



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

LAERTTY GARCIA DE SOUSA CABRAL

POTENCIAL CITOTÓXICO DE FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DO LÁTEX DA  
*Euphorbia umbellata* EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA

Areia, 2018

LAERTTY GARCIA DE SOUSA CABRAL

POTENCIAL CITOTÓXICO DE FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DO LÁTEX DA  
*Euphorbia umbellata* EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentada 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

LAERTTY GARCIA DE SOUSA CABRAL

POTENCIAL CITOTÓXICO DE FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DO LÁTEX DA  
*Euphorbia umbellata* EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA

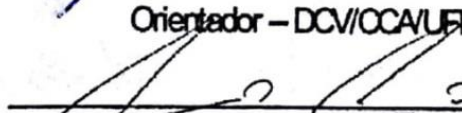
Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentada à Universidade Federal da  
Paraíba como requisito parcial para a  
obtenção do título de Licenciado em  
Ciências Biológicas.

Areia, 31 de Janeiro de 2018.

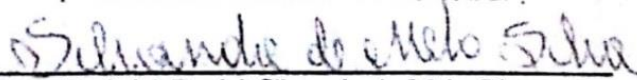
BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr. Abraão Ribeiro Barbosa

Orientador – DCV/CCA/UFPB

  
Dr. Arthur Cássio de Lima Luna

Examinador Externo – DBQ/IQ/USP

  
Prof. (a) Dr. (a) Silvana de Melo Silva

Examinadora – DQF/CCA/UFPB

Dedico este trabalho aos meus pais Edicleide Garcia de Sousa Cabral e Laécio Cabral da Cunha, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos alegres e de adversidade, a minha irmã Luma Garcia de Sousa Cabral, que este sirva de modelo para que ela trilhe seu caminho, e minha avó Maria Pereira Cavalcante que sonhava em ver seu neto formado, mas que hoje não está entre nós.

*“Aos outros dou o direito de ser como são.  
A mim, dou o dever de ser cada dia  
melhor.”*

*(Chico Xavier)*

## Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 9         |
| 2. METODOLOGIA.....   | 12        |
| <b>2.1 Ensaio in vitro.....</b>   | <b>12</b> |
| 2.1.1. Cultura celular.....   | 12        |
| 2.1.2. Avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico de MTT.....  | 12        |
| 2.1.3. Análise do potencial elétrico mitocondrial por microscopia confocal a laser.....   | 13        |
| <b>2.2 Análise estatística.....</b>   | <b>13</b> |
| 3. RESULTADOS.....  | 14        |
| <b>3.1. Avaliação da citotoxicidade do solvente DMSO.....</b>   | <b>14</b> |
| <b>3.2. Avaliação da citotoxicidade da fração Hex nas células tumorais Hepa1c1c7.....</b>   | <b>14</b> |
| <b>3.3 Avaliação da citotoxicidade da subfração EtOH nas células tumorais Hepa1c1c7.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>3.4 Avaliação da citotoxicidade da subfração Cl<sub>2</sub> nas células tumorais Hepa1c1c7.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>3.5. Avaliação da citotoxicidade da subfração MeOH nas células tumorais Hepa1c1c7.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>3.6. Avaliação da citotoxicidade da subfração Éter nas células tumorais Hepa1c1c7.....</b>   | <b>16</b> |
| <b>3.7. Avaliação da citotoxicidade da fração Hex nas células normais FN1.....</b>  | <b>16</b> |
| <b>3.8. Avaliação da citotoxicidade das subfrações Cl<sub>2</sub> e EtOH nas células normais FN1.....</b>   | <b>16</b> |
| <b>3.9. Avaliação da citotoxicidade das subfrações Éter e MeOH nas células normais FN1.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>3.10. Avaliação do potencial elétrico mitocondrial (<math>\Delta\Psi_m</math>) das células tumorais tratadas com as subfrações Éter e MeOH.....</b>    | <b>17</b> |
| <b>3.11. Avaliação do potencial elétrico mitocondrial (<math>\Delta\Psi_m</math>) das células normais FN1 tratadas com as subfrações Éter e MeOH.....</b> | <b>18</b> |
| 4. DISCUSSÃO.....   | 19        |
| 5. CONCLUSÃO.....   | 24        |
| 6. AGRADECIMENTOS.....  | 25        |
| 7. REFERÊNCIAS.....   | 26        |

## RESUMO

Estudos recentes têm demonstrado os efeitos citotóxicos do látex da *Euphorbia umbellata* em diversos linhagens de células tumorais. Contudo, ensaios com linhagens de hepatocarcinoma (CHC) ainda não foram realizados. Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antitumoral da fração hexano (Hex), e suas subfrações metanol (MeOH), dicloro (Cl<sub>2</sub>), éter e etanol (EtOH), extraídas do látex da *E. umbellata*, no modelo de CHC. A citotoxicidade desta fração e suas subfrações foi avaliada nas células tumorais de hepatocarcinoma Hepa1c1c7 e normais FN1, por meio do ensaio colorimétrico de MTT. As concentrações testadas foram 10 µg – 150 µg/poço, por um período de 24 e 48 horas. Posteriormente, o potencial elétrico mitocondrial das células tratadas foi avaliado por microscopia confocal a laser. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que a fração Hex da *E. umbellata* apresentou citotoxicidade nas células Hepa1c1c7. Entretanto, as células FN1 também apresentaram sensibilidade a fração Hex. Nossos resultados também evidenciaram que as células tumorais Hepa1c1c7 e normais FN1 apresentaram grande sensibilidade as subfrações EtOH e Cl<sub>2</sub>, em proporções similares. Em contrapartida, as subfrações éter e MeOH induziram citotoxicidade nas linhagens celulares Hepa1c1c7, com baixa atividade citotóxica em células FN1. Além disto, a subfração MeOH reduziu o  $\Delta\Psi_m$  das células hepa1c1c7, sem induzir alterações nas células FN1. Neste contexto, nossos resultados sugerem que a citotoxicidade da subfração MeOH nas células Hepa1c1c7 ocorre devido a modulação da via apoptótica. Dessa maneira, o conjunto de resultados demonstraram que a subfração MeOH apresenta potencial para o tratamento de CHC *in vitro*.

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

## ABSTRACT

Recent studies have demonstrated the cytotoxic effects of *Euphorbia umbellata*'s latex on several tumor cell lines. However, assays with hepatocellular carcinoma (HCC) strains have not yet been performed. Thus, the present work aimed to evaluate the antitumor potential of the hexane fraction (Hex), and its subfractions methanol (MeOH), dichloro (Cl<sub>2</sub>), ether and ethanol (EtOH), extracted from the latex of *E. umbellata* using HCC models. The cytotoxicity of this fraction and its subfractions were evaluated in hepatocarcinoma tumor cells Hepa1c1c7 and normal FN1 with MTT colorimetric assay. The concentrations tested were 10 µg - 150 µg/well, for a period of 24 and 48 hours. Subsequently, the mitochondrial electrical potential of the treated cells was evaluated by laser confocal microscopy. The results obtained in the present work demonstrated that the Hex fraction of *E. umbellata* presented cytotoxicity in Hepa1c1c7 cells. However, FN1 cells also showed sensitivity to Hex fraction. Our results also showed that the Hepa1c1c7 and normal FN1 tumor cells presented high sensitivity to the EtOH and Cl<sub>2</sub> subfractions, in similar proportions. In contrast, the ether and MeOH subfractions induced cytotoxicity in Hepa1c1c7 cell lines, with low cytotoxic activity in FN1 cells. In addition, the MeOH subfraction reduced the  $\Delta\Psi_m$  of hepa1c1c7 cells, without inducing changes in FN1 cells. In this context, our results suggest that the cytotoxicity of the MeOH subfraction in Hepa1c1c7 cells occurs due to modulation of the apoptotic pathway. Thus, the set of results demonstrated that the MeOH subfraction presents potential for the treatment of HCC *in vitro*.

**Key words:** Euphorbiaceae; *Euphorbia umbellata*; hepatocarcinoma; cancer; tumor cells.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é o termo atribuído a um conjunto de mais de 200 doenças que compartilham características em comum, como o crescimento desordenado e capacidade de invadir tecidos e órgãos (Galuschka et al., 2017). Nas últimas décadas, o número de diagnósticos e mortes ocasionadas pelo câncer tem aumentado exponencialmente, tornando esta doença um problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo a Global Burden of Disease Cancer Collaboration, no ano de 2015, ocorreram em média 17,5 milhões de casos de câncer em todo o mundo e 8,7 milhões de mortes (Fitzmaurice et al., 2017).

A Global Burden of Disease Cancer Collaboration estima que, em 2015, ocorreram 17,5 milhões de casos de câncer e 8,7 milhões de mortes, com previsão de aumento para 23,3 milhões de novos casos até 2030 (Bray et al., 2012; Biemar e Foti, 2013). No Brasil, novos casos de câncer são diagnósticos a cada ano. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer, registrados até dezembro de 2017 (INCA, 2016).

No Brasil, no biênio 2016-2017, os tipos mais frequentes de câncer em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurarão entre os principais (INCA, 2016).

O hepatocarcinoma (CHC) é a sexta neoplasia mais frequente no mundo, correspondendo a terceira causa de morte atribuída por câncer (Serper et al., 2017; Waller et al., 2015). As altas taxas de CHC em partes da Ásia e África subsaariana por exemplo, são decorrentes da prevalência de infecção crônica pelo vírus da hepatite B (VHB), onde 5% da população nessas regiões são infectadas cronicamente com o vírus (Ferlay et al., 2010; Balogh et al., 2016). O número de mortes em decorrência do câncer, tem aumento considerável em todo o mundo, tendo dobrado nos últimos 20 anos nos Estados Unidos (Trojan et al., 2016).

O diagnóstico precoce é essencial para que se tenha um tratamento com maior efetividade, e está correlacionado com um bom prognóstico, que possibilita a ressecção hepática e transplante hepático ortotópico (Kim et al., 2016). Os pacientes que são considerados com CHC precoce, podem se beneficiar da ressecção,

transplante e ablação, já aqueles que estão em estágio intermediário devem fazer uso da quimioterapia (Bruix et al., 2016).

Já nos casos diagnosticados em estágio avançado, o composto preconizado para tratamento é o Sorafenib. Autores como Llovet et al. (2008) e Cheng et al. (2009) demonstraram que o tratamento com Sorafenib possibilita um aumento da sobrevida em apenas 2,8 a 2,3 meses, nesses pacientes. Outros estudos, com camundongos portadores de CHC tratados com Sorafenib, com escalonamento entre as doses de 30 e 60 mg/kg, demonstraram a redução da massa tumoral, mas houve a diminuição da taxa de sobrevida devido a perda considerável de peso corporal (Kuczynski et al., 2015).

Diante dos fatores limitantes das terapias ofertadas para o tratamento do CHC, o desenvolvimento de compostos que apresentem menor toxicidade sistêmica e tecidual é essencial. Dessa maneira, a escassez de agentes terapêuticos eficazes para o tratamento de CHC avançado, exige mais pesquisas com a finalidade de identificar novos compostos para essa terapia.

A planta *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, Euphorbiaceae (Luz et al., 2015), conhecida popularmente como "janauba" e "cola-nota" no Brasil, produz um látex que vêm sendo usado na medicina popular como agente anti-inflamatório, antiúlcera, homeostático e antiangiogênico, e principal como agente antitumoral (Badgujar, 2014; Luz et al., 2016; Munhoz et al., 2014). No sul do Brasil, o látex engarrafado de *E. umbellata*, é popularmente utilizado como tratamento para todos os tipos de câncer (De Oliveira et al., 2013).

Estudos recentes têm demonstrado os efeitos citotóxicos do látex da *E. umbellata*, em células de melanoma murino (B16-F10), células de adenocarcinoma colorretal ileocecal (HCT-8), câncer cervical humano (HeLa) e células de Jurkat (De Oliveira et al., 2013; Luz et al., 2015). Mesmos resultados foram obtidos quando testando frações deste, para células de adenocarcinoma colorretal ileocecal (HCT-8), câncer cervical humano (HeLa) e células de Jurkat (Luz et al., 2016).

Após a avaliação da citototoxicidade, esses autores isolaram frações do látex desta planta, que inicialmente foram as frações hexano, clorofórmio, acetato de etilo e metanol, afim de avaliar as suas respectivas atividades antitumorais (Luz et al., 2016). Inicialmente, foi observado que todas as frações apresentam potencial citotóxico isoladamente, dependendo da concentração e tempo de exposição da célula ao composto, a fração Hex apresentou maior citotoxicidade, de modo que as

células mais sensíveis foram as de Jurkat, com  $IC_{50\%}$  de 1.87mg / mL. Entretanto, quando os dois terpenos foram isolados (eufol e acetato de germanicol), mostraram nos testes uma baixa atividade citotóxica indicando que as propriedades anticancerígenas do extrato podem ser causadas por outras substâncias presentes na fração de hexano. (Luz et al., 2016).

