



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MONIQUE GONÇALVES ALVES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE SUBFRAÇÕES DO LÁTEX DA
Euphorbia umbellata EM CÉLULAS DE MELANOMA

Areia, 2018

MONIQUE GONÇALVES ALVES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE SUBFRAÇÕES DO LÁTEX DA
Euphorbia umbellata EM CÉLULAS DE MELANOMA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal da Paraíba como
requisito parcial para a obtenção do título de
Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadores: Prof. Dr. Abraão Ribeiro Barbosa

Dr. Arthur Cássio de Lima Luna

AREIA, 2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A474a Alves, Monique Goncalves.

Avaliação do potencial citotóxico de subfrações do látex da *Euphorbia umbellata* em células de melanoma / Monique Goncalves Alves. - João Pessoa, 2018.

41 f. : il.

Orientação: Abraão Barosa.

Coorientação: Arthur Luna.

Monografia (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Euphorbiaceae. 2. *Euphorbia umbellata*. 3. Melanoma. 4. câncer. 5. células tumorais. I. Barosa, Abraão. II. Luna, Arthur. III. Título.

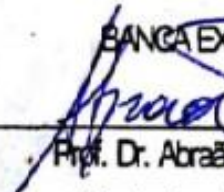
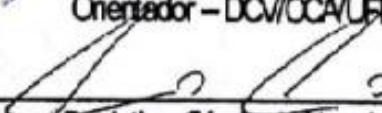
UFPB/CCA-AREIA

MONIQUE GONÇALVES ALVES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE SUBFRAÇÕES DO LÁTEX DA
Euphorbia umbellata EM CÉLULAS DE MELANOMA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à
Universidade Federal da Paraíba como
requisito parcial para a obtenção do título de
Licenciado em Ciências Biológicas.

RESULTADO: Aprovada no dia 03 de dezembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Abraão Ribeiro Barbosa
Orientador – DCV/OCA/UFPB

Dr. Arthur Cássio de Lima Luna
Examinador Externo – DBQ/IQ/USP



Prof. Dr. Alexandre Sarmiento Queiroga

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Morfologia/UFPB

Examinador

Dedico este trabalho aos meus pais Gilvanda Maria Gonçalves Leite e Inácio Alves Cantilino, que sempre apoiaram as minhas decisões e estiveram ao meu lado em todos os momentos alegres e de dificuldades me ajudando a enfrenta-los com humildade, paciência e sabedoria. A minha avó, Joana Gonçalves Leite que também sempre me auxiliou da forma como pôde para que meu sonho de torna-se licenciada em biologia viesse a se tornar realidade. Não posso esquecer-me dos meus parentes queridos que não estão mais aqui, mas que de certa forma me impulsionaram a seguir este caminho que profissionalmente já amo, obrigada meu avó João e meu tio Apolinário.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, Nossa Senhora e ao meu anjo da guarda que sempre me mostram qual caminho devo trilhar e que com todas vossas benevolências, generosidade e amor me auxiliam e dão forças nos meus momentos de solidão e dificuldades, bem como me proporcionam ótimos momentos, sempre presentes através da minha família amigos e situações.

Agradeço aos meus pais que, além disso, são os meus melhores amigos e meus maiores amores. Obrigada por sempre estarem ao meu lado aconselhando, cuidando e apoiando-me em quaisquer que sejam as minhas decisões, sempre em busca do meu melhor. Agradeço aos meus irmãos, em especial Sandra, Luiz Carlos e Lena por todo amor e carinho durante esses anos, bem como a minha prima Andreza, tia Gilsa e a minha avó Joana que em momentos decisivos da minha vida, contribuíram com conselhos. Ao meu avô João e tio Apolinário que infelizmente já não se encontram entre nós, mas que foram exemplos de histórias que me impulsionaram a conhecer esta área de pesquisa e encontrar significado para trilha-la.

Agradeço a todos os amigos que fizeram dos meus dias um pouco mais felizes, em destaque Laerty, Erika, Gabriel, Isabela, Ingrid, Anne, Tatiana, Raniere, Fabrício, Gabriela, Joaquim, Aparecida, João Fernando e Fernando. Agradeço a todos os professores que somaram de alguma forma na minha formação, tanto pessoal como profissional e que servem de inspiração para continuar fazendo um bom trabalho, em especial, Abraão, Ângela, Lupércio, Juscelino, Carlos, David, Elizanilda, Anita, Ana Cristina, Laís, Mailson, Wilson.

Agradeço a todos que contribuíram e permitiram o desenvolvimento dessa pesquisa, como Arthur, Durvanei, Manuela, Daniel, Laerty e Abraão. Enfim, agradeço a todas as pessoas que passaram pela minha vida e contribuíram direta ou indiretamente para formação do ser que hoje sou.

“Desejo que você não tenha medo da vida, tenha medo de não vivê-la. Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes. Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo. Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina, pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas. Seja um debatedor de ideias. Lute pelo que você ama.”

(Augusto Cury)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. METODOLOGIA.....	13
2.1 Ensaios in vitro.....	13
2.1.1. Cultura celular	13
2.1.2. Avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico de MTT	13
2.1.3. Análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por microscopia confocal a laser.....	14
2.1.4. Análise dos microfilamentos por microscopia confocal a laser	14
2.1.5. Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo	15
3. RESULTADOS	15
3.1. Avaliação da citotoxicidade da subfração EtOH nas células tumorais B16-F10.....	15
3.2 Avaliação da citotoxicidade da subfração Cl ₂ nas células tumorais B16-F10	16
3.3 Avaliação da citotoxicidade da subfração MeOH nas células tumorais B16-F10	16
3.4. Avaliação da citotoxicidade da subfração Éter nas células tumorais B16-F10	16
3.5. Avaliação da citotoxicidade da subfração Acetato nas células tumorais B16-F10	17
3.6. Avaliação da citotoxicidade da subfração CHCl ₃ nas células tumorais B16-F10	17
3.7. Avaliação da citotoxicidade das subfrações Cl ₂ e EtOH nas células normais FN1.....	17
3.8. Avaliação da citotoxicidade das subfrações Éter e MeOH nas células normais FN1	17
3.9. Avaliação citotoxicidade das subfrações Acetato e CHCl ₂ nas células normais FN1.....	18
3.10 Avaliação do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células tumorais tratadas com as subfrações Acetato e CHCl ₃	18
3.11. Avaliação dos microfilamentos das células tumorais B16-F10 tratadas com as subfrações Acetato e CHCl ₃	18
4. DISCUSSÃO	19
5.REFERENCIAS.....	24

RESUMO

Estudos recentes têm demonstrado os efeitos citotóxicos do látex da *Euphorbia umbellata* em diversas linhagens de células tumorais. Contudo, ensaios com linhagens de melanoma humano ainda não foram realizados. Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antitumoral das subfrações metanol (MeOH), dicloro (Cl_2), éter, etanol (EtOH), Acetato e clorofórmio (CHCl_3) da fração hexano (Hex) extraída do látex da *Euphorbia umbellata*. A citotoxicidade destas subfrações foi avaliada nas células tumorais de melanoma B16 e fibroblastos FN1, por meio do ensaio colorimétrico de MTT. As concentrações testadas foram 10 μg – 150 $\mu\text{g}/\text{poço}$, por um período de 24 horas. Posteriormente, o potencial elétrico mitocondrial e a análise dos microfilamentos das células tratadas foi avaliada por microscopia confocal a laser. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que as subfrações CHCl_2 e Acetato da *E. umbellata* apresentaram citotoxicidade nas células B16-F10. Entretanto, as células FN1 também apresentaram sensibilidade a subfração CHCl_3 . Nossos resultados também evidenciaram que as células normais FN1 apresentaram grande sensibilidade às subfrações EtOH e Cl_3 . Em contrapartida, as subfrações éter e MeOH não induziram citotoxicidade na linhagem celular B16-F10, com baixa atividade citotóxica em células FN1. Além disso, a subfração Acetato reduziu o $\Delta\Psi_m$ das células B16, bem como modificou a sua morfologia celular ao ser observado os filamentos de actina. Neste contexto, nossos resultados sugerem que a citotoxicidade da subfração Acetato nas células B16 ocorre devido à modulação da via apoptótica. Dessa maneira, o conjunto de resultados demonstrou que a subfração Acetato apresenta potencial para o tratamento de melanoma humano *in vitro*.

Palavras-chaves: Euphorbiaceae; *Euphorbia umbellata*; melanoma; câncer; células tumorais.

ABSTRACT

Recent studies have demonstrated the cytotoxic effects of *Euphorbia umbellata* latex on several tumor cell lines. However, assays with human melanoma lines have not yet been performed. Thus, the present work aimed to evaluate the antitumor potential of the methanol (MeOH), dichloro (Cl₂), ether, ethanol (EtOH), acetate and chloroform (CHCl₂) hexane (Hex) subfractions extracted from *Euphorbia umbellata* latex. The cytotoxicity of these subfractions was evaluated in B16 and normal FN1 melanoma tumor cells by means of the MTT colorimetric assay. The concentrations tested were 10 µg - 150 µg / well, for a period of 24 hours. Subsequently, the mitochondrial electrical potential and the analysis of the microfilaments of the treated cells were evaluated by laser confocal microscopy. The results obtained in the present work demonstrated that the subclass CHCl₂ and acetate of *E. umbellata* presented cytotoxicity in B16F10 cells. However, FN1 cells also showed sensitivity to CHCl₂ subfraction. Our results also showed that the normal FN1 cells showed great sensitivity to the EtOH and Cl₂ subfractions. In contrast, the ether and MeOH subfractions did not induce cytotoxicity in the B16F10 cell line, with low cytotoxic activity in FN1 cells. In addition, the acetate subfraction reduced the $\Delta\Psi_m$ of the B16 cells, as well as modified its cellular morphology when the actin filaments were observed. In this context, our results suggest that the cytotoxicity of the acetate subfraction in B16 cells occurs due to modulation of the apoptotic pathway. In this way, the results set showed that the acetate subfraction presents potential for the treatment of human melanoma in vitro.

Keywords: Euphorbiaceae; *Euphorbia umbellata*; melanoma; cancer; tumor cells.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento do câncer cresceu significativamente nas últimas quatro décadas, aumentando as possibilidades de cura e sobrevida. Apesar destes avanços, hoje, o câncer é responsável pelo maior índice de mortes em todo o mundo (DONEPUDI, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde - OMS (2018), o câncer é a principal causa de morte no mundo e é responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018, sendo o câncer responsável por cerca de uma em cada seis mortes a nível global.

De acordo com relatório da Economist Intelligence Unit (2017) que examina as medidas de controle de câncer na América Latina, o câncer já é a segunda maior causa de mortes da América Latina. As estimativas para 2012 e 2035 é que o número de casos cresça 91% e mortalidade 106%, durante esse período. Consequente haverá aumento em gastos públicos diretos com a saúde, por exemplo, medicamentos, hospitalização e diagnósticos, e também indiretos, como, perda de produtividade por mortalidade precoce e dias de trabalho perdidos (KIELSTRA,2017).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de neoplasia para cada ano. À exceção de câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil novos casos de câncer. Os cânceres mais frequentes serão de próstata (68mil) em homens e mama (60mil) em mulheres (INCA, 2018). Dessa maneira, um diagnóstico correto é primordial para um tratamento adequado e eficiente.

O melanoma é uma neoplasia melanocítica maligna, que surge de melanócitos encontrados na pele, olhos e, em menor grau, em outros tecidos do corpo. O melanoma cutâneo é a forma mais agressiva de câncer de pele, com menos de um ano de sobrevida média global (FINN ET AL., 2012; SHAIN E BASTIAN, 2016).

Nos últimos anos, grandes avanços em duas classes distintas de terapias mudaram completamente as estratégias no tratamento do melanoma, resultando em melhorias marcantes. Uma dessas classes corresponde às terapias-alvo, representadas pelo inibidor da mutação BRAF-V600, ou das proteínas envolvidas na via de sinalização MAPKs (MEK-ERK), que são opções de tratamento para cerca de 40-50% dos tipos de melanoma que contêm uma mutação no gene BRAF (JOHNSON E SOSMAN, 2015). No entanto, apesar dos

avanços nas últimas décadas, os pacientes tratados com inibidores BRAF apresentam progressão da doença durante os primeiros 1 a 2 anos de terapia (JOHNSON E SOSMAN, 2015). Além disso, a duração da resposta é relativamente curta ou a taxa de resposta é baixa. (FINN ET AL., 2012) Assim, novas abordagens terapêuticas são necessárias para o tratamento do melanoma. Na presença de tais condições limitantes das terapias oferecidas para o tratamento contra do melanoma, desenvolver compostos que apresentem menor toxicidade tecidual e sistêmica se faz necessário.

