	A549	75,23 μg/mL		
	Ingenol 6,7-epoxi-3-tetradecanoato	A549	3,35 μg/mL		
		BEL7402	13,05 μg/mL		
		HCT 116	14,62 μg/mL		
		MDA-MB 231	14,42 μg/mL		
	Ingenol-3-miristinato	A549	2,85 μg/mL		
		BEL7402	15,72 μg/mL		
		HCT 116	16,05 μg/mL		
		MDA-MB 231	18,91 μg/mL		
	Ingenol 3-palmitato	A549	2,88 μg/mL		
		BEL7402	25,87 μg/mL		
		HCT 116	14,38 μg/mL		
		MDA-MB 231	22,00 μg/mL		
	Jolkenolídeo B	K-562	12,1 μg/mL	LUO; WANG, 2006	
		Eca-109	23,7 μg/mL		
	Eufonoide A	C4-2B	9,18 μM	YAN <i>et al.</i> , 2019	
		C4-2B/ENZR	9,70 μM		
		HCT-15	18,3 μM		
		RKO	16,2 μM		
	Ent-16β-H-3-oxokauran-17-ol	C4-2B	22,8 μM		
		C4-2B/ENZR	20,1 μM		
	Eufonoide B	C4-2B	13,4 μM		
		C4-2B/ENZR	11,1 μM		
		RKO	35,1 μM		
	Eufonoide C	C4-2B	17,7 μM		
		C4-2B/ENZR	15,2 μM		
		HCT-15	13,4 μM		
		RKO	21,3 μM		
	Eufonoide D	C4-2B	9,23 μM		
		C4-2B/ENZR	15,1 μM		
		HCT-15	23,2 μM		
		RKO	34,4 μM		
	Eufonoide E	C4-2B	16,1 μM		
		C4-2B/ENZR	22,1 μM		
	Eufonoide F	C4-2B	24,9 μM		
		C4-2B/ENZR	40,1 μM		

Quadro 3 - Substâncias isoladas de *Euphorbias* e seus potenciais citotóxicos.

(Continuação)

Espécie	Substância	Linhagem	Cl ₅₀	Referência
<i>E. fischeriana</i>	Eufonoide G	C4-2B	18,1 µM	YAN <i>et al.</i> , 2019
		C4-2B/ENZR	20,1 µM	
	Fischeriabietano A	C4-2B	7,39 µM	
		C4-2B/ENZR	9,20 µM	
		HCT-15	19,0 µM	
		RKO	22,9 µM	
		C4-2B	17,0 µM	
	Ent-kaurane-3-oxo-16β,17-diol	C4-2B/ENZR	23,0 µM	
		HCT15	43,2 µM	
		C4-2B	26,2 µM	
	3α-hidroxi-ent-16-kaureno	C4-2B	16,3 µM	
		C4-2B/ENZR	16,4 µM	
		HCT-15	28,2 µM	
		RKO	42,1 µM	
	11-oxo-ebracteolatanolídeo B	C4-2B	2,85 µM	
		C4-2B/ENZR	2,42 µM	
		HCT-15	15,2 µM	
		MDA MB 231	14,5 µM	
	Caudicifolino	C4-2B	2,22 µM	
		C4-2B/ENZR	5,39 µM	
		HCT-15	12,6 µM	
		RKO	15,3 µM	
		MDA MB 231	8,81 µM	
	Jolkinolídeo A	C4-2B	10,1 µM	
		C4-2B/ENZR	16,1 µM	
	17-hidroxijolkinolídeo B	C4-2B	12,3 µM	
		C4-2B/ENZR	14,0 µM	
		C4-2B	4,43 µM	
		C4-2B/ENZR	5,89 µM	
	Jolkinolídeo B	HCT-15	47,9 µM	
		RKO	35,8 µM	
		MDA MB 231	30,7 µM	
		C4-2B	4,95 µM	
	Methyl-8,11-3-dihidroxi-12-oxo-ent-abietadi-13,15(17)-ene-16-oato	C4-2B/ENZR	4,27 µM	
		HCT-15	25,6 µM	
		RKO	23,3 µM	
		MDA MB 231	23,8 µM	
	Dehidroabietanona	C4-2B	14,2 µM	
		C4-2B/ENZR	29,9 µM	
	Abieta-8,11,13-trieno	C4-2B	20,1 µM	
		C4-2B/ENZR	37,1 µM	
	Ácido 15-hidroxidehidroabietico	C4-2B	33,1 µM	
	(4αS,10αS)-1,2,3,4,4α,10α-hexahidro-1,1,4α-trimethyl-7-(1-methyl) fenantreno	C4-2B	36,2 µM	
	2-fenantreniletanona	C4-2B	26,2 µM	
		C4-2B/ENZR	34,0 µM	
	Ácido (4βS,8αS)- 2-fenantrenocarboxílico	CA-2B	23,1 µM	
	Isopimara-7,15-dien-3-ona	C4-2B	21,9 µM	
		C4-2B/ENZR	24,2 µM	
	ent-(13S)-13-hidroxiatis-16-ene-3,14-diona	C4-2B	30,5 µM	
	Araucarol	C4-2B	19,2 µM	
		C4-2B/ENZR	34,3 µM	

Quadro 4 - Substâncias isoladas de *Euphorbias* e seus potenciais citotóxicos.

(Continuação)

Espécie	Substância	Linhagem	CI ₅₀	Referência
<i>E. fischeriana</i>	Araucarona	C4-2B	16,0 µM	YAN <i>et al.</i> , 2019
		C4-2B/ENZR	24,1 µM	
		HCT-15	47,1 µM	
	Ent-3β,(13S)-dihidroxiatis-16-en-14-ona	C4-2B	13,2 µM	
		C4-2B/ENZR	25,3 µM	
		RKO	45,2 µM	
	Ent- (13R,14R)-13,14-dihidroxiatis-16-en-3-ona	C4-2B	18,8 µM	
		C4-2B/ENZR	15,2 µM	
		HCT-15	39,2 µM	
Ent-atis-16-ene-3,14-diona	C4-2B	26,7 µM		
3-oxoatisane-16α,17-diol	C4-2B	23,7 µM		
	C4-2B/ENZR	29,1 µM		
<i>E. glomerulans</i> (Prokh.) Prokh.	Eufoglomerufano H	MCF-7	51,1 µM	HASAN <i>et al.</i> , 2019
		MCF-7/ADR	39,3 µM	
	Eufoglomerufano L	MCF-7	50,2 µM	
<i>E. helioscopia</i> L.	Eufoscopoídeo B	NCI-H1975	34,12 µM	HUA <i>et al.</i> , 2017
		HepG2	31,38 µM	
		MCF-7	30,23 µM	
	Eufelionolídeo F	MCF-7	9,5 µM	WANG, Wan-Ping <i>et al.</i> , 2018
		PANC-1	10,7 µM	
	Eufelionolídeo L	MCF-7	9,8 µM	
		PANC-1	10,3 µM	
	Heliosterpenoide A	MCF-7/ADR	1,28 µM	MAI <i>et al.</i> , 2018
MDA-MB-231		24,7 µM		
	Heliosterpenoide B	MCF-7/ADR	1,02 µM	
<i>E. humifusa</i> Willd.	Paratocarpina E	MCF-7	19,6 µM	GAO, Suyu <i>et al.</i> , 2016
		U-937	28,6 µM	
		HL-60	20,4 µM	
		786-O	26,3 µM	
		769-P	22,7 µM	
<i>E. hypericifolia</i> L.	Eufipenoide A	HCT 116	12,8 µM	HU <i>et al.</i> , 2021
	20(S),24(R)-20,24-epoxi-24-metildammaran-3β-ol	HCT 116	26,8 µM	
	3β-hidroxicicloart-24-ona	HCT 116	7,4 µM	
	Isomotiol	HCT 116	10,6 µM	
<i>E. kansuensis</i> Prohk.	Euforcanlídeo A	HepG2	12,6 µM	YAN <i>et al.</i> , 2019a
		HepG2/DOX	11,2 µM	
		HCT-15	5,05 µM	
		HCT-15/5-FU	4,72 µM	
		A549	12,2 µM	
		A549/CDDP	11,5 µM	
		A375	2,28 µM	
		RKO	3,83 µM	
	MDA MB 231	5,23 µM		
<i>E. kansui</i> S.L.Liou ex S.B.Ho	Kansenona	IEC-6	19,76 µM	CHENG <i>et al.</i> , 2015
	3-O-(2'E,4'Z-decadienoil)-20-O-acetilingenol	IEC-6	5,74 µg/mL	GAO <i>et al.</i> , 2015
	5-O-benzoil-20-desoxiingenol	MDA-MB-435	109,7 nM	HOU <i>et al.</i> , 2017
	3-O-benzoil-20-desoxiingenol	MDA-MB-435	57,6 nM	
		Colo 205	157,3 nM	

Quadro 5 - Substâncias isoladas de *Euphorbias* e seus potenciais citotóxicos.

(Continuação)

Espécie	Substância	Linhagem	CI ₅₀	Referência
<i>E. kansui</i>	Kansuiphorina D	MDA-MB-435	432,2 nM	HOU <i>et al.</i> , 2017
	3-O-(2'E, 4'Z-decadienoil)-20-desoxiingenol	MDA-MB-435	54,8 nM	
	5-O-(2'E, 4'Z- decadienoil)-20-O-acetilingenol	MDA-MB-435	5,6 nM	
		Colo 205	124,1 nM	
	5-O-(2'E, 4'E- decadienoil)-20-O-acetilingenol	MDA-MB-435	1,5 nM	
		Colo 205	48,1 nM	
	3-O-(2'E, 4'Z-decadienoil)-20-O-acetilingenol	MDA-MB-435	0,9 nM	
		Colo 205	31,3 nM	
	3-O-(2'E, 4'E-decadienoil)-20-O-acetilingenol	MDA-MB-435	0,7 nM	
		Colo 205	39,6 nM	
	3-O-(2, 3-dimetilbutanoil)-13-O-dodecanoil-20-desoxiingenol	MDA-MB-435	8,1 nM	FEI <i>et al.</i> , 2016
		Colo 205	116,6 nM	
	3-O-(2, 3-dimetilbutanoil)-20-O-acetilingenol	MDA-MB-435	2,7 nM	
		Colo 205	23,4 nM	
	3-O-(2, 3-dimetilbutanoil)-13-O-dodecanoilingenol	Colo 205	0,6 nM	
	Kansuiphorina A	MDA-MB-435	136,2 nM	
	Kansuinina F	MDA-MB-435	4,4 nM	
		Colo 205	81,4 nM	
	Kansuinina E	MDA-MB-435	140,2 nM	
		Colo 205	848,5 nM	
	Kansenona	MDA-MB-435	302,3 nM	MENG <i>et al.</i> , 2020
		Colo 205	1436,1 nM	
	Euforicanina A	HeLa	28,85 µM	
		NCI-446	20,89 µM	
	Kansuingenol A	MCF-7	20,86 µM	
		HepG2	14,20 µM	
		DU145	6,19 µM	
	Kansuingenol B	MCF-7	15,82 µM	
		HepG2	29,16 µM	
		DU145	9,27 µM	
	Kansuingenol C	MCF-7	10,26 µM	
		HepG2	23,09 µM	
		DU145	26,05 µM	
	3-O-(2'E,4'E-decadienoil)-20-O-acetilingenol	HepG2	24,07 µM	RIAHI <i>et al.</i> , 2020
		DU145	8,20 µM	
		MCF-7	38,1 µM	
<i>E. kopetdaghi</i> (Prokh.) Prokh.	Kopetdaghinane	OVCAR-3	51,23 µM	WANG, Jia-Xi <i>et al.</i> , 2018
<i>E. lathyris</i> L.	15β-hidroxi-5α-acetoxi-3α-benzoiloxi-7β-nicotinoiloxilatiol.	MCF-7	9,43 µM	WANG, Jia-Xi <i>et al.</i> , 2018
		HepG2	13,22 µM	

Quadro 6 - Substâncias isoladas de *Euphorbias* e seus potenciais citotóxicos.

(Continuação)

Espécie	Substância	Linhagem	CI ₅₀	Referência
<i>E. lathyris</i>	Fator Euphorbia L24	HCT 116	6,44 µM	WANG, Qian <i>et al.</i> , 2018
		MCF-7	8,43 µM	
		786-0	15,30 µM	
		HepG2	9,32 µM	
	Fator Euphorbia L2	KB	33,2 µM	TENG <i>et al.</i> , 2018
		KB-VIN	7,2 µM	
	Fator Euphorbia L3	A549	14,6 µM	
		MDA-MB 231	31,6 µM	
		KB	7,9 µM	
		KB-VIN	8,0 µM	
	Fator Euphorbia L4	MCF-7	23,9 µM	
		A549	11,8 µM	
		MDA-MB 231	24,4 µM	
		KB	17,7 µM	
	Fator Euphorbia L4	KB-VIN	16,9 µM	
		KB-VIN	16,9 µM	
		MCF-7	23,8 µM	
		A549	6,7 µM	
	Fator Euphorbia L5	MDA-MB 231	21,9 µM	
		KB	6,1 µM	
		KB-VIN	5,7 µM	
		MCF-7	8,4 µM	
<i>E. lunulata</i> Bunge	15-O-acetil-3-O-benzoiljolkinol- 5b,6b-óxido	C6	23,4 µM	LU <i>et al.</i> , 2014
		MCF-7	12,4 µM	
	5,15-di-O-acetil-3-O-salicillatirol	C6	15,3 µM	
	15,17-di-O-acetil-3-O-fenilacetil- 17-hidroxijolkinol	MCF-7	13,1 µM	
	15-O acetil-3-O-fenilacetil-17- hidroxijolkinol	C6	47,3 µM	
		MCF-7	33,3 µM	
	Desoxi Fator Euphorbia L1	C6	36,2 µM	
		MCF-7	15,1 µM	
	Ent-3α-formilabieta- (14),13(15)- dien-16,12β-olídeo	NCI-H460	19,5 µM	LIU <i>et al.</i> , 2014
		MFC-7	18,6 µM	
	14α,15β-diacetoxi-3α,7β- dibenzoiloxi-9-oxo-2βH,13- α jatropa-5E,11E-dieno	NCI-H460	58,2 µM	
		MFC-7	57,1 µM	
	Eufornina	NCI-H460	53,1 µM	
		MFC-7	51,3 µM	
	Eufoscopina B	NCI-H460	33,0 µM	QU <i>et al.</i> , 2018
		MFC-7	32,1 µM	
	Eufornina N	NCI-H460	36,7 µM	
		MFC-7	34,5 µM	
		HepG2	7,72 µM	
	Ent-3α-formilabieta- (14),13(15)- dien-16,12β-olídeo	NCI-H460	27,31 µM	
		MCF-7	19,74 µM	
		HCT-116	46,72 µM	
<i>E. macrorrhiza</i> C.A.Mey. ex Ledeb.		K-562	83,36 µM	
	Macrorilatirona B	KB	25,62 µM	GAO, Jie <i>et al.</i> , 2016
		KBv200	30,83 µM	
	Macrorieuforona A	KB	30,46 µM	
		KBv200	29,20 µM	
	Macrorieuforona B	KB	26,58 µM	
		KBv200	29,04 µM	
	Macroricasbalona A	KB	21,19 µM	
		KBv200	30,56 µM	

Quadro 7 - Substâncias isoladas de *Euphorbias* e seus potenciais citotóxicos.

(Continuação)

Espécie	Substância	Linhagem	Cl ₅₀	Referência
<i>E. macrorrhiza</i>	Sikkimenoide A	KB	22,36 µM	GAO, Jie <i>et al.</i> , 2016
		KBv200	21,58 µM	
	Sikkimenoide B	KB	28,07 µM	
		KBv200	24,39 µM	
	Sikkimenoide C	KB	27,38 µM	
		KBv200	27,24 µM	
	Jatrofodiona A	KB	22,46 µM	
		KBv200	47,87 µM	
<i>E. neriifolia</i> L.	Jolkinol B	KB	19,84 µM	CHOODEJ; PUDHOM, 2020
		KBv200	18,20 µM	
	15b-O-benzoil-5a-hidroxiisolatirol	KB	27,25 µM	
		KBv200	43,51 µM	
	Neriifolin A	MCF-7	13,14 µM	
	Neriifolin B	MCF-7	7,12 µM	
	Neriifolin C	MCF-7	9,50 µM	
	Ent-atisane-3α,16α,17-triol (4R,5S,8S,9R,10S,13R,16S)- ent-16α,17-dihidroxi-19-tigloiloxikauran-3-ona	HepG2	13,70 µM	
		HepG2/Adr	15,57 µM	
<i>E. pekinensis</i> Rupr.	Pekinenal	MGC-803	6,1 µM	TAO et al., 2013
		SW620	5,7 µM	
		SMMC-7721	8,3 µM	
		Ketr-3	10,7 µM	
		MCF-7	7,9 µM	
		HL-60	3,1 µM	
		A549	2,2 µM	
	Pekinenina A	MGC-803	23,0 µM	
		SW620	22,3 µM	
		SMMC-7721	19,4 µM	
		Ketr-3	25,4 µM	
		MCF-7	19,7 µM	
		HL-60	14,4 µM	
		A549	16,3 µM	
	Pekinenina C	MGC-803	7,2 µM	
		SW620	10,1 µM	
		SMMC-7721	9,8 µM	
		Ketr-3	7,5 µM	
		MCF-7	5,3 µM	
		HL-60	2,9 µM	
		A549	3,6 µM	
	Pekinenina D	MGC-803	19,4 µM	
		SW620	22,2 µM	
		SMMC-7721	24,0 µM	
		Ketr-3	21,9 µM	
		MCF-7	27,3 µM	
		HL-60	14,1 µM	
		A549	12,1 µM	
	Pekinenina E	MGC-803	21,3 µM	
		SW620	16,8 µM	
		SMMC-7721	23,2 µM	
		Ketr-3	19,7 µM	
		MCF-7	25 µM	
		HL-60	18,9 µM	
		A549	17,3 µM	

Quadro 8 - Substâncias isoladas de *Euphorbias* e seus potenciais citotóxicos.

(Continuação)

Espécie	Substância	Linhagem	Cl ₅₀	Referência
<i>E. pekinensis</i>	Pekinenina F	MGC-803	10,6 µM	TAO et al., 2013
		SW620	11,3 µM	
		SMMC-7721	13,1 µM	
		Ketr-3	16,0 µM	
		MCF-7	12,2 µM	
		HL-60	7,5 µM	
		A549	9,0 µM	
	Yuexiandajisu B	MGC-803	11,4 µM	TAO et al., 2013
		SW620	9,6 µM	
		SMMC-7721	14,0 µM	
		Ketr-3	10,0 µM	
		MCF-7	9,4 µM	
		HL-60	7,9 µM	
		A549	10,1 µM	
	(-)-(1S)-15-hidroxi-18-carboxicembrena	HeLa	35,3 µM	HOU et al., 2013
		PC-3	53,9 µM	
		HT 1080	37,3 µM	
		A375-S2	28,7 µM	
		MDA231	43,5 µM	
<i>E. piscatoria</i> Ainton	Piscatoriol A	L5178Y	69,80 µM	REIS et al., 2014
	Piscatoriol B	L5178Y	81,50 µM	
	Piscatolídeo	L5178Y	59,80 µM	
<i>E. poissonii</i> Pax	12-desoxiforbol 20-acetato 13-angelato	A-549	18,89 µg/mL	FATOPE et al., 1996
		MCF-7	41,76 µg/mL	
		HT-29	30,77 µg/mL	
		A-498	2,18x10 ⁻⁴ µg/mL	
		PC-3	27,71 µg/mL	
		PACA-2	30,34 µg/mL	
	12-desoxiforbol 20-acetato 13-fenilacetato	A-549	26,06 µg/mL	
		MCF-7	41,26 µg/mL	
		HT-29	29,47 µg/mL	
	12-desoxiforbol 20-acetato 13-fenilacetato	A-498	1,59x10 ⁻⁷ µg/mL	
		PC-3	35,10 µg/mL	
		PACA-2	26,90 µg/mL	
	12-desoxiforbol 13-(9,10-metileno) undecanoato	A-549	2,85x10 ⁻¹ µg/mL	
		MCF-7	2,30 µg/mL	
		HT-29	3,83x10 ⁻¹ µg/mL	
		A-498	<10 ⁻⁷ µg/mL	
		PC-3	2,44x10 ⁻¹ µg/mL	
		PACA-2	1,92 µg/mL	
	20-hidroxi-12-desoxiforbol angelato	A-549	11,60 µg/mL	
		MCF-7	69,88 µg/mL	
		HT-29	26,50 µg/mL	
		A-498	45,96 µg/mL	
	Resiniferol 20-(4-hidroxi-3-metoxifenilacetato) 9,13,14-ortofenilacetato	A-549	1,12 µg/mL	
		MCF-7	4,29 µg/mL	
		HT-29	3,00 µg/mL	
		A-549	1,12 µg/mL	
		PC-3	2,90 µg/mL	

Quadro 9 - Substâncias isoladas de *Euphorbias* e seus potenciais citotóxicos.

(Continuação)

Espécie	Substância	Linhagem	CI ₅₀	Referência
<i>E. resinifera</i> O.Berg	Euforol A	U937	74,70 µM	WANG <i>et al.</i> , 2016
		MCF-7	79,07 µM	
		C6	76,12 µM	
	Euforol B	U937	90,28 µM	
		C6	57,86 µM	
	Euforol C	C6	60,24 µM	
	11-oxo-kansenonol	U937	65,85 µM	
		MCF-7	90,61 µM	
		C6	55,50 µM	
	Kansenona	U937	63,40 µM	
		MCF-7	62,47 µM	
		C6	62,32 µM	
	(20R,23E)-eufa-8,23-diene-3β,25-diol	U937	82,85 µM	
		MCF-7	70,56 µM	
		C6	67,21 µM	
	(24R)-eufa-8,25-diene-3β,24-diol	U937	56,18 µM	
		MCF-7	34,55 µM	
		C6	49,63 µM	
	Kansenol	U937	52,17 µM	WANG <i>et al.</i> , 2019
		MCF-7	49,30 µM	
	3β,25-dihidroxi-tirucalla-7,23-dieno	MCF-7	49,81 µM	
	Euforol K	MCF-7	66,96 µM	
	Euforol J	MCF-7	37,36 µM	
		U937	47,17 µM	
<i>E. sogdiana</i> Popov	Obtusifoliol	U937	46,89 µM	AGHAEI <i>et al.</i> , 2016
		C6	46,99 µM	
	Kansuinona	MCF-7	90,21 µM	
		C6	90,21 µM	
	3b,7a-dihidroxi-4a,14a-dimetil-5a-ergosta-8,24(28)-diene-11-ona	MCF-7	29,33 µM	
		MDA-MB231	41,81 µM	
<i>E. sororia</i> Schrenk	3b-hydrox-4a,14a-dimetil-5a-ergosta-8,24(28)-diene-1-ona	MCF-7	7,33 µM	HU <i>et al.</i> , 2018
		MDA-MB231	3,20 µM	
	Cicloartane-3b,24,25-triol	MCF-7	9,67 µM	
		MDA-MB231	5,23 µM	
	(2S*, 3S*, 4R*, 5S*, 13S*, 15R*)-15-acetoxi-5-benzoiloxi-3-hidroxi-jatrofa-6 (17), 11E-diene-9, 14-diona	MCF-7	20,71 µM	
		MDA-MB231	42,31 µM	
<i>E. stracheyi</i> Boiss.	(2S*, 3S*, 4R*, 5R*, 9S*, 11S*, 15R*)-3,5,15-triacetoxi-14-oxolatir6(17),12E-dieno	MCF-7	70,92 µM	YE <i>et al.</i> , 2020
		MCF-7/ADR	90,91 µM	
	5a, 14a-dibenzoiloxi-15b-hidroxi-7b-isobutanoiloxi-2a, 3b, 8a, 9a-tetraacetoxijatrofa-6(17), 11E-dieno	MCF-7	53,87 µM	
	Eufosorofana D	MCF-7	64,81 µM	
	Isoterracinolídeo A	MCF-7	83,20 µM	
		MCF-7/ADR	92,95 µM	
<i>E. stracheyi</i> Boiss.	Eufstrachenol A	MV4-11	12,29 µM	YE <i>et al.</i> , 2020
	Eufstrachenol B	HGC-27	49,90 µM	
	(2R*,3S*,4R*,5R*,9S*,11S*,15R*)-3,5,15-triacetoxi-14-oxolatir6(17),12E-dieno	MV4-11	14,80 µM	
		MV4-11	30,02 µM	
		BaF3	19,20 µM	

Quadro 10 - Substâncias isoladas de *Euphorbias* e seus potenciais citotóxicos.