Sendo assim, identificar qual ou quais são os compostos presentes no látex da *E. umbellata*, que podem promover atividade antitumoral no CHC é de grande importância. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antitumoral de fração hexano (Hex), e suas subfrações metanol (MeOH), dicloro ( $Cl_2$ ), éter, etanol (EtOH), extraídas do latex da *E. umbellata* no modelo de CHC.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Ensaios in vitro

#### 2.1.1. Cultura celular

As células das linhagens de hepatocarcinoma murino (Hepa1c1c7) e fibroblasto humano normal (FN1) utilizadas neste estudo pertencem ao banco de células, do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, sob responsabilidade do Professor Dr. Durvanei Augusto Maria. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (FN1) ou em meio  $\alpha$ MEM (Hepa1c1c7), 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 cm<sup>2</sup> foram mantidos em estufa para incubação de células contendo atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. Após atingirem a confluência aproximada de 90%, as células foram subcultivadas para ampliação, realização de experimentos ou congelamento. Antes da execução dos experimentos, as células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante azul de Tripán (1%), que não penetra nas células viáveis que possuem membrana celular intacta. Apenas as células com viabilidade igual ou superior a 90% foram utilizadas nos ensaios.

#### 2.1.2. Avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico de MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste colorimétrico de redução do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio brometo]. As células foram semeadas em placas com 96 poços, na densidade de  $2 \times 10^4$  e em quadruplicada, sendo cultivadas durante 24 horas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. Após o período de incubação, as células foram tratadas durante 24 e 48 horas com diferentes concentrações (10  $\mu$ g – 150  $\mu$ g/poço) da fração Hex e suas subfrações MeOH, Cl<sub>2</sub>, Éter, EtOH. Após o tratamento, foram adicionados 10  $\mu$ L de reagente de MTT (5 mg/mL). Após 3 horas de incubação, o sobrenadante foi removido e acrescentado 100  $\mu$ L de DMSO, para 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 por microscopia confocal a laser**

Para a análise do potencial mitocondrial utilizando a técnica de microscopia confocal, as células Hepa1c1c7 e FN1 foram plaqueadas sobre lamínulas redondas em placas com 24 poços, na concentração de  $1 \times 10^5$  /poço. No dia seguinte, as células foram com o valor de IC50% da fração Hex e suas subfrações MeOH, Cl<sub>2</sub>, Éter, EtOH, pelo período de 6 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas três vezes com meio de cultura  $\alpha$ MEM (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), a 37 °C, e incubadas com 15  $\mu$ g/mL de rodamina-123 (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI, USA) durante 10 minutos, no escuro a 37 °C. O excesso de rodamina foi retirado por lavagem com meio de cultura, a 4 °C. A montagem das lâminas foi realizada com auxílio de uma pinça, com a qual as lamínulas foram transferidas para as lâminas de vidro, sendo fixadas com ProLong® e armazenadas a -20 °C, no escuro, até o momento da leitura no microscópio confocal a laser (Carl Zeiss LSM 700; Leica, Mannheim, Germany).

## **2.2 Análise estatística**

Os valores numéricos foram expressos em média  $\pm$  desvio (DP). O teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico de um fator) e de comparações multiplas 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 do solvente DMSO

A citotoxicidade do DMSO (Dimetilsulfóxido), que foi utilizado como solvente da fração e suas subfrações, também foi avaliado, pois ele pode causar citotoxicidade devido as suas características químicas. Os volumes testadas foram 1  $\mu$ L, 2  $\mu$ L, 3  $\mu$ L, 4  $\mu$ L, 5  $\mu$ L e 7,5  $\mu$ L, que são equivalentes aos utilizados para obter as concentrações das frações e subfrações na cultura celular de Hepa1c1c7 e FN1.

As células de Hepa1c1c7 apresentaram menor sensibilidade ao DMSO, mantendo as características morfológicas. Entretanto houve uma discreta alteração da morfologia apenas nas concentrações mais altas (Figura 1), sendo o valor de  $IC_{50\%}$  de 6,156  $\mu$ L para estas células (Figura 2). Em contrapartida, as células de FN1 demonstram ser mais sensibilidade ao DMSO, já nas menores concentrações, houve alteração morfológica (Figura 3). O valor de  $IC_{50\%}$  para esta linhagem foi de 3,104  $\mu$ L (Figura 4).

#### 3.2. Avaliação da citotoxicidade da fração Hex nas células tumorais Hepa1c1c7

O potencial citotóxico da fração Hex e suas subfrações MeOH,  $Cl_2$ , Éter e EtOH, em diferentes concentrações, foi avaliado na linhagem tumoral Hepa1c1c7, por meio do ensaio de redução do MTT, após 24 e 48 horas de tratamento. Este teste foi realizado com o intuito de determinar os valores da concentração inibitória de 50% ( $IC_{50\%}$ ) dos diferentes compostos.

O potencial citotóxico desses compostos foi analisada e fotodocumentada utilizando um microscópio óptico invertido. Após o período de tratamento de 24 horas com a fração Hex, as células Hepa1c1c7 apresentaram perda da adesão, alterações da sua morfologia e retração citoplasmática (Figura 5). Após 24 de tratamento com a maior concentração, houve uma redução de apenas 26,18% de viabilidade celular, e após 48 após houve uma redução de 46,68% da viabilidade celular (Figura 6 A-B).

### **3.3 Avaliação da citotoxicidade da subfração EtOH nas células tumorais Hepa1c1c7**

As células Hepa1c1c7 tratadas com a subfração EtOH, no período de 24 horas, nas concentrações de 20 a 30 µg/poço, apresentaram acentuadas alterações na morfologia, como retração citoplasmática (Figura 7), tendo IC<sub>50%</sub> de 20,75 µg/poço. No período de 48 horas, ocorreu uma redução da viabilidade celular, obtendo valor de IC<sub>50%</sub> de 29,68 µg/poço; contudo a indução de citotoxicidade pelo composto não foi dose dependente (Figura 8 A-B).

### **3.4 Avaliação da citotoxicidade da subfração Cl2 nas células tumorais Hepa1c1c7**

A subfração Cl<sub>2</sub> induziu a perda da adesão e alterações significativas da morfologia das células Hepa1c1c7, como retração citoplasmática, houve também a formação de precipitado celular nos tratamentos com as concentrações mais altas (Figura 9). Além disto, houve citotóxicidade em todas as concentrações testadas nas células Hepa1c1c7, resultando em um IC<sub>50%</sub> de 8,85 µg/poço, após 24 horas de tratamento. O valor de IC<sub>50%</sub> para o tratamento de 48 horas foi de 8,5 µg/poço (Figura 10 A-B).

### **3.5. Avaliação da citotoxicidade da subfração MeOH nas células tumorais Hepa1c1c7**

As células Hepa1c1c7 tiveram alterações da morfologia celular, como retração citoplasmática, após a exposição a subfração MeOH, a partir das primeiras concentrações, após o período de 48 horas (Figura 11). O tratamento com a subfração MeOH, em diferentes concentrações, por um período de 24 horas, proporcionou citotoxicidade, com IC<sub>50%</sub> de 36,36 µg/poço. Contudo, nos ensaios de 48 horas foi possível observar uma diminuição significativa da viabilidade celular, maior que a encontrada para as outras subfrações, tendo redução de 91,7% da viabilidade celular já na menor concentração testada (Figura 12 A-B).

### **3.6. Avaliação da citotoxicidade da subfração Éter nas células tumorais Hepa1c1c7**

As alterações na morfologia celular após o tratamento com a subfração Éter foram similares as encontradas para as outras subfrações testadas anteriores (Figura 13). O potencial da subfração Éter também foi avaliado nas células Hepa1c1c7. Após o tratamento das células, por um período de 24 horas, foi verificado uma redução na densidade celular, obtendo valor de  $IC_{50\%}$  de 37,38  $\mu\text{g/poço}$ . Após 48 horas, foi possível observar uma diminuição significativa da viabilidade celular, obtendo  $IC_{50\%}$  de 21,32  $\mu\text{g/poço}$  (Figura 14 A-B).

### **3.7. Avaliação da citotoxicidade da fração Hex nas células normais FN1**

Seguindo o pressuposto que os compostos antineoplásicos devem possuir maior afinidade para as células tumorais, o potencial citotóxico da fração Hex e suas subfrações MeOH,  $Cl_2$ , Éter, EtOH, foram testadas em diferentes concentrações em células de fibroblasto humano (FN1). A viabilidade celular, após 24 horas de tratamento, foi analisada pelo ensaio de MTT.

Foi observado que as células FN1 expostas a fração Hex, no período de 24 horas, apresentou sensibilidade para o tratamento, com leve alteração morfológica, retração citoplasmática, e nas concentrações de 100 e 150  $\mu\text{g/poço}$ , houve a formação de precipitados (Figura 15). A fração Hex foi citotóxica para as células FN1, nas concentrações testadas, tendo  $IC_{50\%}$  de 23,04  $\mu\text{g/poço}$  (Figura 16).

### **3.8. Avaliação da citotoxicidade das subfrações $Cl_2$ e EtOH nas células normais FN1**

As subfrações que promoveram maior citotoxicidade nas células FN1 foram as  $Cl_2$  e EtOH. Estas subfrações promoveram alteração morfológica e, nas concentrações, houve a formação de precipitados (Figura 17-18).

Nas células tratadas com  $Cl_2$ , houve redução significativa da viabilidade celular a partir da segunda concentração testada, tendo diminuição de 75,8%, com  $IC_{50\%}$  de 14,24  $\mu\text{g/poço}$  (Figura 19 A). O tratamento das células FN1 com a subfração EtOH, na menor concentração obteve redução de cerca de 78,68% da

viabilidade celular, mostrando que as células FN1 são sensíveis a esta subfração (Figura 19 B).

### **3.9. Avaliação da citotoxicidade das subfrações Éter e MeOH nas células normais FN1**

As subfrações Éter e MeOH promoveram menor citotóxicidade para as células FN1, em comparação com as outras subfrações testadas, reduzindo a viabilidade celular a partir de 30 µg/poço. Após o tratamento com ambas as subfrações, foi possível observar alteração discreta da morfologia celular, havendo formação de precipitados apenas nas concentrações mais altas da subfração Éter (Figura 20-21). Os valores de IC<sub>50%</sub> para estas subfrações foram 31,41 µg/poço e 31,23 µg/poço, respectivamente (Figura 22 A-B).

### **3.10. Avaliação do potencial elétrico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) das células tumorais tratadas com as subfrações Éter e MeOH.**

As células Hepa1c1c7 foram tratadas com as subfrações Éter e MeOH, nas concentrações de IC<sub>50%</sub>, por um período de 6 horas, e em seguida o  $\Delta\Psi_m$  foi avaliado por meio da utilização da rodamina 123, por microscopia confocal. Este ensaio foi realizado apenas com estas subfrações porque foram as que apresentaram menor citotóxicidade para as células normais.

As células Hepa1c1c7 tratadas com a subfração éter na concentração de 37,38 µg/poço, apresentaram redução no  $\Delta\Psi_m$ , em comparação com o grupo controle, que apresentou alta emissão de fluorescência e mitocôndrias dispersas no citoplasma (Figura 23 A-B). Além disto, nas células tratadas com esta subfração houve uma redistribuição das mitocôndrias, que se encontraram condensadas no citoplasma das células (Figura 23 B).

O tratamento com MeOH na concentração de 36,36 µg/poço, também demonstrou eficiência na redução do  $\Delta\Psi_m$ , bem como alteração morfológica e retração citoplasmática, com mitocôndrias condensadas em locais específicos da célula (Figura 23 C).

### **3.11. Avaliação do potencial elétrico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) das células normais FN1 tratadas com as subfrações Éter e MeOH.**

As células FN1 também foram tratadas com as subfrações Éter e MeOH, por um período de 6 horas, nas concentrações de  $IC_{50\%}$ . Após o período de tratamento, foi possível verificar que a subfração Éter diminuiu discretamente a fluorescência, em relação ao grupo controle (Figura 24 A-B).

O tratamento das células FN1 com a subfração MeOH não modulou o  $\Delta\Psi_m$ , em relação ao grupo controle (Figura 24 A-C). A marcação positiva das células tratadas, demonstra que as mitocôndrias estão funcionais e, portanto, as células estão metabolicamente ativas.

#### 4. DISCUSSÃO

O câncer ainda continua sendo umas das principais causas de morte em todo o mundo; assim, há uma necessidade da identificação de novas drogas para tratar desta doença (Macedo et al. 2016; Miller et al. 2016; Burger, 2004). Regularmente, inúmeros compostos são testados em todo mundo, com o objetivo de identificar novos agentes com ação antineoplásica. 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).

Apesar dos relevantes avanços no desenvolvimento de moléculas-alvo específicas para o tratamento do câncer, a quimioterapia convencional e a radioterapia ainda são frequentemente utilizadas para este objetivo. Tais agentes quimioterápicos são baseados em moléculas que interagem com o DNA, anti-tubulinas, entre outros. Por este motivo, estes compostos induzem inúmeros efeitos colaterais, como lesões gastrointestinais, perda de cabelo, disfunção neurológicas e toxicidade cardíaca (Dropcho, 2011; Nussbaumer et al. 2011).

Compostos bioativos derivados de plantas são conhecidos como agentes quimiopreventivos em potencial, induzindo apoptose em vários modelos experimentais de carcinogênese (M.Greenwell 2015; Pistollato et al., 2015; Li et al. 2015; Wang et al. 2012). Além disto, também apresentam funções antiproliferativa, pró-apoptótica, antimetastática e antiangiogênica em diversos tipos de câncer (Hosseini, 2015).

Levando em consideração a necessidade do desenvolvimento de novos compostos para o tratamento do câncer, o nosso grupo avaliou a eficácia das frações e subfrações extraídas do latex da *E. umbellata*, visto que o extrato desta planta tem sido utilizado na medicina popular.