Estudos recentes sobre a planta *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, Euphorbiaceae (LUZ et al., 2015) conhecida popularmente no Brasil como “cola-nota” ou “janaúba” tem demonstrado os efeitos citotóxicos provenientes do seu látex. No sul do Brasil relata-se que o látex engarrafado da *E umbellata*, é popularmente utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer (OLIVEIRA, 2013).

Estudos recentes com frações proveniente do látex da *E umbellata*, demonstraram o seu potencial antitumoral em células de melanoma murino (B16F10), células de adenocarcinoma colorretal ileocecal (HCT-8), câncer cervical humano (HeLa) e células de Jurkat (DE OLIVEIRA et al., 2013; LUZ et al., 2015; 2016.). Recentemente, frações do látex desta planta foram isoladas para avaliação farmacológica, foram eles: hexano (Hex), clorofórmio (CHCl_3), acetato de etilo e metanol (MeOH). Estudos demonstram que todas as frações avaliadas apresentam potencial citotóxico isoladamente, dependendo da concentração e período de exposição da célula ao composto. Entretanto, dentre tais frações a que apresentou maior citotoxicidade foi a fração Hex, havendo uma possibilidade que outras substâncias presentes na fração hexano sejam causadoras de propriedades anticancerígenas. (LUZ et. Al, 2016).

Neste cenário, descobrir qual ou quais são os compostos no látex da *Euphorbia umbellata* que podem ter atividade antitumoral é extremamente importante, sendo assim, o trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antitumoral da subfrações da fração hexano (Hex), extraído do látex, em células de melanoma. Sendo as subfrações, metanol (MeOH), dicloro (Cl_2) éter, etanol (EtOH), acetato (CH_3COO^-) e clorofórmio (CHCl_3).

2. METODOLOGIA

2.1 Ensaios in vitro

2.1.1. Cultura celular

As células das linhagens do melanoma (B16-F10) e fibroblasto humano normal (FN1) utilizadas neste estudo pertencem ao banco de células do Laboratório de Biologia molecular do Instituto Butantan, sob responsabilidade do Professor Dr. Durvanei Augusto Maria.

As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (FN1 e B16F10), pH 7.2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, 2 mM de L-glutamina e 1% de antibióticos (10.000 UI/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina). Os frascos de cultura de 75 cm² estiveram contidos em estufa para incubação de células incluindo uma atmosfera úmida com 5% de CO₂, a 37 °C. Ao atingirem confluência aproximada de 90%, as células foram subcultivadas para que ocorresse a ampliação celular, realização de experimentos ou congelamento. Antes da execução dos experimentos, as células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante azul de tripan (1%).

2.1.2. Avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico de MTT

A viabilidade celular foi avaliada por meio do teste colorimétrico de redução do MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-1) 2,5-difeniltetrazólio brometo]. As células foram cultivadas em densidade de 2×10^4 , em placas com 96 poços, durante 24 horas em uma estufa a 37°C, contendo 5% de CO₂. Durante 24 horas as células foram tratadas com diversas concentrações (10 µg – 150 µg/poço) das subfrações MeOH, Cl₂, éter, EtOH, acetato e CHCl₃. Após o período de tratamento, foi adicionado 10 µL de reagente de MTT (5 mg/mL), por um período de 3 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e acrescentado 100 µL de DMSO para que ocorresse a dissolução dos cristais de formazan. A quantificação da absorbância foi realizada em leitor de ELISA (ThermoPlate), no comprimento de onda de 540 nm, para a determinação da concentração inibitória (IC₅₀%).

2.1.3. Análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por microscopia confocal a laser

Para analisar o potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi utilizada a sonda rodamina 6G, analisada por microscopia confocal. As células B16-F10 foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 /poço, sob lamínulas redondas em placas com 24 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com a concentração de $IC_{50\%}$ que obteve melhor resultado dentre as subfrações MeOH, Cl_2 , éter, EtOH, $CHCl_3$ e acetato por um período de 12h. Subsecutivo ao tratamento, as células foram lavadas três vezes com meio de cultura RPMI-1640 a $37^\circ C$, incubadas com $5 \mu g/mL$ de rodamina e colocadas na estufa durante 10 minutos no escuro. O excesso de rodamina foi retirado mediante lavagem com o meio de cultura. As laminas foram montadas com o auxílio de uma pinça na qual as lamínulas foram transferidas da placa para as laminas de vidro, sendo fixadas com ProLong® e armazenadas a $-20^\circ C$, no escuro, até o momento da leitura no microscópio confocal a laser (Carl Zeiss LSM 700; Leica, Mannheim, Germany).

2.1.4. Análise dos microfilamentos por microscopia confocal a laser

Para analisar os microfilamentos foi utilizado a faloidina, observado através da técnica de microscopia confocal. As células B16-F10 foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 /poço, sob lamínulas redondas em placas com 24 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com a concentração de $IC_{50\%}$ que obteve melhor resultado dentre as subfrações MeOH, Cl_2 , Éter, EtOH, $CHCl_3$ e Acetato por um período de 12h. Posteriormente foram lavadas duas vezes com PBS por dois minutos em temperatura ambiente, fixadas numa solução contendo 37% de formaldeído (3%), sucrose e PBS por 10 minutos, novamente as células foram lavadas duas vezes em PBS e consecutivo a lavagem permeabilizada por 5 minutos com outra solução. Subsequente a permeabilização, as células foram lavadas por mais 2 vezes e ocorreu o bloqueio durante 30 minutos a partir de uma outra solução com 3% BSA em PBS, pós lavagem as células foram incubadas com $5 \mu g/mL$ de faloidina durante 30 minutos. O excesso de faloidina foi retirado mediante lavagem com PBS. As laminas foram montadas com o auxílio de uma pinça, na qual as lamínulas foram transferidas da placa para as laminas de vidro, sendo fixadas e armazenadas no escuro, até o momento da leitura no microscópio confocal a laser.

2.1.5. Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

As células de melanoma (B16-F10) foram plaqueadas em placas de 6 poços, na concentração de 1×10^5 . No dia seguinte, as células foram tratadas com a concentração obtida mediante o $IC_{50\%}$ durante 12 horas. Após o período de incubação, as células foram contadas e a concentração ajustada para 100.000 cel/mL. Em seguida, as células foram centrifugadas por 10 min (1400rpm) e o pellet ressuspensado em 1 mL de “Cold GM” (glicose 6,1 mM, NaCl 137 mM; KCl 4,4 mM; $14 Na_2HPO_4$ 1,5Mm; KH_2PO_4 0,9 mM; EDTA 0,5 Mm). Em seguida, adicionou-se lentamente etanol absoluto (4°C), agitando-se lentamente. As células foram fixadas durante 30 minutos e posteriormente centrifugadas, lavadas com PBS contendo 5 mM EDTA (Sigma Aldrich, EUA) e ressuspensas em uma solução contendo PBS (5mM de EDTA), 18 µg/mL de iodeto de propídeo (PI) (Sigma Aldrich, EUA) e 0,3 mg/mL de RNase –A. As células foram mantidas a temperatura ambiente durante 1h, no escuro. A leitura foi realizada por citometria (FASC Calibur BD, EUA), no canal FL2-H. Os resultados obtidos demonstraram em qual período do ciclo celular as células se encontravam e os dados foram apresentados em porcentagem.

2.2 Análise estatística

Os valores numéricos foram expressos em média \pm desvio (DP). O teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica de um fator) e de comparações múltiplas de Dun foram realizados para identificar as diferenças estatísticas entre as medidas dos grupos estudados. Os gráficos foram obtidos por meio do programa Prism versão 5.0.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação da citotoxicidade da subfração EtOH nas células tumorais B16-F10

O potencial citotóxico da subfração EtOH nas células B16-F10 foi avaliado por meio do ensaio de redução do MTT, em diferentes concentrações, após 24 horas de tratamento. O intuito foi determinar os valores da concentração inibitória de 50% ($IC_{50\%}$) dos diferentes subfrações da fração Hex.

A citotoxicidade dessa subfração foi analisada e fotodocumentada utilizando um microscópio óptico invertido. Posterior ao período de tratamento de 24 horas com a subfração

EtOH foi possível observar que as células B16-F10 apresentaram uma redução significativa na densidade populacional. Além disto, houve a formação de precipitados a partir das duas maiores concentrações, apresentando acentuadas alterações da sua morfologia e retração citoplasmática (Figura 1), sendo o IC_{50%} de 38.35 µg/poço (Figura 3A).

3.2 Avaliação da citotoxicidade da subfração Cl₂ nas células tumorais B16-F10

O tratamento das células B16-F10 com a subfração CL₂, por 24 horas, induziu a redução da viabilidade celular apenas nas concentrações mais altas (Figura 2). Através do microscópio óptico foi possível observar que a partir da concentração de 40 µg/poço, há uma retração citoplasmática e modificação na morfologia celular (Figura 3B). O valor de IC_{50%} para o tratamento com esta subfração foi de 189.8 µg/poço, desse modo não houve citotoxicidade nas células avaliadas.

3.3 Avaliação da citotoxicidade da subfração MeOH nas células tumorais B16-F10

O tratamento com a subfração MeOH, em diferentes concentrações, por um período de 24 horas, proporcionou baixa citotoxicidade, obtendo IC_{50%} de 6927 µg/poço (Figura 6A), portanto sem a ocorrência de citotoxicidade nas células tratadas. As células B16-F10 tiveram poucas alterações após a exposição à subfração MeOH, mesmo nas concentrações mais altas (Figura 4).

3.4. Avaliação da citotoxicidade da subfração Éter nas células tumorais B16-F10

As células B16-F10 tiveram alterações da morfologia celular, como retração citoplasmática, após a exposição as concentrações mais altas da subfração Éter, ocorrendo também a presença de precipitados (Figura 5). O tratamento proporcionou citotoxicidade baixa após 24 horas de tratamento, não existindo citotoxicidade nas células tratadas (Figura 6B).

3.5. Avaliação da citotoxicidade da subfração Acetato nas células tumorais B16-F10

As células B16-F10 após serem tratadas com a subfração Acetato apresentaram desde a primeira concentração, de 10 µg/poço, alterações em sua morfologia, ocorrendo uma redução significativa na densidade celular, retração citoplasmática e mudança na estrutura celular (Figura 7). O valor de IC_{50%} para o tratamento com esta subfração foi de 2.3 µg/poço (Figura 9A)

3.6. Avaliação da citotoxicidade da subfração CHCl₃ nas células tumorais B16-F10

A subfração CHCl₃ apresentou uma alta citotoxicidade celular para as células tumorais B16-F10. Após 24 horas de tratamento, houve uma diminuição significativa na densidade celular a partir da primeira concentração (Figura 8). Além disto, foi possível observar a modificação na morfologia celular e retração citoplasmática nas concentrações testadas, tendo IC_{50%} de 13.75 µg/poço (Figura 9B)

3.7. Avaliação da citotoxicidade das subfrações Cl₂ e EtOH nas células normais FN1

As subfrações que induziram maior citotoxicidade nas células FN1 foram Cl₂ e EtOH. Esta duas subfrações promoveram alterações morfológicas e a formação de precipitados celulares (Figura 10-11).

As células que foram tratadas com Cl₂ foi observado uma significativa redução da viabilidade celular desde a segunda concentração testada, tendo um IC_{50%} de 14,24 µg/poço (Figura 12A). A subfração EtOH obteve redução de cerca de 78,68% da viabilidade celular desde a sua menor concentração (Figura 12B).

3.8. Avaliação da citotoxicidade das subfrações Éter e MeOH nas células normais FN1

Apenas nas concentrações mais altas foi observado a formação de precipitado na subfração Éter (Figura 13), bem como alterações discretas da morfologia celular. Éter e MeOH (Figura 14) promoveram menor citotoxicidade para as células de FN1 quando comparado as demais subfrações com o valor do IC_{50%} de 31,42 µg/poço e 31,23 µg/poço, respectivamente (Figura 15 A-B).