(Continuação)

Espécie	Substância	Linhagem	CI ₅₀	Referência
<i>E. stracheyi</i>	Jolkinol B	HGC-27	39,00 µM	YE <i>et al.</i> , 2020
		MV4-11	9,82 µM	
		BaF3	11,20 µM	
	Jolkinoato I	MV4-11	12,24 µM	
		BaF3	13,40 µM	
	Ingenane	HGC-27	48,81 µM	
		MV4-11	7,92 µM	
	20-O-acetyl-[3-O-(2'E,4'Z)-decadienoil]-ingenol	HGC-27	41,80 µM	
		MV4-11	3,48 µM	
<i>E. tirucalli</i> L.	3-O-(2'E,4'Z)-decadienoilingenol	HGC-27	48,51 µM	
		MV4-11	10,80 µM	
	Tirucadalenona	K-562	84,6 µM	DUONG <i>et al.</i> , 2019
		HepG2	342 µM	
	Eufol	T47D	0,13 mM	WANG, Lin <i>et al.</i> , 2013
		T47D	38,89 µM	SILVA <i>et al.</i> , 2018
		MDA-MB-23	9,08 µM	
		MDA-MB-468	30,89 µM	
		BT20	8,96 µM	
		HS587T	18,15 µM	
		MCF-7	18,76 µM	
		MCF7/AZ	33,42 µM	
		JHU-O22	26,35 µM	
		HN13	8,89 µM	
		SCC25	6,65 µM	
		SCC4	19,82 µM	
		SCC14	15,81 µM	
		FADU	20,17 µM	
		SW480	5,79 µM	
		SW620	10,02 µM	
		CO115	9,58 µM	
		HCT115	5,47 µM	
		HT29	6,52 µM	
		SK-CO-10	17,53 µM	
		DLD1	2,56 µM	
		LOVO	11,49 µM	
		DIFI	11,38 µM	
		Caco2	35,19 µM	
		U87-MG	26,41 µM	
		U373	30,48 µM	
		U251	29,01 µM	
		GAMG	8,73 µM	
		SW1088	27,12 µM	
		SW1783	19,62 µM	
		RES186	16,70 µM	
		RES259	10,34 µM	
		KNS42	19,94 µM	
		UW479	15,26 µM	
		SF188	5,98 µM	
		PC-3	11,95 µM	
		LNCaP	1,41 µM	
		T24	30,72 µM	
		5637	4,83 µM	
		HT1376	25,25 µM	

Quadro 11 - Substâncias isoladas de *Euphorbias* e seus potenciais citotóxicos.

(Conclusão)

Espécie	Substância	Linhagem	Cl ₅₀	Referência
<i>E. tirucalli</i>	Eufol	MCR	7,40 µM	SILVA <i>et al.</i> , 2018
		DAOY	5,72 µM	
		ONS76	21,72 µM	
		JEG3	16,65 µM	
		A431	17,79 µM	
		H292	13,25 µM	
		SKMES1	25,62 µM	
		A549	11,01 µM	
		SK-LU-1	22,83 µM	
		SIHA	24,74 µM	
		CASKI	24,74 µM	
		C33A	21,32 µM	
		HeLa	17,55 µM	
		KYSE30	3,52 µM	
		KYSE70	8,77 µM	
		KYSE270	10,71 µM	
		KYSE410	4,35 µM	
		Mia PaCa-2	8,46 µM	
		PANC-1	21,47 µM	
		PSN-1	3,71 µM	
		BXPC-3	5,47 µM	
		Capan-1	16,33 µM	
		COLO858	14,02 µM	
		COLO679	8,93 µM	
		A375	9,67 µM	
		WM1617	16,32 µM	
		WM9	9,67 µM	
		WM852	7,61 µM	
		WM278	27,46 µM	
		WM35	12,40 µM	
		WN793	5,96 µM	
		SKMEL-37	10,07 µM	
		PA-1	7,97 µM	
		SW626	30,40 µM	
<i>E. tuckeyana</i> Steud. ex Webb	Helioscopinolídeo E	EPG85-257P	45 µM µM	DUARTE; LAGE; FERREIRA, 2008
		EPP85-181P	77 µM	
		HT-29	108 µM	
	Helioscopinolídeo B	EPG85-257P	38 µM	
		EPP85-181P	78 µM	
		HT-29	102 µM	
	Naringenina	EPG85-257P	95 µM	
		EPP85-181P	65 µM	
<i>E. umbellata</i> (Pax) Bruyns	Eufol	HRT-18	39,2 µM	DE OLIVEIRA et al., 2021
		Jurkat	84,33 µM	CRUZ et al., 2018
		HL-60	49,36 µM	
		HRT-18	69,80 µM	
<i>E. welwitschii</i> Boiss. & Reut.	Welwitschena	EPG85-257RDB	17,1 µM	REIS et al., 2015
		EPG85-257RDB	3,6 µM	
	Epoxi welwitschena	EPP85-181RN	21,3 µM	
		EPP85-181RDB	18,2 µM	

Fonte: A autora.

Encontram-se também na literatura relatos de estudos *in vivo* corroborando o potencial citotóxico observado em estudos *in vitro*. A exemplo, tem-se que extrato hidroalcólico de cascas de *E. tirucalli* reduziu a progressão tumoral em modelo de tumor ascítico de Ehrlich (SANTOS *et al.*, 2016). Já a ingestão de solução aquosa de látex de *E. tirucalli*, promoveu redução do volume tumoral em ratos Walker 256 portadores carcinossarcoma (MARTINS *et al.*, 2020) e intensidade da metástase pulmonar em modelo de melanoma (BRUNETTI *et al.*, 2019). De forma semelhante, extrato de acetato de etila de *E. hemifusa* foi capaz de reduzir a metástase de câncer de mama para o pulmão (SHIN *et al.*, 2016). Já o tratamento com EFLDO, uma substância isolada de extrato de *E. lunulata* reduziu o tamanho de tumor hepático (HepG2) de forma dose dependente (QU *et al.*, 2018).

3.4 POTENCIAL CITOTÓXICO DA ESPÉCIE *Euphorbia umbellata*

A espécie *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (sinonímias: *Synadenium grantii* e *Synadenium umbellatum*) é conhecida popularmente pelos nomes de janaúba, leitosinha, *African milk bush* (Figura 2) (ROJAS-SANDOVAL, 2017). Tradicionalmente é utilizada na forma de uma garrafada, a qual o preparo consiste em adicionar 18 gotas do látex, extraído do caule, em 1 litro de água, sendo administrado um cálice 3 vezes ao dia. Indicado para tratamento de alergias, câncer, cólicas menstruais, doença de Chagas, diabetes, dores no corpo, gripe, hemorragia, impinge, impotência sexual, lepra, leucemia, obesidade, tumores e úlcera nervosa (ORTÊNCIO *apud* LUZ *et al.*, 2016).

Figura 2 – Espécime de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns e folhas (em destaque).



Fonte: A autora.

Estudos fitoquímicos revelaram ampla variedade de metabólitos. Do látex já foram identificadas proteínas (BADGUJAR, 2014; MENON *et al.*, 2002) e glicoproteínas (RAJESH *et al.*, 2006); ésteres diterpênicos (HASSAN; MOHAMMED; MOHAMED, 2012; KINGHORN; CHIN; SWANSON, 2009), triterpenos (CRUZ *et al.*, 2018; HASSAN; MOHAMMED; MOHAMED, 2012; LUZ *et al.*, 2016; MUNHOZ *et al.*, 2014), compostos fenólicos, ácidos orgânicos e graxos (COSTA *et al.*, 2012; UZABAKILIHO; LARGEAU; CASADEVALL, 1987), ressaltando a presença de ésteres de forbois, relatados na literatura como responsáveis pela atividade anticâncer e marcadores taxonômicos da família Euphorbiaceae (COSTA *et al.*, 2012; VASAS; HOHMANN, 2014).

No que diz respeito aos estudos citotóxicos, a atividade antitumoral e antiangiogênica do extrato etanol das partes aéreas foi relatada. Houve redução significativa na produção de fator de crescimento vascular endotelial, além de atividade pro-apoptótica na linhagem K-562, a qual ocorre via aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, ao promover a despolarização mitocondrial, externalização de fosfatidilserina e ativação da caspase 9 (MOTA; BENFICA; VALADARES, 2012).

Resultado semelhante foi observado para o extrato etanol de folhas de *S. umbellatum* (*E. umbellata*) para o qual foram investigados os mecanismos de indução da morte celular em modelos de tumor de Ehrlich. Demonstrando que ocorre apoptose

uma vez eu foi observado aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, aumento da concentração de cálcio, alteração da função mitocondrial, externalização de fosfatidilserina resultando na ativação das caspases e morte celular (MOTA et al., 2012).

Outro estudo avaliou o potencial citotóxico de extratos das folhas, o extrato metanol e as frações acetato de etila e metanol foram avaliadas frente às linhagens U251, MCF-7, 786-0 e NCI-H460; a fração acetato de etila foi a mais potente para todas as linhagens, com valores de CI_{50} de 25; 23,7; 10,6 e 1,1 $\mu\text{g/mL}$. A atividade antiproliferativa de extratos das cascas do caule também foi determinada, a exemplo das folhas e a fração acetato de etila foi a mais ativa, apresentando valores de CI_{50} de 2,9; 2,9; 1,4 e 0,37 $\mu\text{g/mL}$, para as mesmas linhagens celulares (CAMPOS et al., 2016).

Frente à linhagem Jurkat, foram analisadas as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol de cascas de *E. umbellata*. Entre essas, a fração clorofórmio foi a mais potente, com valor de CI_{50} de 7,59 $\mu\text{g/mL}$ após 72 h de tratamento. Além disso, a ação citotóxica está associada à indução da apoptose e parada de ciclo celular em fase G0/G1 (KANUNFRE et al., 2017).

O látex devido ao uso tradicional é a matriz mais estudada em relação ao potencial citotóxico. Tanto que o látex e a sua forma de uso popular (diluição em água) foram avaliados em linhagem B16F10, promovendo redução da viabilidade celular *in vitro* e *in vivo*, uma vez que houve redução significativa do volume do tumor de melanoma em camundongos (OLIVEIRA et al., 2013). O látex também se mostrou citotóxico para as linhagens HRT-18 e HeLa, com valores de CI_{50} de 263,42 e 252,58 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (LUZ et al., 2015).

Luz et al. (2016) determinaram a atividade citotóxica de frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) do látex de *E. umbellata* em modelos tumorais, linhagens HeLa, HRT-18 e Jurkat. A fração hexano foi a mais citotóxica, obtendo o menor CI_{50} (1,87 $\mu\text{g/mL}$) para as células Jurkat, portanto apresentando-se como efetiva e promissora fração com atividade antitumoral em células leucêmicas. De fato, quando analisada a seletividade da fração, o índice foi superior a 2 ($SI = 4,10$), indicando menor toxicidade às células normais do que às cancerosas. Esse estudo demonstrou, ainda, que a citotoxicidade está relacionada à parada do ciclo celular e a indução de morte celular por apoptose. Este estudo estabelece a maior potência da fração apolar quando comparada as demais frações.

Considerando o potencial citotóxico da fração hexano, esta foi refractionada e seus efeitos avaliados em várias linhagens celulares. A exemplo, tem-se que a fração hexano e a subfração diclorometano foram avaliadas na linhagem de melanoma B16F10 e obteve como resultado valores de CI_{50} de 18,02 e 2,82 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Ao determinar a seletividade observa-se valores de 1,1 e 3,4. Tal estudo sugere que o refractionamento potencializa o efeito citotóxico e aumenta a seletividade (ANDRADE *et al.*, 2021).

Outros estudos foram realizados com frações e subfrações de látex. As frações clorofórmio e acetato de etila demonstram citotoxicidade em linhagens B16F10, com resultados de CI_{50} de 13,7 e 2,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (ALVES *et al.*, 2020b). Em linhagens modelo de câncer de mama (4T1 e MDA MB 231) as frações clorofórmio e acetato de etila também foram citotóxicas com valores de CI_{50} de 3,0 e 2,2 $\mu\text{g/mL}$, para linhagem 4T1 e 6,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$, para linhagem MDA MB 231 (CABRAL *et al.*, 2020a, 2020b). Já as subfrações variaram de 2,0 a 25 $\mu\text{g/mL}$, frente à linhagem 4T1 (CABRAL *et al.*, 2020a).

Quando avaliadas em linhagens cancerosas Hepa1c1c7, B16F10 e MDA MB-231, as frações e subfrações apresentaram valores de CI_{50} entre 2,0 e 38,3 $\mu\text{g/mL}$ (ALVES *et al.*, 2020a; CABRAL *et al.*, 2019). Tais estudos ainda demonstraram que os tratamentos reduziram o potencial elétrico mitocondrial, observado pela redução da fluorescência (ALVES *et al.*, 2020b, 2020a; CABRAL *et al.*, 2020a, 2020b); alteram o ciclo celular com aumento da população de células 4T1 em fase G2/M (CABRAL *et al.*, 2020b) e aumento da população de células B16F10 em fase S (ALVES *et al.*, 2020b).

Eufol, substância majoritária presente no látex de *E. umbellata* é um triterpeno tetracíclico, o qual já foi avaliado frente a um painel de células tumorais, com valores de CI_{50} variando de 1,41 μM (LNCaP - próstata) a 38,89 μM (T47D - câncer de mama) (SILVA *et al.*, 2018). Em células Jurkat, 117,17 μM reduziu em 56% a viabilidade celular quando comparado ao controle negativo (LUZ *et al.*, 2016).

Enquanto que 140,60 μM de eufol gerou aproximadamente 60% de morte celular em linhagem CNS (células gástricas não tumorais) e 100% nas linhagens CS12 (células gástricas não tumorais), AGS (adenocarcinoma gástrico) e MKN 45 (adenocarcinoma gástrico) (LIN *et al.*, 2012). Em linhagem HRT-18, o eufol mostrou-se citotóxico com valor de CI_{50} de 70,1 μM . O tratamento com 234,4, 117,2 e 58,6 μM de eufol resultou em alterações morfológicas como arredondamento, condensação de

cromatina e formação de *blebs*, indicando a ocorrência de um processo apoptótico (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLVENTES

Éter de petróleo, hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol, vanilina, bicarbonato de sódio, dimetilsulfóxido (DMSO), glutamina e ácido sulfúrico foram adquiridos da Vetec. Alaranjado de acridina, azul de tripan, brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT), brometo de etídio, camptotecina, hidrocloreto de doxorrubicina, Histopaque 1077, iodeto de propídeo, mesilato de imatinibe, piruvato de sódio, RNase, solução de antibiótico (estreptomicina-penicilina) e triton X-100 foram adquiridos da Sigma Aldrich. Os meios de cultura RPMI 1640 e DMEM/F-12, soro fetal bovino (SFB), tripsina e tampão fosfato pH 7,4 (PBS - *phosphate buffer saline*) da Gibco. Da empresa Thermo Fischer Scientific foi utilizado o reagente CellEvent™ Caspase-3/7, e por fim, água ultra pura foi produzida pelo Laboratório de Recursos Hídricos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Diversos equipamentos pertencentes à UEPG e ao *National Center for Natural Products Research* (NCNPR) foram utilizados para a realização dos experimentos, entre eles: balança analítica (Shimadzu e Acuris Instrument), banho térmico (Logen e Fischer Scientific), câmera fotográfica (Olympus DP71), citômetro de fluxo (BD Bioscience), contador automático de células (BioRad), *Cytation 5 Image Reader* (BioTech), pHmetro (Sartorius e Gehaka), cabine de fluxo laminar (Veco e Esco), incubadora de CO₂ (Sanyo e Thermo Scientific), leitor de placas (Biotec e Molecular Devices), microscópio de fluorescência (Olympus BX41), microscópio óptico (Olympus CX31 e Nikon), agitador de tubos tipo vortex (Marconi e Fisher Scientific) e manta aquecedora (Fisatom), assim como os acessórios filtro 0,45 µm (Coring), lâmina e lamínula (Bioslide), câmara de Neubauer (Knittel Gläser), micropipetas (Brand e Eppendorf), placa de cultura de 24 e 96 poços (Kasvi e Falcon), tubos de 2 mL, 15 mL e 50 mL (Kasvi e Thermo Scientific) e tubos a vácuo contendo anticoagulante (EDTA - *ethylenediamine tetraacetic acid*) (Labor Import), sílica 35-70 mesh (Merck).

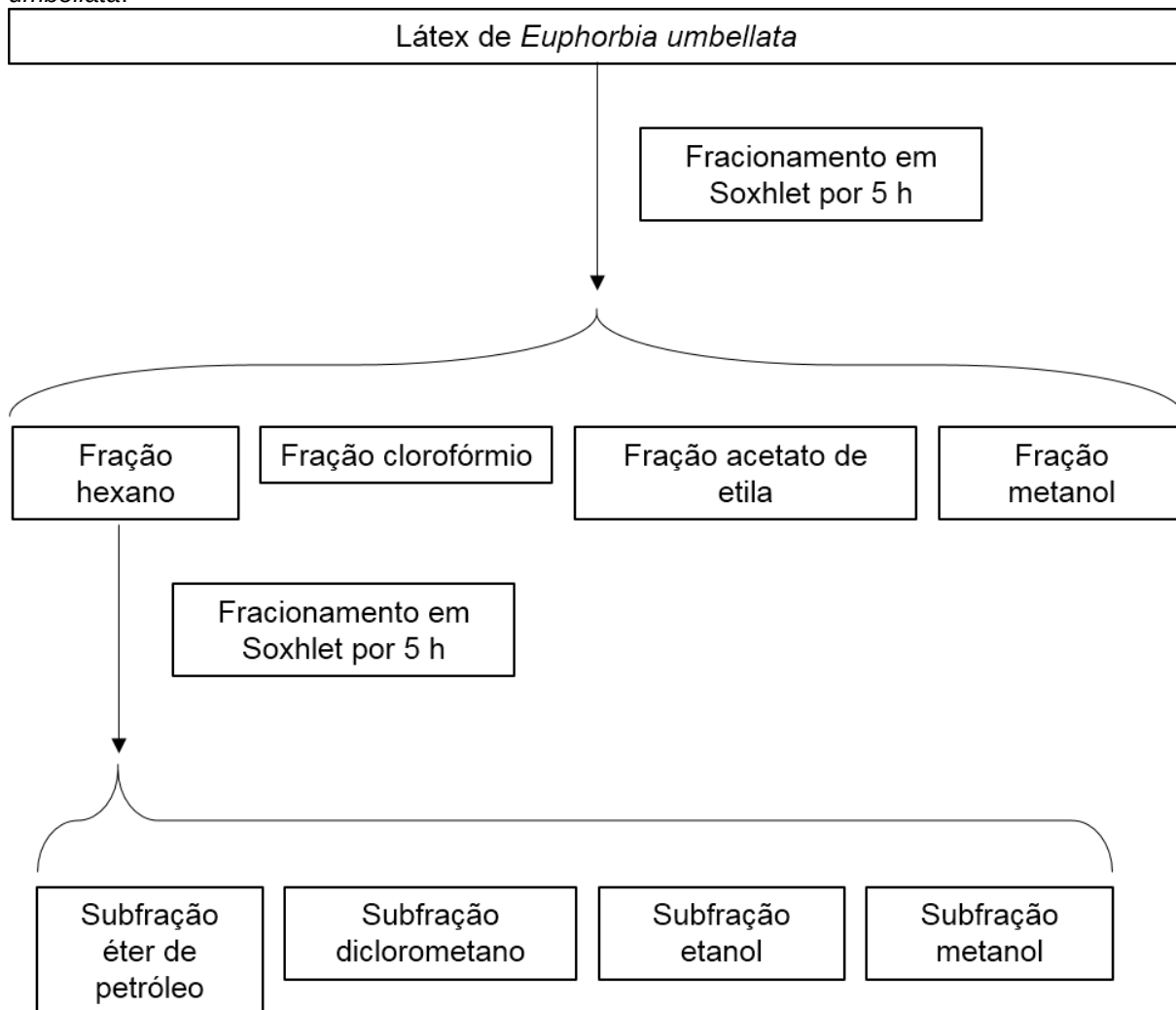
4.3 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES, SUBFRAÇÕES E EUFOL (SUBSTÂNCIA ISOLADA)

O látex de *E. umbellata* foi coletado, em outubro de 2015, na cidade de Ponta Grossa, Paraná (975 metros de altitude, 25°05'38'' S de latitude, 50° 09'30'' O de longitude), através de diversas incisões de cerca de cinco centímetros na casca do caule e galhos, sendo o látex secretado coletado em frascos limpos e opacos. O material coletado foi armazenado sob refrigeração até o momento do fracionamento. A identificação havia sido realizada em fevereiro de 2014, sendo que uma exsicata foi depositada e registrada no Herbário Maria Eneida P. Kauffmann Fidalgo, do Instituto de Botânica de São Paulo, sob número de registro SP453920.

O fracionamento (Figura 3) se deu em um extrator de Soxhlet. Para tanto, o látex (40,383 g) foi adsorvido em sílica e submetido à extração por 5 h com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol). Após a extração os solventes foram removidos em rotaevaporador, apresentando rendimentos de 24,91; 11,12; 2,92 e 0,08%, respectivamente. Todas as frações foram armazenadas sob refrigeração.

O refracionamento (Figura 3) foi realizado por processo semelhante, sendo que a fração hexano (7,427 g) foi adsorvida em sílica e extraída com os solventes éter de petróleo, diclorometano, etanol e metanol. As subfrações também foram concentradas em rotaevaporador apresentando rendimentos de 51,19; 15,23; 5,98 e 0,77%, respectivamente. Todas as frações foram armazenadas sob refrigeração.

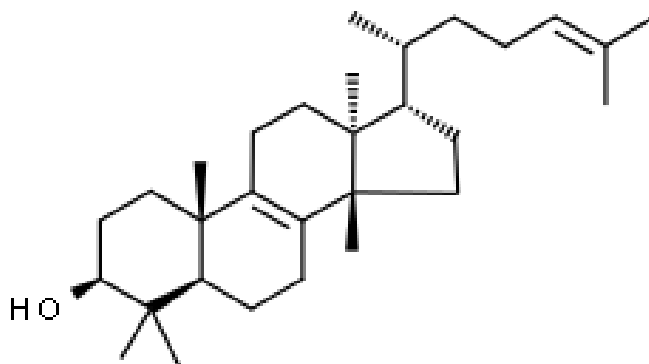
Figura 3 – Desenho experimental da obtenção de frações e subfrações do látex de *Euphorbia umbellata*.



Fonte: a autora.

Para obtenção do eufol, substância isolada do látex, foi realizado o processo de precipitação ácida, onde o látex *in natura* (19,521 g) foi adicionado em 100 mL de água acidificada (1% de ácido sulfúrico), em seguida adicionou-se 100 mL de éter de petróleo. O precipitado foi filtrado e armazenado sob refrigeração. Parte do precipitado (2,98 g) foi submetido a cromatografia em coluna, eluída de modo gradiente com hexano e acetato de etila. As frações obtidas foram avaliadas por cromatografia em camada delgada e reveladas com vanilina sulfúrica. Frações com perfis semelhantes foram agrupadas e analisadas por ressonância magnética nuclear. Os resultados foram comparados com a literatura comprovando o isolamento do triterpeno tetracíclico eufol (Figura 4).

Figura 4 – Estrutura química do eufol.



Fonte: ChemSpider, 2021.

4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO

4.4.1 Cultivo celular

Foram utilizadas células humanas de leucemia (K-562 - ATCC CCL-243 e HL-60 - ATCC CCL-240), câncer colorretal (HT-29 - ATCC HTB-38 e HCT 116 - ATCC CCL-247), câncer de mama (MCF-7 - ATCC CRL-3435 e MDA-MB 231 - ATCC HTB-26) e células embrionárias de rim humano (HEK-293 - ATCC CRL-1573). As linhagens leucêmicas, que proliferam em suspensão, foram cultivadas em meio RPMI® 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 20 mM de bicarbonato de sódio, 2 mM de glutamina e penicilina e estreptomicina (100 U/mL e 10 mg/mL, respectivamente). As demais linhagens dependentes de adesão foram cultivadas em meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 28,5 mM de bicarbonato de sódio e penicilina e estreptomicina (100 U/mL e 10 mg/mL, respectivamente). Todas as linhagens foram mantidas em expansão contínua e em estufa a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

4.4.2 Determinação da viabilidade celular

A citotoxicidade das frações e subfrações do látex de *E. umbellata* e do eufol foi avaliada por meio da determinação da viabilidade celular empregando o ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT) conforme descrito por Mosmann (1983) e descritas a seguir. Para tanto, todas as amostras (frações, subfrações e eufol) foram solubilizadas em DMSO em uma concentração de 25 mg/mL, ou 58,58 mM, no caso do eufol. O desenho experimental é apresentado na figura 5.

4.4.2.1 Linhagem com crescimento em suspensão

As células K-562 foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/mL em placas de 24 poços. Após 24 h, as células foram tratadas com várias concentrações da fração hexano (1,25-25 $\mu\text{g/mL}$), de suas subfrações (1,25-25 $\mu\text{g/mL}$) e eufol (23,4-117,2 μM), diluídos em solução veículo (DMSO 0,1% em meio de cultivo). A avaliação da viabilidade celular foi realizada 72 h após a adição do tratamento, transferindo as células para tubos de 2 mL e centrifugadas por 5 minutos a 220 g. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado celular foram adicionados 400 μL de reagente MTT (0,5 mg/mL). As células foram incubadas em condição de cultivo por 30 minutos; em seguida os tubos foram centrifugados (5 minutos a 900 g), o sobrenadante foi removido e os cristais de *formazan* foram solubilizados em 300 μL de DMSO. A leitura das absorbâncias foi feita em uma leitora de placas num comprimento de onda de 570 nm. Solução veículo (DMSO 0,1 %, em meio de cultivo) foi utilizada como controle. A análise foi realizada, no mínimo, em 3 experimentos independentes e em triplicata.

4.4.2.2 Linhagens com crescimento dependente de adesão

As linhagens HT-29, HCT 116, MCF-7 e MDA-MB 231 foram plaqueadas na concentração de 5×10^4 células/mL, em placas de 96 poços. Após 24 h, 100 μL de diferentes concentrações de frações (12,5-200 $\mu\text{g/mL}$), subfrações (12,5-200 $\mu\text{g/mL}$) e eufol (25-200 μM), diluídos em solução veículo (DMSO 0,8% em meio de cultivo), foram adicionados aos poços. A análise de viabilidade foi realizada após 24 e 48 h de tratamento, sendo o meio removido e substituído por 100 μL de solução de MTT (0,5 mg/mL) e incubado em condições de cultivo por 3 ou 4 h. Os cristais de *formazan* foram solubilizados em 100 μL de DMSO e a leitura foi realizada em leitora de placa, comprimento de onda 570 nm. Solução veículo (DMSO 0,8%, em meio de cultivo) foi utilizada como controle. Foram realizados quatro experimentos independentes em duplicata para cada concentração.