Diversos trabalhos têm evidenciado os efeitos citotóxicos da família Euphorbiaceae em diferentes tipos de tumores (Assaf et al., 2013; Hsieh e tal, 2011; Lin et al., 2012a; Mota et al., 2012b).

Estudos tem demonstrado resultados positivos para os extratos de plantas da família Euphorbiaceae, nos quais extratos da *Mercurialis annua L.* apresentaram efeito citotóxico e inibitório para células de linfoma de burkitt (BJAB) e mieloma múltiplo (U266). Esses extratos são usados populamente na Jordania para tratamento de leucemia (Assaf et al., 2013).

Assaf et al. (2013), mostrou que o extrato metanólico da *Viscum cruciatum* foi seletivo contra as células de linfoma de Burkitt BJAB, apresentando  $IC_{50\%}$  de 14,21  $\mu\text{g/ml}$ . Outros estudos verificaram 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 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).

Hsieh et al. evidenciaram que o látex da *Euphorbia antiquorum* apresenta potencial citotóxico sobre as células HeLa, induzindo apoptose, que foi caracterizada pelas alterações morfológicas, fragmentação do DNA, aumento da população Sub-G1 e modulação da expressão de proteínas envolvida no processo apoptótico.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que a fração Hex da *E. umbellata* apresentou citotoxicidade nas células Hepa1c1c7, modificando sutilmente a morfologia celular nas concentrações e períodos testados. Entretanto, as células normais FN1 também apresentaram sensibilidade a fração Hex. Sendo assim, esta fração, na sua forma integral, não demonstra efetividade para o tratamento de células Hepa1c1c7, sendo necessário a avaliação das suas subfrações.

Estudos recentes também têm avaliado os efeitos citotóxicos de diversas frações do látex da *E. umbellata* em linhagem de adenocarcinoma retal humano HRT-18, em carcinoma de cérvix humana HeLa e nas células de leucemia linfóide aguda Jurkat. Os resultados demonstraram que a fração Hex foi a que apresentou maior citotoxicidade, sendo as células Jurkat as mais sensíveis ao tratamento, com  $IC_{50\%}$  de 1,87 mg/mL. Os mecanismos envolvidos na atividade antitumoral da fração Hex nestas envolvem a fragmentação do DNA, modulação do processo de morte celular programada e parada do ciclo celular na fase  $G_0/G_1$  (Luz et al., 2016).

Neste contexto, dois principais compostos foram isolados desta fração, o eufol (principal composto) e o acetato de germanicol (Luz et al., 2016). Os ensaios realizados com estes compostos nas células Jukart demonstraram que o acetato de germanicol não apresentou atividade citotóxica significativa. Similarmente, 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).

A fração Hex extraída da *Cyperus rotundus*, da família Cyperaceae, modulou o aumento da expressão da caspase 3 e 7 em células de câncer de mama (MDA-MB), câncer de ovário (A2780, SKOV3 e OVCAR3), câncer de endométrio (HEC1A) (Ahn et al. 2015).

Em outros estudos, a fração Hex extraída da *Mangifera zeylanica*, da família Anacardiaceae, proporcionou uma atividade antiproliferativa significativa em células de carcinoma de próstata (PC3), bem como ocasionou efeito citotóxico positivo em câncer de pulmão de não pequenas células (A549) e câncer de nasofaringe (CNE1) (Ediriweera et al. 2016; Li et al. 2015).

Outros trabalhos mostram que a fração Hex extraída da *Clinacanthus nutans*, da família Acanthaceae, não apresentou efetividade para promover atividade antitumoral em câncer de fígado (HepG2), tendo IC<sub>50%</sub> de 250 µg/mL. Em contrapartida, a fração Hex extraída de *Acanthopanax sessiliflorus*, da família Araliaceae, apresentou citotoxicidade sobre as células de câncer de mama (MCF-7), com valor de IC<sub>50%</sub> de 58,40 µg/ml.

Em ensaios realizados com a linhagem de câncer de boca SCC-9, a fração Hex obtida da *Erythroxylum suberosum*, da família Erythroxylaceae, não foi seletiva, desencadeando citotoxicidade sobre as células normais na mesma proporção que nas células tumorais (Ng et al., 2017; Macedo et al., 2016; Thamizhiniyan et al., 2015). Similarmente, no nosso estudo as células normais FN1 apresentaram sensibilidade a fração Hex. Dessa maneira, a partir da fração Hex, as subfrações EtOH, Cl<sub>2</sub>, éter e MeOH foram isoladas e avaliadas.

Nossos resultados também evidenciaram que as células tumorais Hepa1c1c7 e normais FN1 apresentaram grande sensibilidade a subfração EtOH, em proporções similares. Sendo assim, esta subfração não foi considerada seletiva. Alguns trabalhos mostraram que o extrato EtOH isolado da *Ferula gummosa*, da família Apiaceae, induziu apoptose e parada no ciclo celular na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e S em células de câncer de mama (MCF-7) e em células de câncer de boca (BHY), respectivamente. A mesma subfração isolada da *Annona muricata L.*, da família Annonaceae, induziu a apoptose nas células de hepatocarcinoma (HEPG2), por meio do estresse do retículo endoplasmático, com valor de IC<sub>50%</sub> de 120 µg/ml (Gudarzi et al. 2015; Kim et al. 2015; Liu et al. 2016; Rzepecka-Stojko et al. 2015).

Similarmente aos resultados obtidos para a subfração EtOH, a subfração Cl<sub>2</sub> apresentou citotóxico sobre as células Hepa1C1c7; contudo, também promoveu citotoxicidade nas células FN1. Estudos na literatura demonstram que extrato clorado de *Phyllanthus engleri*, família Euphorbiaceae, inibiu seletivamente o crescimento de células de câncer renal (UO-31) em diferentes concentrações (Akee et al., 2012).

A subfração éter pode apresentar atividade antiproliferativa e citotóxica em algumas linhagens celulares. Os resultados obtidos neste estudo também mostram que esta subfração foi efetiva na indução de citotoxicidade nas linhagens celulares Hepa1c1c7, com baixa atividade citotóxica em células FN1 normais. Outro extrato éter, isolado das flores de *Magydaris tomentosa* (família Apiaceae), composto basicamente por furanocumarinas e metabólitos secundários, apresentou citotoxicidade para células de melanoma humano (A375) e câncer de mama humano (MCF-7), sendo mais citotóxico para o último (Autore et al. 2015).

De todas as subfrações avaliadas neste trabalho, a que apresentou melhor efeito sobre as células hepa1c1c7, sem desencadear citotoxicidade em células normais, nas mesmas concentrações e períodos de tratamento, foi a subfração MeOH, na concentração de 36,36 µg/poço.

Estudos na literatura apontam a efetividade de frações MeOH em diminuir a expansão tumoral. Por exemplo, frações MeOH obtidas de três diferentes espécies de plantas, *Phyllanthus emblica*, *Terminalia bellirica* e *Terminalia chebula*, promoveram citotoxicidade no modelo de células de cólon humano (HCCSCs e HCT116) (Vadde et al. 2015).

Fração MeOH obtida de *Nardostachys jatamansi*, da família Caprifoliaceae, também mediou um efeito citotóxico e antiproliferativo em câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). Já frações MeOH de *E. umbellata* apresentaram citotoxicidade para células de adenocarcinoma colorretal ileocecal (HCT-8), câncer cervical humano (HeLa) e células de Jurkat (2015; Chaudhary et al. 2015; Luz et al., 2015; Luz et al. 2016).

No presente trabalho, os resultados obtidos por meio do ensaio de rodamina-123 demonstraram novamente a citotoxicidade seletiva da fração MeOH. Neste ensaio, as células Hepa1c1c7 tiveram redução do  $\Delta\Psi_m$ .

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, que atravessa facilmente as membranas e se acumula 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).

A capacidade do látex de plantas da família *Euphorbiaceae* em modular o  $\Delta\Psi_m$  já tem sido relatado na literatura. Estudos mostraram que o látex da *E antiquorum* foi capaz de promover a perda do  $\Delta\Psi_m$  em células HeLa, aumentando os níveis de espécies reativas de oxigênio. Foi observado também que este extrato induziu o aumento das proteínas Fas, FasL, JNK, p38 e MAPK e das caspases 8, 9 e 3 (Hsieh et al., 2011). Dessa maneira, estes resultados comprovaram que o látex da *E antiquorum* foi capaz de modular a ativação do mecanismo de morte celular programada.

Neste contexto, nossos resultados sugerem que a citotoxicidade da subfração éter e MeOH nas células Hepa1c1c7 ocorre devido a modulação da via apoptótica, pois houve a redução do  $\Delta\Psi_m$  após o tratamento das células.

## 5. CONCLUSÃO

O conjunto de resultados demonstrou que a fração Hex e suas subfrações 2Cl e EtOH não apresentaram seletividade, pois induziram citotoxicidade em proporções similares nas células tumorais Hepa1c1c7 e normais FN1. Em contrapartida, as subfrações Éter e MeOH promoveram atividade citotóxica nas células Hepa1c1c7, sem desencadear citotoxicidade nas células normais FN1, nas mesmas concentrações e períodos de tratamento. Além disto, a subfração MeOH reduziu o  $\Delta\Psi_m$  das células hepa1c1c7, sem induzir alterações nas células normais. Dessa maneira, o conjunto de resultados demonstraram que a subfração MeOH apresenta potencial para o tratamento de CHC *in vitro*.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, com toda sua benevolência, generosidade e amor para comigo, me auxiliando e dando forças nos momentos difíceis, bem como me proporcionando ótimos momentos.

Agradeço aos meus pais e a minha irmã, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando a continuar e me apoiando em todas as minhas decisões mesmo quando tudo estava adverso.

Agradeço as minhas tias, avô e a minha avó que já não se encontra entre nós, que me estenderam a mão em momentos decisivos da minha vida, me proporcionando até mesmo que este trabalho esteja realizado hoje.

Agradeço a todos os amigos que fizeram dos meus dias um pouco mais felizes, em especial Amanda Rafaela, Enoque Medeiros, Erika Dayana, Gabriel Ginane, Isabela Iris e Monique Gonçalves.

Agradeço a todos os professores que somaram de alguma forma na minha formação, tanto profissional como acadêmica, e que servem de inspiração para continuar fazendo um bom trabalho, em especial, Ângela Albino, Creuziene, David Holanda, Enoque Medeiros, Lais Angélica, Silvanda Silva e Wilson Xavier.

Agradeço a todos que contribuíram e permitiram o desenvolvimento dessa pesquisa, como Arthur, Durvanei e Monique.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que passaram pela minha vida e contribuíram direta ou indiretamente para formação do ser que hoje sou.

## 7. REFERÊNCIAS

- Ahmadi, F., Mojarrab, M., Ghazi-Khansari, M., & Hosseinzadeh, L. (2015). "A semipolar fraction of petroleum ether extract of *Artemisia aucheri* induces apoptosis and enhances the apoptotic response to doxorubicin in human neuroblastoma SKNMC cell line". *Research in Pharmaceutical Sciences*, 10(4), 335–344.
- Ahn, Ji Hye et al. 2015. "6-Acetoxy Cyperene, a Patchoulane-Type Sesquiterpene Isolated from *Cyperus Rotundus* Rhizomes Induces Caspase-Dependent Apoptosis in Human Ovarian Cancer Cells." *Phytotherapy Research* 29(9): 1330–38.
- Akee, R K et al. 2012. "Chlorinated Englerins with Selective Inhibition of Renal Cancer Cell Growth." *The Journal of Natural Products* 75(3): 459–63.
- Ahmed, Hanaa H., Ahmed A. Abd-Rabou, Amal Z. Hassan, and Soheir E. Kotob. 2015. "Phytochemical Analysis and Anti-Cancer Investigation of *Boswellia Serrata* Bioactive Constituents in Vitro." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16(16): 7179–88.
- Ahn, Ji Hye et al. 2015. "6-Acetoxy Cyperene, a Patchoulane-Type Sesquiterpene Isolated from *Cyperus Rotundus* Rhizomes Induces Caspase-Dependent Apoptosis in Human Ovarian Cancer Cells." *Phytotherapy Research* 29(9): 1330–38.
- 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>.
- Autore, Giuseppina et al. 2015. "Cytotoxic Activity and Composition of Petroleum Ether Extract from *Magydaris Tomentosa* (Desf.) W. D. J. Koch (Apiaceae)." *Molecules* 20(1): 1571–78.
- Badgujar, Shamkant B. 2014. "Evaluation of Hemostatic Activity of Latex from Three *Euphorbiaceae* Species." *Journal of Ethnopharmacology* 151(1): 733–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.044>.
- Balogh J, Victor D 3rd, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, Li X, Ghobrial RM, Monsour HP Jr. "Hepatocellular carcinoma: a review". *J Hepatocell Carcinoma*, 2016; 3:41-53.
- Biemar, Frédéric, and Margaret Foti. 2013. "Global Progress against Cancer-Challenges and Opportunities." *Cancer biology & medicine* 10(4): 183–86. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3860343&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bray, Freddie et al. 2012. "Global Cancer Transitions according to the Human Development Index (2008-2030): A Population-Based Study." *The Lancet Oncology* 13(8): 790–801. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70211-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70211-5).
- Bruix J, Reig M, Sherman M. "Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma." *Gastroenterology*, 2016; 150(4):835-53.
- Burger, Angelika M. 2004. "For New Anticancer Agents." *Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacokinetics*: 29–45.