3.9. Avaliação citotoxicidade das subfrações Acetato e CHCl_2 nas células normais FN1

As células FN1 tratadas com as subfrações Acetato e CHCl_2 obtiveram o $\text{IC}_{50\%}$, no valor de 13,02 $\mu\text{g/poço}$ e 12,23 $\mu\text{g/poço}$, respectivamente (Figura 18 A-B). Foi possível observar também uma diminuição na densidade celular, já nas primeiras concentrações testadas (Figura 16 -17).

3.10 Avaliação do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) das células tumorais tratadas com as subfrações Acetato e CHCl_3

As células B16 foram tratadas com as subfrações Acetato e CHCl_3 , nas concentrações obtidas de $\text{IC}_{50\%}$ mediante o teste colorimétrico de MTT por um período de 12h, e em seguida o $\Delta\Psi\text{m}$ foi avaliado através da rodamina 6G, por meio da microscopia confocal. Este ensaio foi realizado apenas com estas subfrações porque foram as que apresentaram efetividade para as células B16-F10.

Quando comparado ao grupo controle (Figura 19 A) é possível perceber que as células B16 tratadas com a subfração CHCl_3 apresentaram significativa redução no $\Delta\Psi\text{m}$ (figura 19 C), ocorrendo uma retração citoplasmática, bem como uma leve alteração morfológica das células.

Por sua vez, o tratamento com Acetato (Figura 19 B) na concentração de 2.3 $\mu\text{g/poço}$ demonstrou uma grande redução no $\Delta\Psi\text{m}$ com a presença de mitocôndrias condensadas no citoplasma de algumas células.

3.11. Avaliação dos microfilamentos das células tumorais B16 –F10 tratadas com as subfrações Acetato e CHCl_3 .

As células B16-F10 tratadas foram tratadas por 12h com as subfrações CHCl_2 e Acetato, nas concentrações de $\text{IC}_{50\%}$ e em seguida foi analisado a estrutura dos filamentos de actina por microscopia confocal. Foi possível observar que ambos compostos (Figura 20) induziram alterações que ocorrem no processo apoptótico, como alterações nos filamentos de actina. Além disso, as células que foram tratadas com a subfração CHCl_3 apresentaram a formação de fibras de estresse.

4. DISCUSSÃO

Atualmente o câncer causa mais mortes do que todas as doenças cardíacas coronárias ou todos os acidentes vasculares cerebrais. Dessa maneira, é incontestável o fato de que hoje, no Brasil, esta doença é um problema de saúde pública e, por isso, seu controle e prevenção deve ser priorizada no país (OMS,2011; FACINA,2014). Na busca por terapias inovadoras, diversos produtos naturais derivados de plantas e outros organismos têm sido estudados para utilização como fonte para o desenvolvimento de quimioterápicos empregados no tratamento de diversos tipos de câncer (ALMEIDA, 2016). Contudo, mais de 80% dos compostos que mostraram efeitos promissores em estudos pré-clínicos não conseguiram passar pela fase II de ensaios clínicos (Kumar, 2016).

As plantas do gênero *Euphorbia* são conhecidas por possuírem altos níveis de compostos bioativos, e é provável que algumas espécies possam realmente apresentar atividades biológicas capazes de promover uma melhora clínica em algumas situações patológicas (LAGE et al., 2010; PUSZTAI et al., 2007).

Trabalhos evidenciam que os extratos de plantas da família Euphobiaceae têm demonstrado resultados positivos, nos quais extratos da *Mercurialis annua L.* apresentaram efeito citotóxico e inibitório para linfoma de burkitt (BJAB) e mieloma múltiplo (U266). Esses extratos são usados populamente na Jordania para tratamento de leucemia (ASSAF et al., 2013). Varias partes da *E. tirucalli*, em especial o látex, estimulou o organismo a produzir citosinas que modulam o sistema imune para combater tumores, existindo poder curativo contra tumores de qualquer destinação, agindo principalmente na regressão de tumores do câncer de mama (ALVES, 2015).

Pesquisas desenvolvidas com as frações isoladas da *Croton urucurana B.* em células de carcinoma hepatocelular humano (Huh-7) demonstrou que o tratamento levou a ativação de caspases 3 e 7, e um aumento na expressão de proteínas pró- apoptóticas (Bak, Bid, Bax, Puma, Bim e Bad) e caspase 3 clivada (BACANI, 2016).

Análises recentes também têm avaliado os efeitos citotóxicos de diversas frações extraídas da *Euphorbia umbellata*. Resultados em linhagens de adenocarcinoma retal humano HRT-18, células de leucemia linfóide aguda Jurkat e em carcinoma de cérvix humana HeLa demonstraram que a fração Hex foi a que apresentou maior citotoxicidade, sendo as Jurkat mais sensíveis ao tratamento.

Neste contexto, dois principais compostos foram isolados desta fração, o eufol e o acetato de germanicol (Luz et al., 2016). Na qual os ensaios realizados nas células Jukart demonstraram que o acetato de germanicol não apresentou atividade citotóxica significativa. Igualmente, o eufol também não diminuiu a viabilidade destas células, quando comparado ao grupo controle tratado com vincristina (Luz et al., 2016). Sendo assim a atividade citotóxica da fração Hex nesta linhagem pode estar correlacionada a outra subfração que ainda não foi estudada (Luz et al., 2016).

Cabral (2018), evidenciou o efeito citotóxico da subfração MeOH proveniente da fração Hex, extraída do látex da planta, em células de hepatocarcinoma (CHC). Nesse estudo, a linhagem Hepa1c1c1 tratada com a subfração MeOH apresentou redução do $\Delta\Psi_m$ devido a modulação da via apoptótica. Por outro lado, Cruz (2017) concluiu que a subfração diclorometano é promissora para o tratamento de leucemia, possivelmente por ação sinérgica dos terpenos nela presente.

Similarmente aos estudos realizados com a *E. umbellata*, ensaios com *Croton campestris* identificaram frações isoladas do seu látex que estão envolvidas na atividade antitumoral. Foi observado que uma ou outra fração era mais ou menos citotóxica de acordo com a linhagem tumoral testada. Dessa forma possuindo diferenciais em se tratando do desenvolvimento de um medicamento quimioterápico. Além disso, foi percebido que tais frações reduziram significativamente o volume da massa tumoral *in vivo*, após apresentarem bons resultados *in vitro* (CARVALHO,2014).

Tendo em vista a necessidade do desenvolvimento de novos compostos para o tratamento do câncer, foi avaliada a eficácia das subfrações extraídas da fração Hexano do látex da *E. umbellata*, considerando que o extrato bruto dessa planta tem sido bastante utilizado pela medicina popular.

Em estudos realizados com a linhagem de câncer de boca SCC-9, a fração Hex obtida da *Erythroxylum suberosum*, da família Erythroxylaceae, desencadeou citotoxicidade sobre as células normais na mesma proporção que nas células tumoral, mostrando-se não seletiva (NG ET AL., 2017; MACEDO ET AL., 2016; THAMIZHINIYAN ET AL., 2015). Dessa maneira, a partir da fração Hex, as subfrações EtOH, Cl₂, éter, Acetato, CHCl₃, e MeOH foram isoladas e avaliadas, pois do mesmo modo a fração Hex da *E.umbellata* em pesquisas anteriores exibiu o mesmo comportamento com células FN1, mostrando também a falta de seletividade.

Baniadam e colaboradores estudaram quatro triterpenóides ciclo-araneos de *Euphorbia macrostegia* com sua citotoxicidade contra linhagens de células cancerígenas MDA-MB48 e MCF-7. Usando o ensaio MTT para avaliar a citotoxicidade em duas linhas celulares diferentes, os valores IC_{50%} destes quatro compostos foram de 102,3, 34,0, 2,05 e 53,8 µg/mL na linhagem celular MDA-MB468, e os valores IC_{50%} de 88,3, 5,4, 8,9 e 127,3 µg/mL na linhagem MCF-7 (BANIADAM ET AL., 2014). Por sua vez, Pusztai (2007), estudaram o efeito de seis diterpenóides macrocíclicos isolados do extrato metanólico de *Euphorbia lagascae*, na linhagem de cancro do pulmão (A549). Os resultados demonstraram que houve citotoxicidade destes extratos nas células de câncer de pulmão (PUSZTAI ET AL., 2007)

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que para as células de melanoma B16 as subfrações dicloro, etanol, éter e metanol obtiveram IC_{50%} elevado. Dessa maneira, estas subfrações demonstraram baixo potencial citotóxico e efetividade. Entretanto, de acordo com o teste colorimétrico de MTT, as subfrações clorofórmio e acetato diminuíram significativamente a viabilidade celular já nas primeiras concentrações testadas.

Nossos resultados também evidenciaram que as subfrações clorofórmio e acetato aumentaram significativamente a população de células com DNA fragmentado após o tratamento, indicando a ocorrência de apoptose (Figura 21-B). Havendo também a presença de células paradas na fase G2/M do ciclo celular (Figura 21-A). Este efeito pode ter ocorrido pela parada nas células no checkpoint entre as fases S e G2/M. Esse ponto de verificação é colocado em operação como um mecanismo de segurança, desenvolvido para garantir que alterações na estrutura molecular do DNA ou sua quebra, que causariam mudanças prejudiciais, não prossigam antes de serem reparados, contribuindo assim com a manutenção da estabilidade genômica e transmissões de mutações para as células filhas (CIPRESSA, 2013; FURGASON, 2013).

Outras pesquisas avaliaram os efeitos antitumorais do látex da *Synadenium grantii Hook f.* em células de melanoma murino B16F10 e em camundongos portadores de melanoma B16F10. Os ensaios *in vivo* mostraram que o látex diminuiu a viabilidade celular, induzindo a parada do ciclo celular na fase S-G2/M. Além disto, nos animais tratados com este extrato houve a redução de 40% do volume tumoral (OLIVEIRA ET AL., 2013).

Após o período de tratamento das células B16-F10 com as duas subfrações que demonstram maior efetividade, os filamentos de actina foram analisados por meio da marcação com faloidina. Foi possível observar que a subfração CL₂, além de agir na diminuição do potencial elétrico mitocondrial, induziu a formação de fibras de estresse. De

acordo com Ferreira (2014), tal desorganização do citoesqueleto dá indícios de uma disfunção celular. Em contrapartida, seguindo o pressuposto que os compostos antineoplásicos devem possuir maior afinidade para as células tumorais, a subfração CHCl_3 não demonstrou viabilidade para o tratamento antitumoral, pois também induziu citotoxicidade em células FN1 em concentrações mais baixas que o $\text{IC}_{50\%}$ obtido para as células B16-F10.

Similarmente aos resultados obtidos para subfração CHCl_3 , os resultados da subfração acetato por meio do ensaio de rodamina 6G demonstrou novamente a citotoxicidade desta subfração. Neste ensaio, as células B16 tiveram redução do $\Delta\Psi_m$. Da mesma maneira, ocorreu a presença de desorganização dos filamentos de actina, apesar de não ser visível uma formação de fibras de estresse, como no tratamento com a subfração CHCl_3 .

As mitocôndrias são organelas encontradas em quase todas as células eucarióticas e possuem papel fundamental no metabolismo e morte celular, bem como na produção de ATP e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (HOYE ET AL. 2008; OW ET AL. 2008; TANG 2012; ZHANG ET AL. 2010). Um importante parâmetro de funcionalidade mitocondrial é o $\Delta\Psi_m$ (HU, LEUNG, E TANG 2014; LIN ET AL. 2016). Este pode ser avaliado utilizando-se sondas baseadas em compostos catiônicos lipofílicos, como a rodamina 123 ou 6G que atravessa facilmente as membranas e se acumulam no espaço da matriz mitocondrial (HU, LEUNG, AND TANG 2014; MATHUR ET. AL., 2000, PERRY ET AL. 2011; SUN ET AL. 2015; ZHANG ET AL. 2010).

Outros similares avaliaram um novo diterpeno de tetrahydroingiol isolado da *Euphorbia erythradenia* Bioss. em células tumorais de melanoma humano. Os resultados demonstram que ocorreu a indução Bax e inibição da expressão de Bcl-2, o que resultou no aumento da relação Bax / Bcl-2 e ativação da caspase-3. Além disso, o efeito apoptótico do composto também foi relacionado à produção de ROS e perda do $\Delta\Psi_m$ (FALLAHIAN, 2017).