4.4.2.3 Cálculo da viabilidade celular e CI_{50}

Os resultados de viabilidade celular foram expressos em porcentagem (%), para o cálculo utilizou-se a equação abaixo.

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Absorbância média das amostras testadas}}{\text{Absorbância média do controle}} \times 100$$

Sendo o controle células tratadas apenas com solução veículo, enquanto que as amostras correspondem as diferentes concentrações de tratamento adicionadas.

Para determinação do CI_{50} foi utilizado o software *StatPlus* (versão 5.9.8), a análise de sobrevivência pela regressão de *Probit*, método de Finney (FINNEY, 1971). Os resultados foram expressos em $CI_{50} \pm$ erro padrão da média.

4.5 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

Foi calculado previamente a concentração das subfrações do látex e do eufol que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) no período de tratamento de 48 h.

O IS é um valor obtido como a razão entre o CI_{50} obtido para linhagens não tumorais e as linhagens tumorais. As células não tumorais HEK-293 (células embrionárias de rim humano) foram obtidas da ATCC (CRL-1573) e a avaliação da citotoxicidade foi realizada conforme descrito no item 4.4.2.2.

Enquanto as células mononucleares (linfócitos e monócitos) foram isoladas de sangue periférico de três voluntários saudáveis (40 mL de cada voluntário), após assinatura do termo de consentimento livre esclarecido (COEP 3.653.048 – anexo A). O sangue foi coletado em tubos a vácuo contendo anticoagulante (EDTA), e diluído em volume igual de PBS pH 7,4, e na sequência homogeneizado lentamente. Sobre o reagente Histopaque 1077® foi adicionado o sangue diluído, na proporção 1 mL de reagente para cada 2 mL de sangue diluído. Em seguida, os tubos de 50 mL foram centrifugados a 220 g por 30 minutos. Após este período os linfócitos e monócitos foram coletados, diluídos em volume igual de PBS concentrado, pH 7,4 e novamente centrifugados a 220 g por mais 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o resíduo celular ressuspenso em 24 mL de meio de cultura RPMI 1640, acrescido de 10% de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina (100 U/L e 10 mg/L respectivamente). A viabilidade celular foi avaliada em câmara de Neubauer utilizando o corante azul de tripan. A suspensão celular foi plaqueada em placas de 24 poços e mantida por 2 h na incubadora de CO₂ (tempo necessário para adesão dos monócitos à placa de cultivo), enquanto os linfócitos permanecem em suspensão. Após as 2 h, o meio contendo os linfócitos foi retirado das placas, reunido em tubo de 50 mL e centrifugado

a 220 g por 5 minutos. O precipitado celular foi ressuspenso em 5 mL de meio de cultura e a viabilidade e concentração celular foram determinadas em câmara de Neubauer. Sobre os monócitos aderidos foi adicionado meio de cultura. Posteriormente à contagem, foram plaqueados 500 µL de uma suspensão celular a 1×10^6 células/mL. Aguardou-se 1 h para estabilização celular e na sequência foram adicionadas diluições da subfração diclorometano (5 a 200 µg/mL) e eufol (23,4-117,2 µM), diluídas em solução veículo (DMSO 0,1% em meio de cultivo), sendo a mesma utilizada como controle. Após 48 h de tratamento foi realizada análise da viabilidade celular por redução mitocondrial por MTT para todas as células conforme descrito no item 4.4.2.1.

4.6 INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS ASSOCIADOS A CITOTOXICIDADE

Foram testadas as amostras mais eficazes frente às linhagens mais sensíveis obtidas nesse ou em estudos prévios (CRUZ *et al.*, 2020). Foram avaliados: (1) investigação do processo de morte induzida pelos tratamentos utilizando os ensaios de análise morfológica com o emprego dos fluoróforos alaranjado de acridina e brometo de etídio, (2) distribuição percentual das células nas fases do ciclo celular com emprego de iodeto de propídio (PI) por citometria de fluxo, (3) ativação de caspases 3 e 7 por microscopia de fluorescência. Desenho experimental é apresentado na figura 5.

4.6.1 Avaliação de morte celular com fluoróforos

A avaliação do tipo de morte induzida pelos tratamentos com as frações e subfrações do látex de *E. umbellata* foi realizada conforme protocolo descrito por Ribble *et al.* (2005) com modificações.

As células HL-60 e K-562 foram plaqueadas 4×10^4 células/mL em placas de 24 poços. Após 12 h foram adicionadas, na linhagem HL-60, as subfrações diclorometano (10 e 20 µg/mL) e etanol (37,5 e 75 µg/mL) e, na linhagem K-562, eufol (23,4 e 46,9 µM).

Após 12 h de tratamento, as células foram coletadas, transferidas para tubos de 2 mL, centrifugadas por 5 minutos a 220 g. O sobrenadante foi removido, sobre o precipitado de células foram adicionados 2 µL de solução de alaranjado de acridina e brometo de etídio (100 µg/mL, cada). O conteúdo foi homogeneizado e 10 µL foram

colocados entre lâmina e lamínula. A fluorescência foi observada em microscópio de fluorescência. Como controles foram utilizados meio de cultura e solução veículo (DMSO 0,08% (HL-60) e 0,4% (K-562) em meio de cultura). Como controles positivos foram utilizadas soluções de mesilato de imatinibe 0,5 μ M e cloridrato de doxorrubicina 85 nM. Os ensaios foram realizados em duplicata.

A distinção celular foi realizada conforme descrito por Baskic *et al.* (2006) no qual células viáveis são as que possuem núcleos verdes brilhantes uniformes com estrutura organizada. Enquanto células apoptóticas têm núcleos verdes, mas é visível a condensação da cromatina como fragmentos verdes brilhantes ou possuem núcleos laranja com cromatina condensada ou fragmentada. As células necróticas, por sua vez, apresentam-se uniformemente laranja com estrutura organizada.

4.6.2 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

As células HL-60 e K-562 foram plaqueadas 4×10^5 células/mL em placas de 24 poços. Após 12 h foram adicionadas, na linhagem HL-60, as subfrações diclorometano (10 e 20 μ g/mL) e etanol (37,5 e 75 μ g/mL) e, na K-562, eufol (23,4 e 46,9 μ M).

Após 12 h, as células foram coletadas, transferidas para tubos de 2 mL, centrifugadas por 5 minutos a 1800 rpm. O sobrenadante foi removido, o precipitado celular foi ressuspendido em 0,5 mL de tampão pH 7,4, foram novamente centrifugadas (5 minutos a 1800 rpm) e o sobrenadante removido. Sobre o precipitado de células foi adicionado 200 μ L de tampão PSSI (50 μ g/mL de iodeto de propídio, 0,1% Triton X-100 e 50 μ g/mL RNase, preparados em tampão pH 7,4) e incubadas por 5 h em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo. Como controles foram utilizados meio de cultura e solução veículo (DMSO 0,08% (HL-60) e 0,40% (K-562) em meio de cultura). Como controles positivos foram utilizadas soluções de mesilato de imatinibe 0,5 μ M e cloridrato de doxorrubicina 85 nM. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

4.6.3 Análise da atividade da caspases 3 e 7

A determinação da atividade de caspases empregando o kit reagente CellEvent™ Caspase 3 e 7 (ThermoScientific) sendo seguido o procedimento conforme instruções do fornecedor.

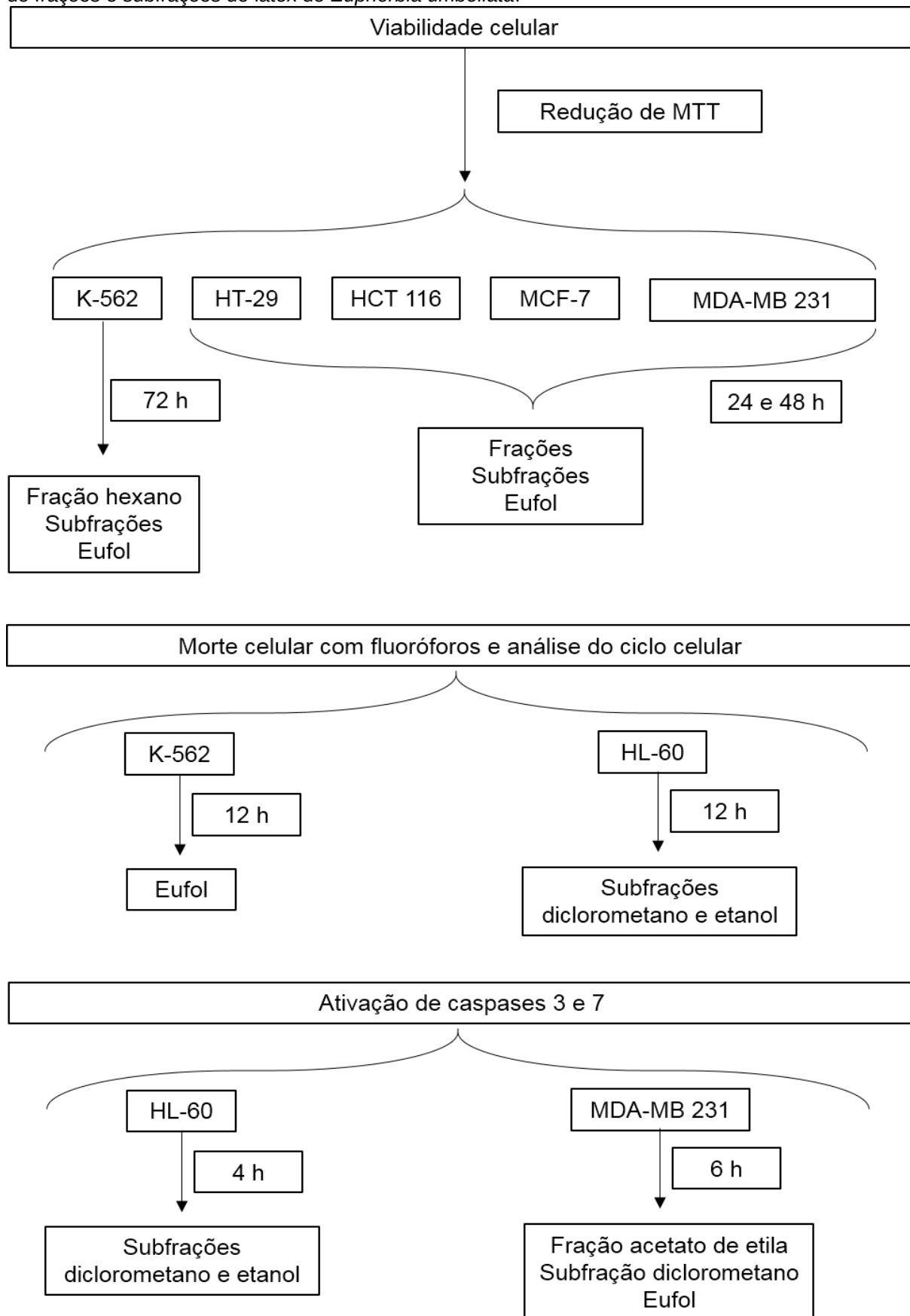
4.6.3.1 *Linhagens com crescimento em suspensão*

Células HL-60 foram plaqueadas na concentração de 4×10^5 células/mL. Após 24 h de estabilização foram adicionadas as amostras: subfrações diclorometano (10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) e etanol (37,5 e 75 $\mu\text{g/mL}$). Como controles foram utilizados meio de cultivo celular, solução veículo (solução de DMSO 0,08% em meio de cultivo) e 85 nM de doxorrubicina. Após 4 h de tratamento, as células foram transferidas para tubos de 2 mL, centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante foi descartado e sobre o precipitado celular foram adicionados 100 μL de reagente CellEvent™ Caspase 3/7 (2 μM diluído em PBS). O material foi incubado em condições de cultivo por 1 h antes da análise em microscópio de fluorescência. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.6.3.2 *Linhagens com crescimento dependente de adesão*

A linhagem MDA-MB 231 foi plaqueada (5×10^3 células/poço) e tratada com 20 $\mu\text{g/mL}$ de fração acetato de etila e subfração diclorometano, e 40 μM de eufol. Após 6 h, o meio foi substituído pelo reagente CellEvent Caspase 3 e 7 (2 μM em PBS), incubado por 1 h em condições de cultivo. Meio de cultivo foi utilizado como controle. A análise foi realizada em equipamento Cytation 5 Image Reader. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata.

Figura 5 - Desenho experimental da análise de viabilidade celular e efeitos associados à citotoxicidade de frações e subfrações do látex de *Euphorbia umbellata*.



Fonte: a autora.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram normalizados em relação ao controle, expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo programa estatístico Graph Pad Prism (versão 5), empregando-se a análise de variância ANOVA de uma via, seguido dos pós teste Tukey. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados como indicativos de significância. Os valores de CI_{50} foram calculados no software StatPlus versão 5.9.8, pelo método de análise de Probit, método de Finney.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

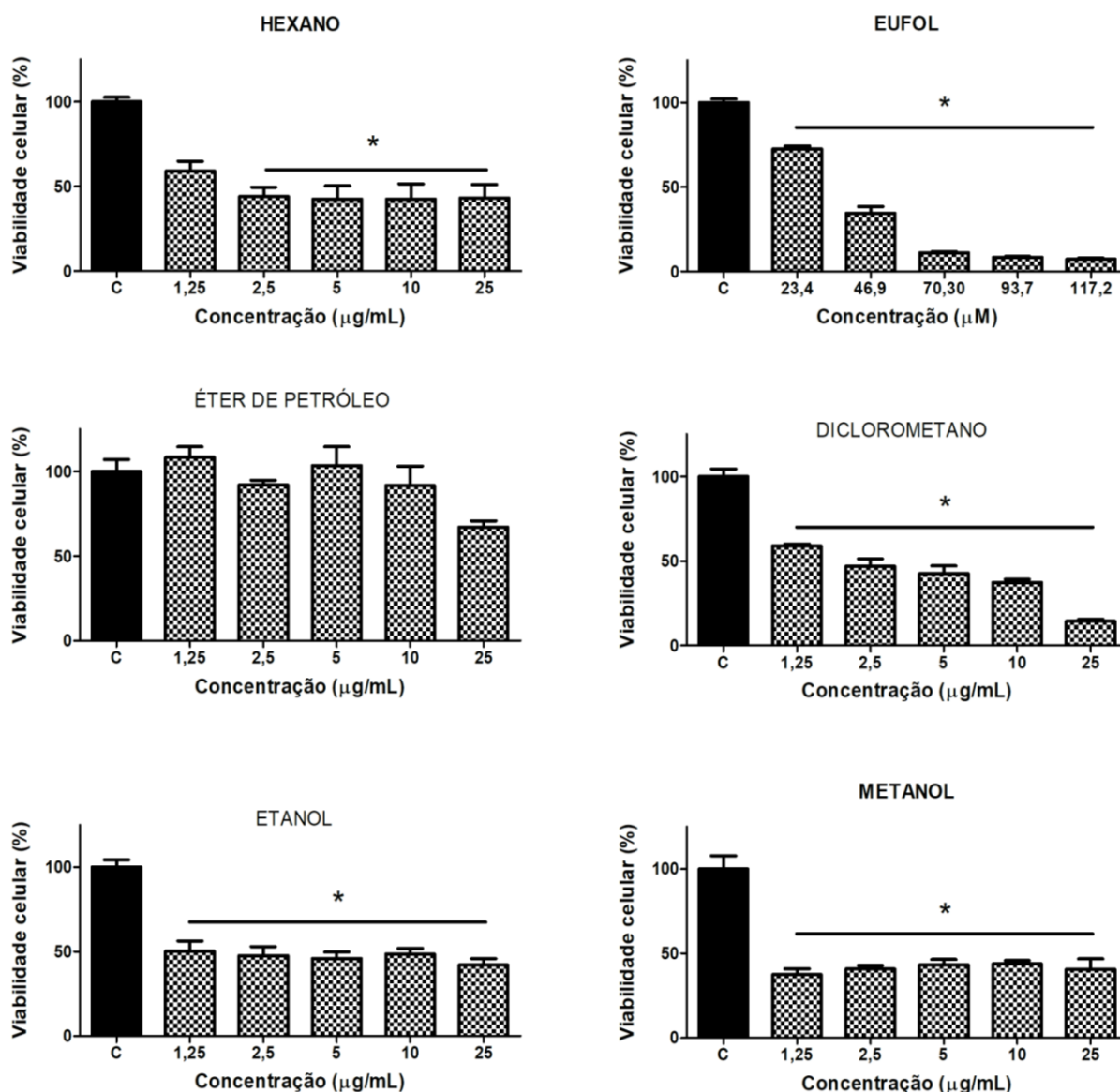
Para o desenvolvimento de um fármaco, como os antitumorais, o potencial de citotoxicidade dos produtos naturais pode ser avaliado em linhagens celulares, por meio de diferentes ensaios, que incluem a determinação da viabilidade celular. De fato, o teste de citotoxicidade *in vitro*, tem se tornado importante para a avaliação de diferentes atividades biológicas sendo, portanto, considerado fase de triagem inicial (FRESHNEY, 2016).

A determinação da viabilidade celular pode ser realizada pelo emprego de métodos colorimétricos como o da redução de sal de tetrazólio (MTT), o qual é descrito como método padrão ouro. Baseia-se no princípio de que células viáveis, com metabolismo ativo, convertem o MTT a cristais de *formazan*, os quais possuem absorbância máxima próxima a 570 nm. (MOSMANN, 1983; RISS; NILES; MINOR, 2004).

5.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DA FRAÇÃO HEXANO E SUBFRAÇÕES DO LÁTEX DE *Euphorbia umbellata* E DO EUFOL NO MODELO DE LEUCEMIA

Assim, buscando ampliar a observação do efeito proeminente da fração hexano, especificamente frente às linhagens modelos de leucemias, conduziu-se a avaliação do potencial citotóxico da fração hexano, subfrações e eufol sobre a linhagem K-562, modelo de leucemia mieloide crônica (Figura 6). Os valores de CI_{50} são apresentados na Tabela 2.

Figura 6 – Avaliação da viabilidade celular da linhagem K-562 após 72 h de tratamento com fração hexano, subfrações e eufol.



Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média de 3 experimentos independentes e em quadruplicata. O símbolo * representa diferença estatística ($p < 0,001$) em relação ao controle (C) (solução veículo - DMSO 0,1%, em meio de cultivo).

Fonte: a autora.

Considerando os valores de CI_{50} calculados, nota-se que o fracionamento alterou o efeito citotóxico, inclusive potencializando o efeito quando se compara os resultados das subfrações diclorometano e etanol à matriz inicial, fração hexano. Esse efeito é consequência da modificação da composição das matrizes vegetais, com seleção de compostos devido à polaridade e sugere que há efeito sinérgico entre diterpenos e triterpenos presentes nessas subfrações (ANDRADE et al., 2021; CRUZ et al., 2020). Os diterpenos podem exercer seus efeitos por meio da modulação de PKC (*protein kinase C* - proteína quinase C); inibição da atividade da topoisomerase

II ou da síntese de DNA; indução de apoptose por inibição de IL-6 e ativação de STAT ou inibição da via NF- κ B (VASAS e HOHMANN, 2014). Já os triterpenos atuam na ativação ou inibição de receptores de membrana (TGR5, CCR5 e canabinoides); *downregulation* de genes Sp1, Sp3, Sp4; redução da expressão de ciclina, Bcl-2, VEGF (SAFE *et al.*, 2012).

Tabela 2 - Valores de CI_{50} (μ g/mL) obtidos após tratamento por 72 h, com frações, subfrações e eufol de látex de *Euphorbia umbellata* para a linhagem K-562.

Hexano	Éter de petróleo	Diclorometano	Etanol	Metanol	Eufol
7,78 $\pm$ 4,86	>25	2,52 $\pm$ 0,49	1,26 $\pm$ 3,65	ND	34,56 $\pm$ 2,12 μ M

Dados expressos como $CI_{50} \pm$ erro padrão da média, calculados por análise de Probit, método de Finney. ND- não determinado.

Fonte: a autora.

A citotoxicidade de extratos provenientes de folhas de *E. umbellata* frente a linhagem K-562 tem demonstrado valores de CI_{50} de 400 μ g/mL para o extrato bruto etanólico, enquanto que frações hexano e clorofórmio apresentam valores de CI_{50} de 100 e 80 μ g/mL, respectivamente, após 24 h de tratamento, demonstrando que o fracionamento com solventes apolares aumenta a citotoxicidade, uma vez que há concentração dos compostos ativos (NOGUEIRA *et al.*, 2008). Tais resultados também foram corroborados nesse estudo.

No mesmo sentido, estudos com frações obtidas do extrato bruto hidroalcolico das cascas do caule de *E. umbellata* também demonstraram que a fração clorofórmio mostrou-se mais potente frente a linhagem Jurkat (leucemia humana), apresentando valor de CI_{50} de 21,76; 7,72 e 7,59 μ g/mL, para o tempos de 24, 48 e 72 h de tratamento (KANUNFRE *et al.*, 2017).

Outro estudo descrito na literatura demonstra que o extrato etanólico obtido de partes aéreas de *E. umbellata* reduz em 50% a viabilidade celular de células K-562 na concentração de 73 μ g/mL (MOTA; BENFICA; VALADARES, 2012). Entretanto, os pesquisadores que conduziram esse estudo não avaliaram o fracionamento do extrato bruto etanólico para verificar se haveria uma potencialização dos efeitos citotóxicos das frações desse material.

Ademais, em estudos prévios do grupo de pesquisa observou-se que o fracionamento do látex potencializou o efeito citotóxico, uma vez que os valores de CI_{50} obtidos para o látex foram de 252,58 e 263,42 μ g/mL para as linhagens HeLa e HRT-18, enquanto que as frações hexano e clorofórmio apresentaram valores de

30,50 e 180,44 $\mu\text{g/mL}$, para a linhagem HeLa e 26,16 e 170,85 $\mu\text{g/mL}$, para a linhagem HRT-18 (LUZ *et al.*, 2015, 2016).

As frações também foram avaliadas frente a linhagem Jurkat, um modelo de leucemia, e esta mostrou-se mais sensível ao tratamento do que as linhagens anteriormente descritas. Apresentando valores de CI_{50} de 1,87; 17,68; 132,57 e 19,13 $\mu\text{g/mL}$ para as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, respectivamente (LUZ *et al.*, 2016).

Esses resultados revelam o grande potencial da fração hexano, especialmente frente a linhagem modelo de leucemia. Portanto, a fração hexano foi refractionada e avaliada nas linhagens leucêmicas Jurkat e HL-60. A fração hexano foi citotóxica com valores de CI_{50} de 15,93 e 0,76 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Já as subfrações diclorometano e etanol apresentaram valores ainda inferiores, sendo que para a linhagem Jurkat os valores foram 0,96 e 11,86 $\mu\text{g/mL}$ e para a linhagem HL-60, 0,69 e 0,05 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (CRUZ *et al.*, 2020).

O eufol, por sua vez, também já foi avaliado frente a diversas células, apresentando valores de CI_{50} entre 1,41 e 38,89 μM , porém, nenhuma linhagem modelo de leucemia foi avaliada (SILVA *et al.*, 2018). Em relação às linhagens leucêmicas o eufol apresentou valores CI_{50} de 49,36 e 84,33 μM para HL-60 e Jurkat, respectivamente (CRUZ *et al.*, 2018).

Durante a pesquisa por novos compostos ou substâncias citotóxicas além da avaliação inicial, *in vitro*, é necessário determinar a seletividade desses em células não neoplásicas. O índice de seletividade (IS) é um parâmetro utilizado para inferir a respeito da toxicidade de uma amostra avaliada frente às células não tumorais. Uma das formas de determiná-lo é a partir da razão entre o CI_{50} determinado para uma linhagem não tumoral e uma tumoral, tratadas com a mesma amostra pelo mesmo período e avaliadas pelo mesmo método.

Para tanto, como células não tumorais foram utilizados linfócitos e monócitos isolados de sangue periférico de voluntários saudáveis. Estas foram tratadas com as subfrações diclorometano e eufol, por 48 h devido a limitação de viabilidade das células obtidas de sangue periférico. Os valores de CI_{50} e IS são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de CI_{50} e índice seletividade obtidos para as subfrações diclorometano e eufol de látex de *Euphorbia umbellata*, após 48 h de tratamento.

Células	CI_{50}		IS	
	Diclorometano	Eufol	Diclorometano	Eufol
Linfócito	53,04 $\mu\text{g/mL}$	71,79 μM	7,42	2,08
Monócito	65,16 $\mu\text{g/mL}$	81,20 μM	9,11	2,35
K-562	7,15 $\mu\text{g/mL}$	34,44 μM	-	-

Dados expressos como CI_{50} , calculados por análise de Probit, método de Finney. E IS calculados pela razão entre CI_{50} .

Fonte: a autora.