- Chaudhary, Shilpee et al. 2015. "Evaluation of Antioxidant and Anticancer Activity of Extract and Fractions of *Nardostachys Jatamansi* DC in Breast Carcinoma." *BMC complementary and alternative medicine* 15: 50.
- Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS. "Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *Lancet Oncol.* 2009; 10(1):25-34.
- Dropcho, Edward J. "The Neurologic Side Effects of Chemotherapeutic Agents." *Continuum* 2011: 95–112.
- Ediriweera, Meran Keshawa et al. 2016. "A Study of the Potential Anticancer Activity of *Mangifera Zeylanica* Bark: Evaluation of Cytotoxic and Apoptotic Effects of the Hexane Extract and Bioassay-Guided Fractionation to Identify Phytochemical Constituents." *Oncology Letters* 11(2): 1335–44.
- Ferlay, Jacques et al. 2015. "Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012." *International Journal of Cancer* 136(5): E359–86.
- Fitzmaurice, Christina et al. 2017. "Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015." *JAMA Oncology* 3(4): 524. <http://oncology.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoncol.2016.5688>.
- Galuschka, Claudia et al. 2017. "Models in Translational Oncology: A Public Resource Database for Preclinical Cancer Research." *Cancer Research* 77(10): 2557–63.
- Gudarzi, Hoda et al. 2015. "Ethanollic Extract of *Ferula Gummosa* Is Cytotoxic against Cancer Cells by Inducing Apoptosis and Cell Cycle Arrest." *Natural Product Research* 29(6): 546–50.
- Hoye, Adam T. et al. 2008. "Targeting Mitochondria." *Accounts of Chemical Research* 41(1): 87–97.
- Hosseini, A.Ghorbani. 2015. "Cancer Therapy with Phytochemicals: Evidence from Clinical Studies." *Avicenna Journal of Phytomedicine* 5(2): 84–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25949949> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4418057>.
- Hsieh, Wen-Tsong et al. 2011. "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* 63(8): 1339–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22044063>.
- 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. 2016. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva INCA - *Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016*. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>.

- Kim, Aeyung, Minju Im, and Jin Yeul Ma. 2015. "Ethanol Extract of *Remotiflora Radix* Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Cell Death through AMPK/mTOR Signaling in Human Prostate Cancer Cells." *Scientific Reports* 5: 8394.
- Kuczynski EA, Lee CR, Man S, Chen E, Kerbel RS. 2015 "Effects of Sorafenib Dose on Acquired Reversible Resistance and Toxicity in Hepatocellular Carcinoma." *Cancer Res.* 75(12):2510-9.
- 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>
- Li, Wei et al. 2015. "Juglans Regia Hexane Extract Exerts Antitumor Effect, Apoptosis Induction and Cell Cycle Arrest in Prostate Cancer Cells in Vitro." *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 14(3): 399–405.
- 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.
- Liu, Na et al. 2016. "Functional Proteomic Analysis Reveals That the Ethanol Extract of *Annona Muricata* L. Induces Liver Cancer Cell Apoptosis through Endoplasmic Reticulum Stress Pathway." *Journal of Ethnopharmacology* 189: 210–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.045>.
- Llovet JM1, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF. "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma." *N Engl J Med*, 2008; 359(4):378-90.
- 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 Biomonitored Study of *Euphorbia Umbellata* (Pax) Bruyns." *Journal of Ethnopharmacology* 183: 29–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.025>.
- M.Greenwell, P.K.S.M. Rahman. 2015. "Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment." *Int J Pharm Sci Res* 6(10): 4103–12.
- 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.
- Mota, M.F., Benfica, P.L., Batista, A.C., Martins, F.S., Paula, J.R., Valadares, M.C., 2012. "Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax." *Journal of Ethnopharmacology* 139, 319–329.
- Miller, Kimberly D. et al. 2016. "Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2016." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 66(4): 271–89. <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21349>.
- Munhoz, Antonio C.M. et al. 2014. "Chemical and Pharmacological Investigation of

*the Stem Bark of Synadenium Grantii.*” *Planta Medica* 80(6): 458–64.

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>.

Nussbaumer, Susanne, Pascal Bonnabry, Jean Luc Veuthey, and Sandrine Fleury-Souverain. 2011. “*Analysis of Anticancer Drugs: A Review.*” *Talanta* 85(5): 2265–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.034>.

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.

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>.

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

Pistollato, Francesca, Francesca Giampieri, and Maurizio Battino. 2015. “*The Use of Plant-Derived Bioactive Compounds to Target Cancer Stem Cells and Modulate Tumor Microenvironment.*” *Food and Chemical Toxicology* 75: 58–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.11.004>.

Rzepecka-Stojko, Anna et al. 2015. “*Caffeic Acid Phenethyl Ester and Ethanol Extract of Propolis Induce the Complementary Cytotoxic Effect on Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines.*” *Molecules* 20(5): 9242–62. <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/5/9242/>.

Serper, Marina et al. 2017. “*Association of Provider Specialty and Multidisciplinary Care With Hepatocellular Carcinoma Treatment and Mortality.*” *Gastroenterology* 152(8): 1954–64. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2017.02.040>.

Shoja, M. H. et al. 2015. “*Glycosmis Pentaphylla (Retz.) DC Arrests Cell Cycle and Induces Apoptosis via Caspase-3/7 Activation in Breast Cancer Cells.*” *Journal of Ethnopharmacology* 168: 50–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.048>.

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](http://dx.doi.org/10.1021/ja310324q)

Trojan J, Zangos S, Schnitzbauer AA. "Diagnostics and Treatment of Hepatocellular Carcinoma in 2016: Standards and Developments." *Visc Med.* 2016; 32(2):116-20.

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>.

Vadde, Ramakrishna, Sridhar Radhakrishnan, Lavanya Reddivari, and Jairam K P

Vanamala. 2015. "Triphala Extract Suppresses Proliferation and Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Stem Cells via Suppressing c-Myc / Cyclin D1 and Elevation of Bax / Bcl-2 Ratio." *BioMed Research International*

Waller LP, Deshpande V, Pysopoulos N. "Hepatocellular carcinoma: A comprehensive review." *World J Hepatol.* 2015; 7(26):2648-63.

Wang, Hu et al. 2012. "Plants vs. Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 12(10): 1281–1305.  
<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=12&issue=10&spage=1281>.

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.

## LEGENDAS DE FIGURAS

- Figura 1. Fotomicrografias das análises morfológicas das células Hepa1c1c7. (A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com DMSO **(B)** 1  $\mu\text{L}/\text{poço}$  **(C)** 2  $\mu\text{L}/\text{poço}$  **(D)** 3  $\mu\text{L}/\text{poço}$  **(E)** 4  $\mu\text{L}/\text{poço}$  **(F)** 5  $\mu\text{L}/\text{poço}$  **(G)** 7,5  $\mu\text{L}/\text{poço}$ . Verifica-se leve alteração morfológica apenas nas concentrações mais altas.
- Figura 2. Determinação da citotoxicidade em células Hepa1c1c7 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 de DMSO, durante o período de 24 horas. DMSO (1 – 7,5  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ).
- Figura 3. 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 DMSO **(B)** 1  $\mu\text{L}/\text{poço}$  **(C)** 2  $\mu\text{L}/\text{poço}$  **(D)** 3  $\mu\text{L}/\text{poço}$  **(E)** 4  $\mu\text{L}/\text{poço}$  **(F)** 5  $\mu\text{L}/\text{poço}$  **(G)** 7,5  $\mu\text{L}/\text{poço}$ . Desde as menores concentrações, percebe-se que houve alteração morfológica.
- Figura 4. 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 de DMSO, durante o período de 24 horas. DMSO (1 – 7,5  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ).
- Figura 5. Fotomicrografias das análises morfológicas das células Hepa1c1c7. (A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a fração Hex 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  $\mu\text{g}/\text{poço}$ . Apresentaram perda da adesão, alterações da sua morfologia e retração citoplasmática
- Figura 6. Determinação da citotoxicidade em células Hepa1c1c7 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 fração Hex, durante o período de 24 e 48 horas. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas **(A)** Hex (10 – 150  $\mu\text{g}/\text{poço}$ ). Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 48 horas **(B)** Hex (10 – 150  $\mu\text{g}/\text{poço}$ ).
- Figura 7. Fotomicrografias das análises morfológicas das células Hepa1c1c7. (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  $\mu\text{g}/\text{poço}$  **(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  $\mu\text{g}/\text{poço}$ . Apresentaram acentuadas alterações na morfologia, como retração citoplasmática.

**Figura 8. Determinação da citotoxicidade em células Hepa1c1c7 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, durante o período de 24 e 48 horas. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas **(A)** EtOH (10 – 150  $\mu\text{g/poço}$ ). Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 48 horas **(B)** EtOH (10 – 150  $\mu\text{g/poço}$ ).

**Figura 9. Fotomicrografias das análises morfológicas das células Hepa1c1c7.** **(A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração  $\text{Cl}_2$  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  $\mu\text{g/poço}$ . Verifica-se que estas células apresentaram perda da adesão e alterações significativas da sua morfologia, como retração citoplasmática, havendo também a formação de precipitado celular nos tratamentos com as concentrações mais altas.

**Figura 10. Determinação da citotoxicidade em células Hepa1c1c7 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  $\text{Cl}_2$ , durante o período de 24 e 48 horas. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas **(A)**  $\text{Cl}_2$  (10 – 150  $\mu\text{g/poço}$ ). Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 48 horas **(B)**  $\text{Cl}_2$  (10 – 150  $\mu\text{g/poço}$ ).

**Figura 11. Fotomicrografias das análises morfológicas das células Hepa1c1c7.** **(A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração MeOH no período de 48 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  $\mu\text{g/poço}$ . Nota-se alterações da morfologia celular, como retração citoplasmática, a partir das primeiras concentrações.

**Figura 12. Determinação da citotoxicidade em células Hepa1c1c7 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, durante o período de 24 e 48 horas. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas **(A)** MeOH (10 – 150  $\mu\text{g/poço}$ ). Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 48 horas **(B)** MeOH (10 – 150  $\mu\text{g/poço}$ ).

**Figura 13. Fotomicrografias das análises morfológicas das células Hepa1c1c7.** **(A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Éter no período de 48 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  $\mu\text{g/poço}$ . Alterações morfológicas, como retração

citoplasmática a partir das primeiras concentrações, e formação de precipitado nas concentrações mais altas

**Figura 14. Determinação da citotoxicidade em células Hepa1c1c7 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 Éter, durante o período de 24 e 48 horas. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas **(A)** Éter (10 – 150  $\mu\text{g/poço}$ ). Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 48 horas **(B)** Éter (10 – 150  $\mu\text{g/poço}$ ).

**Figura 15. 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 fração Hex 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  $\mu\text{g/poço}$ . Verifica-se alterações morfológicas, como retração citoplasmática desde as primeiras concentrações, e formação de precipitado nas concentrações mais altas.

**Figura 16. 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 fração Hex, durante o período de 24 horas. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas **(A)** Hex (10 – 150  $\mu\text{g/poço}$ ).

**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  $\text{Cl}_2$  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  $\mu\text{g/poço}$ . As alterações morfológicas são bem acentuadas, e presença de formação de precipitado nas concentrações mais altas.

**Figura 18. 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  $\mu\text{g/poço}$  **(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  $\mu\text{g/poço}$ . Alterações morfológicas, e presença de formação de precipitado nas concentrações mais altas.

**Figura 19. 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  $\text{Cl}_2$  e EtOH, durante o período de 24 horas. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas **(A)**  $\text{Cl}_2$  (10 – 150  $\mu\text{g/poço}$ ). Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas **(B)** EtOH (10 – 150  $\mu\text{g/poço}$ ).

**Figura 20. 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 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. Leves alterações morfológicas nas concentrações iniciais, e presença de formação de precipitado nas concentrações mais altas.

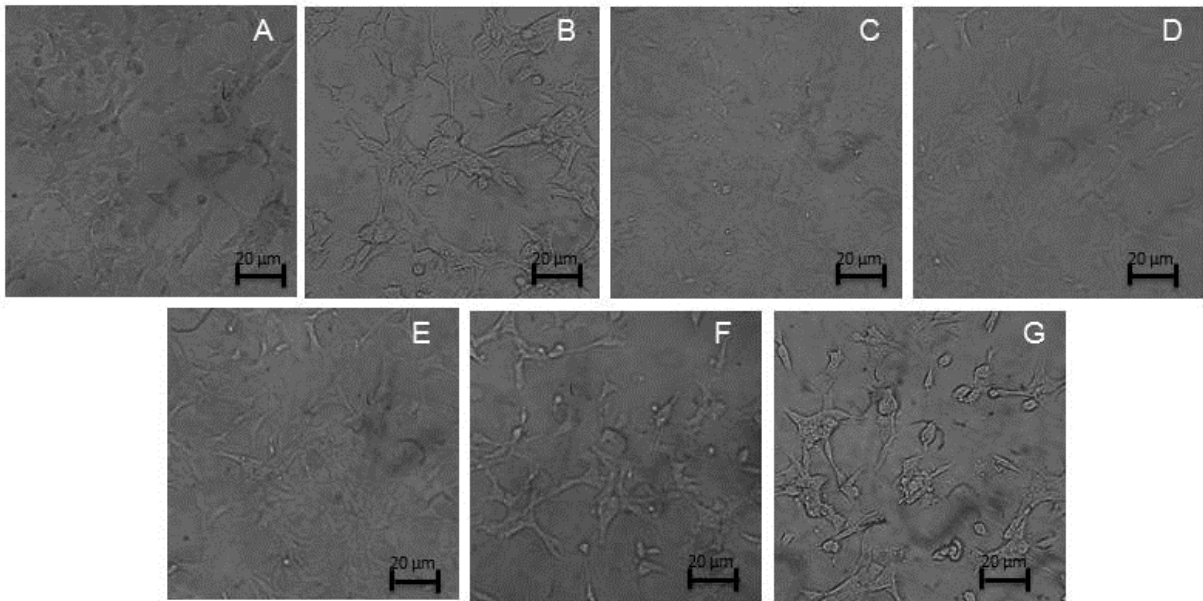
**Figura 21. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1.** (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Éter no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço. Leves alterações da morfologia celular nas primeiras concentrações, e presença de formação de precipitado nas concentrações mais altas

**Figura 22. 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. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas (A) MeOH (10 – 150 µg/poço). Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas (B) Éter (10 – 150 µg/poço).