Os nossos resultados sugerem que o acetato e clorofórmio podem inibir a proliferação de células tumorais de melanoma humano B16-F10, promovendo a apoptose e induzindo a interrupção do ciclo celular. Portanto, mais especificamente a subfração acetato pode ser um agente natural promissor para o tratamento do câncer de melanoma, provavelmente por induzir uma modulação da via apoptótica e desestruturação do citoesqueleto celular.

O conjunto de resultados demonstrou que as subfrações Éter e MeOH não apresentaram uma significativa citotoxicidade nas células tumorais B16- F10. Em contrapartida, as subfrações

Cl₂, EtOH foram as que mais promoveram atividade citotóxica nas células FN1. As subfrações Acetato e CHCl₃ foram as que apresentaram maior efetividade para as células tumorais B16-F10, sendo o Acetato a subfração mais efetiva, pois não promoveu citotoxicidade nas células normais FN1, nas mesmas concentrações das células B16-F10. Dessa maneira, mais estudos devem ser realizados com essa subfração para avaliar o seu potencial antitumoral *in vivo*.

5.REFERENCIAS

ALMEIDA, Patrícia de Oliveira Santos, 2016, Atividade citotóxica do óleo essencial de *Lippia* spp. frente a células da linhagem A549 de carcinoma de pulmão humano.

ALVES, Cristiano Marcio Rennê, et al., 2015, utilização de *euphorbia tirucalli* (avelos) no tratamento do câncer

ASSAF, Areej M. et al., 2013, Anti-Cancer, Anti-Inflammatory and Anti-Microbial Activities of Plant Extracts Used against Hematological Tumors in Traditional Medicine of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology* 145(3): 728–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.11.039>.

BACANI, Priscila de Matos Cândido, 2016, Novo ciclopeptídeo citotóxico do látex de *croton urucurana baillon* (Euphorbiaceae) e investigação de seu mecanismo de ação *in vitro*. Diss. Université Rennes 1.

BANIADAM S, Rahiminejad MR , Ghannadian H , Saeidi H , Ayatollahi AM , Aghaei M., 2014, Triterpenóides Cicloartane de *Euphorbia macrostegia* com sua citotoxicidade contra linhagens de células cancerígenas MDA-MB48 e MCF-7 . *Irã J Pharm Res.* 13: 135 - 141 .

CABRAL, Laerty Garcia de Sousa, 2018, Potencial citotóxico de frações e subfrações do látex da *euphorbia umbellata* em células de hepatocarcinoma.

CARVALHO, Joao Ernesto de, et al., 2014, Composição Farmacêutica Contendo Extrato De *Croton Campestris* Bem Como As Frações Provenientes Da União De Frações Previamente Obtidas Do Extrato E Seu Uso Em Composições Medicamentosas Destinadas Ao Tratamento De Câncer.

CIPRESSA F, Cenci G., 2013, DNA damage response, checkpoint activation and dysfunctional telomeres: face to face between mammalian cells and *Drosophila*. *Tsitologiya* 55, 211-217.

CRUZ, Luiza Stolz., 2017, Avaliação da atividade citotóxica de subfrações do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns e eufol.

DONEPUDI, M. S., Kondapalli, K., Amos, S. J., & Venkanteshan, P., 2014,. Breast cancer statistics and markers. *Journal of cancer research and therapeutics*, 10(3), 506.

FACINA, Taís., 2014,. Estimativa 2014–incidência de câncer no brasil. *Rev Bras Cancerol*, 60(1), 63-64.

FALLAHIAN, F., Ghanadian, M., Aghaei, M., e Zarei, SM , 2017, Indução da parada de fase G2 / M e apoptose por um novo diterpeno tetrahidroingenol da *Euphorbia erythradenia* Bioss. em células cancerosas de melanoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy* , 86 , 334-342.

FERREIRA, Fernanda Silva. (2014). Efeitos do ditelureto de difenila sobre o citoesqueleto de astrócitos corticais de ratos.

FINN, L.; MARKOVIC, S. N.; JOSEPH, R. W, 2012, Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Med*, v. 10, p. 23. ISSN 1741-7015. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22385436> >.

- FURGASON JM, Bahassi el M., 2013, Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacol Ther* 137, 298-308.
- HOYE, Adam T. et al., 2008, Targeting Mitochondria. *Accounts of Chemical Research* 41(1): 87–97.
- HU, Rongrong; Nelson L. C. Leung; Ben Zhong Tang., 2014, AIE Macromolecules: Syntheses, Structures and Functionalities. *Chem. Soc. Rev.* 43(13): 4494–4562. <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4CS00044G>
- INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2017, Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva INCA - *Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018-2019*. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>.
- JOHNSON, D. B.; SOSMAN, J. A., 2015, Therapeutic Advances and Treatment Options in Metastatic Melanoma. *JAMA Oncol*, v. 1, n. 3, p. 380-6. ISSN 2374-2445. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26181188> >.
- KIELSTRA, Paul, 2017, Controle do câncer, acesso e desigualdade na América Latina: uma história de luz e sombra. *Economist Intelligence Unit*. p.5-7.
- KUMAR, S., Bajaj, S., & Bodla, R. B., 2016, Preclinical screening methods in cancer. *Indian Journal of Pharmacology*, 48(5), 481–486. <http://doi.org/10.4103/0253-7613.190716>
- LAGE, H., DUARTE, N., COBURGER, C., HILGEROTH, A., FERREIRA, M. J., 2010, Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine*, v. 17, n. 6, p. 441-448.
- LIN, Hui et al. 2016. Inhibition of Gli/hedgehog Signaling in Prostate Cancer Cells By ‘cancer bush’ *Sutherlandia Frutescens* Extract. *Cell Biology International* 40(2): 131–42.
- LUZ, L.E.C. et al., 2015, Cytotoxicity of Latex and Pharmacobotanical Study of Leaves and Stem of *Euphorbia Umbellata* (Janaúba). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 25(4): 344–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.005>.
- LUZ, L.E.C. et al., 2016, Cytotoxic Biomonitoring Study of *Euphorbia Umbellata* (Pax) Bruyns. *Journal of Ethnopharmacology* 183: 29–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.025>.
- MACEDO, Taysa B C et al., 2016, Cytotoxic Effect of *Erythroxylum Suberosum* Combined with Radiotherapy in Head and Neck Cancer Cell Lines. *Brazilian Dental Journal* 27(1): 108–12.
- MATHUR, A. et al., 2000, Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 46(1):126-38.
- NG, Pei Ying et al., 2017. *Clinacanthus Nutans* Hexane Extracts Induce Apoptosis Through a Caspase-Dependent Pathway in Human Cancer Cell Lines. *Asian Pacific journal of cancer prevention* : APJCP 18(4): 917–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28545188>.
- OLIVEIRA, Thais Latansio de et al., 2013, Antitumoural Effect of *Synadenium Grantii* Hook F. (*Euphorbiaceae*) Latex. *Journal of Ethnopharmacology* 150(1): 263–69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.033>.

OLIVEIRA, Thais Latansio de et al., 2013, Antitumoural Effect of *Synadenium Grantii* Hook F. (Euphorbiaceae) Latex. *Journal of Ethnopharmacology* 150(1): 263–69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.033>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011, Ministério da Saúde. Folha informativa – câncer. https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=879.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018, Ministério da Saúde. Folha informativa – câncer. https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=839.

OW, Yong Ling P., Douglas R. Green, Zhenyue Hao, and Tak W. Mak., 2008, Cytochrome c: Functions beyond Respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(7): 532–42.

PERRY, Seth W. et al., 2011, Mitochondrial Membrane Potential Probes and the Proton Gradient: A Practical Usage Guide. *BioTechniques* 50(2): 98–115.

PUSZTAI, R , MJ Ferreira , Duarte N , Engi H. , Molnar J., 2007, As lantias macrocíclicas diterpenos como promotores antitumorais . *Anticancer Res.* 27: 201 – 205

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*, v. 16, n. 6, p. 345-58, Jun 2016. ISSN 1474-1768. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27125352> >.

SUN, Tingting et al., 2015, Mitochondria-Localized Fluorescent BODIPY-Platinum Conjugate. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 6(4): 430–33.

TANG, Ben Zhong., 2012, A Photostable AIE Luminogen for Specific Mitochondrial Imaging and Tracking. *American Chemical Society*, 135, 62–65. dx.doi.org/10.1021/ja310324q

THAMIZHINIYAN, Venkatesan, Choi Young-Woong, and Kim Young-Kyoon., 2015, The Cytotoxic Nature of *Acanthopanax Sessiliflorus* Stem Bark Extracts in Human Breast Cancer Cells. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22(6): 752–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.004>.

ZHANG, Lu et al., 2010, Old Is New Again: A Chemical Probe for Targeting Mitochondria and Monitoring Mitochondrial Membrane Potential in Cells. *Optoelectronics and Advanced Materials, Rapid Communications* 4(8): 1166–69.

LEGENDA DE FIGURAS

- Figura 1. Fotomicrografias das análises morfológicas das células B16. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a sufração Etanol no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.
- Figura 2. Fotomicrografias das análises morfológicas das células B16. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a sufração Cl₂ no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.
- Figura 3. Determinação da citotoxicidade em células B16 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média ± DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da subfração EtOH e Cl₂, durante o período de 24 horas. (A) EtOH (10 – 150 µg/poço). (B) Cl₂ (10 – 150 µg/poço).
- Figura 4. Fotomicrografias das análises morfológicas das células B16. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração MeOH no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.
- Figura 5. Fotomicrografias das análises morfológicas das células B16. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Éter no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.
- Figura 6. Determinação da citotoxicidade em células B16 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média ± DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da subfração MeOH e Éter, durante o período de 24 horas. (A) MeOH (10 – 150 µg/poço). (B) Éter (10 – 150 µg/poço).
- Figura 7. Fotomicrografias das análises morfológicas das células B16. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Acetato no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.
- Figura 8. Fotomicrografias das análises morfológicas das células B16. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Clorofórmio no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.
- Figura 9. Determinação da citotoxicidade em células B16 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média ± DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes

concentrações da subfração Acetato e clorofórmio, durante o período de 24 horas. (A) Acetato (10 – 150 µg/poço). (B) CHCl₂ (10 – 150 µg/poço).

Figura 10. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a sufração Cl₂ no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.

Figura 11. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a sufração EtOH no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.

Figura 12. Determinação da citotoxicidade em células FN1 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média ± DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da subfração Cl₂ e EtOH, durante o período de 24 horas. (A) Cl₂ (10 – 150 µg/poço). (B) EtOH (10 – 150 µg/poço).

Figura 13. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a sufração Éter no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.

Figura 14. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a sufração MeOH no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.

Figura 15. Determinação da citotoxicidade em células FN1 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média ± DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da subfração MeOH e Éter, durante o período de 24 horas. (A) MeOH (10 – 150 µg/poço). (B) Éter (10 – 150 µg/poço).

Figura 16. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a sufração Acetato no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.

Figura 17. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a sufração Clorofórmio no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.

Figura 18. Determinação da citotoxicidade em células FN1 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média ± DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes

concentrações da subfração Acetato e clorofórmio durante o período de 24 horas. (A) Acetato (10 – 150 µg/poço). (B) Clorofórmio (10 – 150 µg/poço).

Figura 19. Fotomicrografias das células B16 com mitocôndrias marcadas com rodamina 6G (vermelho), analisadas por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com Acetato e Clorofórmio, nas concentrações de 2.3 e 13.75 µg/poço, durante um período 12 horas. Controle (A); Acetato 2.3 µg/mL (B) Clorofórmio 13.75 µg/mL (C).

Figura 20. Fotomicrografias das células B16 com filamentos de actina marcadas com faloidina(verde), analisadas por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com Acetato e Clorofórmio, nas concentrações de 2.3 e 13.75 µg/poço, durante um período 6 horas. Controle (A); Acetato 2.3 µg/mL (B) Clorofórmio 13.75 µg/mL (C).

Figura 21. Determinação Fases do ciclo celular (A) e degradação do DNA (B) de células B16-F10. As células foram tratadas com Acetato e Clorofórmio, nas concentrações de 2.3 e 13.75 µg/poço, durante um período 6 horas.