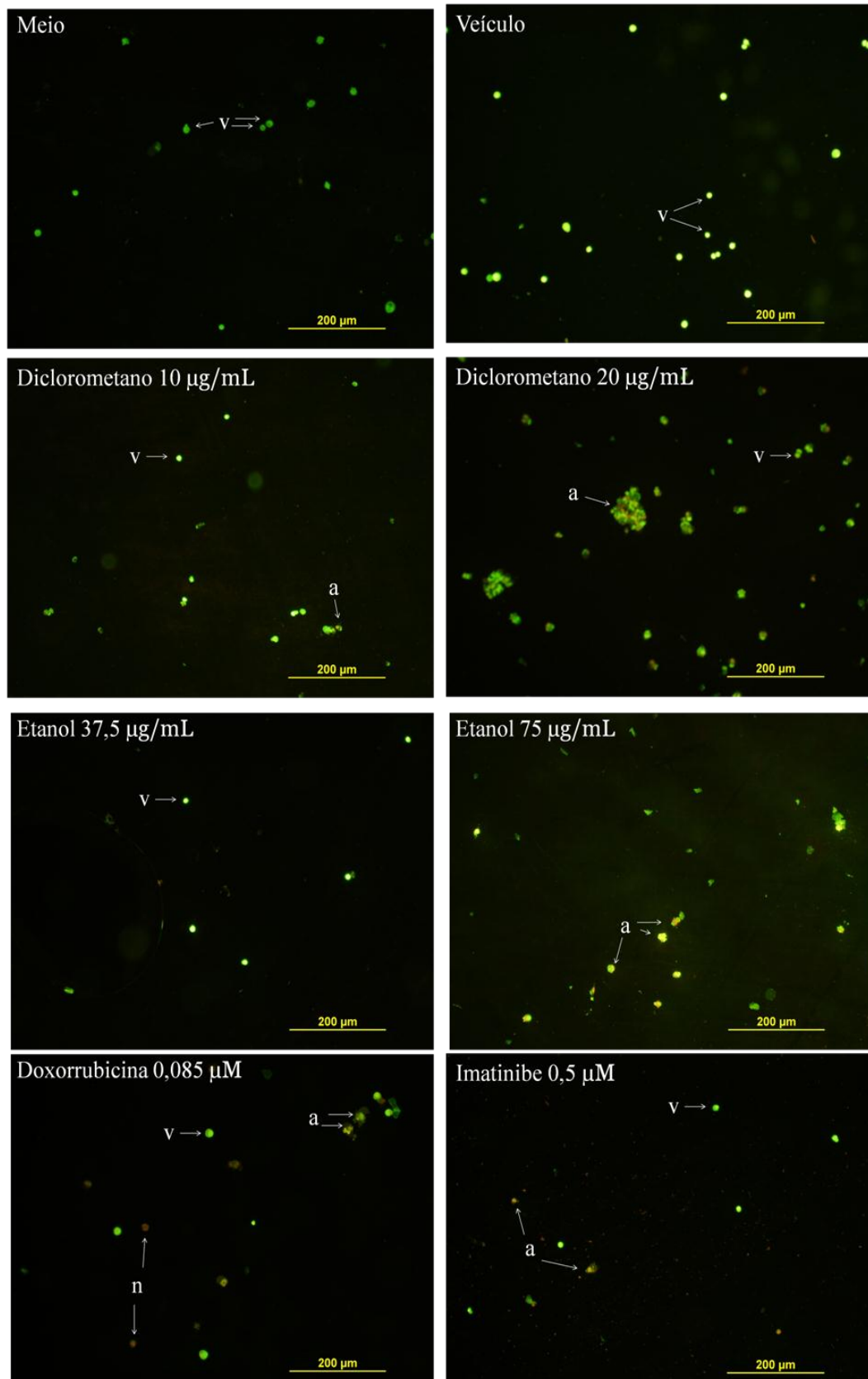
O índice de seletividade da fração hexano foi calculado ao comparar linfócitos à linhagem Jurkat, com resultado de 4,30 (LUZ *et al.*, 2016). O IS também foi calculado para a subfração diclorometano comparando a linhagem HL-60 com linfócitos e monócitos. A qual revelou alta seletividade com valores de 24,44 e 30,03 para linfócitos e monócitos, respectivamente (CRUZ *et al.*, 2020). Ao comparar os valores obtidos para a subfração com o obtido para a fração, tem-se que o fracionamento aumenta a seletividade dos tratamentos.

Considerando todos os valores de CI_{50} obtidos para linhagens leucêmicas, a linhagem HL-60, modelo de leucemia promielocítica aguda, foi a mais sensível ao tratamento com subfrações diclorometano e etanol. Já para o eufol, observa-se que a linhagem K-562 foi mais sensível ao tratamento. Dessa forma, essas amostras e linhagens foram selecionadas para avaliar as possíveis vias que levam à morte celular.

A análise morfológica foi realizada utilizando os reagentes fluorescentes alaranjado de acridina e brometo de etídio. Considerando que o alaranjado de acridina é absorvido tanto por células viáveis quanto não viáveis e emite fluorescência verde, e que o brometo de etídio é absorvido apenas por células não viáveis e emite fluorescência alaranjada. Assim, distinguimos os tipos de células de acordo com a emissão de fluorescência e o aspecto morfológico das células (BASKIC *et al.*, 2006).

A Figura 7 apresenta o efeito do tratamento com as subfrações diclorometano e etanol na linhagem HL-60. Enquanto que a Figura 8 mostra o efeito do tratamento com eufol em linhagem K-562. É possível notar que os tratamentos causaram apoptose, assim como os controles positivos, doxorrubicina e imatinibe.

Figura 7 – Efeito das subfrações diclorometano e etanol sobre a morfologia de células HL-60 coradas com alaranjado de acridina e brometo de etídio.

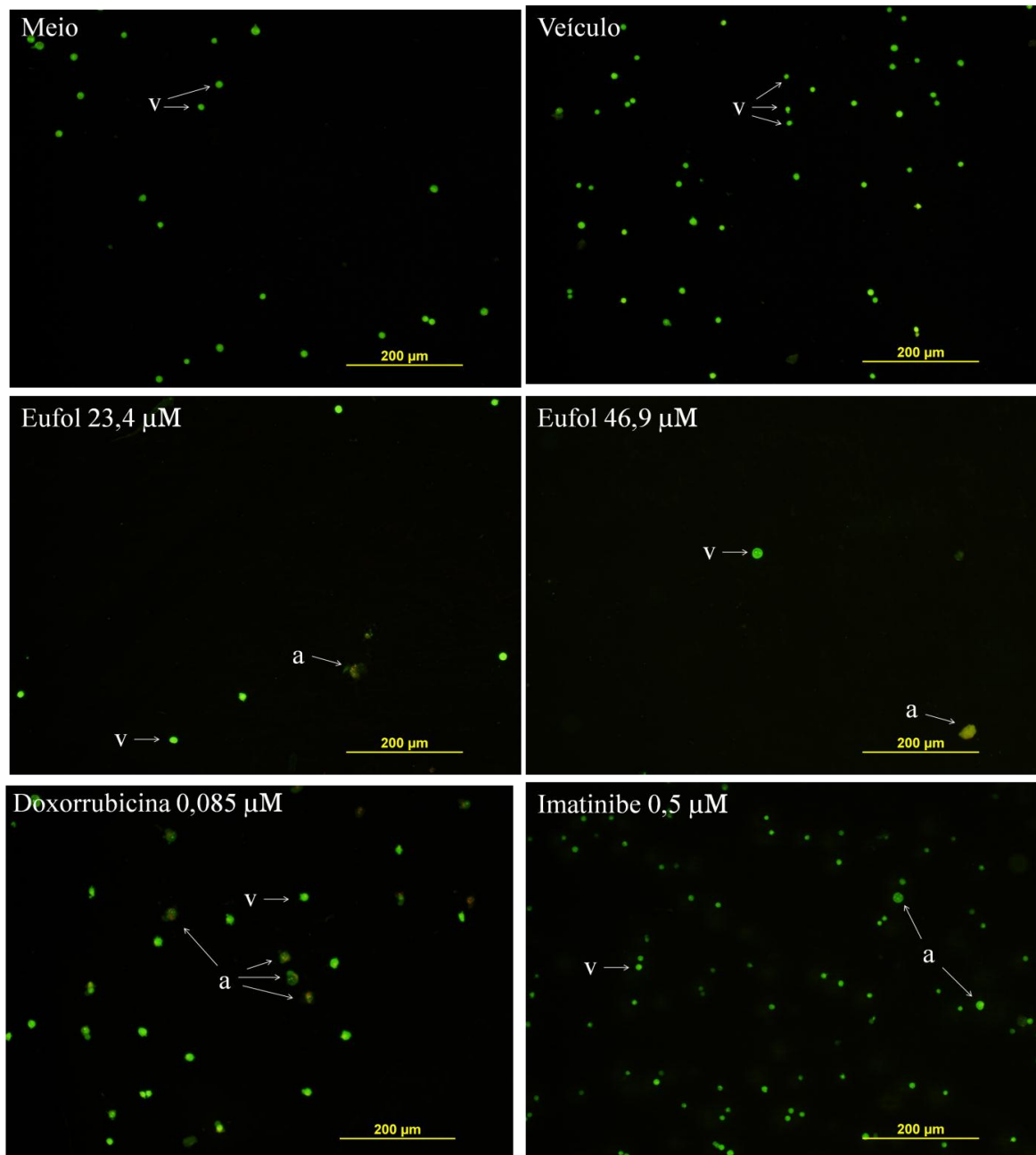


Como controle negativo foram utilizados meio de cultura e solução veículo (DMSO 0,08%, em meio de cultivo). Todas as imagens estão em aumento de 200x, barra= 200 µm. v: células viáveis; a: células apoptóticas; n: células necróticas.

Fonte: a autora.

Os resultados observados nesse experimento estão de acordo com dados publicados de avaliação da citotoxicidade frente a linhagem Jurkat quando tratada com fração hexano do látex ou com fração clorofórmio de casca de caule de *E. umbellata*. Também para essa linhagem celular, as matrizes vegetais obtidas da espécie *E. umbellata* apresentaram redução da densidade celular e presença de células apoptóticas (KANUNFRE *et al.*, 2017; LUZ *et al.*, 2016).

Figura 8 - Efeito do eufol sobre a morfologia de células K-562 coradas com alaranjado de acridina e brometo de etídio.



Como controles foram utilizados meio de cultivo e solução veículo (DMSO - 0,4%, meio de cultivo). Todas as imagens estão em aumento de 200x, barra= 200 μ m. v: células viáveis; a: células apoptóticas; n: células necróticas.

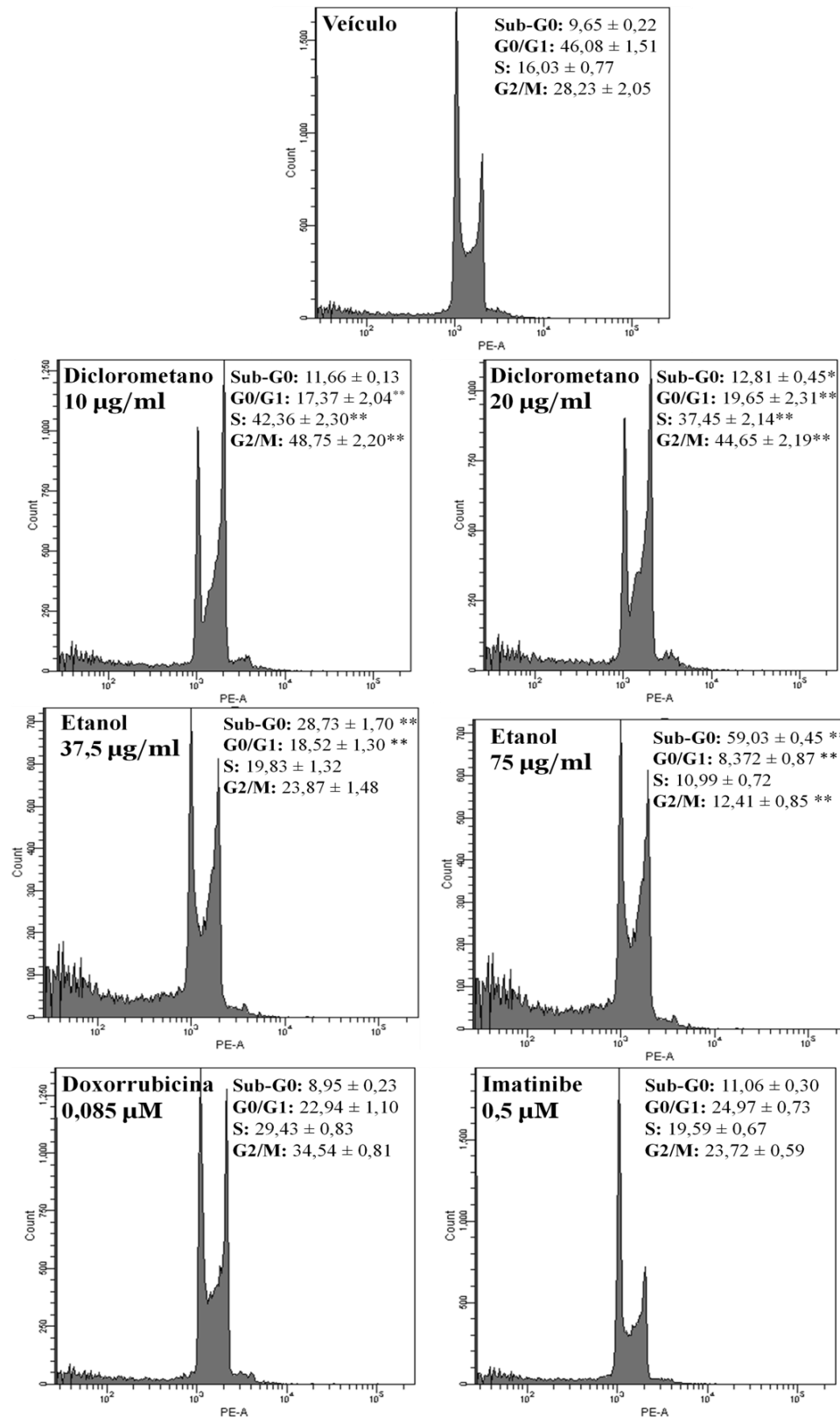
Fonte: a autora.

A fração etanol obtida de partes aéreas de *E. umbellata* promoveu alterações morfológicas tais quais condensação de cromatina e formação de *blebs* em células K-562, corroborando os dados obtidos neste estudo (MOTA; BENFICA; VALADARES, 2012). Os resultados obtidos reforçam a proposta que os componentes químicos presentes nos extratos obtidos dessa espécie vegetal são capazes de promover apoptose em células cancerosas.

A análise do ciclo celular é realizada frequentemente usando citometria de fluxo. Esta permite a quantificação unicelular do DNA corado para indicar a porcentagem de células existentes em cada fase do ciclo celular (GORDON; BROWN; REYNOLDS, 2018).

O efeito do tratamento com subfrações diclorometano e etanol foi avaliado sobre a linhagem HL-60 (Figura 9). A subfração diclorometano, em ambas as concentrações testadas (10 e 20 µg/mL), provocou aumento da população celular em fase S e em fase G2/M, em detrimento da fase G0/G1. Esse resultado infere que os compostos presentes nessa fração são capazes de interagir com ciclinas e CDKs específicas da fase S, possivelmente reduzindo a expressão de ciclina E, CDK 2, 6 e 7, assim como descrito para outros compostos de origem vegetal (BAILON-MOSCOSO *et al.*, 2017). Enquanto a subfração etanol causou aumento da população em fase sub G0, indicando processo apoptótico, sendo tal efeito mais intenso na maior concentração.

Figura 9 - Distribuição do ciclo celular obtido para linhagem HL-60 após 12 h de tratamento com subfrações diclorometano e etanol.



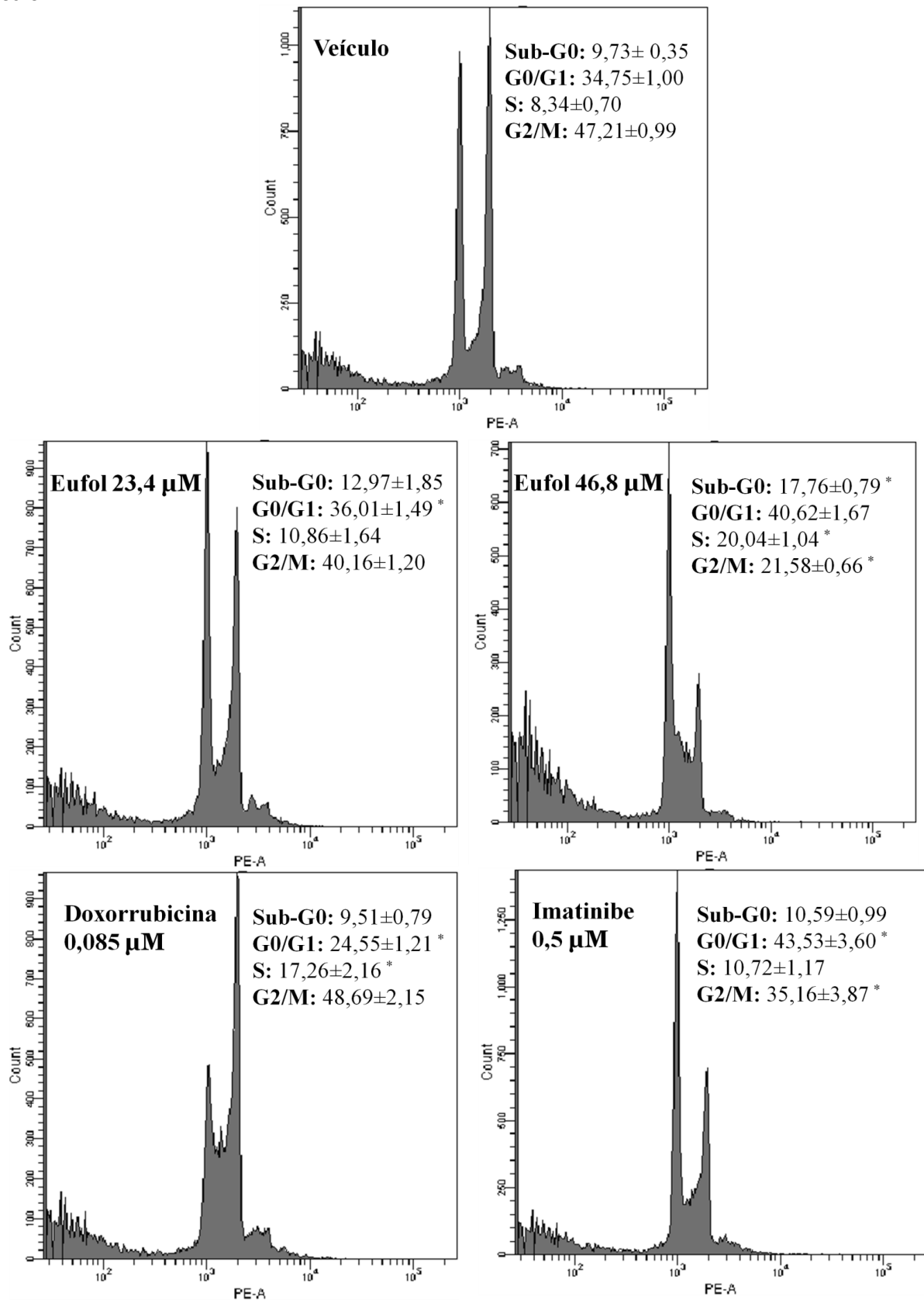
Como controle foi utilizada solução veículo (DMSO 0,08%, em meio de cultivo). Os dados são expressos como porcentagem de população celular em cada fase do ciclo celular, sendo média $\pm$ erro padrão da média (n=4). *, **, *** indicam diferença em relação ao veículo $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

Fonte: a autora.

O tratamento com matrizes vegetais oriundas de *E. umbellata* é capaz de alterar o ciclo celular de diferentes linhagens de células cancerosas. Relatos científicos demonstram que o látex reduz a população celular em fase S-G2/M de células B16F10 (OLIVEIRA *et al.*, 2013), as frações hexano (do látex) e clorofórmio (da casca de caule) aumentam significativamente a população celular em fase sub G0 e G0/G1, em detrimento das populações em fase S e G2/M, em células Jurkat (KANUNFRE *et al.*, 2017; LUZ *et al.*, 2016), e células K-562 quando tratadas com extrato etanol de partes aéreas sofrem aumento das populações celulares em fases G0/G1 e G2/M, e redução da fase S, quando comparado a células sem tratamento (MOTA; BENFICA; VALADARES, 2012).

O efeito do eufol sobre o ciclo celular de células K-562 é apresentado na Figura 10. Nota-se que aumento da população celular em fase sub G0, G1 e S, em detrimento da população em fase G2/M. Tal efeito é mais intenso na maior concentração de tratamento.

Figura 10 - Distribuição do ciclo celular obtidos para linhagem K-562 após 12 h de tratamento com eufol.



Como controle foi utilizada solução veículo (DMSO 0,4%, em meio de cultivo). Os dados são expressos como porcentagem de população celular em cada fase do ciclo celular, sendo média $\pm$ erro padrão da média (n=4). * indica diferença significativa em relação ao veículo ($p < 0,05$).

Fonte: a autora.

Para avaliação do efeito das subfrações diclorometano e etanol sobre a atividade de caspases 3 e 7 células HL-60 foram tratadas por 4 h com subfrações. O ensaio foi realizado utilizando o reagente de detecção CellEvent™ Caspase-3/7 o qual é um substrato fluorogênico para caspases 3 e 7 ativadas.

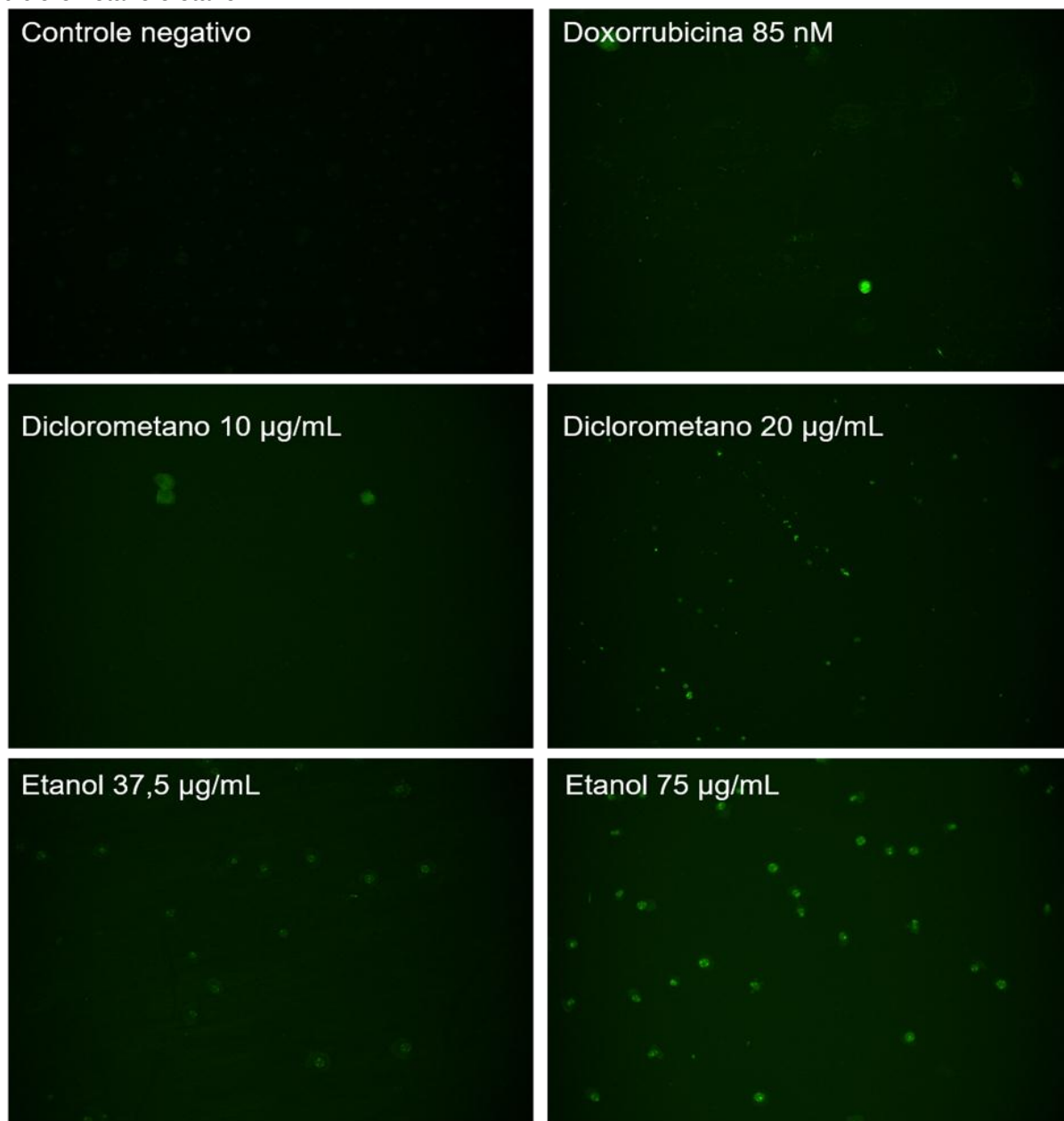
Após ativação de caspase-3 ou caspase-7 em células apoptóticas, o reagente (peptídeo DEVD) é clivado, permitindo que o corante se ligue ao DNA e produza uma resposta fluorogênica com um máximo de absorção / emissão de aproximadamente 502/530 nm (LIFE TECHNOLOGIES, 2017).

As caspases são proteases identificadas por números, já foram descobertas pelo menos 15 diferentes enzimas. Quanto às suas funções são associadas ao controle do processo de morte celular, como apoptose, e processos inflamatórios. Entre as caspases responsáveis pelo processo apoptótico, encontram-se as caspases 3 e 7, descritas como efetoras de apoptose (SHALINI *et al.*, 2015). Dessa forma a ativação de caspases 3 e 7 é indicativa do processo de apoptose, porém sem definir se a apoptose se dá por via intrínseca ou extrínseca.

Imagens foram obtidas utilizando microscópio de fluorescência (Figura 11). Ao observa-las nota-se que há maior fluorescência nas imagens referentes às subfrações, principalmente a subfração etanol em maior concentração. Isso indica a ativação de caspases 3 e/ou 7. Porém, a baixa intensidade de fluorescência pode ser devido ao curto período de tratamento.