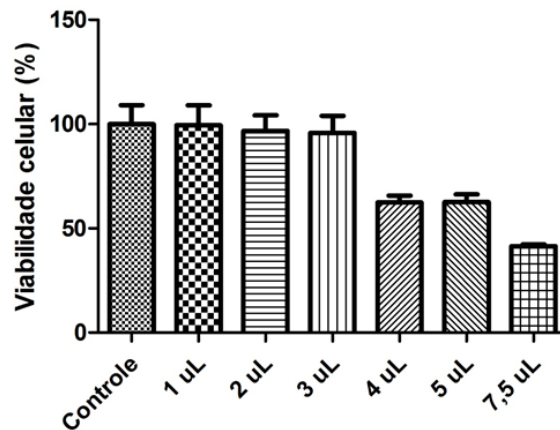
**Figura 23. Fotomicrografias das células FN1 com mitocôndrias marcadas com rodamina 123 (verde), analisadas por microscopia confocal a laser.** As células foram tratadas com Éter e MeOH, nas concentrações de 37,38 e 36,36 µg/poço, durante um período 6 horas. Controle (A); Éter 37,38 µg/poço (B) MeOH 36,36 µg/poço (C).

**Figura 24. Fotomicrografias das células Hepa1c1c7 com mitocôndrias marcadas com rodamina 123 (verde), analisadas por microscopia confocal a laser.** As células foram tratadas com Éter e MeOH, nas concentrações de 37,38 e 36,36 µg/poço, durante um período 6 horas. Controle (A); Éter 37,38 µg/poço (B) MeOH 36,36 µg/poço (C).

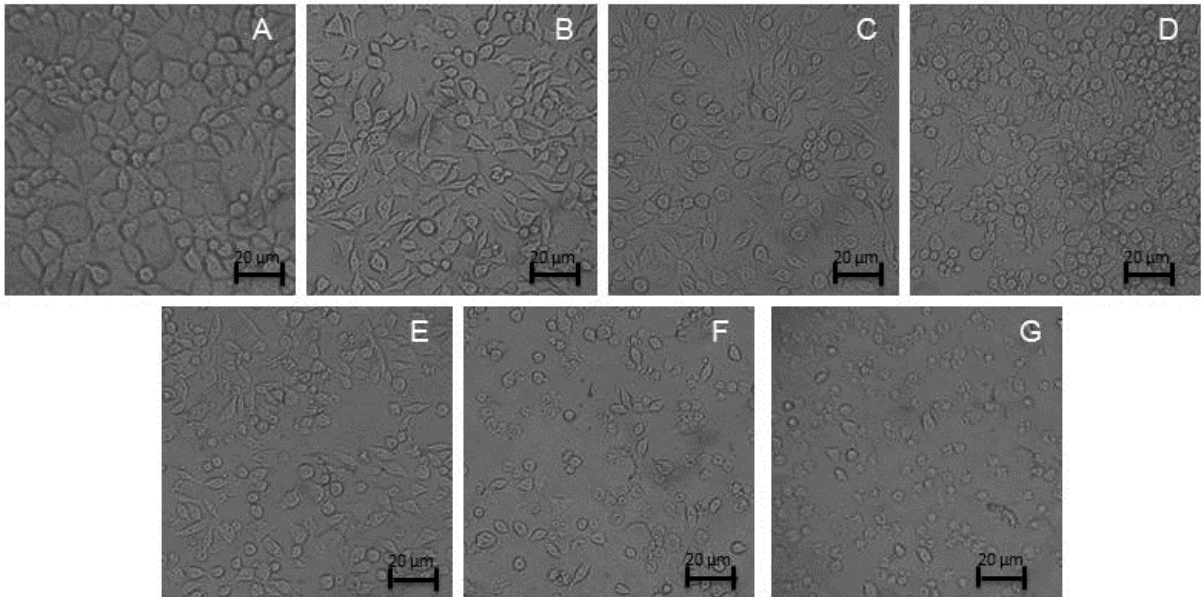
## ANEXOS



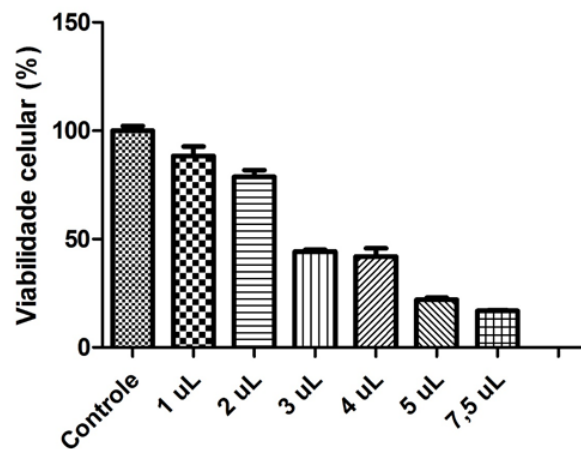
**Figura 1. Fotomicrografias das análises morfológicas das células Hepa1c1c7. (A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com DMSO **(B)** 1 μL/poço **(C)** 2 μL/poço **(D)** 3 μL/poço **(E)** 4 μL/poço **(F)** 5 μL/poço **(G)** 7,5 μL/poço. Verifica-se leve alteração morfológica apenas nas concentrações mais altas.



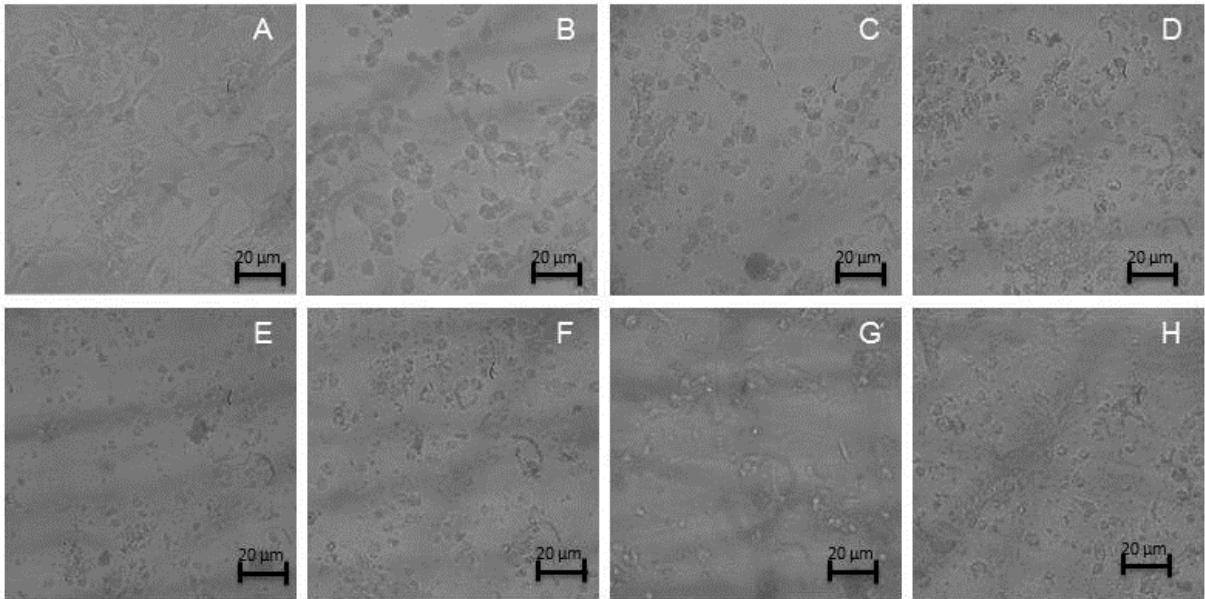
**Figura 2. Determinação da citotoxicidade em células Hepa1c1c7 pelo método colorimétrico MTT.** O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações de DMSO, durante o período de 24 horas. DMSO (1 – 7,5 μL/poço).



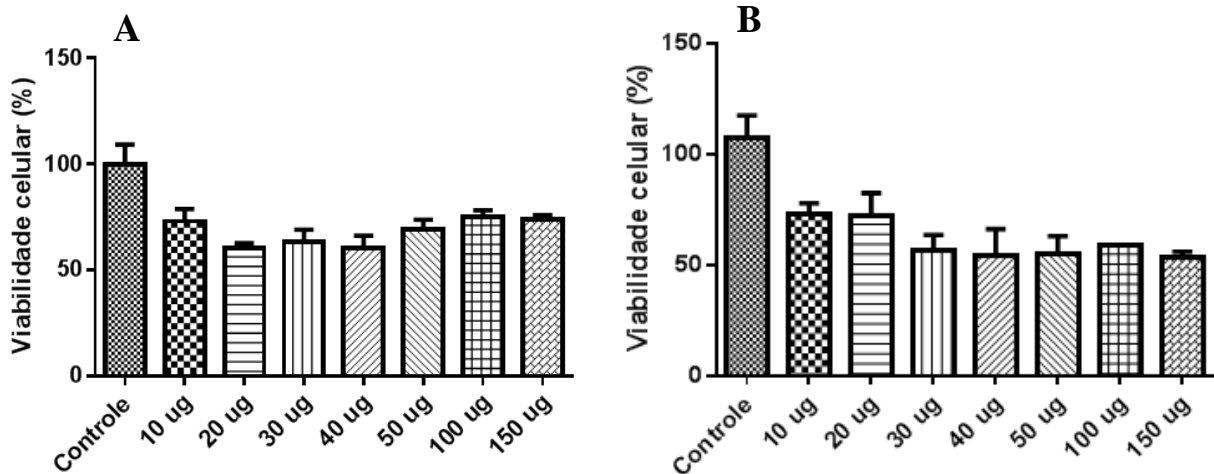
**Figura 3. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1. (A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com DMSO **(B)** 1 µL/poço **(C)** 2 µL/poço **(D)** 3 µL/poço **(E)** 4 µL/poço **(F)** 5 µL/poço **(G)** 7,5 µL/poço. Desde as menores concentrações, percebe-se que houve alteração morfológica.



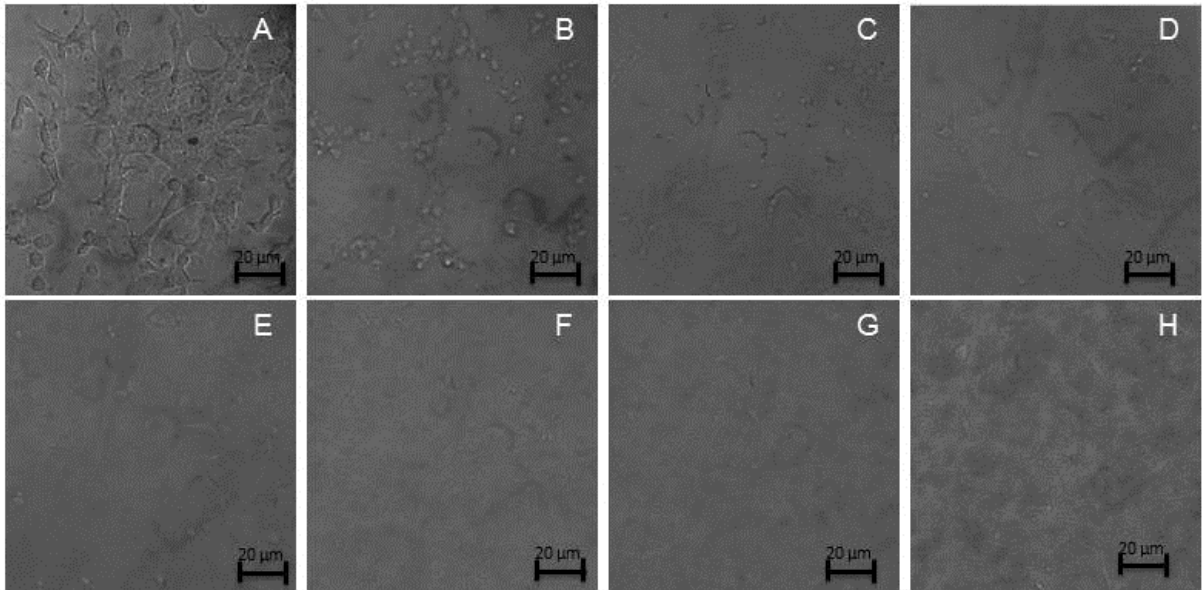
**Figura 4. Determinação da citotoxicidade em células FN1 pelo método colorimétrico MTT.** O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações de DMSO, durante o período de 24 horas. DMSO (1 – 7,5 µL/poço).