FIGURAS

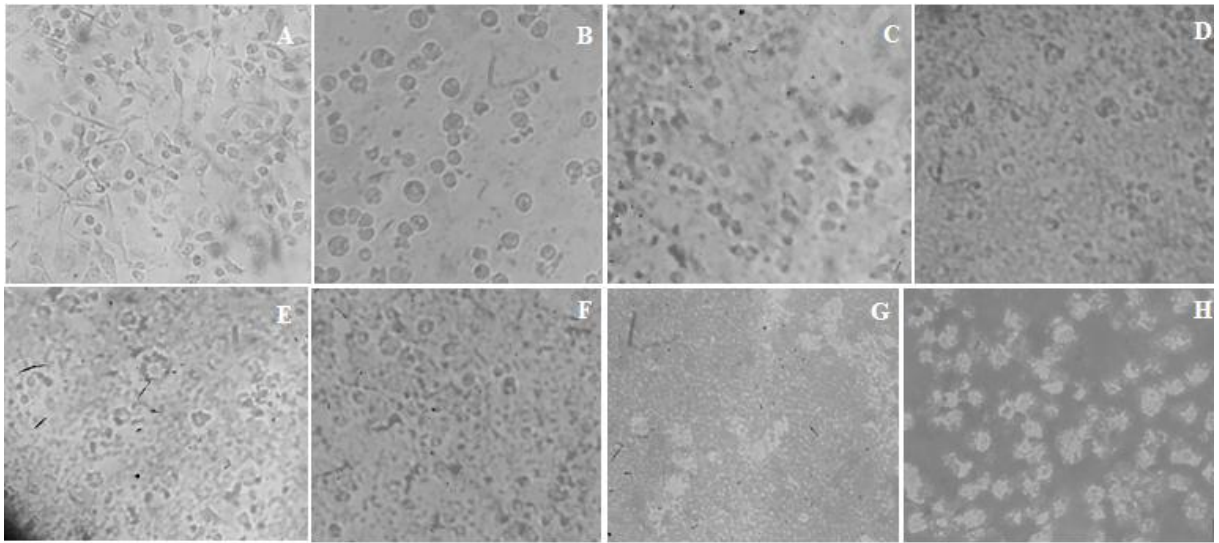


Figura 1. Fotomicrografias das análises morfológicas das células B16. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Cl₂ no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.

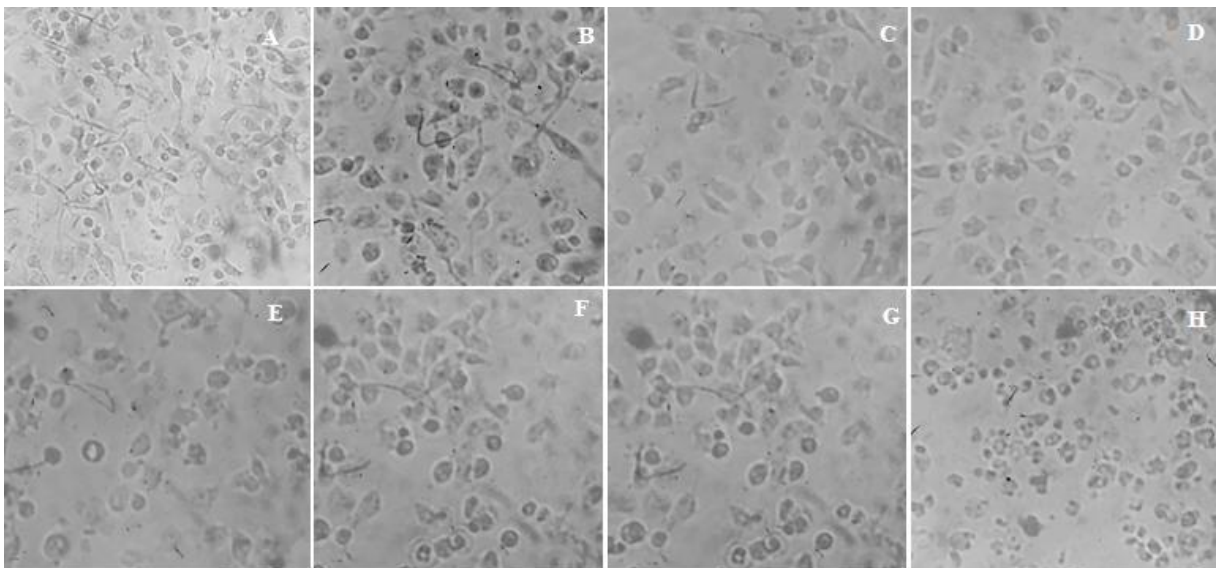


Figura 2. Fotomicrografias das análises morfológicas das células B16. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Etanol no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.

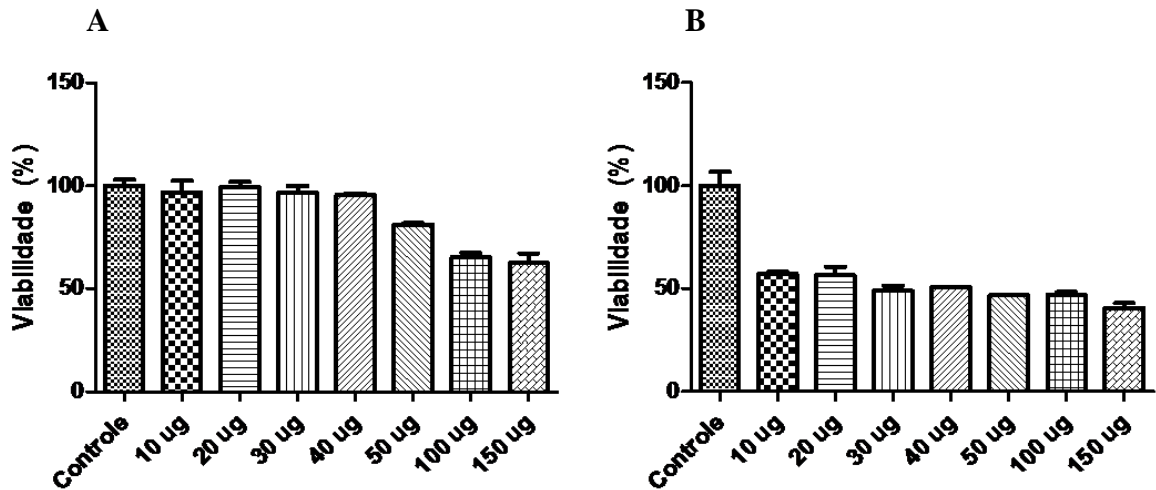


Figura 3. Determinação da citotoxicidade em células B16 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média \pm DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da subfração EtOH e Cl₂, durante o período de 24 horas. **(A)** Cl₂ (10 – 150 µg/poço). **(B)** EtOH (10 – 150 µg/poço).

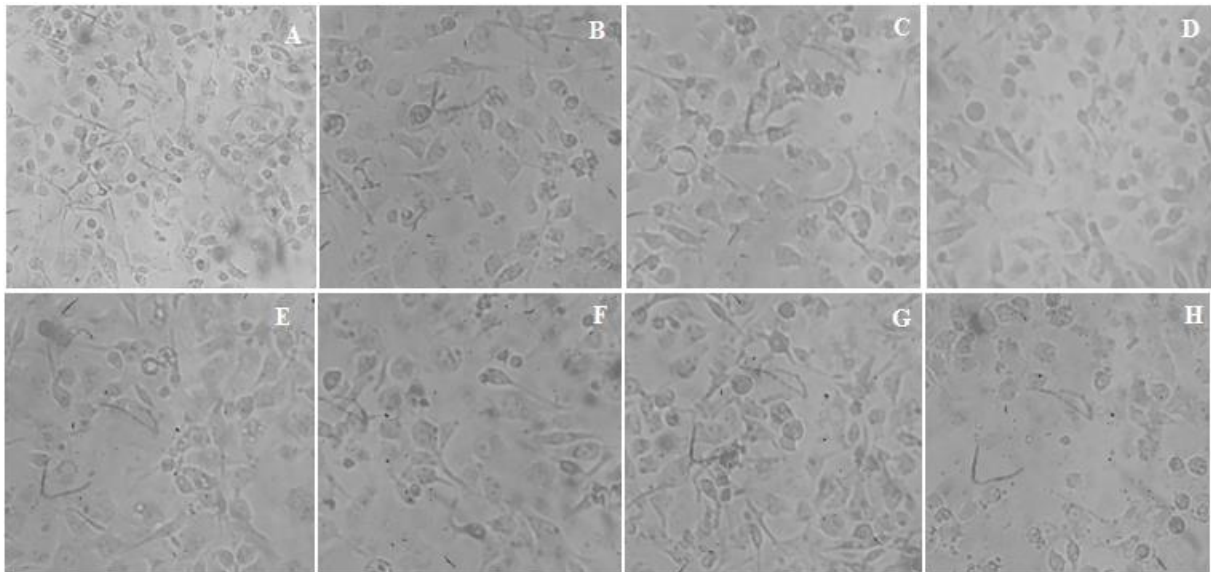


Figura 4. Fotomicrografias das análises morfológicas das células B16. **(A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração MeOH no período de 24 horas **(B)** 10 µg/poço **(C)** 20 µg/poço **(D)** 30 µg/poço **(E)** 40 µg/poço **(F)** 50 µg/poço **(G)** 100 µg/poço **(H)** 150 µg/poço.

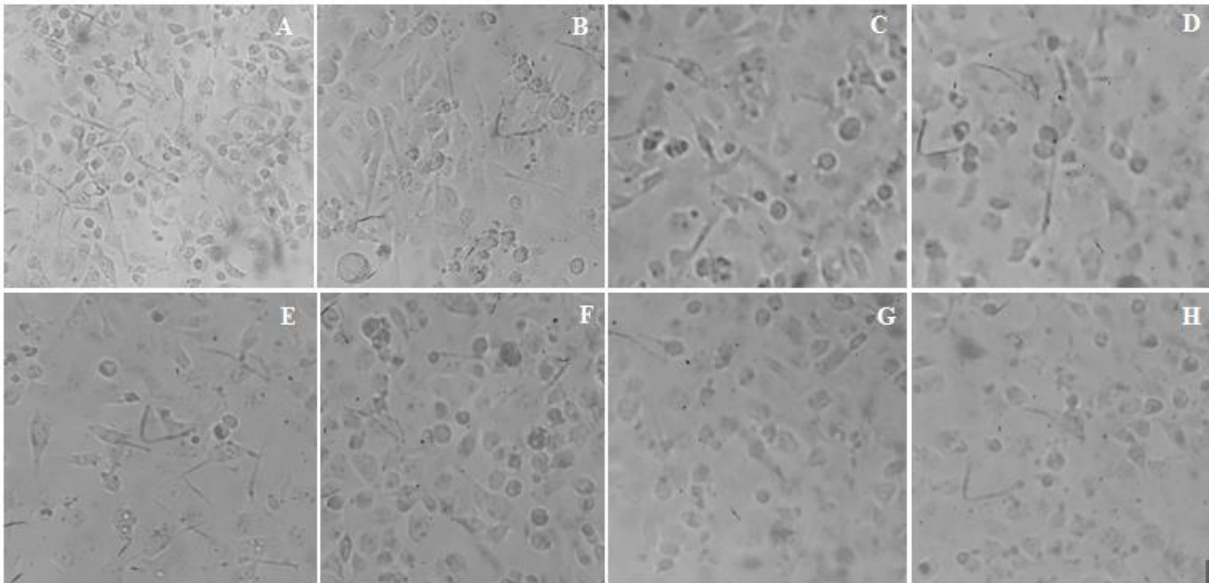


Figura 5. Fotomicrografias das análises morfológicas das células B16. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Éter no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.