Extrato etanol de partes aéreas de *E. umbellata* aumentaram em 15% a atividade de caspase 9 em células K-562 (MOTA; BENFICA; VALADARES, 2012). De forma semelhante, um extrato aquoso de raízes de *E. formosana* elevaram a clivagem de caspase 3 de 2,4 para 3,7, em células leucêmicas THP-1 (HSIEH *et al.*, 2013).

Figura 11 - Análise de ativação de caspases de células HL-60 após 4 h de tratamento com subfrações diclorometano e etanol.



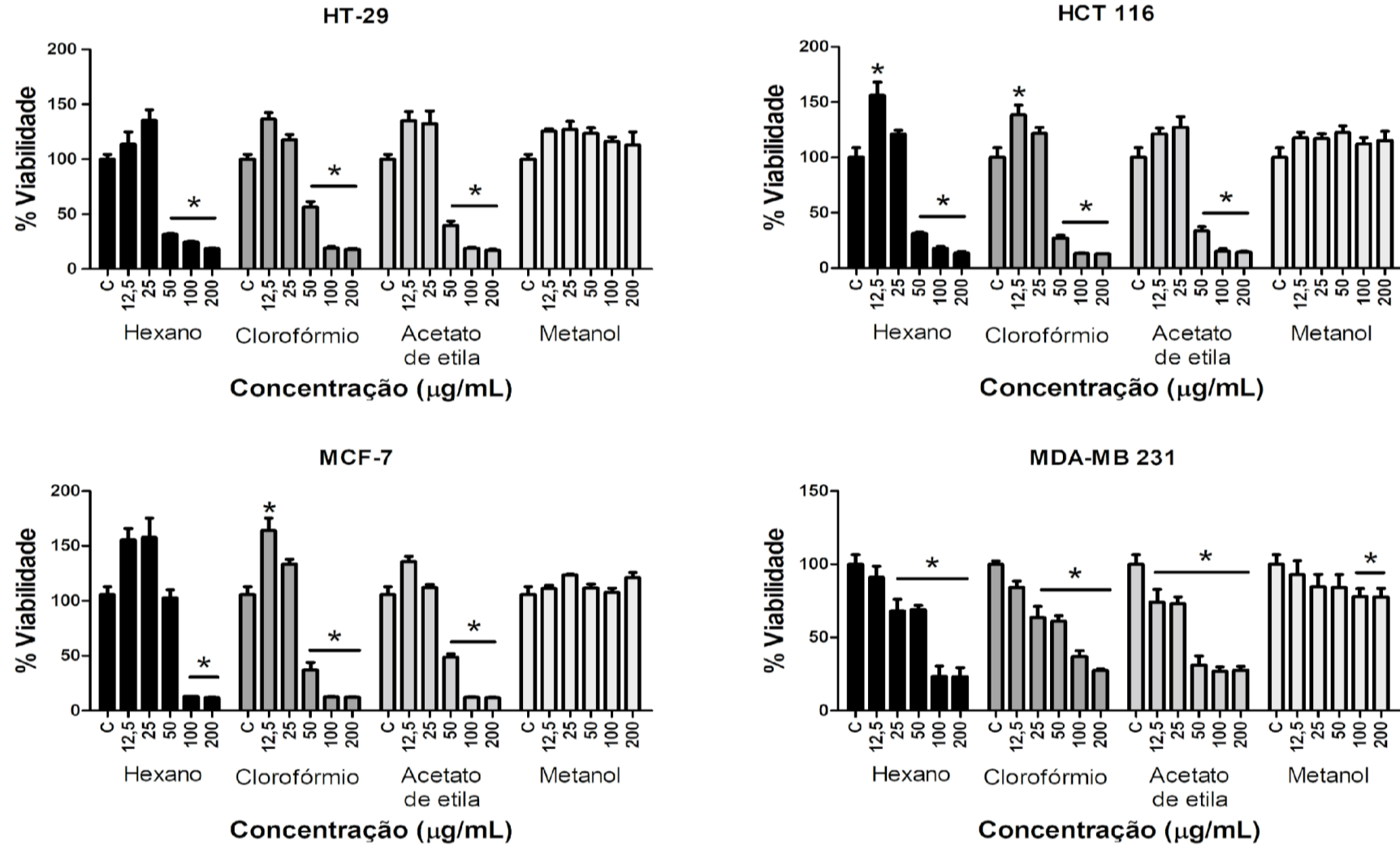
Meio de cultivo e doxorrubicina (85 nM) foram utilizados como controles negativos e positivos, respectivamente. Imagens foram obtidas em aumento de 100x.

Fonte: a autora.

5.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DAS FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DO LÁTEX DE *Euphorbia umbellata* E DO EUFOL FRENTE A MODELOS DE CÂNCER COLORRETAL E DE MAMA

A citotoxicidade das frações sobre a viabilidade celular das linhagens modelo de câncer colorretal (HT-29 e HCT 116) e das linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB 231) foi avaliada após o tratamento por 24 e 48 h (Figuras 12 e 13). Os valores de CI_{50} são apresentados na Tabela 4.

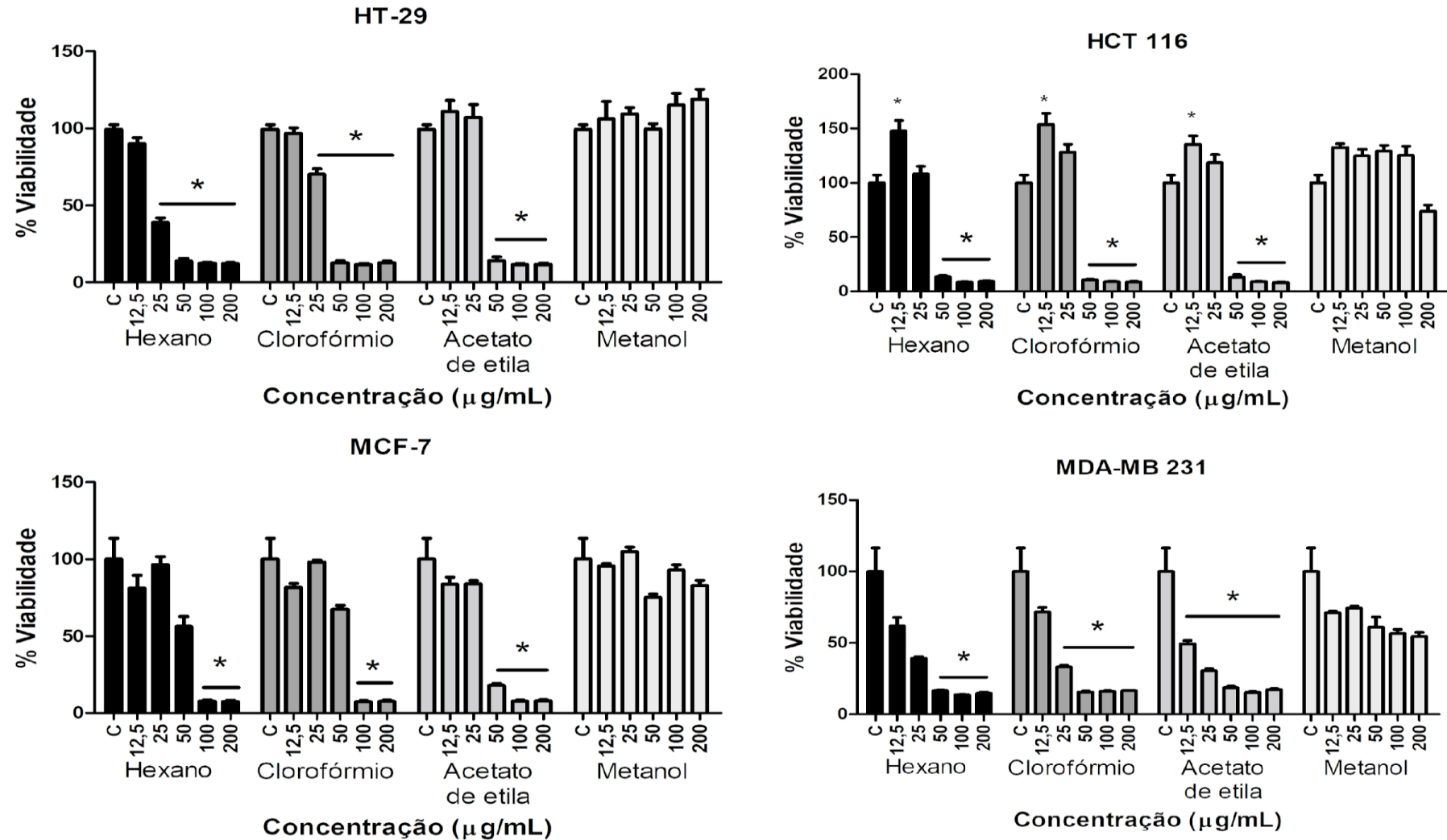
Figura 12 - Viabilidade celular das linhagens HT-29, HCT 116, MCF-7 e MDA-MB 231 após 24 h de tratamento com frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.



Dados expressos como média + erro padrão da média de três experimentos independentes (n=2). C - Controle (solução veículo – DMSO 0,8%, em meio de cultivo). O símbolo * representa diferença estatística ($p < 0,001$) em relação ao controle ().

Fonte: a autora.

Figura 13 - Viabilidade celular das linhagens HT-29, HCT 116, MCF-7 e MDA-MB 231 após 48 h de tratamento com frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.



Dados expressos como média + erro padrão da média de três experimentos independentes (n=2). C - Controle (solução veículo – DMSO 0,8%, em meio de cultivo). O símbolo * representa diferença estatística (p<0,001) em relação ao controle.

Fonte: a autora.

A exceção da fração metanol, todas as amostras foram capazes de reduzir a viabilidade celular em mais de 50%, independentemente do tempo de tratamento. Entretanto, observa-se que alguns tratamentos promoveram aumento da viabilidade celular. Esse fenômeno pode ser consequência do método utilizado. Visto que a redução do MTT é dependente do metabolismo celular, sendo possível que determinados tratamentos causem estimulação ao metabolismo, principalmente se aumentarem os níveis de NADPH ou a ação de lactato desidrogenase (SLIWKA *et al.*, 2016; STEPANENKO; DMITRENKO, 2015).

Tabela 4 - Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos após tratamento, por 24 e 48 h, com frações de látex de *Euphorbia umbellata*.

	HT-29		HCT 116		MCF-7		MDA-MB 231	
	24	48	24	48	24	48	24	48
Hexano	62,34 $\pm$ 17,78	26,24 $\pm$ 8,76	57,34 $\pm$ 14,83	46,66 $\pm$ 15,01	87,84 $\pm$ 17,00	48,12 $\pm$ 13,08	61,44 $\pm$ 17,91	15,84 $\pm$ 14,07
Clorofórmio	70,11 $\pm$ 25,94	37,28 $\pm$ 10,79	53,68 $\pm$ 14,95	45,78 $\pm$ 15,46	56,44 $\pm$ 13,26	53,16 $\pm$ 16,63	63,52 $\pm$ 7,08	17,95 $\pm$ 8,35
Acetato de etila	62,64 $\pm$ 15,16	48,69 $\pm$ 16,21	57,34 $\pm$ 14,47	46,00 $\pm$ 14,68	60,99 $\pm$ 30,18	35,47 $\pm$ 22,11	42,00 $\pm$ 78,62	7,77 $\pm$ 3,11
Metanol	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200

Dados expressos como $CI_{50} \pm$ erro padrão da média, calculados por análise de Probit, método de Finney.

Fonte: a autora.

Ao analisar os valores de CI_{50} para as diferentes frações, observa-se que, dentro de um mesmo período de tratamento, a fração acetato de etila foi mais citotóxica à linhagem MDA-MB 231. Ademais, tem-se que o prolongamento do tratamento potencializa o efeito citotóxico, visto que os valores de CI_{50} obtidos após 48 h de tratamento foram inferiores aos de 24 h, sugerindo um perfil de tempo dependência na ação estudada; entretanto, não houve corroboração estatística de tais observações.

A fração butanol de caule de *E. tirucalli* também reduziu a viabilidade celular de linhagens de MCF-7 e MDA-MB 231, com valores de CI_{50} de aproximadamente 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (CHOENE; MOTADI, 2016). Enquanto que extrato hidroalcóolico de partes aéreas de *E. szovitsii* reduziu a viabilidade de células MDA-MB 231 de forma concentração dependente, com valores de CI_{50} de 76,78 e 59,71 $\mu\text{g/mL}$, após 24 e 48 h de tratamento (ASADI-SAMANI *et al.*, 2019).

Frações obtidas do látex de *E. umbellata* foram avaliadas em linhagens modelo de câncer de mama (4T1 e MDA-MB 231), sendo que as frações clorofórmio e acetato

de etila foram citotóxicas com valores de CI_{50} de 5,9 e 4,3 $\mu\text{g/mL}$ (CABRAL *et al.*, 2020b) e, 6 e 4 $\mu\text{g/mL}$ (CABRAL *et al.*, 2020a) para linhagem 4T1. E para a linhagem MDA MB 231 os valores foram 5,8 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$ (CABRAL *et al.*, 2019) e, 6 e 2 $\mu\text{g/mL}$ (CABRAL *et al.*, 2020a).

O potencial citotóxico das frações de látex de *E. umbellata* foram determinados para outras linhagens como HRT-18, HeLa e Jurkat apresentando valores de CI_{50} entre 1,87 e 180,44 $\mu\text{g/mL}$. Sendo que a fração hexano foi a mais potente frente a todas as linhagens com valores de CI_{50} de: 26,16 (HRT-18); 30,50 (HeLa) e 1,87 $\mu\text{g/mL}$ (Jurkat) após 72 h de tratamento (LUZ *et al.*, 2016).

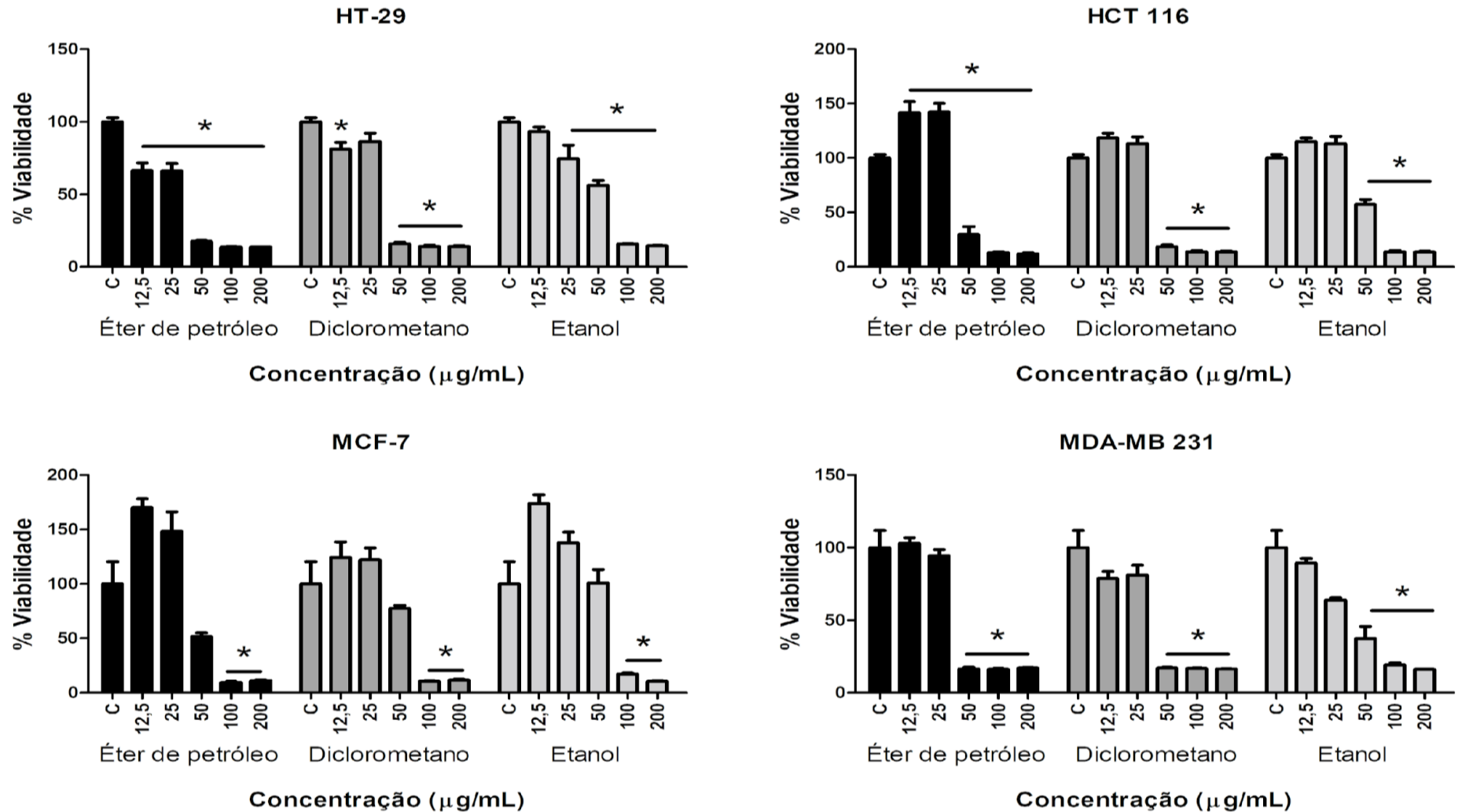
Na linhagem B16F10, a fração hexano apresentou um valor de CI_{50} de 18,02 $\mu\text{g/mL}$ (ANDRADE *et al.*, 2021). Enquanto que as frações clorofórmio e acetato de etila, quando avaliadas frente à mesma linhagem, revelaram CI_{50} de 13,7 $\mu\text{g/mL}$ e 2,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (ALVES *et al.*, 2020b). Outros estudos obtiveram CI_{50} de 2,8 e 2,1 $\mu\text{g/mL}$ (CABRAL *et al.*, 2019), e 3 e 2 $\mu\text{g/mL}$ (ALVES *et al.*, 2020a), para mesma linhagem e tempo de tratamento (24h).

As frações clorofórmio e acetato de etila também foram citotóxicas para a linhagem Hepa1c1c7, com valores de CI_{50} de 6,2 e 1,9 $\mu\text{g/mL}$ (CABRAL *et al.*, 2019), 6 e 2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (ALVES *et al.*, 2020a).

O látex *in natura* de *E. umbellata*, assim como sua diluição em água destilada são capazes de reduzir a viabilidade celular de células B16F10 (melanoma humano) em 64% e 40% após 48 h de tratamento (OLIVEIRA *et al.*, 2013); além disso, em 72 h de tratamento, o látex reduziu a viabilidade celular de células HRT-18 e HeLa em 50% nas concentrações de 263,42 e 252,58 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (LUZ *et al.*, 2015).

Cabe ressaltar que o solvente utilizado para a obtenção das frações altera o perfil químico da mesma, assim tem-se que diferentes matrizes vegetais possuem diferente seletividade ao tipo celular. Portanto, buscando concentrar os possíveis componentes ativos presentes na fração hexano, a fração mais apolar e identificada, em estudos prévios, como a mais potente, e incrementar o efeito citotóxico em avaliação, foi realizado um procedimento de refracionamento obtendo-se as subfrações éter de petróleo, diclorometano e etanol. Essas subfrações foram também avaliadas frente às linhagens HT-29, HCT 116, MFC-7, MDA-MB 231 (Figuras 14 e 15) e os valores de CI_{50} são apresentados na Tabela 5.

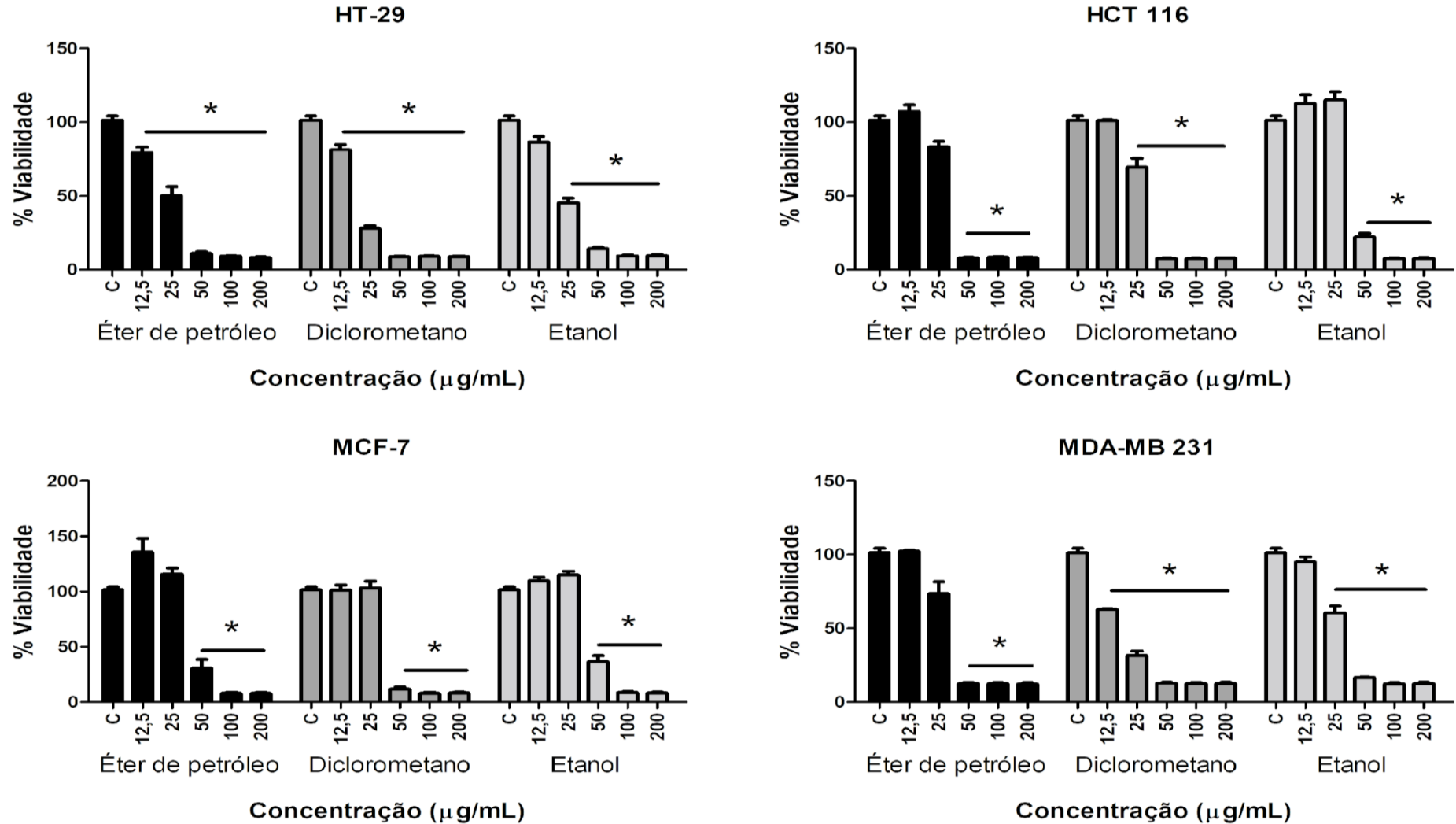
Figura 14 - Viabilidade celular das linhagens HT-29, HCT 116, MCF-7 e MDA-MB 231 após 24 h de tratamento com subfrações éter de petróleo, diclorometano e etanol.



Dados expressos como média + erro padrão da média de três experimentos independentes (n=2). C - Controle (solução veículo – DMSO 0,8%, em meio de cultivo). O símbolo * representa diferença estatística (p<0,001) em relação ao controle.

Fonte: a autora.

Figura 15 - Viabilidade celular das linhagens HT-29, HCT 116, MCF-7 e MDA-MB 231 após 48 h de tratamento com subfrações éter de petróleo, diclorometano e etanol.



Dados expressos como média + erro padrão da média de três experimentos independentes (n=2). C - Controle (solução veículo – DMSO 0,8%, em meio de cultivo). O símbolo * representa diferença estatística (p<0,001) em relação ao controle.

Fonte: a autora.

As subfrações da fração hexano reduziram a viabilidade celular, em mais de 50%, de todas as linhagens avaliadas, independentemente do tempo de tratamento. Porém, assim como observado para as frações, alguns tratamentos promoveram aumento da viabilidade celular. Assim como descrito para as frações, o aumento da redução do MTT pode estar associado com a estimulação metabólica causada por compostos presentes nas subfrações.

Tabela 5 - Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos após tratamento, por 24 e 48 h, com subfrações da fração hexano de látex de *Euphorbia umbellata*.

	HT-29		HCT 116		MCF-7		MDA-MB 231	
	24	48	24	48	24	48	24	48
Éter de petróleo	25,69± 24,36	24,10± 10,47	54,31± 14,02	38,78± 11,90	60,50± 38,08	51,25± 12,45	50,07± 16,87	39,48± 11,47
Diclorometano	37,67± 12,01	19,44± 7,49	51,37± 16,68	34,90± 10,36	72,47± 30,18	45,40± 15,10	36,42± 11,45	16,76± 1,50
Etanol	52,29± 7,19	25,79± 27,66	66,14± 23,15	48,39± 13,60	88,74± 14,76	53,25± 11,79	41,32± 6,57	34,82± 68,70

Dados expressos como $CI_{50} \pm$ erro padrão da média, calculados por análise de Probit, método de Finney.

Fonte: a autora.