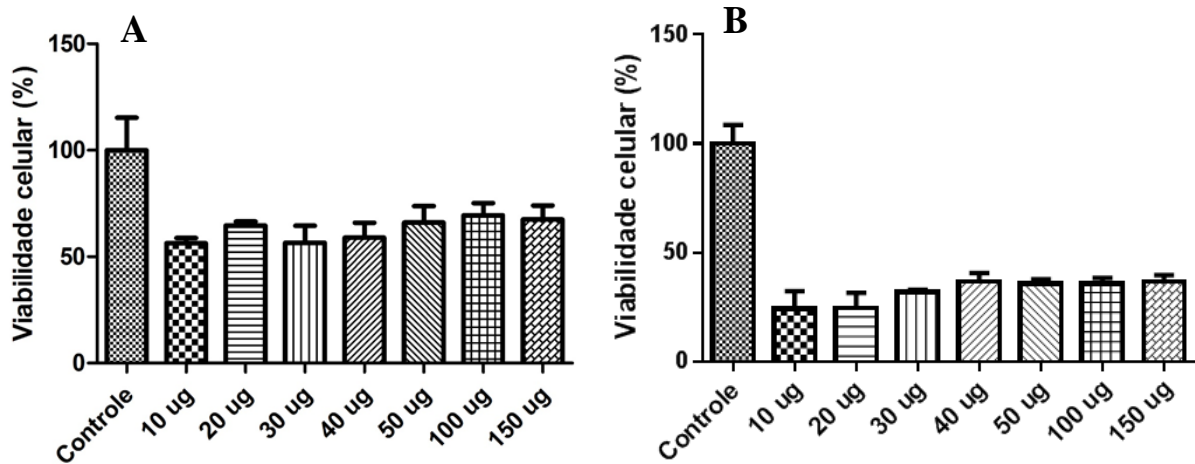
**Figura 5. Fotomicrografias das análises morfológicas das células Hepa1c1c7. (A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a fração Hex no período de 24 horas **(B)** 10 µg/poço **(C)** 20 µg/poço **(D)** 30 µg/poço **(E)** 40 µg/poço **(F)** 50 µg/poço **(G)** 100 µg/poço **(H)** 150 µg/poço. Apresentaram perda da adesão, alterações da sua morfologia e retração citoplasmática



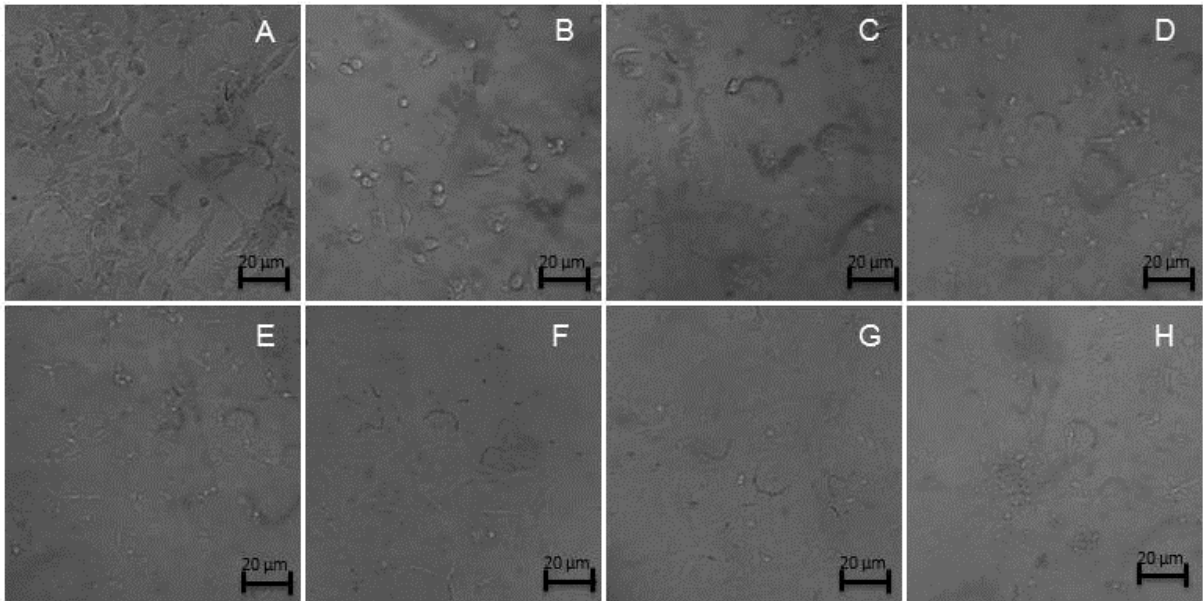
**Figura 6. Determinação da citotoxicidade em células Hepa1c1c7 pelo método colorimétrico MTT.** O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da fração Hex, durante o período de 24 e 48 horas. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas **(A)** Hex (10 – 150 µg/poço). Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 48 horas **(B)** Hex (10 – 150 µg/poço).



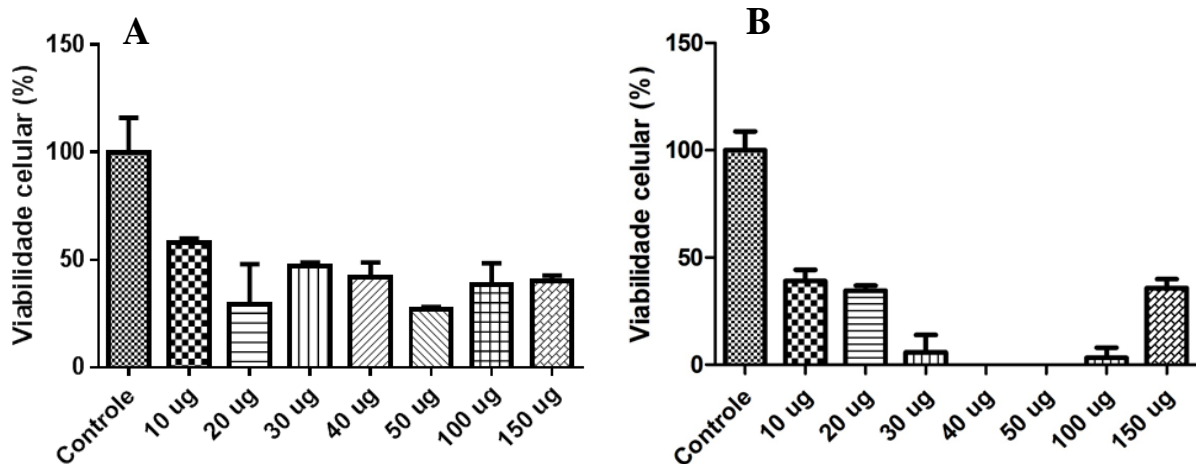
**Figura 7. Fotomicrografias das análises morfológicas das células Hepa1c1c7. (A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração EtOH no período de 24 horas **(B)** 10 µg/poço **(C)** 20 µg/poço **(D)** 30 µg/poço **(E)** 40 µg/poço **(F)** 50 µg/poço **(G)** 100 µg/poço **(H)** 150 µg/poço. Apresentaram acentuadas alterações na morfologia, como retração citoplasmática.



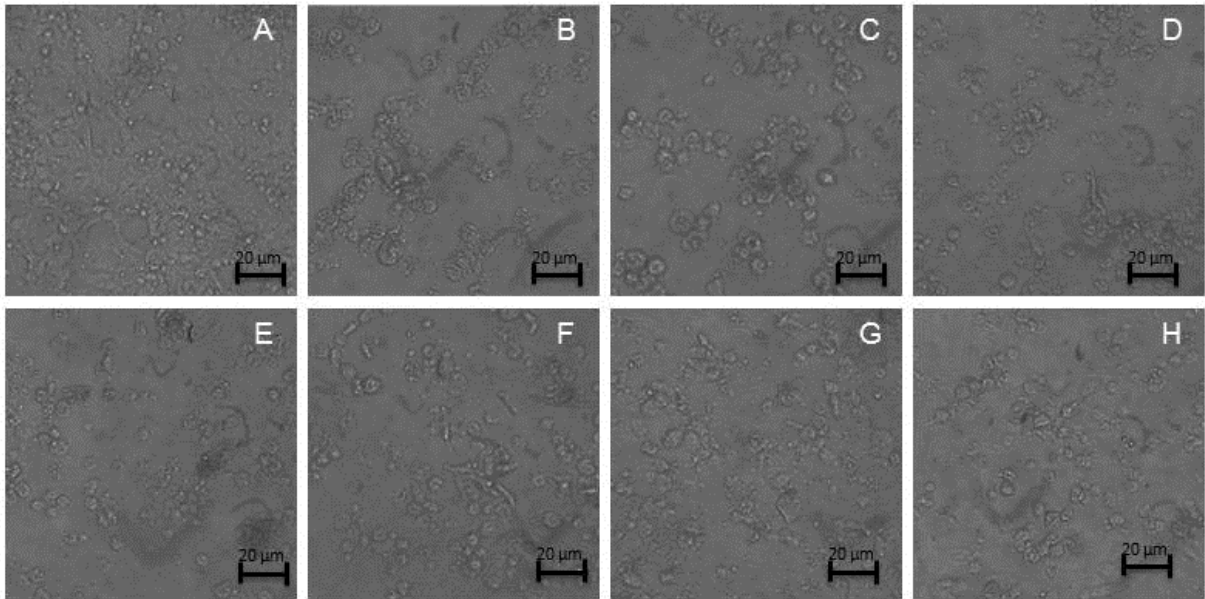
**Figura 8. Determinação da citotoxicidade em células Hepa1c1c7 pelo método colorimétrico MTT.** O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da subfração EtOH, durante o período de 24 e 48 horas. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas **(A)** EtOH (10 – 150 µg/poço). Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 48 horas **(B)** EtOH (10 – 150 µg/poço).



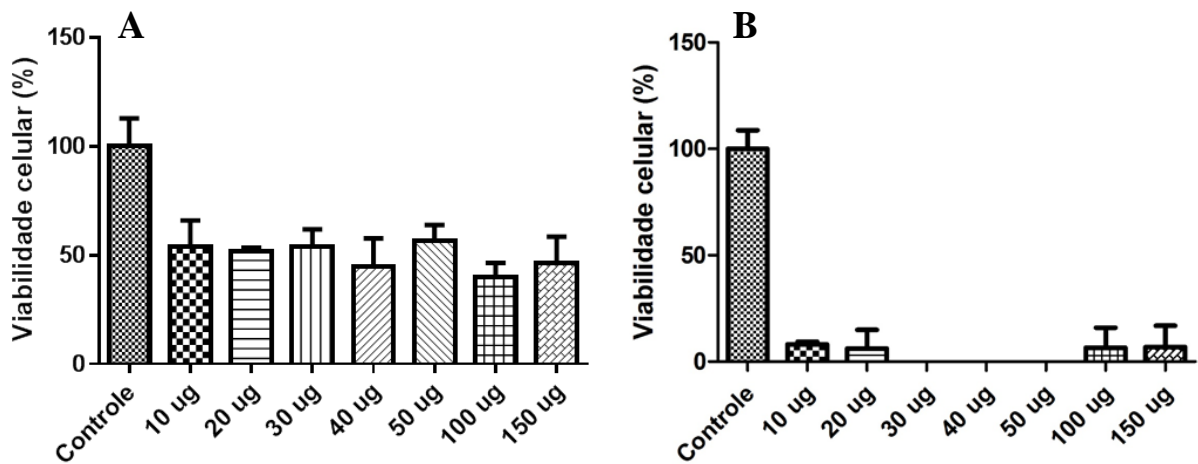
**Figura 9. Fotomicrografias das análises morfológicas das células Hepa1c1c7. (A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Cl<sub>2</sub> no período de 24 horas **(B)** 10 µg/poço **(C)** 20 µg/poço **(D)** 30 µg/poço **(E)** 40 µg/poço **(F)** 50 µg/poço **(G)** 100 µg/poço **(H)** 150 µg/poço. Verifica-se que estas células apresentaram perda da adesão e alterações significativas da sua morfologia, como retração citoplasmática, havendo também a formação de precipitado celular nos tratamentos com as concentrações mais altas.