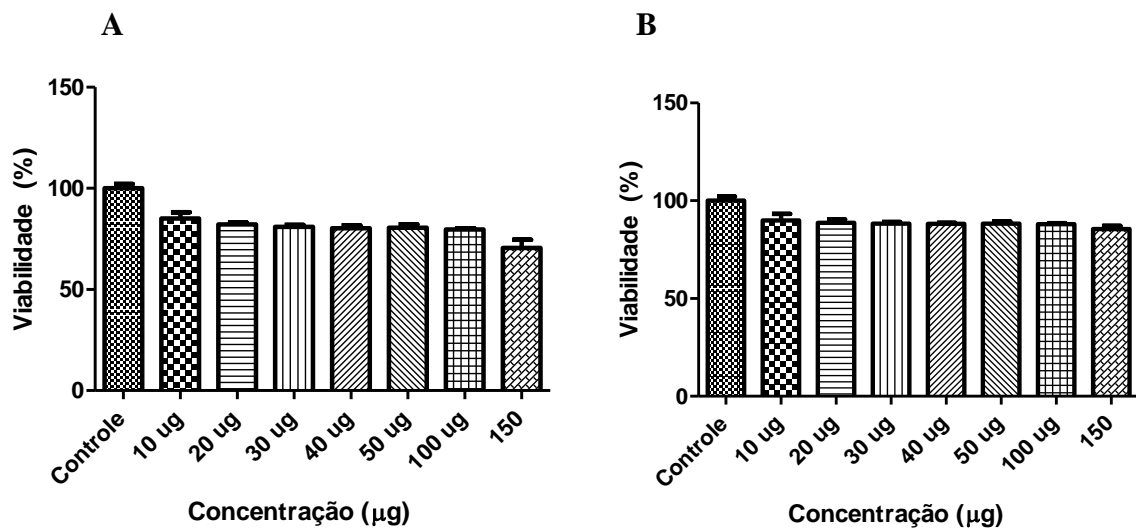


Figura 6. Determinação da citotoxicidade em células B16 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média \pm DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da subfração MeOH e Éter, durante o período de 24 horas. (A) MeOH (10 – 150 µg/poço). (B) Éter (10 – 150 µg/poço).

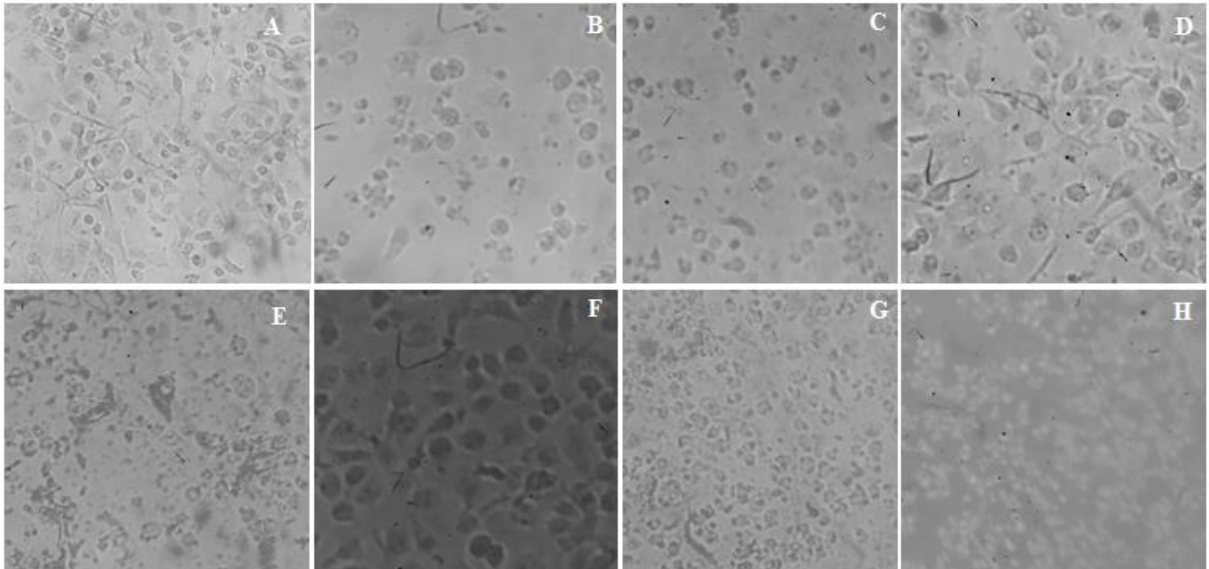


Figura 7. Fotomicrografias das análises morfológicas das células B16. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Acetato no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.

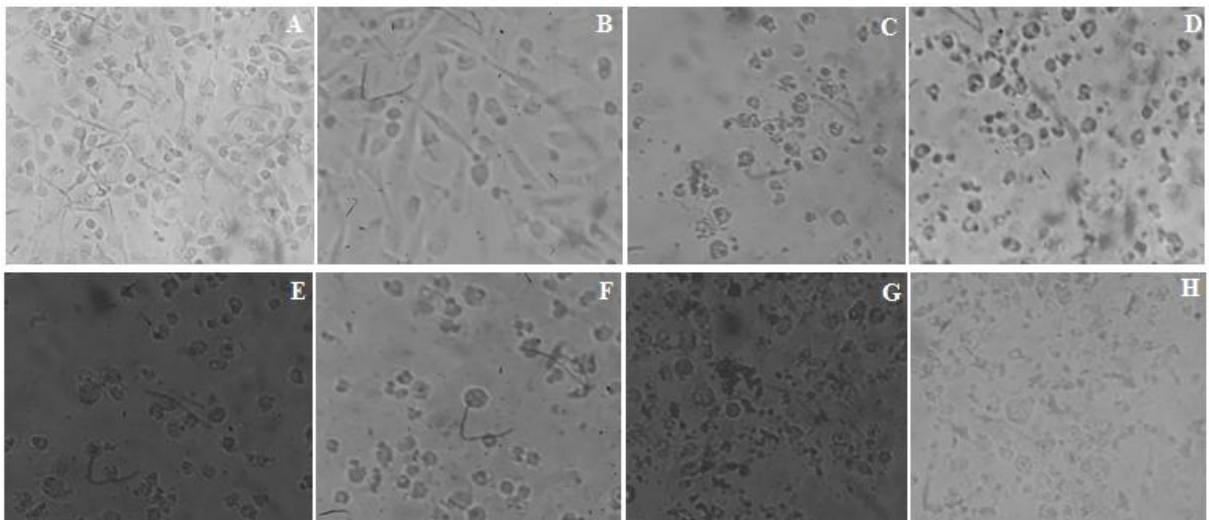


Figura 8. Fotomicrografias das análises morfológicas das células B16. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Clorofórmio no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.

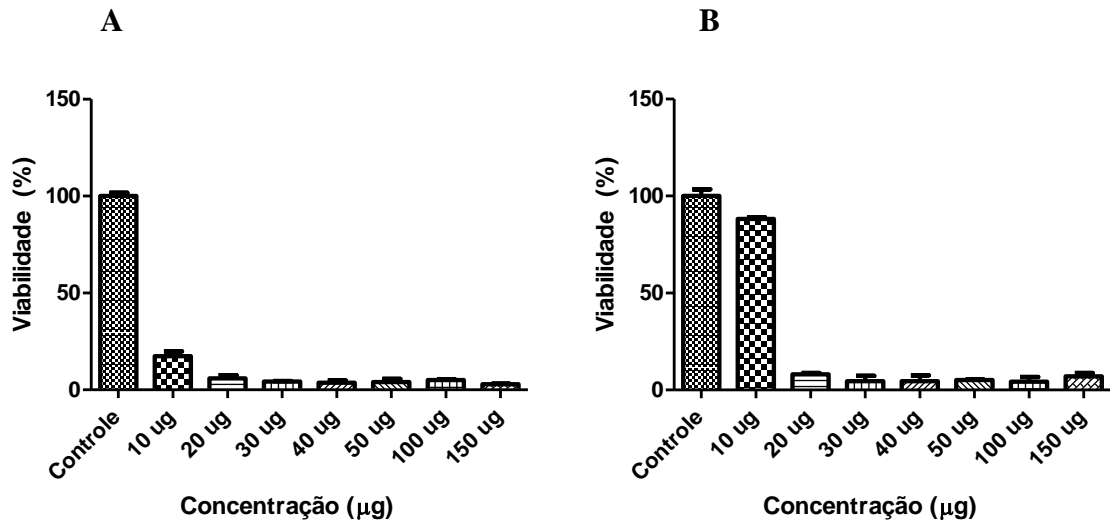


Figura 9. Determinação da citotoxicidade em células B16 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média \pm DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da subfração Acetato e clorofórmio, durante o período de 24 horas. **(A)** Acetato (10 – 150 $\mu\text{g}/\text{poço}$). **(B)** CHCl_2 (10 – 150 $\mu\text{g}/\text{poço}$).

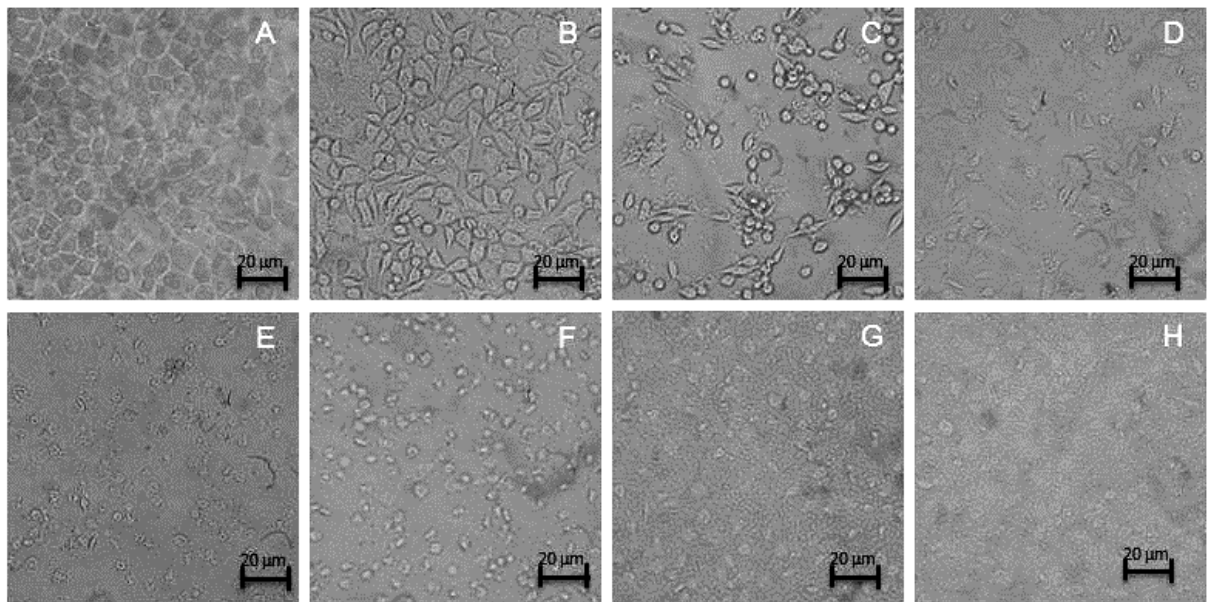


Figura 10. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1. **(A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Cl_2 no período de 24 horas **(B)** 10 $\mu\text{g}/\text{poço}$ **(C)** 20 $\mu\text{g}/\text{poço}$ **(D)** 30 $\mu\text{g}/\text{poço}$ **(E)** 40 $\mu\text{g}/\text{poço}$ **(F)** 50 $\mu\text{g}/\text{poço}$ **(G)** 100 $\mu\text{g}/\text{poço}$ **(H)** 150 $\mu\text{g}/\text{poço}$.

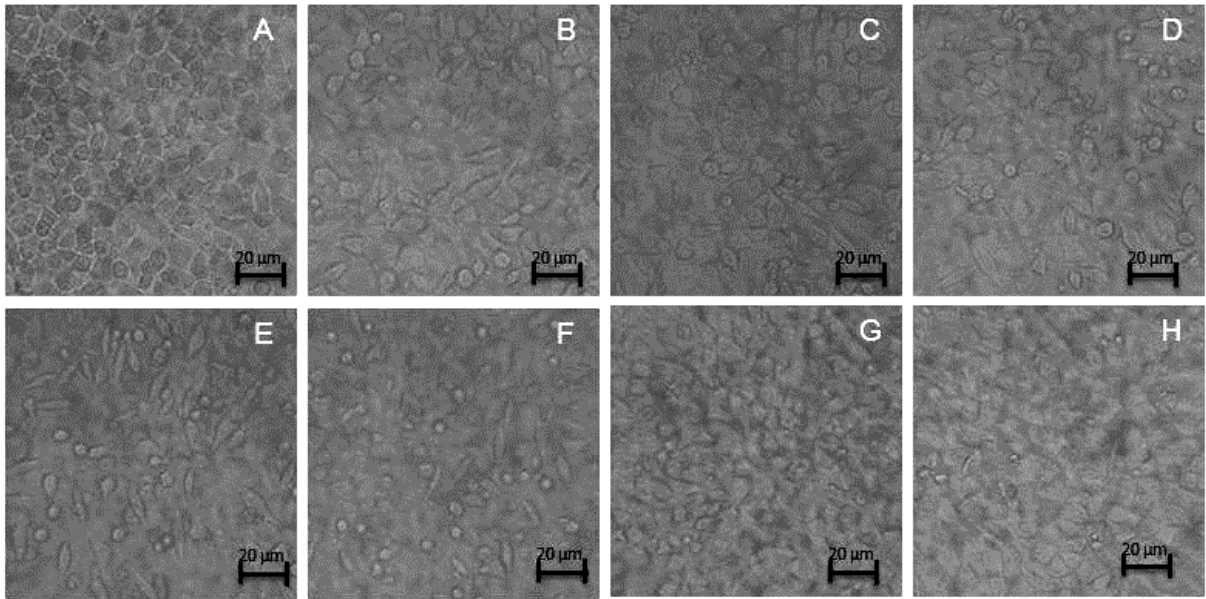


Figura 11. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração EtOH no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.