Considerando apenas as subfrações e baseado nos valores de CI_{50} , tem-se que o tratamento mais eficiente foi, após 48 h, com a subfração diclorometano frente a linhagem MDA-MB 231, uma vez que se trata do menor valor de CI_{50} . Destaca-se ainda a alta sensibilidade da linhagem HT-29 que respondeu de forma semelhante aos três tratamentos após maior exposição. Além disso, de forma semelhante às frações, o tempo de tratamento reduziu os valores, indicando um perfil de tempo dependente, todavia a análise estatística não revelou diferença significativa entre os tratamentos ou sequer entre os tempos de tratamento.

Ao comparar os resultados obtidos para as subfrações ao da fração de origem, hexano, tem-se que o fracionamento, não potencializou o efeito citotóxico para essas linhagens, uma vez que também não houve diferença significativa entre os valores de CI_{50} .

Essas mesmas amostras foram avaliadas em linhagem Hepa1c1c7 e apresentaram valores de CI_{50} próximos de 8; 6; 12 $\mu\text{g/mL}$, para as subfrações éter de petróleo, diclorometano e etanol, respectivamente. Em linhagem B16F10 apenas a subfração etanol foi citotóxica com CI_{50} de 39 $\mu\text{g/mL}$ (ALVES *et al.*, 2020a; CABRAL *et al.*, 2019). Ao serem aplicadas em células de câncer de mama (MDA-MB 231 e 4T1) as subfrações diclorometano e etanol obtiveram valores de CI_{50} de 8 e 16 $\mu\text{g/mL}$, para

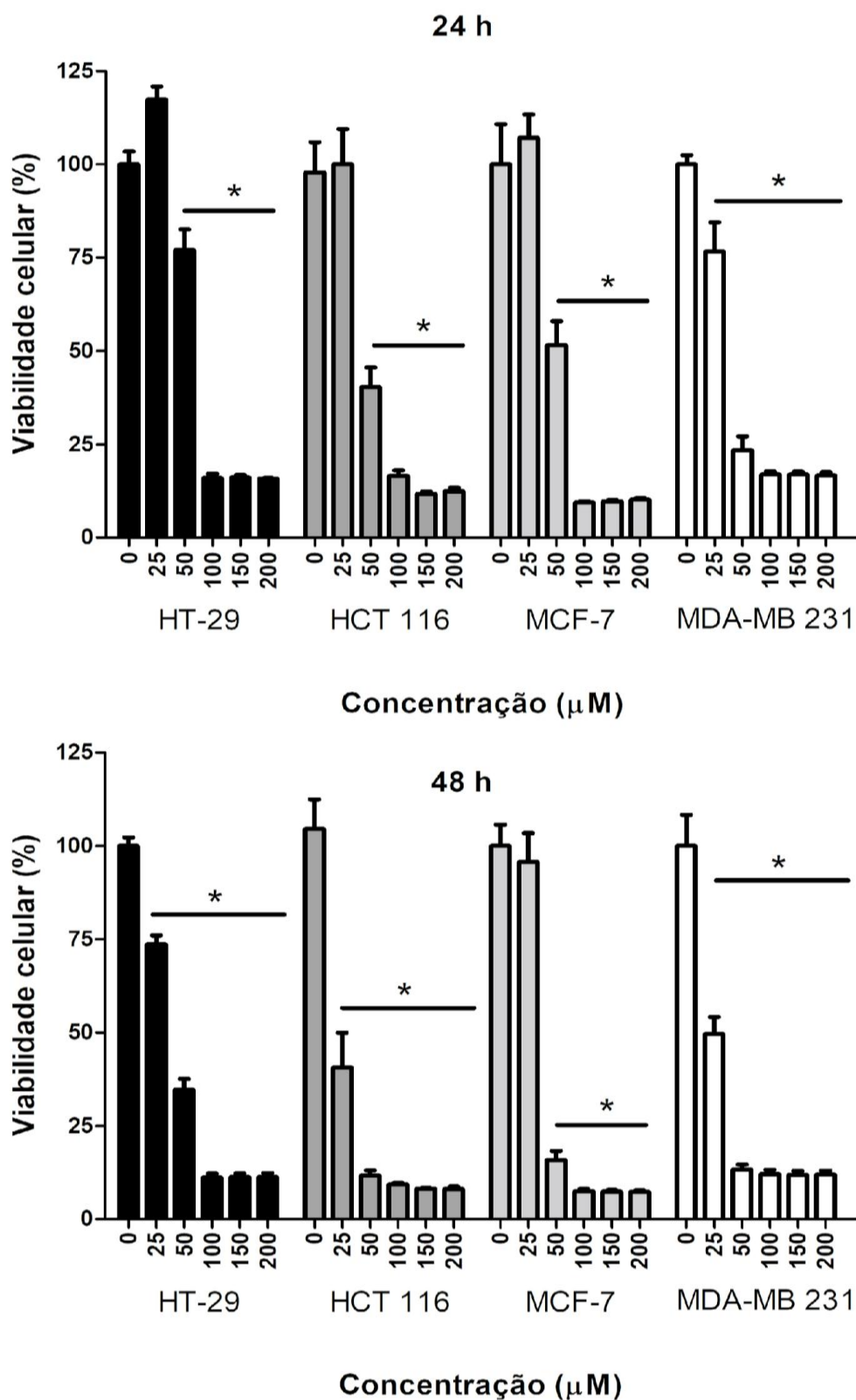
a linhagem MDA-MB 231, enquanto que para a linhagem 4T1, os valores foram 2 e 2,5 µg/mL, respectivamente (CABRAL *et al.*, 2020a).

O efeito citotóxico observado para essas linhagens está provavelmente associado à composição química das subfrações, as quais apresentam grande variedade de terpenos, principalmente triterpenos lanosteroides e diterpenos tigliano (ALVES *et al.*, 2020b; ANDRADE *et al.*, 2021; BISHAYEE, 2011; CRUZ *et al.*, 2020; DUARTE *et al.*, 2009; LAGE *et al.*, 2010; VASAS *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2015). Dessa forma, é possível que o fracionamento não tenha concentrado os compostos mais ativos, e sim os particionou/dividiu, inferindo que a proporção dos compostos encontrados na fração que exerce um efeito sinérgico.

Dos compostos majoritários presente no látex de *E. umbellata*, o eufol, um triterpeno pentacíclico, é o de maior percentual, estando presente na fração hexano e nas subfrações (CRUZ *et al.*, 2018) e seu potencial citotóxico foi também avaliado frente às linhagens modelo de câncer colorretal e de mama (Figura 16).

Os resultados obtidos para o eufol foram semelhantes aos observados para as frações e subfrações, no sentido que foi capaz de reduzir a viabilidade celular, em mais de 50%. Também ocorreu aumento da viabilidade celular em alguns tratamentos, porém não houve diferença estatística em relação ao controle. Como já descrito, esse aparente aumento de viabilidade pode ser resultado do aumento da estimulação metabólica provocada pelo eufol.

Figura 16 - Viabilidade celular das linhagens HT-29, HCT 116, MCF-7 e MDA-MB 231 após 24 e 48 h de tratamento com eufol.



Dados expressos como média + erro padrão da média de três experimentos independentes (n=2). O símbolo * representa diferença estatística ($p < 0,001$) em relação ao controle (solução veículo – DMSO 0,8%, em meio de cultivo)

Fonte: a autora.

Baseado nos valores de CI_{50} constata-se que há redução dos valores em consequência do aumento do tempo de tratamento, indicando um perfil de tempo dependência. Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os tempos de tratamento. A maior efetividade de tratamento foi alcançada com as linhagens HCT 116 e MDA-MB 231 após 48 h (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores de CI_{50} (μM) obtidos após tratamento, por 24 e 48 h, com eufol.

HT-29		HCT 116		MCF-7		MDA-MB 231	
24	48	24	48	24	48	24	48
77,94± 18,20	39,78± 9,19	58,58± 32,17	12,49± 44,57	60,14± 19,56	43,80± 12,15	38,23± 13,24	12,38± 9,09

Dados expressos como $CI_{50} \pm$ erro padrão da média, calculados por análise de Probit, método de Finney.

Fonte: a autora.

O potencial citotóxico do eufol já foi avaliado, por outros pesquisadores, frente a diversas linhagens celulares, incluindo linhagens HT-29, MCF-7 e MDA-MB 231, para os quais os valores de CI_{50} , após 72 h de tratamento, foram descritos como 6,52; 18,76; 9,08 μM , respectivamente (SILVA *et al.*, 2018). Também em 72 h, o eufol mostrou-se citotóxico com valor de CI_{50} de 70,1 μM , em linhagem HRT-18. Ademais, o tratamento com 234,4; 117,2 e 58,6 μM de eufol resultou em alterações morfológicas como arredondamento, condensação de cromatina e formação de *blebs*, indicando a ocorrência de um processo apoptótico (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

A respeito dos possíveis mecanismos de ação associados tem-se que eufol testado frente a células T47D (câncer de mama) causou parada de ciclo celular em fase G1 através da modulação da expressão de ciclina D1, proteínas p21 e p27. Entretanto, as concentrações mais baixas avaliadas (10 e 30 μM) dessa substância promoveram aumento da população em fase S (WANG, Lin *et al.*, 2013). Em células CS12 (câncer gástrico) o mecanismo de ação foi associado à ativação de caspase, parada de ciclo celular por indução de p27kip1 e inibição de ciclina B1 (LIN *et al.*, 2012). Enquanto que em células Mv1Lu o eufol foi capaz de interagir com a membrana plasmática e assim modular a sinalização de proteínas nela presente. Suprimindo a sinalização da proteína TGF- β , a qual é caracterizada por fosforilação da proteína Smad2 e transcrição da proteína PAI-1. Esse efeito é resultado da interação do eufol com a membrana plasmática (CHEN *et al.*, 2015).

Vale ressaltar que a substância isolada eufol, bem como as frações com maiores concentrações de triterpenos, frações apolares, apresentaram os mais baixos

valores de CI_{50} . Tal observação, sugere que a presença de triterpenos é importante para a ação citotóxica e essa pode estar associada à alteração das propriedades de adesão celular, uma vez que triterpenos são descritos como bloqueadores da adesão celular (TAKAMATSU, 2018).

Como já citado, além da avaliação de citotoxicidade é importante determinar o índice de seletividade dos tratamentos ao comparar os valores de CI_{50} obtidos para linhagens não tumorais e para linhagens tumorais, pelo mesmo método, após o mesmo período de tratamento. Nesse sentido, o efeito das frações, subfrações e eufol foram avaliados em células HEK-293 e esta linhagem não tumoral foi utilizada para cálculo do IS em razão a linhagens tumorais HT-29, HCT 116, MCF-7 e MDA-MB 231. Os valores de CI_{50} obtidos para as células não tumorais (HEK-293) são apresentados na Tabela 7, enquanto que na Tabela 8 são apresentados os valores correspondentes ao IS.

Tabela 7 - Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos para as células HEK-293 após tratamento, por 24 e 48 h, com frações, subfrações e eufol extraídos do látex de *Euphorbia umbellata*.

		24	48
Fração	Hexano	126,36 $\pm$ 32,75	97,08 $\pm$ 25,25
	Clorofórmio	130,74 $\pm$ 29,34	95,83 $\pm$ 26,80
	Acetato de etila	117,5 $\pm$ 29,56	76,51 $\pm$ 95,96
Subfração	Éter de petróleo	154,89 $\pm$ 82,60	106,47 $\pm$ 10,63
	Diclorometano	112,99 $\pm$ 33,53	112,15 $\pm$ 31,65
	Etanol	161,60 $\pm$ 8,91	93,37 $\pm$ 19,16
Substância isolada	Eufol	112,93 $\pm$ 16,06 μM	80,08 $\pm$ 23,64 μM

Dados expressos como $CI_{50} \pm$ erro padrão da média, calculados por análise de Probit, método de Finney.

Fonte: a autora.

Ayesh, Abed e Faris (2014) descrevem que valores de índice de seletividade inferior a 2 correlacionam a toxicidade não específica. Comparando as frações, as subfrações e o eufol, tem-se que apenas a subfração éter de petróleo apresentou valores de índice de seletividade acima de 2, para todas as linhagens testadas e em ambos os tempos de cultivo (Tabela 8). De forma semelhante, a única linhagem que com índices de seletividade superior a 2, para todos os tratamentos foi a linhagem MDA-MB 231, apresentando inclusive o maior índice de seletividade entre todos os tratamentos, $IS = 9,85$. Em relação especificamente ao eufol, composto isolado, destaca-se as altas seletividades ($IS = 6,41$ e $6,47$) obtidas após 48 h de tratamento das linhagens HCT 116 e MDA-MB 231.

Tabela 8 - Valores de índice de seletividade determinados após tratamento, por 24 e 48 h, com frações, subfrações e eufol obtidos do látex de *Euphorbia umbellata*.

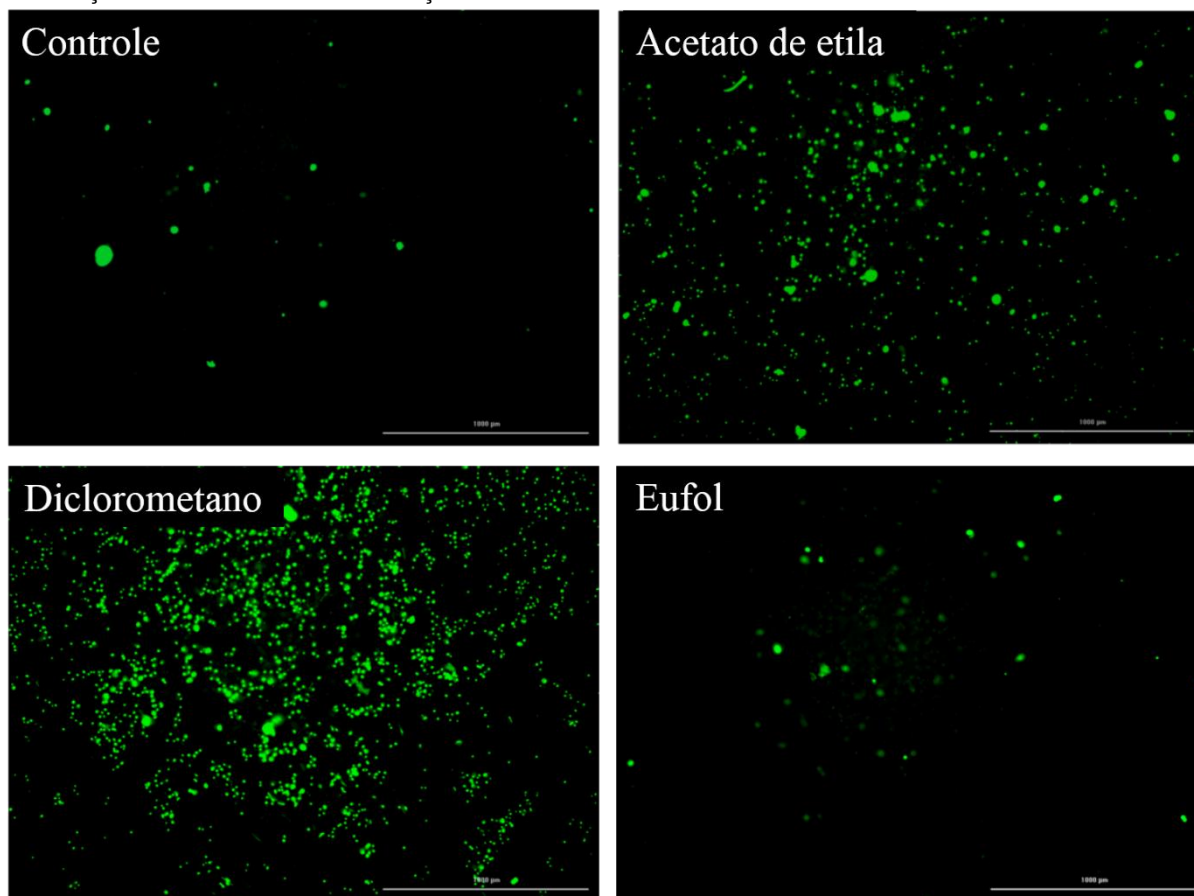
	HT-29		HCT 116		MCF-7		MDA-MB 231	
	24	48	24	48	24	48	24	48
Hexano	2,02	3,73	2,20	2,10	1,44	2,03	2,06	6,17
Clorofórmio	1,86	2,57	2,43	2,09	2,31	1,80	2,05	5,34
Acetato de etila	1,88	1,57	2,05	1,66	1,93	2,16	2,80	9,85
Éter de petróleo	6,03	4,42	2,85	2,75	2,56	2,08	3,09	2,70
Diclorometano	3,00	5,77	2,20	3,21	1,56	2,47	3,10	6,69
Etanol	3,09	3,62	2,44	1,93	1,82	1,75	3,91	2,68
Eufol	1,44	2,01	1,92	6,41	1,87	1,83	2,95	6,47

Fonte: a autora.

Uma vez observada a citotoxicidade e seletividade das matrizes vegetais e substância isolada, ensaio de ativação de caspases 3/7 foi realizado. Para tanto, selecionou-se a linhagem MDA-MB 231, a qual apresentou alta sensibilidade e seletividade aos tratamentos com fração acetato de etila e subfração diclorometano. O ensaio foi realizado utilizando o reagente de detecção CellEvent™ Caspase-3/7 o qual é um substrato fluorogênico para caspases 3 e 7 ativadas.

A linhagem MDA-MB 231 foi tratada por 6 h com fração acetato de etila, subfração diclorometano e eufol. As fotografias são apresentadas na Figura 17.

Figura 17 - Avaliação da ativação de caspases 3/7 em células MDA-MB 231 após 6 h de tratamento com fração acetato de etila e subfração diclorometano.



Meio de cultivo foi utilizado como controle. Imagens obtidas em aumento de 2,5x, barra = 1000 µm.
Fonte: a autora.

Com base nas fotografias observa-se que o tratamento, principalmente com a fração e subfração, foi capaz de induzir a ativação de caspase 3 e/ou 7. De forma similar, extratos hexano e metanol de caule de *E. tirucalli* também promoveram ativação de caspases 3 e 7 em linhagem MDA-MB 231 (CHOENE; MOTADI, 2016).

Esse resultado sugere que o efeito citotóxico observado se dê por meio de apoptose, uma vez que dentro do processo de morte celular, especialmente por apoptose, há ativação de caspases, sendo que as caspases 3 e 7 estão relacionadas a fase efetora da apoptose, não havendo, portanto, diferenciação entre as vias de ativação do processo apoptótico (SHALINI *et al.*, 2015).

6 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular tem-se que a exceção da fração metanol, as frações, subfrações e substância isolada, eufol, são citotóxicas às linhagens avaliadas. Destaca-se os baixos valores de CI_{50} obtidos com as subfrações diclorometano e etanol em ensaios com a linhagem K-562, inclusive inferiores ao valor da fração hexano. Demonstrando que para essa linhagem o fracionamento potencializou o efeito citotóxico.

As linhagens de câncer colorretal e de mama mostraram-se aparentemente mais resistentes ao tratamento, porém devido aos altos valores de desvio não é possível afirmar tal correlação. Para essas linhagens o fracionamento da fração hexano não resultou em maior efeito citotóxico. Dentre as linhagens estudadas, a MDA-MB 231, após 48 h de tratamento apresentou os menores valores de CI_{50} .

A respeito do índice de seletividade calculado para as linhagens de câncer colorretal e de mama (aderidas) observou-se ampla variação entre os diferentes tratamentos, alguns mais seletivos, com valores próximos de 10, porém com outros valores semelhantes ou inferiores a 2. De forma semelhante, a linhagem leucêmica apresentou índices de seletividade para a subfração de 7,42 e 9,11. O eufol, por sua vez, mostrou-se pouco seletivo na maioria das células, com valores expressivos apenas para as linhagens HCT 116 e MDA-MB 231, após 48 h de tratamento.

Os ensaios de mecanismo de ação envolvidos com a citotoxicidade revelaram que a fração acetato de etila, as subfrações diclorometano e etanol ativam caspases 3/7 em linhagens MDA-MB 231 e HL-60, os dois modelos celulares que apresentaram as melhores respostas no ensaio de viabilidade celular. As subfrações diclorometano e etanol também provocaram alterações morfológicas e de ciclo celular em linhagem leucêmica (HL-60). Bem como o eufol, o qual também causou alterações morfológicas e de ciclo celular em linhagem K-562, e ativação de caspases 3 e 7 em células MDA-MB 231. A soma desses resultados infere-se que os efeitos citotóxicos observados culminem na indução de apoptose.

Por fim, somando o efeito citotóxico obtido aos altos valores de índice de seletividade, especialmente para subfrações diclorometano em linhagem leucêmica, ressalta-se o potencial promissor das substâncias presentes nessa matriz vegetal para o desenvolvimento de um novo antitumoral.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-ATY, A. M.; HAMED, M. B.; SALAMA, W. H.; ALI, M. M.; FAHMY, A. S.; MOHAMED, S. A. *Ficus carica*, *Ficus sycomorus* and *Euphorbia tirucalli* latex extracts: Phytochemical screening, antioxidant and cytotoxic properties. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101199, 2019.
- AGHAEI, M.; YAZDINIPOUR, Z.; GHANADIAN, M.; ZOLFAGHARI, B.; LANZOTTI, V.; MIRSAFAEE, V. Obtusifoliol related steroids from *Euphorbia sogdiana* with cell growth inhibitory activity and apoptotic effects on breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB231). **Steroids**, v. 115, p. 90–97, 2016.
- AHMED, F.; ISHIBASHI, M. Bio-active natural products with TRAIL-Resistance overcoming activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 64, n. 2, p. 119–127, 2016.
- AL-EMAM, A.; AL-SHRAIM, M.; ALI EID, R.; JAMIL, A. M.; MOUSTAFA, M. F.; RADAD, K. Cytotoxicity of *Euphorbia peplus* extract on MCF7 breast cancer cells. **Folia Biologica (Poland)**, v. 67, n. 3, p. 127–139, 2019.
- AL-FAIFI, Z. I. A.; MASRAHI, Y. S.; ALY, M. S.; AL-TURKI, T. A.; DARDEER, T. Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of *Euphorbia triaculeata* Forssk . extract. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, p. 771–777, 2017.
- AL-YOUSEF, H. M.; ALQAHTANI, A. S.; GHANI, A. S. A.; EL-TOUMY, S. A.; EL-DOUGDOUG, W. I. A.; HASSAN, W. H. B.; HASSAN, H. M. Nephroprotective, cytotoxic and antioxidant activities of *Euphorbia paralias*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 785–792, 2021.
- ALIOMRANI, M.; JAFARIAN, A.; ZOLFAGHARI, B. Phytochemical Screening and Cytotoxic evaluation of *Euphorbia turcomanica* on Hela and HT-29 tumor cell lines. **Advanced Biomedical Research**, v. 6, p. 1–5, 2017.
- ALJUBIRI, S. M.; MAHGOUB, S. A.; ALMANSOUR, A. I.; SHAABAN, M.; SHAKER, K. H. Isolation of diverse bioactive compounds from *Euphorbia balsamifera*: Cytotoxicity and antibacterial activity studies. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 417–426, 2021.
- ALONAZI, M.; HORCHANI, H.; ALWHIBI, M.; BACHA, A. Ben. Cytotoxic, antioxidant, and metabolic enzyme inhibitory activities of *Euphorbia cyparissias* extracts. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.
- ALVES, M. G.; CABRAL, L. G. de S.; CONCEIÇÃO, T. de O.; GOMES, A.; OLIVEIRA, T. A. D.; LAISO, R. A. N.; MARIA, D. A. Antiproliferative response induced *Euphorbia umbellata* fractions and subfractions in melanoma and hepatocellular carcinoma tumor cells. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 5, p. 32–40, 2020a.
- ALVES, M. G.; CABRAL, L. G. de S.; CRUZ, L. S.; BELTRAME, F. L.; LUNA, A. C. de L.; MARIA, D. A. Induced antiproliferative responsive by fraction of *Euphorbia umbellata* latex inhibits melanoma tumor cells. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 8, n. 5, p. 125–133, 2020b.

- AMBROGGI, M.; BIASINI, C.; DEL GIOVANE, C.; FORNARI, F.; CAVANNA, L. Distance as a barrier to cancer diagnosis and treatment: review of the literature. **The Oncologist**, v. 20, n. 12, p. 1378–1385, 2015.
- AMIRGHOFNAN, Z.; BAHMANI, M.; AZADMEHR, A.; JAVIDNIA, K. 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.
- AMIRGHOFNAN, Z.; MALEK-HOSSEINI, S.; GHOLMOGHADDAM, H.; KALALINIA, F. Inhibition of tumor cells growth and stimulation of lymphocytes by *Euphorbia* species. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 33, n. 1, p. 34–42, 2011.
- ANDRADE, E. A. De; CRUZ, L. S.; MACHINSKI, I.; VENTURA, A. C. T.; CARLETTO, B.; SABRINA PALUDO, K.; LIPINSKI, L. C.; MEURER, E. C.; BELTRAME, F. L. Terpenes of *Euphorbia umbellata* latex are involved in cytotoxic effect against melanoma cells. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 4, p. 26–37, 2021.
- ASADI-SAMANI, M.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; LORIGOOINI, Z.; SHIRZAD, H. The effect of *Euphorbia szovitsii* Fisch . & C . A . Mey extract on the viability and the proliferation of MDA-MB-231 cell line. **Bioscience Reports**, p. 1–8, 2019.
- AYESH, B. M.; ABED, A. A.; FARIS, D. M. *In vitro* inhibition of human leukemia THP-1 cells by *Origanum syriacum* L . and *Thymus vulgaris* L . extracts. **BMC Research Notes**, v. 7, p. 1–6, 2014.
- BADGUJAR, S. B. Evaluation of hemostatic activity of latex from three Euphorbiaceae species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 733–739, 2014.
- BAILON-MOSCOSO, N.; CEVALLOS-SOLORZANO, G.; ROMERO-BENAVIDES, J. C.; ORELLANA, M. I. R. Natural compounds as modulators of cell cycle arrest: application for anticancer chemotherapies. **Current Genomics**, v. 18, p. 106–131, 2017.
- BASKIC, D.; POPOVIC, S.; RISTIC, P.; ARSENIJEVIC, N. N. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes : Fluorescence microscopy using annexin V / propidium iodide versus acridin orange / ethidium bromide. **Cell Biology International**, v. 30, p. 924–932, 2006.
- BASU, P.; MEZA, E.; BERGEL, M.; MAIER, C. Estrogenic, antiestrogenic and antiproliferative activities of *Euphorbia bicolor* (euphorbiaceae) latex extracts and its phytochemicals. **Nutrients**, v. 12, n. 59, 2019.
- BEHERA, B.; DASH, J.; PRADHAN, D.; TRIPATHY, G.; PRADHAN, R. 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.
- BISHAYEE, A. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, n. 1, p. 980, 2011.