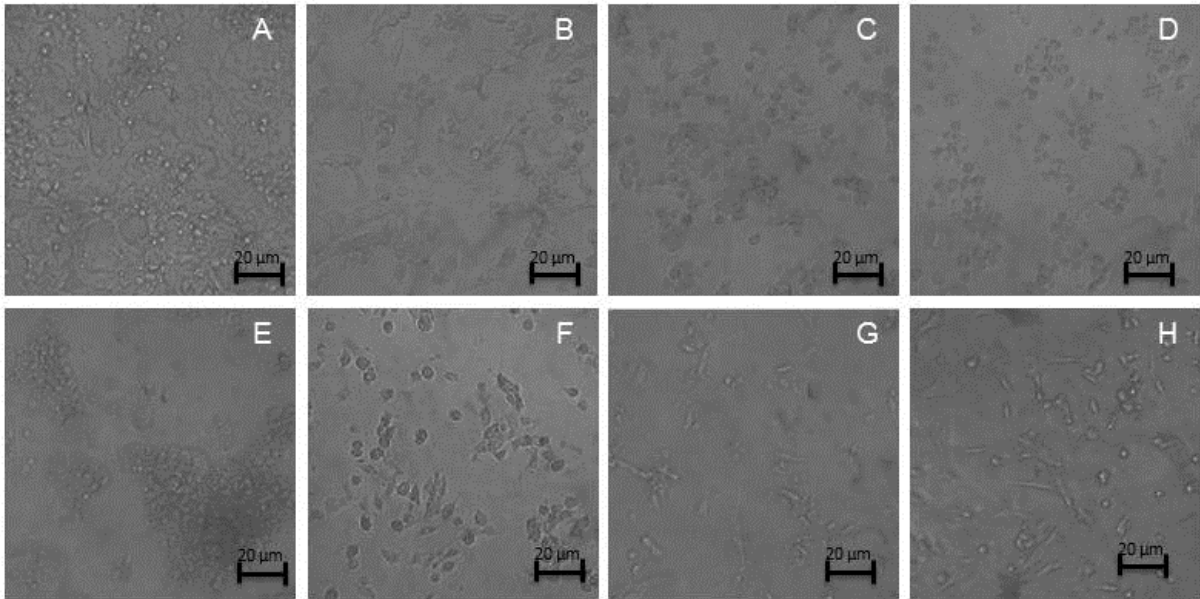
**Figura 10. Determinação da citotoxicidade em células Hepa1c1c7 pelo método colorimétrico MTT.** O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média ± DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da subfração Cl<sub>2</sub>, durante o período de 24 e 48 horas. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas **(A)** Cl<sub>2</sub> (10 – 150 µg/poço). Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 48 horas **(B)** Cl<sub>2</sub> (10 – 150 µg/poço).



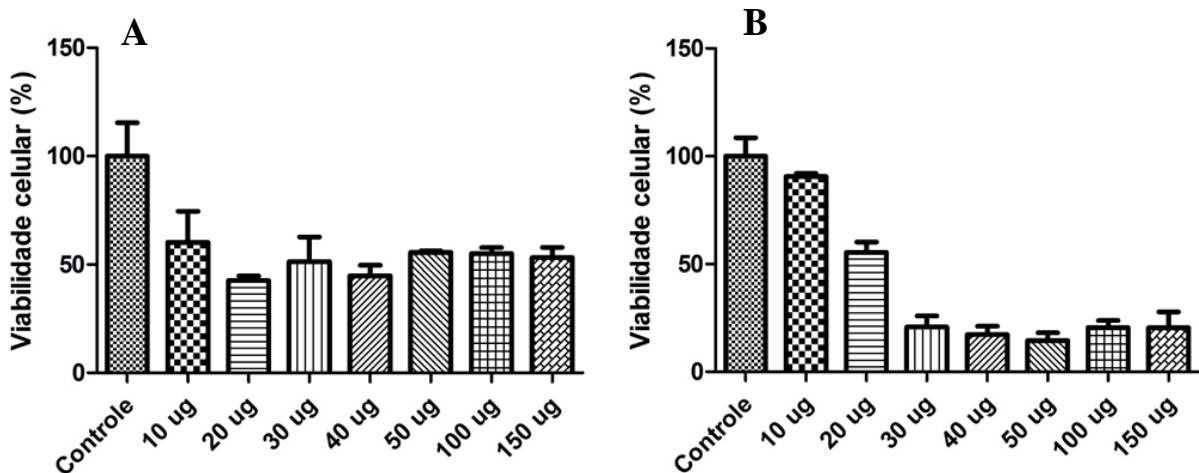
**Figura 11. Fotomicrografias das análises morfológicas das células Hepa1c1c7. (A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração MeOH no período de 48 horas **(B)** 10 µg/poço **(C)** 20 µg/poço **(D)** 30 µg/poço **(E)** 40 µg/poço **(F)** 50 µg/poço **(G)** 100 µg/poço **(H)** 150 µg/poço. Nota-se alterações da morfologia celular, como retração citoplasmática, a partir das primeiras concentrações.



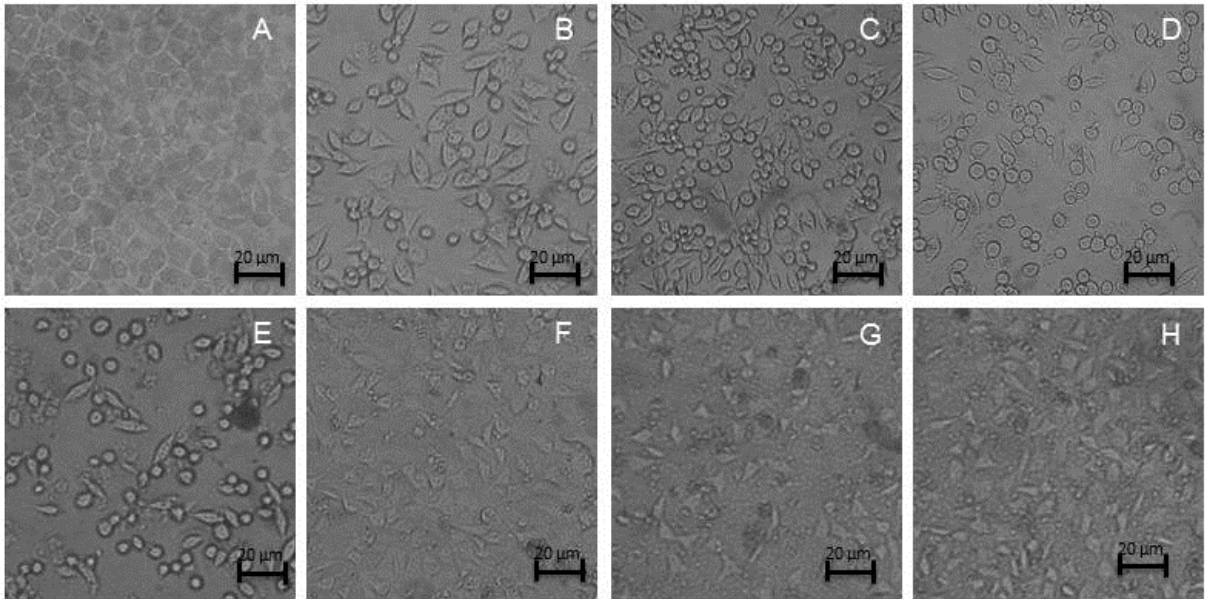
**Figura 12. Determinação da citotoxicidade em células Hepa1c1c7 pelo método colorimétrico MTT.** O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da subfração MeOH, durante o período de 24 e 48 horas. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas **(A)** MeOH (10 – 150 µg/poço). Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 48 horas **(B)** MeOH (10 – 150 µg/poço).



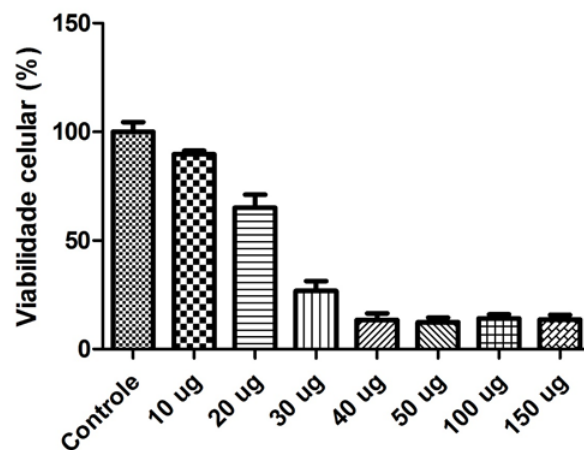
**Figura 13. Fotomicrografias das análises morfológicas das células Hepa1c1c7. (A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Éter no período de 48 horas **(B)** 10 µg/poço **(C)** 20 µg/poço **(D)** 30 µg/poço **(E)** 40 µg/poço **(F)** 50 µg/poço **(G)** 100 µg/poço **(H)** 150 µg/poço. Alterações morfológicas, como retração citoplasmática a partir das primeiras concentrações, e formação de precipitado nas concentrações mais altas..



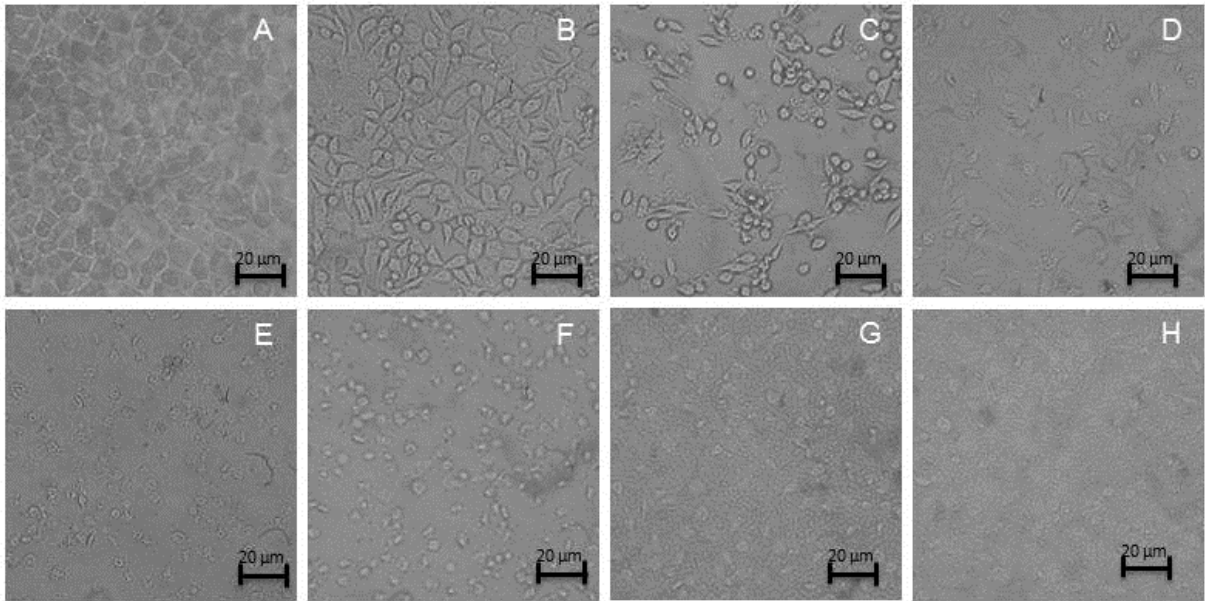
**Figura 14. Determinação da citotoxicidade em células Hepa1c1c7 pelo método colorimétrico MTT.** O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da subfração Éter, durante o período de 24 e 48 horas. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas **(A)** Éter (10 – 150 µg/poço). Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 48 horas **(B)** Éter (10 – 150 µg/poço).



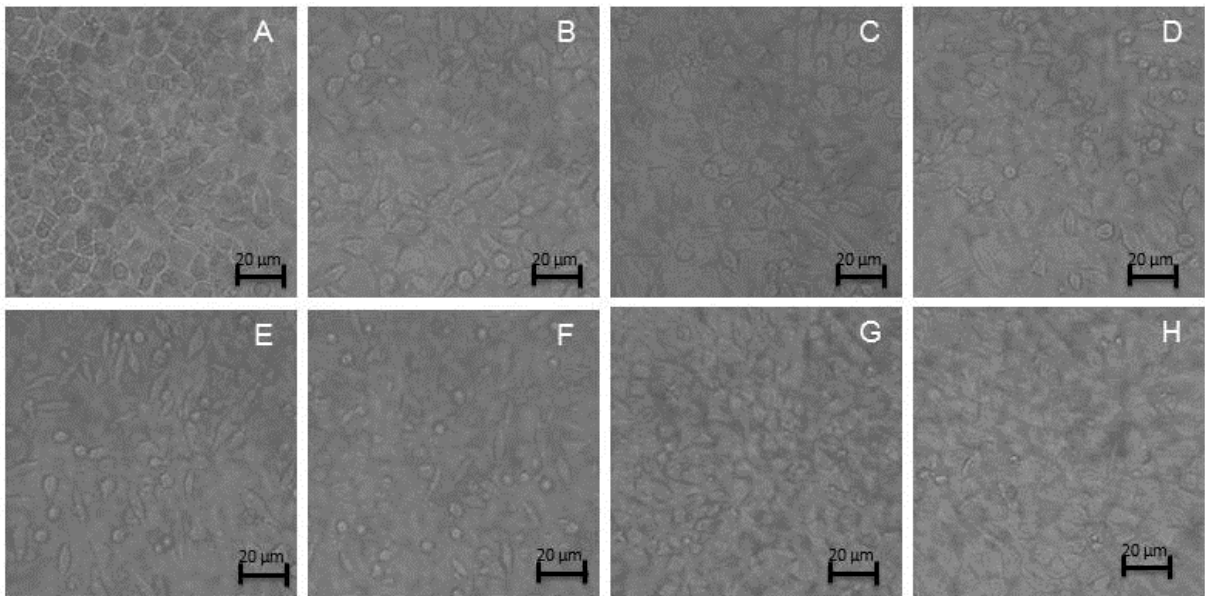
**Figura 15. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1.** (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a fração Hex no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço. Verifica-se alterações morfológicas, como retração citoplasmática desde as primeiras concentrações, e formação de precipitado nas concentrações mais altas.