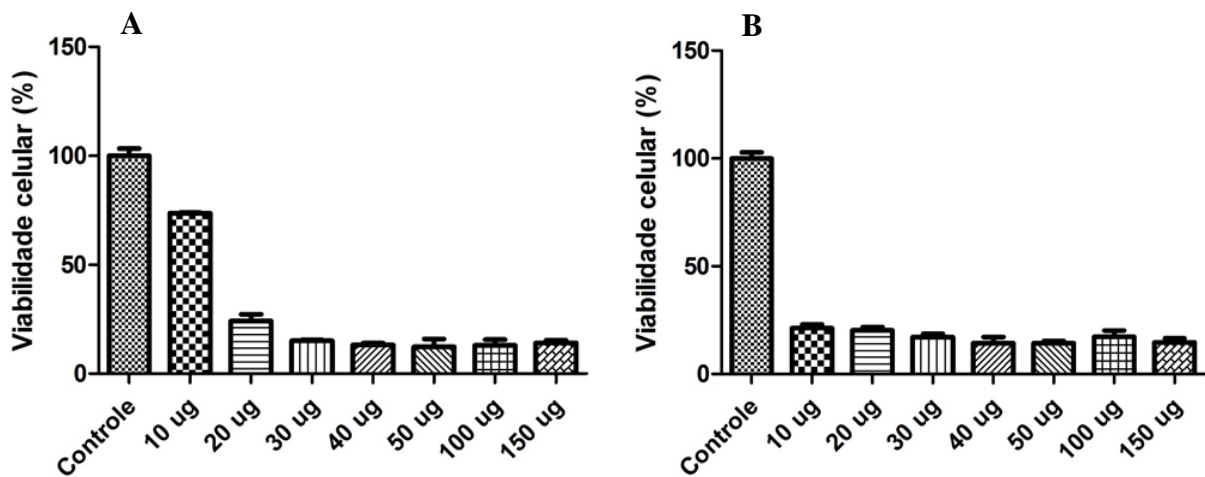


Figura 12. Determinação da citotoxicidade em células FN1 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média \pm DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da subfração Cl₂ e EtOH, durante o período de 24 horas. (A) Cl₂ (10 – 150 µg/poço). (B) EtOH (10 – 150 µg/poço).

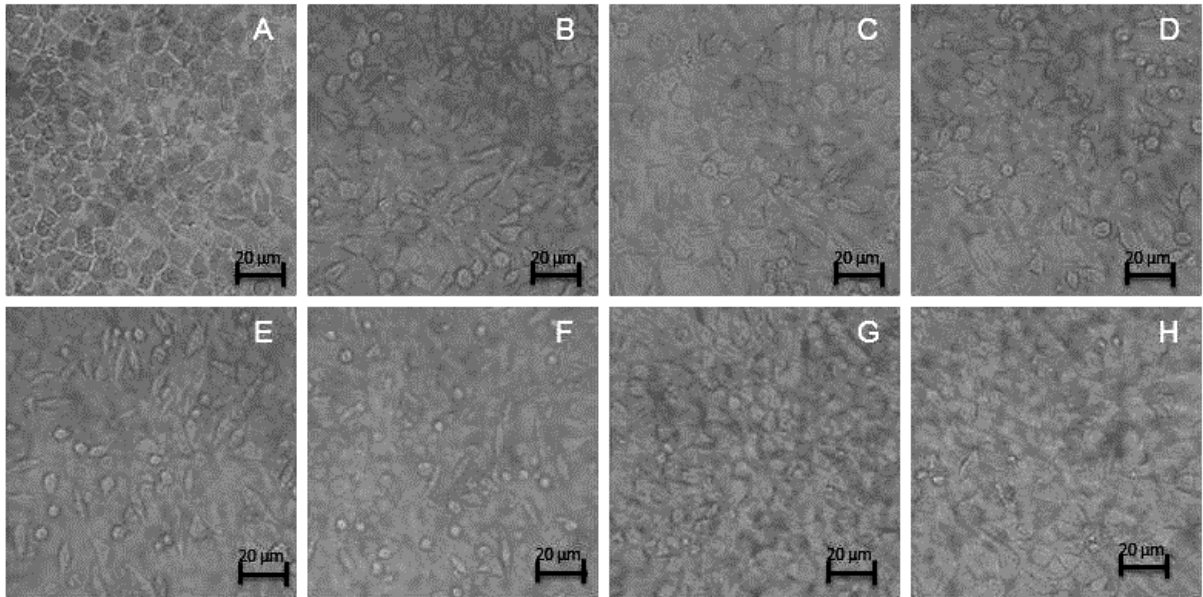


Figura 13. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Éter no período de 24 horas **(B)** 10 $\mu\text{g/poço}$ **(C)** 20 $\mu\text{g/poço}$ **(D)** 30 $\mu\text{g/poço}$ **(E)** 40 $\mu\text{g/poço}$ **(F)** 50 $\mu\text{g/poço}$ **(G)** 100 $\mu\text{g/poço}$ **(H)** 150 $\mu\text{g/poço}$.

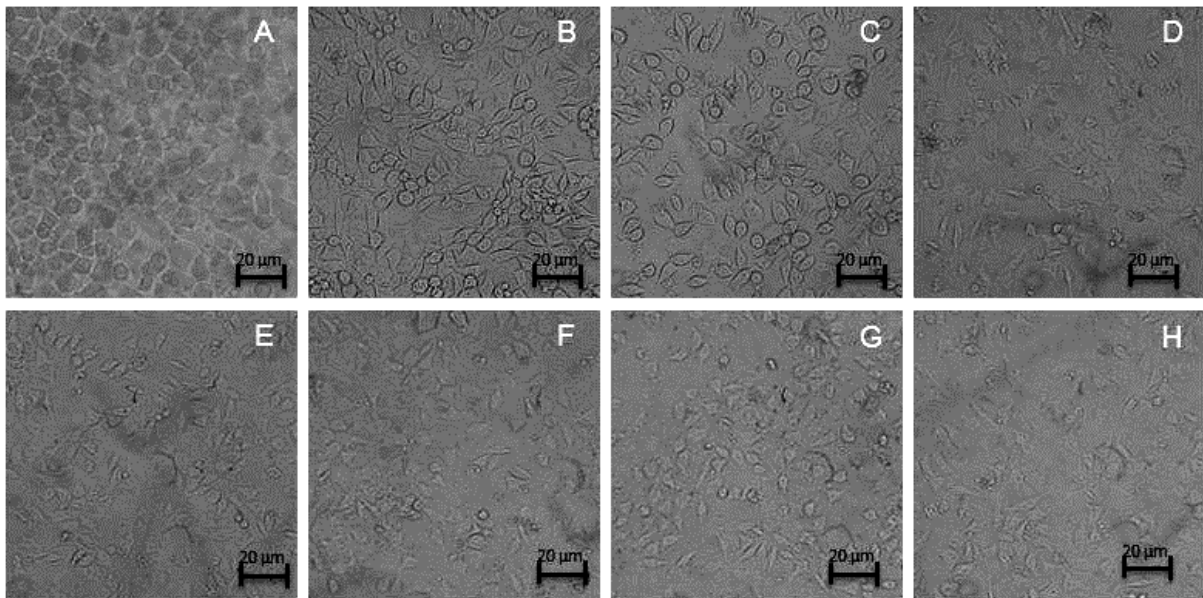


Figura 14. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração MeOH no período de 24 horas **(B)** 10 $\mu\text{g/poço}$ **(C)** 20 $\mu\text{g/poço}$ **(D)** 30 $\mu\text{g/poço}$ **(E)** 40 $\mu\text{g/poço}$ **(F)** 50 $\mu\text{g/poço}$ **(G)** 100 $\mu\text{g/poço}$ **(H)** 150 $\mu\text{g/poço}$.

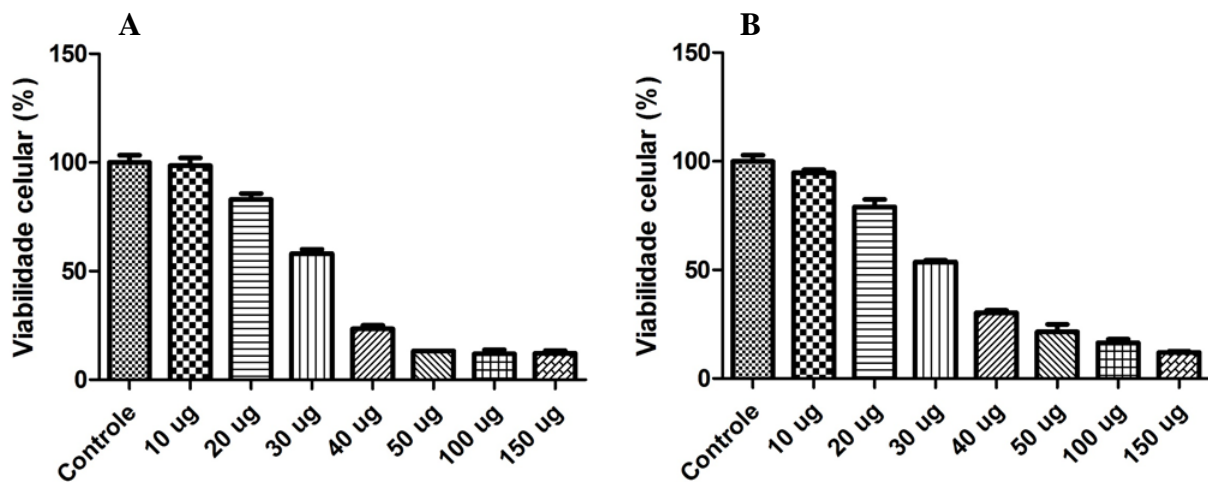


Figura 15. Determinação da citotoxicidade em células FN1 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média \pm DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da subfração MeOH e Éter, durante o período de 24 horas. **(A)** MeOH (10 – 150 μ g/poço). **(B)** Éter (10 – 150 μ g/poço).

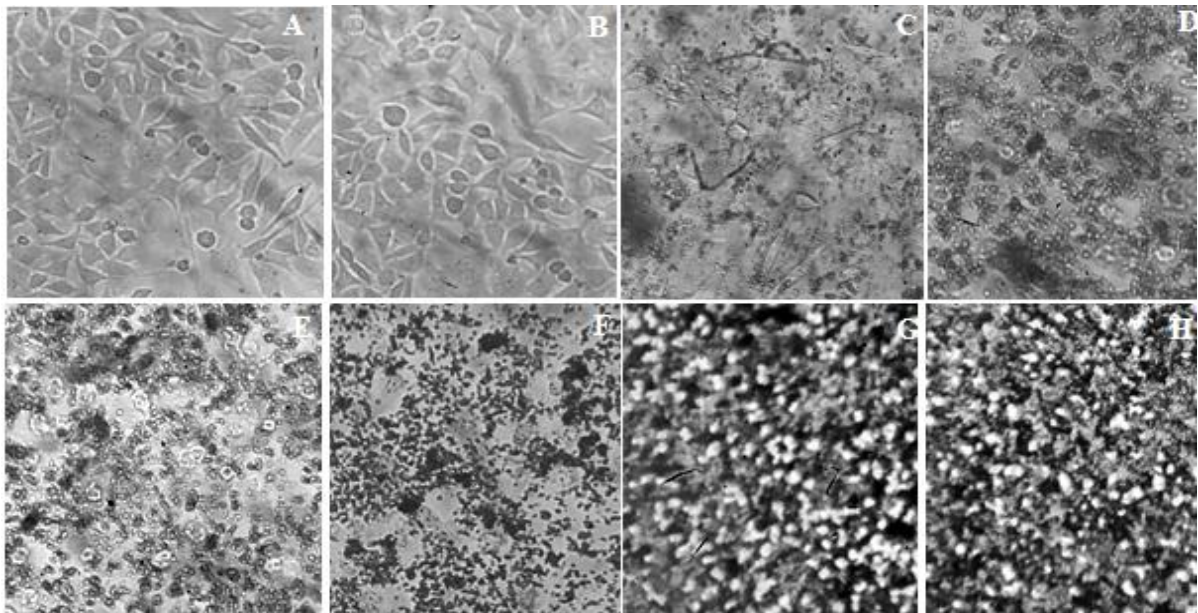


Figura 16. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1. **(A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Acetato no período de 24 horas **(B)** 10 μ g/poço **(C)** 20 μ g/poço **(D)** 30 μ g/poço **(E)** 40 μ g/poço **(F)** 50 μ g/poço **(G)** 100 μ g/poço **(H)** 150 μ g/poço.