BLACKADAR, C. B. Historical review of the causes of cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 1, p. 54–86, 2016.

BRUNETTI, R. L.; DA PAZ, D. P. A.; MACKOWIAK DA FONSECA, I. I.; NAGAMINE, M. K.; MORI, C. M. C.; DEL GRANDE, M. P.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.; SALLES-GOMES, C. O. M.; DAGLI, M. L. Z.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Inhibitory effects of *Euphorbia tirucalli* latex on murine B16/F10 melanoma cells and lung metastasis. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 11, n. 5, p. 511–516, 2019.

CABRAL, L. G. de S.; ALVES, M. G.; CONCEIÇÃO, T. de O.; OLIVEIRA, T. A. D.; GOMES, A.; LAISO, R. A. N.; MARIA, D. A.; DE, T.; CONCEIÇÃO, O. Natural bioactive from *Euphorbia umbellata* latex as a modulator of mitochondrial activity in breast cancer cells. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 5, p. 823–829, 2020a.

CABRAL, L. G. de S.; ALVES, M. G.; SILVA, M. G. L.; CRUZ, L. S.; BELTRAME, F. L.; LUNA, A. C. de L.; MARIA, D. A. Antitumor potential of *Euphorbia umbellata* latex fractions and subfractions. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 7, n. 5, p. 45–51, 2019.

CABRAL, L. G. de S.; ALVES, M. G.; SOUZA, G. O. D. De; CRUZ, L. S.; BELTRAME, F. L.; LUNA, A. C. de L.; MARIA, D. A. Fraction of latex of *Euphorbia umbellata* induced inhibitory proliferation in triple negative breast tumor cell. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 8, n. 4, p. 93–100, 2020b.

CAETANO, N. L. de B.; AMARAL, R. G.; NEO, G. G. de A.; DOS SANTOS, S. A.; ANDRADE, L. N.; DE ANDRADE, L. R. M.; SEVERINO, P.; CARVALHO, A. A. Uso de Plantas medicinais e fitoterápicos por pacientes submetidos a tratamento antineoplásico no serviço de saúde privado no estado de Sergipe - Brasil. **Cadernos de graduação ciências biológicas e da saúde**, v. 5, n. 1, p. 163–176, 2018.

CAMPOS, A.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; LONGATO, G. B.; ZERMIANI, T.; RUIZ, A. L. T. G.; DE CARVALHO, J. E.; PANDIELLA, A.; CECHELIN FILHO, V. Antiproliferative effect of *Synadenium grantii* Hook f. stems (euphorbiaceae) and a rare phorbol diterpene ester. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 666–671, 2016.

CHEMSPIDER. **Euphol**. 2021. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.390292.html>>. Acesso em: 5 jun. 2021.

CHEN, C. L.; CHEN, Y. P.; LIN, M. W.; HUANG, Y. Bin; CHANG, F. R.; DUH, T. H.; WU, D. C.; WU, W. C.; KAO, Y. C.; YANG, P. H. Euphol from *Euphorbia tirucalli* negatively modulates TGF- β responsiveness via TGF- β receptor segregation inside membrane rafts. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–22, 2015.

CHENG, F.; YANG, Y.; ZHANG, L.; CAO, Y.; YAO, W.; TANG, Y.; DING, A. A Natural triterpene derivative from *Euphorbia kansui* inhibits cell proliferation and induces apoptosis against rat intestinal epithelioid cell line *in vitro*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 18956–18975, 2015.

CHOENE, M.; MOTADI, L. Validation of the antiproliferative effects of *Euphorbia tirucalli* extracts in breast cancer cell lines. **Molecular Cell Biology**, v. 50, n. 1, p. 98–110, 2016.

CHOODEJ, S.; PUDHOM, K. Cycloartane triterpenoids from the leaves of *Euphorbia neriifolia*. **Phytochemistry Letters**, v. 35, p. 1–5, 2020.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A. De; MORAES, M. O. De. The Contribution of natural products as source of new anticancer drugs: studies carried out at the national experimental oncology laboratory from the federal university of Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47–58, 2010.

COSTA, L. L. G.; DAVID, V. C.; PINTO, R. M. C.; MINOZZO, B. R.; KOZLOWSKI, V. A.; CAMPOS, L. A.; SILVA, R. Z.; BELTRAME, F. L. Anti-ulcer activity of *Synadenium grantii* latex. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p. 1070–1078, 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products : A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CRUZ, L. S. **Avaliação da atividade citotóxica de subfrações do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns e euphol**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2017.

CRUZ, L. S.; DE OLIVEIRA, T. L.; KANUNFRE, C. C.; PALUDO, K. S.; MINOZZO, B. R.; PRESTES, A. P.; WANG, M.; FERNANDES, D.; SANTOS, F. A. do.; MANDA, V. K.; KHAN, S. I.; ALI, Z.; DE MESSIAS-REASON, I. J.; AVULA, B.; KHAN, I. A.; BELTRAME, F. L. Pharmacokinetics and cytotoxic study of euphol from *Euphorbia umbellata* (Bruyns) Pax latex. **Phytomedicine**, v. 47, p. 105–112, 2018.

CRUZ, L. S.; KANUNFRE, C. C.; ANDRADE, E. A. De; OLIVEIRA, A. A. De; CRUZ, L. S.; MOSS, M. de F.; SASSAKI, G. L.; MENEZES, L. R. A.; WANG, M.; KHAN, I. A.; BELTRAME, F. L. Enriched Terpenes fractions of the latex of *Euphorbia umbellata* promote apoptosis in leukemic cells. **Chemistry and Biodiversity**, v. 17, 2020.

DU, K.; YANG, X.; LI, J.; MENG, D. Antiproliferative diterpenoids and acetophenone glycoside from the roots of *Euphorbia fischeriana*. **Phytochemistry**, v. 177, p. 112437, 2020.

DUARTE, N.; LAGE, H.; FERREIRA, M. J. U. Three new jatrophone polyesters and antiproliferative constituents from *Euphorbia tuckeyana*. **Planta Medica**, v. 74, p. 61–68, 2008.

DUARTE, N.; RAMALHETE, C.; VARGA, A.; MOLNÁR, J.; FERREIRA, M. J. U. Multidrug resistance modulation and apoptosis induction of cancer cells by terpenic compounds isolated from *Euphorbia* species. **Anticancer Research**, v. 29, n. 11, p. 4467–4472, 2009.

DUONG, T.; BENIDDIR, M. A.; GENTA-JOUE, G.; NGUYEN, H.; NGUYEN, D.;

NGUYEN, T.; MAC, D.; BOUSTIE, J.; NGUYEN, K.-P.-P.; CHAVASIRI, W.; LE POGAM, P. Further terpenoids from *Euphorbia tirucalli*. **Fitoterapia**, v. 135, p. 44–51, 2019.

DUTTA, S.; MAHALANOBISH, S.; SAHA, S.; GHOSH, S.; SIL, P. C. Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 128, p. 240–255, 2019.

ERNST, M.; NOTHIAS, L. F.; VAN DER HOOFT, J. J. J.; SILVA, R. R.; SASLIS-LAGOUDAKIS, C. H.; GRACE, O. M.; MARTINEZ-SWATSON, K.; HASSEMER, G.; FUNEZ, L. A.; SIMONSEN, H. T.; MEDEMA, M. H.; STAERK, D.; NILSSON, N.; LOVATO, P.; DORRESTEIN, P. C.; RØNSTED, N. Assessing specialized metabolite diversity in the cosmopolitan plant genus *Euphorbia* L. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 846, 2019.

FANG, J.; LIU, C.; WANG, Q.; LIN, P.; CHENG, F. In silico polypharmacology of natural products. **Briefings in Bioinformatics**, v. 19, n. 6, p. 1153–1171, 2017.

FATOPE, M. O.; ZENG, L.; OHAYAGA, J. E.; SHI, G.; MCLAUGHLIN, J. L. Selectively cytotoxic diterpenes from *Euphorbia poissonii*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 4, p. 1005–1008, 1996.

FEI, D. Q.; DONG, L. Le; QI, F. M.; FAN, G. X.; LI, H. H.; LI, Z. Y.; ZHANG, Z. X. 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.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animals Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**. 7. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2016.

FU, Z.; HAN, X.; DU, J.; HAN, X.; LIU, W.; SHAO, S.; LIU, X. *Euphorbia lunulata* extract acts on multidrug resistant gastric cancer cells to inhibit cell proliferation, migration and invasion, arrest cell cycle progression, and induce apoptosis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, p. 8–17, 2018.

FU, Z.; HAN, X.; WANG, A.; LIU, X. Apoptosis of human gastric carcinoma cells induced by *Euphorbia esula* latex. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 13, p. 3564–3572, 2016.

GAO, Jie; CHEN, Q. Bin; LIU, Y. Q.; XIN, X. L.; YILI, A.; AISA, H. A.; AKBER, H. Diterpenoid constituents of *Euphorbia macrorrhiza*. **Phytochemistry**, v. 122, p. 246–253, 2016a.

GAO, J.; GAO, L.; ZHANG, L.; YAO, W.; CAO, Y.; BAO, B.; DING, A. 3-O-(2'E,4'Z-decadienoyl)-20-O-acetylingenol induces apoptosis in intestinal epithelial cells of rats via mitochondrial pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 331–338, 2015.

GAO, Suyu; SUN, D.; WANG, G.; ZHANG, J.; JIANG, Y.; LI, G.; ZHANG, K.; WANG, L.; HUANG, J.; CHEN, L. Growth inhibitory effect of paratocarpin E , a prenylated

chalcone isolated from *Euphorbia humifusa* Wild., by induction of autophagy and apoptosis in human breast cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, p. 121–128, 2016b.

GHRAMH, H. A.; KHAN, K. A.; IBRAHIM, E. H. Biological activities of *Euphorbia peplus* leaves ethanolic extract and the extract fabricated gold nanoparticles (AuNPs). **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1431, 2019.

GORDON, J. L.; BROWN, M. A.; REYNOLDS, M. M. Cell-based methods for determination of efficacy for candidate therapeutics in the clinical management of cancer. **Diseases**, v. 6, n. 85, p. 1–13, 2018.

GUAMÁN-ORTIZ, L. M.; ORELLANA, M. I. R.; RATOVITSKI, E. A. Natural compounds as modulators of non-apoptotic cell death in cancer cells. **Current Genomics**, v. 18, p. 132–155, 2017.

GUO, Q.; CAO, H.; QI, X.; LI, H.; YE, P.; WANG, Z.; WANG, D.; SUN, M. Research progress in reversal of tumor multi-drug resistance via natural products. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 1466–1476, 2017.

HAN, M. H.; LEE, W. S.; NAGAPPAN, A.; KIM, H. J.; PARK, C.; KIM, G. Y. G.; HONG, S. H.; KIM, N. D.; KIM, G. Y. G.; RYU, C. H.; SHIN, S. C.; CHOI, Y. H. Polyphenols from Korean prostrate spurge *Euphorbia supina* induce apoptosis through the Fas-associated extrinsic pathway and activation of ERK in human leukemic U937 cells. **Oncology Reports**, v. 36, n. 1, p. 99–107, 2016.

HASAN, A.; LIU, G. Y.; HU, R.; AISA, H. A. Jatrophone diterpenoids from *Euphorbia glomerulans*. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 4, p. 724–734, 2019.

HASSAN, E. M.; MOHAMMED, M. M. D.; MOHAMED, S. M. Two new phorbol-type diterpene esters from *Synadenium grantii* Hook F. leaves. **Records of Natural Products**, v. 6, n. 3, p. 255–262, 2012.

HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127–129, 2017.

HE, J.; XU, J. K.; GUO, L. B.; XIA, C. Y.; LIAN, W. W.; TIAN, H. Y.; ZHANG, J.; SHI, Y. X.; ZHANG, W. K. Fischdiabetane A, an antitumoral diterpenoid dimer featuring an unprecedented carbon skeleton from *Euphorbia fischeriana*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 86, n. 8, p. 5894–5900, 2021.

HOU, J.; SHEN, Y.; YANG, Z.; FANG, L.; CAI, L.; YAO, S.; LONG, H.-L.; WU, W.-Y.; GUO, D.-A. Anti-proliferation activity of terpenoids isolated from *Euphorbia kansui* in human cancer cells and their structure-activity relationship. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 10, p. 766–774, 2017.

HOU, P.; ZENG, Y.; MA, B.; BI, K.; CHEN, X. A new cytotoxic cembrane diterpene from the roots of *Euphorbia pekinensis* Rupr. **Fitoterapia**, v. 90, p. 10–13, 2013.

HSIEH, W.-T.; LIN, H.-Y.; CHEN, J.-H.; LIN, W.-C.; KUO, Y.-H.; WOOD, W. G.; LU, H.-F.; CHUNG, J.-G. 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, p. 1205–1215, 2014.

HSIEH, W. T.; LIN, H. Y.; CHEN, J. H.; KUO, Y. H.; FAN, M. J.; WU, R. S. C.; WU, K. C.; WOOD, W. G.; CHUNG, J. G. Latex of *Euphorbia antiquorum* induces apoptosis in human cervical cancer cells via c-Jun N-terminal kinase activation and reactive oxygen species production. **Nutrition and Cancer**, v. 63, n. 8, p. 1339–1347, 2011.

HSIEH, Y. J.; CHANG, C. J.; WAN, C. F.; CHEN, C. P.; CHIU, Y. H.; LEU, Y. L.; PENG, K. C. *Euphorbia formosana* root extract induces apoptosis by caspase-dependent cell death via fas and mitochondrial pathway in THP-1 human leukemic cells. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1949–1962, 2013.

HU, R.; GAO, J.; ROZIMAMAT, R.; AISA, H. A. Jatrophone diterpenoids from *Euphorbia sororia* as potent modulators against P-glycoprotein-based multidrug resistance. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 146, p. 157–170, 2018.

HU, R.; SANG, J.; LI, W.; TIAN, Y.; ZOU, M. F.; TANG, G. H.; YIN, S. Structurally diverse triterpenoids with cytotoxicity from *Euphorbia hypericifolia*. **Fitoterapia**, v. 151, p. 104888, 2021.

HUA, J.; LUO, S.; LIU, Y.; LIU, Y.; TAN, Y.; FENG, L.; XIAO, C.-J.; ZHANG, K.; LI, S.; NIU, X. New bioactive macrocyclic diterpenoids from *Euphorbia helioscopia*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 14, p. 1–7, 2017.

ICHIM, G.; TAIT, S. W. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. **Nature Publishing Group**, 2016.

INCA. **Estatísticas de câncer**. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 1 jul. 2021.

ISHIBASHI, M. Screening for natural products that affect Wnt signaling activity. **Journal of Natural Medicines**, 2019.

JAIN, C. K.; MAJUMDER, H. K.; ROYCHOUDHURY, S. Natural compounds as anticancer agents targeting DNA topoisomerases. **Current Genomics**, v. 18, p. 75–92, 2017.

JANNET, B. S.; HYMERY, N.; BOURGOU, S.; JDEY, A.; LACHAAL, M.; MAGNÉ, C.; KSOURI, R. Antioxidant and selective anticancer activities of two *Euphorbia* species in human acute myeloid leukemia. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 90, p. 375–385, 2017.

KANUNFRE, C. C.; LEFFERS, T.; CRUZ, L. S.; LUZ, L. E. C.; CRISMA, A. R.; WANG, M.; AVULA, B.; KHAN, I. A.; BELTRAME, F. L. *Euphorbia umbellata* bark extracts – An in vitro cytotoxic study. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 2, p. 206–213, 2017.

KIM, C.; KIM, B. Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress-mediated apoptosis: A review. **Nutrients**, v. 10, n. 1021, p. 1–29, 2018.

KINGHORN, A. D.; CHIN, Y.-W.; SWANSON, S. M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. **Current opinion in drug discovery &**

development, v. 12, n. 2, p. 189–196, 2009.

KO, Y. S.; LEE, W. S.; JOO, Y. N.; CHOI, Y. H.; KIM, G. S.; JUNG, J.-M.; RYU, C. H.; SHIN, S. C.; KIM, H. J. Polyphenol mixtures of *Euphorbia supina* the inhibit invasion and metastasis of highly metastatic breast cancer MDA-MB-231 cells. **Oncology Reports**, v. 34, p. 3035–3042, 2015.

KWAN, Y. P.; SAITO, T.; IBRAHIM, D.; AL-HASSAN, F. M. S.; OON, C. E.; CHEN, Y.; JOTHY, S. L.; KANWAR, J. R.; SASIDHARAN, S. Evaluation of the cytotoxicity , cell-cycle arrest , and apoptotic induction by *Euphorbia hirta* in MCF-7 breast cancer cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 7, p. 1223–1236, 2016.

LAGE, H.; DUARTE, N.; COBURGER, C.; HILGEROTH, A.; FERREIRA, M. J. U. Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells. **Phytomedicine**, v. 17, n. 6, p. 441–448, 2010.

LI, J. C.; FENG, X. Y.; LIU, D.; ZHANG, Z. J.; CHEN, X. Q.; LI, R. T.; LI, H. M. Diterpenoids from *Euphorbia neriifolia* and their related anti-HIV and cytotoxic activity. **Chemistry and Biodiversity**, v. 16, n. 12, p. e1900495, 2019.

LIFE TECHNOLOGIES. **CellEvent™ Caspase-3 / 7 Green Detection Reagent**, 2017.

LIN, M. W.; LIN, A. S.; WU, D. C.; WANG, S. S. W.; CHANG, F. R.; WU, Y. C.; HUANG, Y. Bin. Euphol from *Euphorbia tirucalli* selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 12, p. 4333–4339, 2012.

LIN, S.; CHANG, C.; HSU, C.; TSAI, M.; CHENG, H.; LEONG, M. K.; SUNG, P.; CHEN, J.; WENG, C. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 6, p. 1409–1423, 2020.

LIN, S. R.; FU, Y. S.; TSAI, M. J.; CHENG, H.; WENG, C. F. Natural compounds from herbs that can potentially execute as autophagy inducers for cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, 2017.

LIU, C.; LIAO, Z. X.; LIU, S. J.; QU, Y. B.; WANG, H. S. Two new diterpene derivatives from *Euphorbia lunulata* Bge and their anti-proliferative activities. **Fitoterapia**, v. 96, p. 33–38, 2014.

LIU, D.; CHEN, L.; ZHAO, H.; VAZIRI, N. D.; MA, S. C.; ZHAO, Y. Y. Small molecules from natural products targeting the Wnt/ β -catenin pathway as a therapeutic strategy. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 117, p. 108990, 2019.

LU, J.; LI, G.; HUANG, J.; ZHANG, C.; ZHANG, L.; ZHANG, K.; LI, P.; LIN, R.; WANG, J. Lathyrane-type diterpenoids from the seeds of *Euphorbia lathyris*. **Phytochemistry**, v. 104, p. 79–88, 2014.

LUO, H.; WANG, A. Induction of apoptosis in K562 cells by jolkinolide B. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 84, p. 959–965, 2006.

- LUZ, L. E. C.; KANUNFRE, C. C.; PALUDO, K. S.; DA SILVA JUSTO, A.; PETRY, V. K.; LEMES, B. M.; BARISON, A.; NEPEL, A.; WANG, M.; AVULA, B.; KHAN, I. A.; BELTRAME, F. L. Cytotoxic biomonitored study of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 29–37, 2016.
- LUZ, L. E. C.; PALUDO, K. S.; SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; KLEIN, T.; SILVA, R. Z.; BELTRAME, F. L.; BUDEL, J. M. Cytotoxicity of latex and pharmacobotanical study of leaves and stem of *Euphorbia umbellata* (Janaúba). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 4, p. 344–352, 2015.
- MAI, Z.; NI, G.; LIU, Y.; ZHANG, Z.; LI, L.; CHEN, N.; YU, D. Helioscopianoids A–Q, bioactive jatrophone diterpenoid esters from *Euphorbia helioscopia*. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 5, p. 805–817, 2018.
- MARTINS, C. G.; APPEL, M. H.; COUTINHO, D. S. S.; SOARES, I. P.; FISCHER, S.; DE OLIVEIRA, B. C.; FACHI, M. M.; PONTAROLO, R.; BONATTO, S. J. R.; FERNANDES, L. C.; IAGHER, F.; DE SOUZA, L. M. Consumption of latex from *Euphorbia tirucalli* L. promotes a reduction of tumor growth and cachexia, and immunomodulation in Walker 256 tumor-bearing rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 255, p. 112722, 2020.
- MENG, X. H.; WANG, K.; CHAI, T.; GUO, Z. Y.; ZHAO, M.; YANG, J. L. Ingenane and jatrophone diterpenoids from *Euphorbia kansui* and their antiproliferative effects. **Phytochemistry**, v. 172, p. 112257, 2020.
- MENON, M.; VITHAYATHIL, P. J.; RAJU, S. M.; RAMADOSS, C. S. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, “P”. **Plant Science**, v. 163, n. 1, p. 131–139, 2002.
- MERARCHI, M.; SETHI, G.; SHANMUGAM, M. K.; FAN, L.; ARFUSO, F.; AHN, K. S. Role of natural products in modulating histone deacetylases in cancer. **Molecules**, v. 24, n. 1047, p. 1–15, 2019.
- MESAS, C.; MARTÍNEZ, R.; ORTÍZ, R.; GALISTEO, M.; LÓPEZ-JURADO, M.; CABEZA, L.; PERAZZOLI, G.; MELGUIZO, C.; PORRES, J. M.; PRADOS, J. Antitumor effect of the ethanolic extract from seeds of *Euphorbia lathyris* in colorectal cancer. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 1–17, 2021.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MOTA, M. F. Da; BENFICA, P. L.; BATISTA, A. C.; MARTINS, F. S.; DE PAULA, J. R.; VALADARES, M. C. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 319–329, 2012.
- MOTA, M. F. Da; BENFICA, P. L.; VALADARES, M. C. *Synadenium umbellatum* Pax. promotes cell cycle arrest and induces apoptosis in K-562 leukemia cells. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 497–505, 2012.
- MUNHOZ, A. C. M.; MINOZZO, B. R.; CRUZ, L. S.; OLIVEIRA, T. L.; MACHADO, W.

M.; PEREIRA, A. V.; FERNANDES, D.; MANENTE, F. A.; VELLOSA, J. C. R.; NEPEL, A.; BARISON, A.; BELTRAME, F. L. Chemical and pharmacological investigation of the stem bark of *Synadenium grantii*. **Planta Medica**, v. 80, n. 6, p. 458–464, 2014.

MUNRO, B.; VUONG, Q.; CHALMERS, A.; GOLDSMITH, C.; BOWYER, M.; SCARLETT, C. Phytochemical, antioxidant and anti-cancer properties of *Euphorbia tirucalli* methanolic and aqueous extracts. **Antioxidants**, v. 4, n. 4, p. 647–662, 2015.

NETO, S.; DUARTE, N.; PEDRO, C.; SPENGLER, G.; MOLNÁR, J.; FERREIRA, M.-J. U. Effective MDR reversers through phytochemical study of *Euphorbia boetica*. **Phytochemical analysis**, v. 30, p. 498–511, 2019.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NOGUEIRA, I. A. L.; LEÃO, A. B. B.; VIEIRA, M. de S.; BENFICA, P. L.; DA CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 474–478, 2008.

OLIVEIRA, T. L. De; BAVIA, L.; FONTANA, P. D.; CRUZ, L. S.; PALUDO, K. S.; CRISMA, A. R.; MESSIAS-REASON, I. J.; BELTRAME, F. L. Immunomodulatory and cytotoxic activities of euphol. **Life Sciences**, v. 280, p. 119700, 2021.

OLIVEIRA, T. L. De; MUNHOZ, A. C. M.; LEMES, B. M.; MINOZZO, B. R.; NEPEL, A.; BARISON, A.; FÁVERO, G. M.; CAMPAGNOLI, E. B.; BELTRAME, F. L. 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**. 2° ed. Brasília: Thesaurus, 1997.

PALHARINI, J. G.; RICHTER, A. C.; SILVA, M. F.; FERREIRA, F. B.; PIROVANI, C. P.; NAVES, K. S. C.; GOULART, V. A.; MINEO, T. W. P.; SILVA, M. J. B.; SANTIAGO, F. M. Eutirucallin : a lectin with antitumor and antimicrobial properties. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1–13, 2017.

PARK, S. A.; SURH, Y. J. Modulation of tumor microenvironment by chemopreventive natural products. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1401, n. 1, p. 65–74, 2017.

PASCAL, O. A.; BERTRAND, A. E. V.; ESAÏE, T.; SYLVIE, H. M.; ELOI, A. Y. A review of the ethnomedical uses, phytochemistry and pharmacology of the *Euphorbia* genus. **The Plant Innovation Journal**, v. 6, n. 1, p. 34–39, 2017.

PFEFFER, C. M.; SINGH, A. T. K. Apoptosis: A target for anticancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 448, 2018.