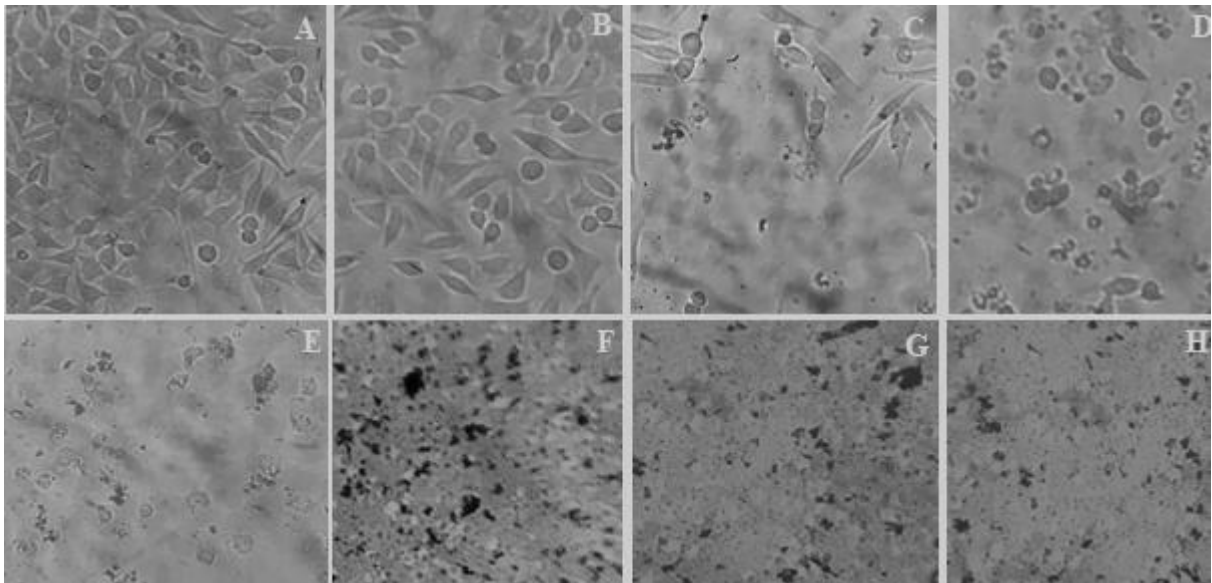


Figura 17. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1. (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Clorofórmio no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço.

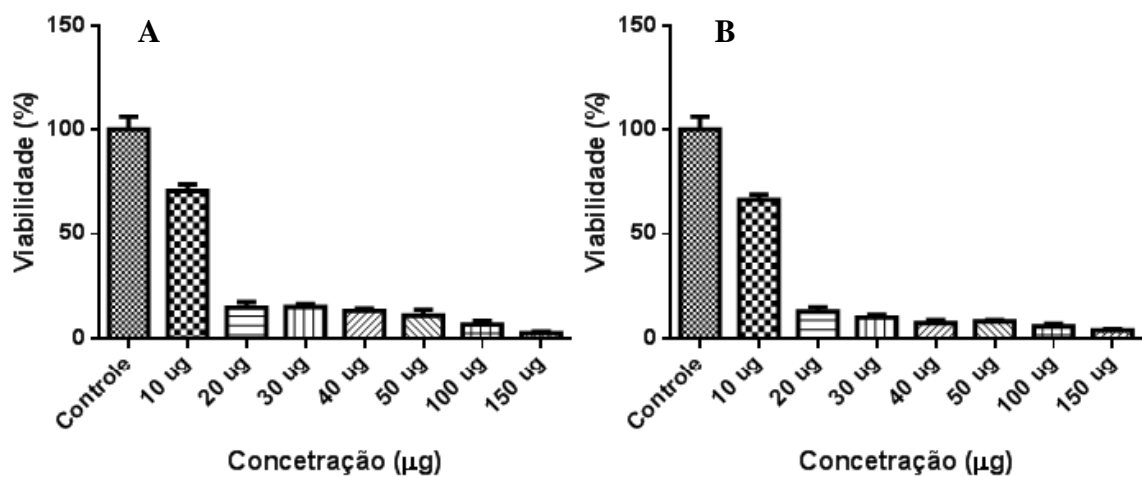


Figura 18. Determinação da citotoxicidade em células FN1 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média \pm DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da subfração Acetato e clorofórmio durante o período de 24 horas. (A) Acetato (10 – 150 µg/poço). (B) Clorofórmio (10 – 150 µg/poço).

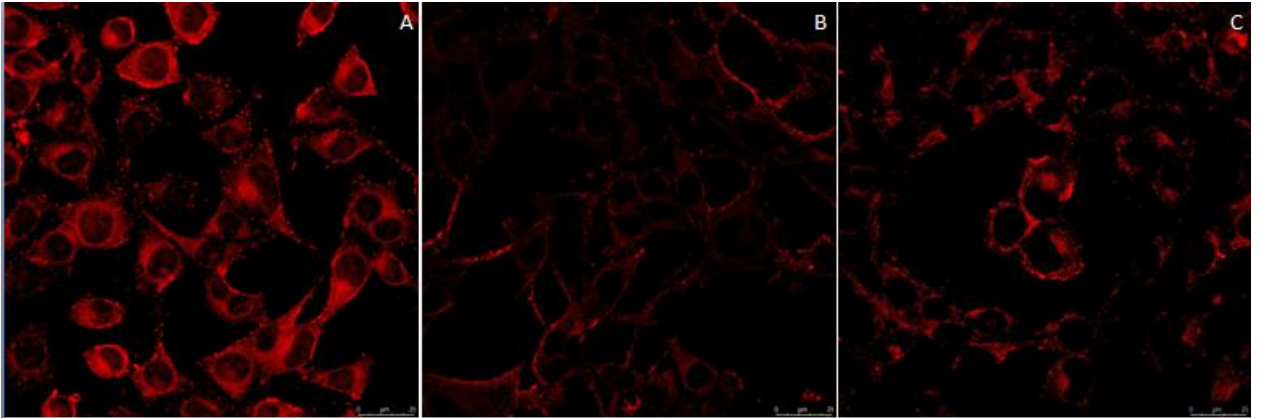


Figura 19. Fotomicrografias das células B16 com mitocôndrias marcadas com rodamina 6G (vermelho), analisadas por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com Acetato e Cloróformio, nas concentrações de 2.3 e 13.75 µg/poço, durante um período 12 horas. Controle (A); Acetato 2.3 µg/mL (B) Cloróformio 13.75 µg/mL (C).

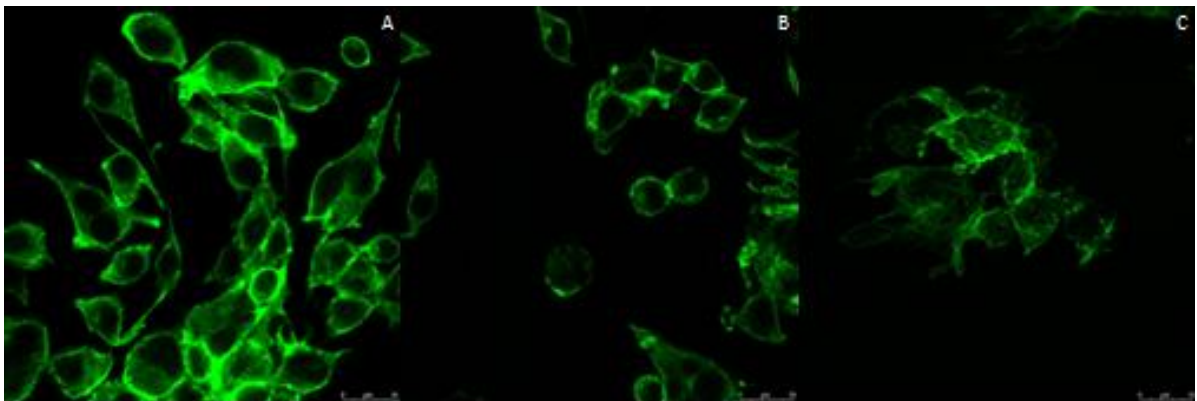


Figura 20. Fotomicrografias das células B16 com filamentos de actina marcadas com faloidina(verde), analisadas por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com Acetato e Cloróformio, nas concentrações de 2.3 e 13.75 µg/poço, durante um período 6 horas. Controle (A); Acetato 2.3 µg/mL (B) Cloróformio 13.75 µg/mL (C).

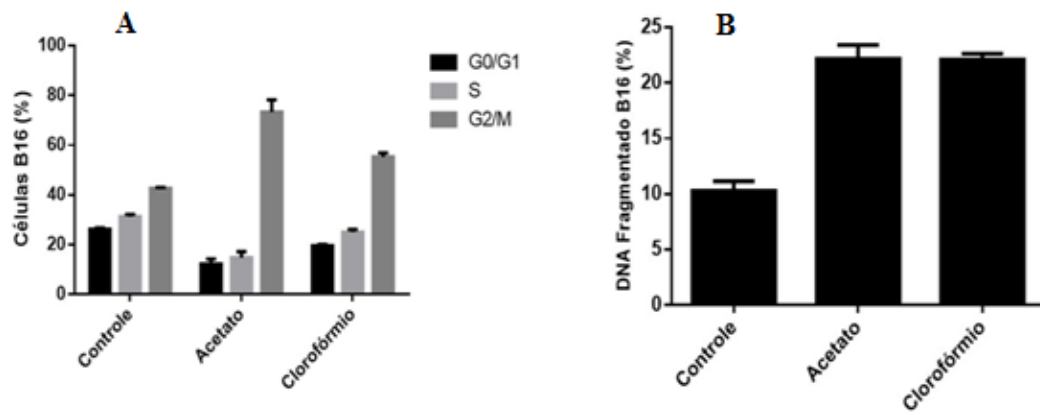


Figura 21. Determinação Fases do ciclo celular (A) e degradação do DNA (B) de células B16. As células foram tratadas com Acetato e Clorofórmio, nas concentrações de 2.3 e 13.75 $\mu\text{g}/\text{poço}$, durante um período 6 horas.

GLOSSÁRIO

A549	Câncer de pulmão de não pequenas células
ATP	Adenosina trifosfato
B16-F10	melanoma murino
BJAB	Linfoma de Burkitt
CHC	Hepatocarcinoma
CHCl_3	Clorofórmio
CH_3COO^-	Acetato
Cl_2	Dicloro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EtOH	Etanol
FN1	Fibroblasto Humano Normal
HeLa	Câncer cervical humano
Hex	Hexano
HCT-8	Adenocarcinoma colorretal ileocecal
HRT-18	Câncer colon íleocecal
Huh-7	carcinoma hepatocelular humano
IC50%	Concentração Inibitória de 50%
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Jukart	
MCF-7	Câncer de mama
MDA-MB	Câncer de mama
MeOH	Metanol

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SCC-9	Câncer de boca
SFB	Soro Bovino Fetal
U266	Mieloma múltiplo
$\Delta\Psi_m$	Potencial elétrico da membrana mitocondrial
μg	Micrograma
μL	Microlitro