PRŠA, P.; KARADEMIR, B.; BIÇIM, G.; MAHMOUD, H.; DAHAN, I.; YALÇIN, A. S.; MAHAJNA, J.; MILISAV, I. The potential use of natural products to negate hepatic, renal and neuronal toxicity induced by cancer therapeutics. **Biochemical**

Pharmacology, 2019.

QU, Y.; LIAO, Z.; LIU, C.; WANG, X.; ZHANG, J. EFLDO induces apoptosis in hepatic cancer cells by caspase activation *in vitro* and suppresses tumor growth *in vivo*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 100, p. 407–416, 2018.

RAJESH, R.; NATARAJU, A.; GOWDA, C. D. R.; FREY, B. M.; FREY, F. J.; VISHWANATH, B. S. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. **Biochimie**, v. 88, n. 10, p. 1313–1322, 2006.

REIS, M. A.; ANDRÉ, V.; DUARTE, M. T.; LAGE, H.; FERREIRA, M. J. U. 12,17-Cyclojatrophane and jatrophane constituents of *Euphorbia welwitschii*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 11, p. 2684–2690, 2015.

REIS, M. A.; PATERNA, A.; MÓNICO, A.; MOLNAR, J.; LAGE, H.; FERREIRA, M. J. U. Diterpenes from *Euphorbia piscatoria*: Synergistic interaction of lathyranes with doxorubicin on resistant cancer cells. **Planta Medica**, v. 80, n. 18, p. 1739–1745, 2014.

RIAH, F.; DASHTI, N.; GHANADIAN, M.; AGHAEI, M.; FAEZ, F.; JAFARI, S. M.; ZARGAR, N. Kopetdaghinanes, pro-apoptotic hemiacetalic cyclomyrsinanes from *Euphorbia kopetdagi*. **Fitoterapia**, v. 146, p. 104636, 2020.

RIBBLE, D.; GOLDSTEIN, N. B.; NORRIS, D. A.; SHELLMAN, Y. G. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC Biotechnology**, v. 7, p. 1–7, 2005.

RICIGLIANO, V. A.; SICA, V. P.; KNOWLES, S. L.; DIETTE, N.; HOWARTH, D. G.; OBERLIES, N. H. Bioactive diterpenoid metabolism and cytotoxic activities of genetically transformed *Euphorbia lathyris* roots. **Phytochemistry**, v. 179, p. 112504, 2020.

RISS, T. L.; NILES, A. L.; MINOR, L. Cell viability assays assay guidance manual. **Assay Guidance Manual**, p. 1–23, 2004.

ROJAS-SANDOVAL, J. *Euphorbia umbellata* (African milk bush). In: **Invasive Species Compendium**. Wallingford, UK, 2017.

ROZIMAMAT, R.; HU, R.; AKBAR, H. New isopimarane diterpenes and nortriterpene with cytotoxic activity from *Euphorbia alata* Boiss. **Fitoterapia**, v. 127, p. 328–333, 2018.

SADEGHI-ALIABADI, H.; SAJJADI, S. E.; KHODAMORADI, M. Cytotoxicity of *Euphorbia macroclada* on MDA-MB-468 breast cancer cell line. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 103–108, 2009.

SANTOS, O. J. Dos; SAUAIA FILHO, E. N.; DO NASCIMENTO, F. R. F.; SILVA JÚNIOR, F. C.; FIALHO, E. M. S.; SANTOS, R. H. P.; SANTOS, R. A. P.; SERRA, I. C. P. B. Use of raw *Euphorbia tirucalli* extract for inhibition of ascitic Erlich tumor. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, n. 1, p. 18–21, 2016.

SHALINI, S.; DORSTYN, L.; DAWAR, S.; KUMAR, S. Old, new and emerging functions of caspases. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 4, p. 526–539, 2015.

SHARIFI-RAD, J.; OZLEYEN, A.; TUMER, T. B.; ADETUNJI, C. O.; OMARI, N. EI; BALAHBIB, A.; TAHERI, Y.; BOUYAHYA, A.; MARTORELL, M.; MARTINS, N.; CHO, W. C. Natural products and synthetic analogs as a source of antitumor drugs. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 679, 2019.

SHARMA, N.; SAMARAKOON, K. W.; GYAWALI, R.; PARK, Y.-H.; LEE, S.-J.; OH, S. J.; LEE, T.; JEONG, D. K. Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of *Euphorbia hirta* ethanolic extract. **Molecules**, v. 19, p. 14567–14581, 2014.

SHI, H.-M.; WILLIAMS, I. D.; SUNG, H. H.-Y.; ZHU, H.-X.; IP, N. Y.; MIN, Z.-D. Cytotoxic diterpenoids from the roots of *Euphorbia ebracteolata*. **Planta Medica**, v. 71, n. 4, p. 349–354, 2005.

SHIN, S. Y.; KIM, C. G.; JUNG, Y. J. Y.; JUNG, Y. J. Y.; JUNG, H.; IM, J. *Euphorbia humifusa* Willd exerts inhibition of breast cancer cell invasion and metastasis through inhibition of TNF α - induced MMP-9 expression. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–11, 2016.

SILVA, V. A. O.; ROSA, M. N.; TANSINI, A.; OLIVEIRA, R. J. S.; MARTINHO, O.; LIMA, J. P.; PIANOWSKI, L. F.; REIS, R. M. *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, p. 557–566, 2018.

SINGH, A. K.; PANDEY, A.; MAHESHWARI, A. *Euphorbia* plant induced toxic keratopathy. **Delhi Journal of Ophthalmology**, v. 31, p. 93–94, 2020.

SLIWKA, L.; WIKTORSKA, K.; SUCHOCKI, P.; MILCZAREK, M.; MIELCZAREK, S.; LUBELSKA, K.; CIERPIAL, T.; LYZWA, P.; KIELBASINSKI, P.; JAROMIN, A.; FLIS, A.; CHILMONCZYK, Z. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. **PLoS ONE**, v. 15, p. 1–17, 2016.

SOUZA, L. S. De; PUZIOL, L. C.; TOSTA, C. L.; BITTENCOURT, M. L. F.; ARDISSON, J. S.; KITAGAWA, R. R.; FILGUEIRAS, P. R.; KUSTER, R. M. Analytical methods to access the chemical composition of an *Euphorbia tirucalli* anticancer latex from traditional Brazilian medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 237, p. 255–265, 2019.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay : Direct and off-target effects of inhibitors can result in over / underestimation of cell viability. **Gene**, v. 574, n. 2, p. 193–203, 2015.

SZNARKOWSKA, A.; KOSTECKA, A.; MELLER, K.; BIELAWSKI, K. P. Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 15996–16016, 2017.

TAKAMATSU, S. Naturally occurring cell adhesion inhibitors. **Journal of Natural Medicines**, v. 72, p. 817–835, 2018.

TAO, W.; DUAN, J.; TANG, Y.; YANG, N.; LI, J.; QIAN, Y. Casbane diterpenoids from the roots of *Euphorbia pekinensis*. **Phytochemistry**, v. 94, p. 249–253, 2013.

TENG, Y.; WANG, Y.; HSU, P.; XIN, G.; ZHANG, Y.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; GOTO, M.; LEE, K.-H. Mechanism of action of cytotoxic compounds from the seeds of *Euphorbia lathyris*. **Phytomedicine**, v. 41, n. February, p. 62–66, 2018.

TRAN, S.; DE GIOVANNI, P.-J.; PIEL, B.; RAI, P. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. **Clinical and Translational Medicine**, v. 6, n. 44, p. 1–21, 2017.

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

VASAS, A.; HOHMANN, J. *Euphorbia* Diterpenes : isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008 – 2012). **Chemical Reviews**, v. 114, p. 8579–8612, 2014.

VASAS, A.; RÉDEI, D.; CSUPOR, D.; MOLNÁR, J.; HOHMANN, J. Diterpenes from European *Euphorbia* species serving as prototypes for natural-product-based drug discovery. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 27, p. 5115–5130, 2012.

VIANA, A. R.; MARZARI, J.; WERGUTZ, J.; FONTANARI, M. Bioactive products in the prevention and treatment of cancer , in particular melanoma. **Disciplinarum Scientia**, v. 18, n. 3, p. 511–528, 2017.

VOSS, A. K.; STRASSER, A. The essentials of developmental apoptosis. **F1000 Research**, v. 9, p. 1–12, 2020.

WANG, Hong-Bing; CHEN, W.; ZHANG, Y.; WANG, X.; LIU, L.; TONG, L.; CHEN, Y. Four new diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana*. **Fitoterapia**, v. 91, p. 211–216, 2013.

WANG, H.; WANG, X.; LIU, L.; QIN, G.; KANG, T. Tiglane diterpenoids from the Euphorbiaceae and Thymelaeaceae families. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 2975–3011, 2015.

WANG, Jia-Xi; WANG, Q.; ZHEN, Y.; ZHAO, S.; GAO, F.; ZHOU, X.-L. Cytotoxic lathyrane-type diterpenes from seeds of *Euphorbia lathyris*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 66, n. 6, p. 674–677, 2018.

WANG, Lin; WANG, G.; YANG, D.; GUO, X.; XU, Y.; FENG, B.; KANG, J. Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 4, p. 1279–1285, 2013.

WANG, Qian; ZHEN, Y.; GAO, F.; HUANG, S.; ZHOU, X. Five new diterpenoids from the seeds of *Euphorbia lathyris*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 15, 2018.

WANG, S.; LIANG, H.; ZHAO, Y.; WANG, G.; YAO, H.; KASIMU, R.; WU, Z.; LI, Y.; HUANG, J.; WANG, J. New triterpenoids from the latex of *Euphorbia resinifera* Berg. **Fitoterapia**, v. 108, p. 33–40, 2016.

WANG, S. Y.; HUANG, C.; SUN, R. K.; LU, L. N.; LIANG, H. G.; GAO, L.; HUANG, J.; WANG, J. H.; YANG, B. F. New tirucallane triterpenoids from the dried latex of *Euphorbia resinifera*. **Phytochemistry Letters**, v. 29, p. 220–224, 2019.

WANG, Wan-Ping; JIANG, K.; ZHANG, P.; SHEN, K.; QU, S.; YU, X.; TAN, C. Phytochemistry highly oxygenated and structurally diverse diterpenoids from *Euphorbia helioscopia*. **Phytochemistry**, v. 145, p. 93–102, 2018.

WANG, Z. Y. H. E. Y.; LIU, H. P. A. I. P.; ZHANG, Y. O. U. C.; GUO, L. Q. I. U. Q.; LI, Z. X. I. N.; SHI, X. F. Anticancer potential of *Euphorbia helioscopia* L extracts against human cancer cells. **Anatomical Record**, v. 295, n. 2, p. 223–233, 2012.

WHO. **Cancer**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 2 jul. 2021.

YAN, X. L.; SANG, J.; CHEN, S. X.; LI, W.; TANG, G. H.; GAN, L. S.; YIN, S. Euphorkanlide A, a highly modified ingenane diterpenoid with a c24 appendage from *Euphorbia kansuensis*. **Organic Letters**, 2019a.

YAN, X. L.; ZHANG, J. S.; HUANG, J. L.; ZHANG, Y.; CHEN, J. Q.; TANG, G. H.; YIN, S. Euphonoids A–G, cytotoxic diterpenoids from *Euphorbia fischeriana*. **Phytochemistry**, v. 166, p. 112064, 2019b.

YANG, J.-L.; LIEN, J.-C.; CHEN, Y.-Y.; HSU, S.-C.; CHANG, S.-J.; HUANG, A.-C.; AMAGAYA, S.; FUNAYANA, S.; WOOD, W. G.; KUO, C.-L.; CHUNG, J.-G. Crude extract of *Euphorbia formosana* induces apoptosis of DU145 human prostate cancer cells acts through the caspase-dependent and independent signaling pathway. **Environmental Toxicology**, v. 31, n. 11, p. 1600–1611, 2016.

YE, Y.; LIU, G.-H.; DAWA, D.; DING, L.-S.; CAO, Z.-X.; ZHOU, Y. Cytotoxic diterpenoids from the roots of *Euphorbia stracheyi*. **Phytochemistry Letters**, v. 36, p. 183–187, 2020.

YUAN, R.; HOU, Y.; SUN, W.; YU, J.; LIU, X.; NIU, Y.; LU, J. J.; CHEN, X. Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1401, n. 1, p. 19–27, 2017.

APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.055>

Phytomedicine 47 (2018) 105–112



Contents lists available at ScienceDirect

Phytomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phymed



Original Article

Pharmacokinetics and cytotoxic study of euphol from *Euphorbia umbellata* (Bruyns) Pax latex



Luiza S. Cruz^a, Thais L. de Oliveira^b, Carla C. Kanunfre^c, Katia S. Paludo^c, Bruno R. Minozzo^a, Ana P. Prestes^a, Mei Wang^d, Daniel Fernandes^a, Fábio A. dos Santos^e, Vamshi K. Manda^d, Shabana I. Khan^d, Zulfiqar Ali^d, Iara J. de Messias-Reason^b, Bharathi Avula^d, Ikhlas A. Khan^d, Flávio L. Beltrame^{a,*}

^a Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Carlos Cavalcanti Avenue, 4748, Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná 84030-900, Brazil

^b Department of Medical Pathology, Federal University of Paraná, General Carneiro Street, 460, Downtown, Curitiba, Paraná 80060-900, Brazil

^c Department of Structural and Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, Carlos Cavalcanti Avenue, 4748, Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná 84030-900, Brazil

^d National Center for Natural Products Research, University of Mississippi, MS 38677, USA

^e Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Carlos Cavalcanti Avenue, 4748, Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná 84030-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Euphol
Cell culture
Cytotoxic activity
UHPLC-MS
Euphorbia
Pharmacokinetics

ABSTRACT

Background: Medicinal plants are an important source to identify new active pharmaceutical compounds. Traditionally, the sap of *Euphorbia umbellata* is widely used to treat cancer and inflammatory conditions. These effects have been attributed to the presence of terpenes and phenolic compounds in the extracts of this plant. Euphol, a tetracyclic triterpene alcohol, is one of the major compounds present in *Euphorbia* species, and some biological activities have been attributed to this compound.

Purpose: This study aimed to evaluate the *in vitro* cytotoxicity of euphol against Jurkat, HL-60, K-562, B16F10, and HRT-18 cells lines, as well as the biological stability, distribution, metabolism properties *in vitro*, and the determination of the concentration of euphol in the plasma and liver of mice.

Methods: The MTT reduction assay was used to evaluate the cytotoxicity of euphol against cancer cell lines, and the selectivity index, the morphology and cell cycle assays to evaluate the death mechanisms in K-562 and B16F10 lineages. UHPLC-MS was applied for the *in vitro* evaluation of the concentration of euphol in plasma and liver, and *in vitro* metabolic stability in human liver microsomes and S9 fraction, plasma protein binding, and stability in simulated gastric and intestinal fluids assays.

Conclusions: This study demonstrated that euphol exhibited cytotoxic effects against a variety of cancer cell lines, selectivity against leukemia and possibly, the mechanism involved is apoptosis. The evaluation of stability, distribution, and metabolism properties showed that euphol was unstable in gastric and intestinal fluids, presenting moderate plasma protein binding with two hours elimination half-life and possible phase II liver metabolism. All the results suggested that further studies could be developed to prove the viability of euphol as an anticancer agent.

Abbreviations: 1D and 2D NMR, one and two dimension nuclear magnetic resonance spectroscopy; ACN, acetonitrile; ATCC, american type culture collection; CDCl₃, deuterated chloroform; CDK, cyclin dependent kinase; CEUA, ethics committee on the use of animals; CKI, cyclin dependent kinase inhibitor; CHCl₃, chloroform; CMC-Na, carboxymethylcellulose sodium; COEP, human research ethics committee; DMSO, dimethyl sulfoxide; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; EI, electron ionization; ESI, electrospray ionization; EtOAc, ethyl acetate; EtOH, ethanol; FA, formic acid; FACS, fluorescence activated cell sorting; G-6-PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; Hex, hexane; IC₅₀, inhibit cellular proliferation by 50%; IS, internal standard; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; MeOH, methanol; mRNA, messenger ribonucleic acid; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; OD, optical density; PBS, phosphate buffered saline; PKC ϵ , protein kinase C epsilon; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; SGF, simulated gastric fluid; SI, selectivity index; SIF, simulated intestinal fluids; TGF- β , transforming growth factor beta; TLC, thin-layer chromatography; UDPGA, UDP-glucuronic acid; UHPLC-MS, ultra-high pressure liquid chromatography-mass spectrometry

* Corresponding author.

E-mail address: flavio.beltrame@uepg.br (F.L. Beltrame).

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.055>

Received 29 November 2017; Received in revised form 20 March 2018; Accepted 29 April 2018
0944-7113/ © 2018 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Enriched Terpenes Fractions of the Latex of *Euphorbia umbellata* Promote Apoptosis in Leukemic Cells

Luiza Stolz Cruz,^a Carla Cristine Kanunfre,^b Evelyn Assis de Andrade,^a Alexandre Alves de Oliveira,^a Laura Stolz Cruz,^a Mariane de Faria Moss,^c Guilherme Lanzi Sassaki,^d Leociley Rocha Alencar Menezes,^d Mei Wang,^e Ikhlas Ahmad Khan,^e and Flávio Luís Beltrame^{*,a}

^a Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, General Carlos Cavalcanti Avenue 4748, 84900-030 Ponta Grossa, Paraná, Brazil, e-mail: flaviobeltra@uepg.br

^b Department of General Biology, State University of Ponta Grossa, General Carlos Cavalcanti Avenue 4748, 84900-030 Ponta Grossa, Paraná, Brazil

^c Department of Clinical and Toxicological Analysis, State University of Ponta Grossa, General Carlos Cavalcanti Avenue 4748, 84900-030 Ponta Grossa, Paraná, Brazil

^d Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Polytechnic Center 81530-000 Curitiba, Paraná, Brazil

^e National Center for Natural Products Research, University of Mississippi, MS 38677, Oxford, MS, USA

The current study was carried out by a bioguided fractionation of a hexane extract of the latex of *Euphorbia umbellata* against leukemic cells. Samples were analyzed by NMR, GC/MS, triterpenes quantification, and MTT reduction assay. Morphological, cell cycle, mitochondrial membrane potential and caspases 3/7 analyses were performed for the dichloromethane and ethanol fractions, and selectivity index for the dichloromethane fraction. NMR analysis presented characteristic signals of terpenes and steroids, data were confirmed by the quantification of triterpenes and GC/MS analysis. MTT reduction assay demonstrated that HL-60 was the most sensitive cell lineage against dichloromethane and ethanol fractions. Compounds of these matrices caused morphological changes compatible with apoptosis induction, altered cell cycle, increment of depolarized population cells and activation of caspases 3/7. Selectivity indices were higher than 22.44. Bioguided-fractionation study showed that samples of the latex of *E. umbellata* raised the activity of the phytocomplex against leukemic cells, and the cytotoxicity can be associated with an apoptosis pathway.

Keywords: cancer, cell cycle, chemical evaluation, cytotoxic mechanisms, phytocomplex.

Introduction

Leukemia is a kind of cancer which develops in the blood-forming tissue of the bone marrow. Therefore, a large number of abnormal white blood cells accumulate in this site and blood. It interferes with the production of normal blood cells.^[1] Treatment is defined in accordance with the clinical diagnosis, and it can include target and radiation therapy, monoclonal antibodies, surgery, stem cell transplant and/or chemotherapy.^[2] Though chemotherapy is the most usual treatment, it is sometimes ineffective due to the selection of resistant cell phenotypes, and it can also develop several adverse effects.^[3,4]

Latex of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) is commonly used in Brazil to treat allergy problems, inflammatory diseases, pain, gastric ulcer and mainly cancers.^[5,6] Phytochemical investigations demonstrated the presence of proteins, fatty acids, phenolic, and terpene compounds.^[7–9] Biological studies have shown cytotoxicity activity of the latex, bark and leaves extracts against B16F10 cells (melanoma), HeLa (adenocarcinoma), HRT-18 (ileocecal colorectal adenocarcinoma), Jurkat cells (acute T cell leukemia) and K-562 (chronic myelogenous leukemia).^[10–14] These studies have demonstrated that fractionation improves the cytotoxic activity of the compounds present in these vegetal matrices. Hexane

FRACTIONS FROM *EUPHORBIA UMBELLATA* (PAX) BRUYN'S SAP ARE CYTOTOXIC TO BREAST AND COLORECTAL CELLS

Luiza Stolz Cruz^{1*}, Carla Cristine Kanunfre², Shabana Khan³, Ikhlas Khan³ and Flávio Luis Beltrame¹

¹Department of Pharmaceutical Science, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

²Department of General Biology, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

³National Centre for Natural Products Research, University of Mississippi, Oxford, Mississippi, USA.

Article Received on
19 Feb. 2021,

Revised on 11 March 2021,
Accepted on 31 March 2021

DOI: 10.20959/wjpps20214-18774

*Corresponding Author

Luiza Stolz Cruz

Department of
Pharmaceutical Science,
State University of Ponta
Grossa, Ponta Grossa,
Paraná, Brazil.

ABSTRACT

It has previously been shown that extracts (fractions and subfractions) from *Euphorbia umbellata* sap possess cytotoxic and anticancer effects against different cell lineages. However, there are few studies regarding the effects of such sap extracts upon breast and colorectal cell lineages. Therefore, the aims of this study were as follows: to evaluate the cytotoxic potential and selectivity against of extracts against five different cell lineages (human colorectal cancer cells: HT-29 and HCT 116; human breast cancer: MCF-7 and MDA-MB 231; and human renal embryonic: HEK-293); and to try to assess the mechanism of action of these extracts and also a major compound obtained from *E. umbellata* sap (euphol). The cytotoxicity was

determined by MTT reduction assay, and the IC₅₀ values were used to calculate the selectivity indices; caspase-3 and caspase-7 activation was assessed for the most sensitive cells. The results showed that only the methanol fraction was unable to reduce cell viability at the tested concentrations. MDA-MB 231 presented the lowest IC₅₀ value and the highest selectivity index when treated with the ethyl acetate fraction (IC₅₀: 7.77±3.11 µg/mL, SI: 9.85). Euphol was cytotoxic to all the tested cells and selective for MDA-MB 231 and HT-29. The ethyl acetate fraction, dichloromethane subfraction, and euphol all induced caspase-3 and caspase-7 activity. These extracts, and the main compound obtained from *E. umbellata* sap

ANEXO A – PARECER DO COEP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE FRAÇÕES DE *Euphorbia umbellata* EM LEUCEMIA

Pesquisador: LUIZA STOLZ CRUZ

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 21587219.1.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.653.048

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa:

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE FRAÇÕES DE *Euphorbia umbellata* EM LEUCEMIA

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Determinar o potencial citotóxico de frações de *E. umbellata* frente a células de leucemia, utilizando de modelo ex vivo.

Objetivo Secundário:

Desenvolver protocolo de triagem de produtos naturais em modelo ex vivo de leucemia; Comparar a citotoxicidade das frações em modelo in vitro e ex vivo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A participação no estudo não implica nenhum risco para a saúde, podendo apenas causar certo desconforto no momento da coleta de sangue.

Benefícios:

O projeto estabelece e capacita os alunos de programa de pós-graduação e de iniciação científica em um novo modelo de avaliação citotóxica.

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 116-B

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3108

E-mail: coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 3.653.048

Enquanto os resultados obtidos ampliam o conhecimento a cerca das propriedades biológicas de matrizes vegetais, além de proporcionar o incremento de pesquisas básicas nos programas de Pós Graduação contribuindo para o desenvolvimento de conhecimento pela comunidade científica regional, em um primeiro momento

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Leucemia é uma doença maligna que atinge os leucócitos. Seu tratamento é dependente do diagnóstico, porém na maioria dos casos é feita a quimioterapia. Os medicamentos atualmente utilizados nos protocolos quimioterápicos apresentam inúmeras desvantagens, incluindo a seleção de fenótipos resistentes. O látex de *Euphorbia umbellata*, o qual é popularmente utilizado para o tratamento de câncer, já apresentou promissores resultados citotóxicos em ensaios in vitro, mostrando-se seletivo a leucemia. Além disso, os estudos demonstraram que as frações do látex aumentam o potencial citotóxico da matriz vegetal. A triagem fenotípica tem sido utilizada na busca de novos tratamentos. Considerando que as células leucêmicas são encontradas em sangue periférico, há uma certa facilidade na obtenção de material cancerígeno para a condução de um estudo ex vivo. Diante do exposto, esse projeto tem por objetivo avaliar se a atividade citotóxica das frações de *Euphorbia umbellata* observada em modelos in vitro reproduz em modelo ex vivo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em anexo e de acordo com as normas 466/2012 e 510/2016

Recomendações:

Enviar o relatório final ao término do projeto por Notificação via Plataforma Brasil para evitar pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 116-B
Bairro: Uvaranas **CEP:** 84.030-900
UF: PR **Município:** PONTA GROSSA
Telefone: (42)3220-3108 **E-mail:** coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 3.653.048

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1383373.pdf	16/10/2019 09:00:46		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado.docx	16/10/2019 09:00:17	LUIZA STOLZ CRUZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Plataforma_Brasil.docx	26/06/2019 19:01:24	LUIZA STOLZ CRUZ	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	26/06/2019 18:52:08	LUIZA STOLZ CRUZ	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_PPGCF.pdf	26/06/2019 18:51:28	LUIZA STOLZ CRUZ	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_aceite_hospital.pdf	26/06/2019 18:48:12	LUIZA STOLZ CRUZ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PONTA GROSSA, 21 de Outubro de 2019

Assinado por:
ULISSES COELHO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 116-B
Bairro: Uvaranas **CEP:** 84.030-900
UF: PR **Município:** PONTA GROSSA
Telefone: (42)3220-3108 **E-mail:** coep@uepg.br