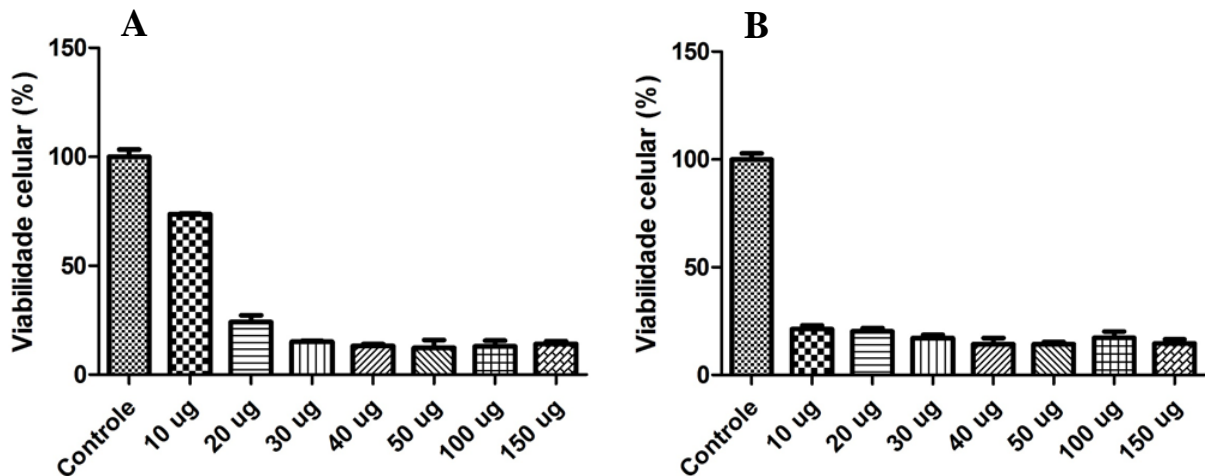
**Figura 16. Determinação da citotoxicidade em células FN1 pelo método colorimétrico MTT.** O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da fração Hex, durante o período de 24 horas. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas (A) Hex (10 – 150 µg/poço).



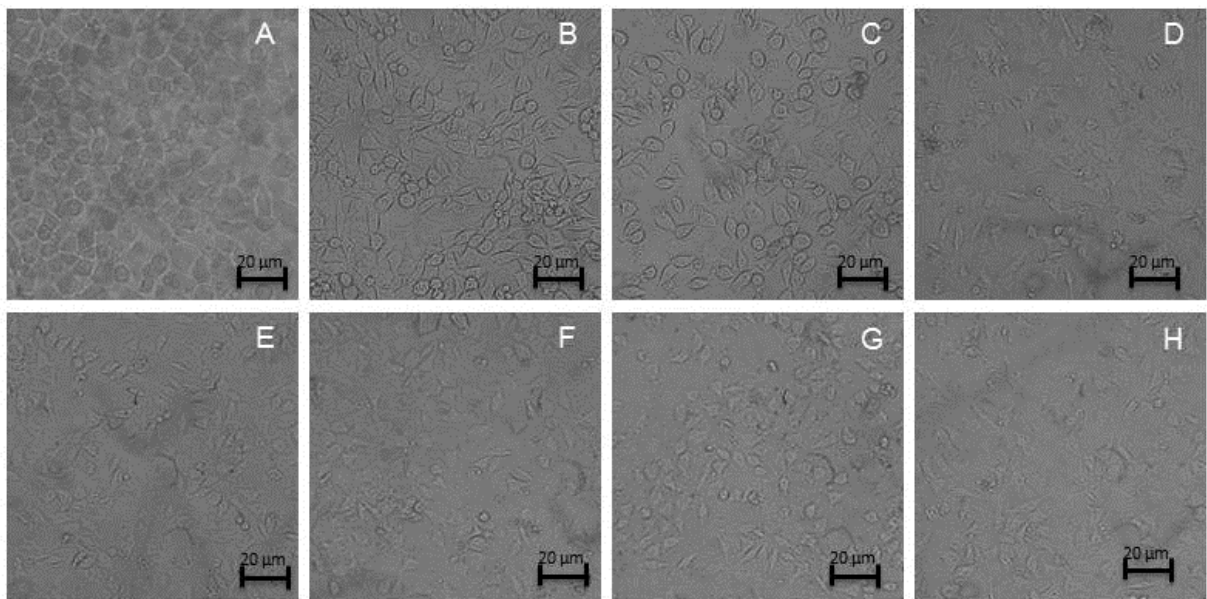
**Figura 17. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1. (A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a sufração  $\text{Cl}_2$  no período de 24 horas **(B)** 10  $\mu\text{g}/\text{poço}$  **(C)** 20  $\mu\text{g}/\text{poço}$  **(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  $\mu\text{g}/\text{poço}$ . As alterações morfológicas são bem acentuadas, e presença de formação de precipitado nas concentrações mais altas.



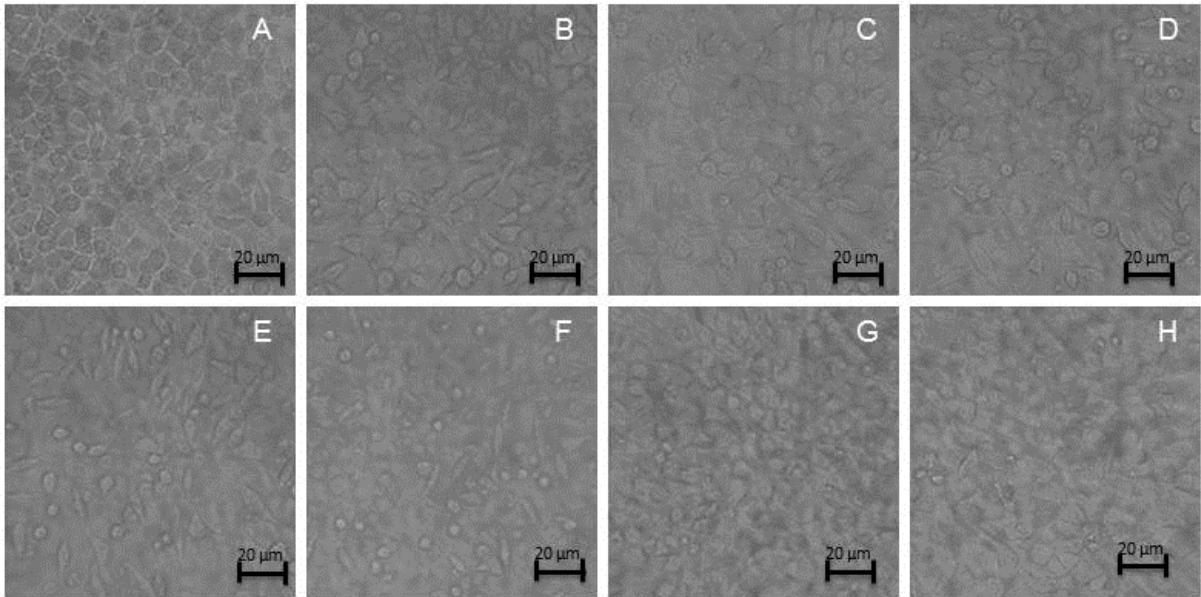
**Figura 18. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1. (A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a sufração EtOH no período de 24 horas **(B)** 10  $\mu\text{g}/\text{poço}$  **(C)** 20  $\mu\text{g}/\text{poço}$  **(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  $\mu\text{g}/\text{poço}$ . Alterações morfológicas, e presença de formação de precipitado nas concentrações mais altas



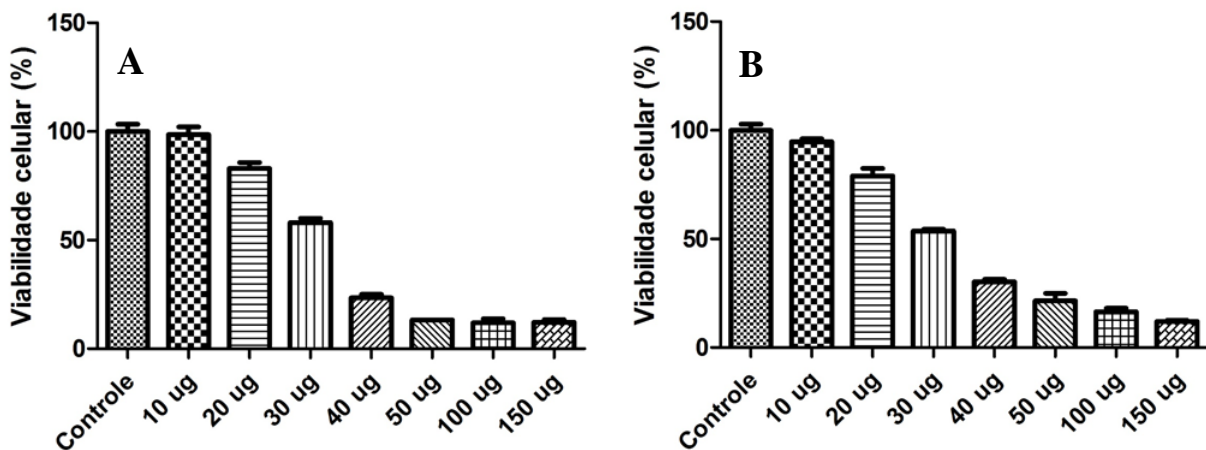
**Figura 19. Determinação da citotoxicidade em células FN1 pelo método colorimétrico MTT.** O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações da subfração Cl<sub>2</sub> e EtOH, durante o período de 24 horas. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas **(A)** Cl<sub>2</sub> (10 – 150 µg/poço). Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas **(B)** EtOH (10 – 150 µg/poço).



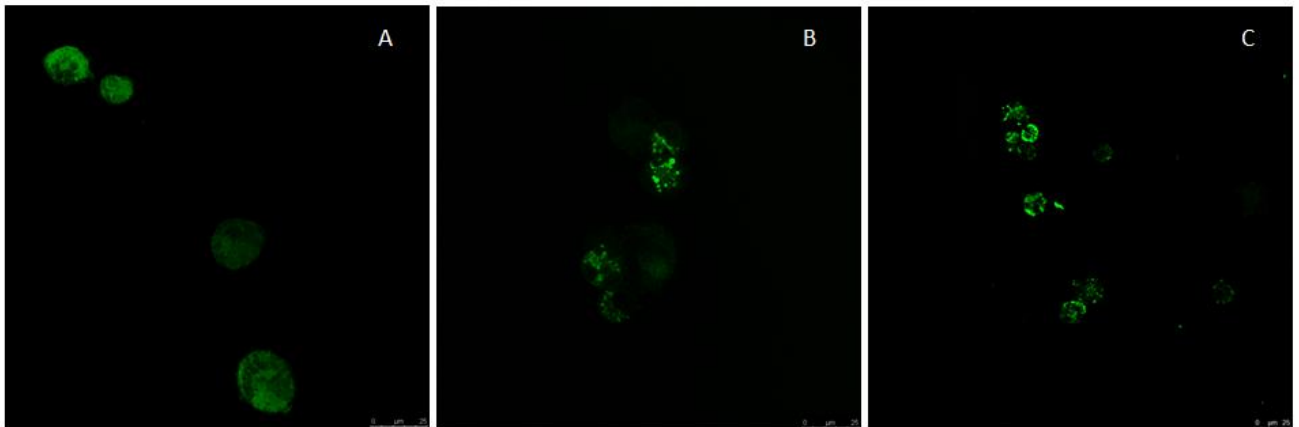
**Figura 20. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1.** **(A)** Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblástica (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração MeOH no período de 24 horas **(B)** 10 µg/poço **(C)** 20 µg/poço **(D)** 30 µg/poço **(E)** 40 µg/poço **(F)** 50 µg/poço **(G)** 100 µg/poço **(H)** 150 µg/poço. Leves alterações morfológicas nas concentrações iniciais, e presença de formação de precipitado nas concentrações mais altas.



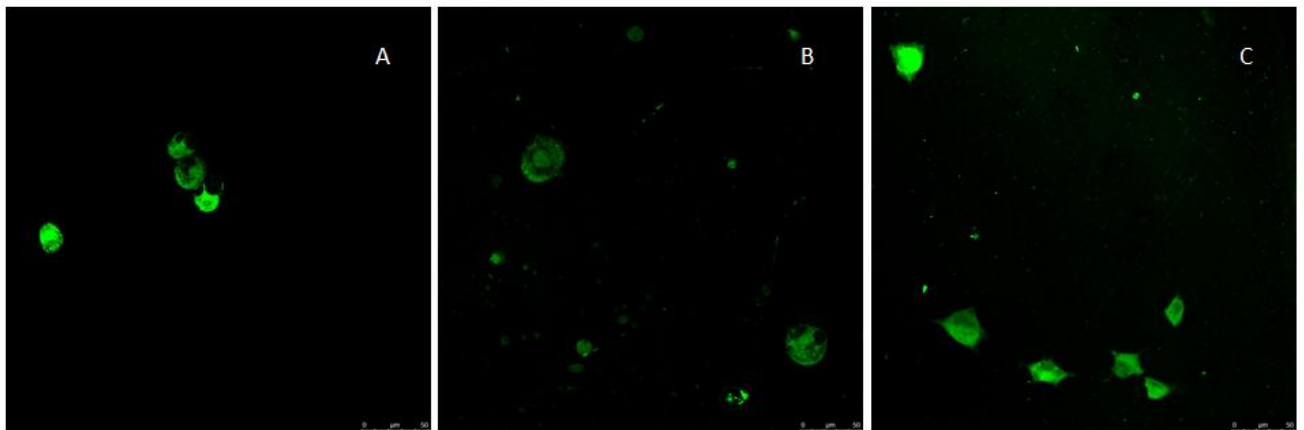
**Figura 21. Fotomicrografias das análises morfológicas das células FN1.** (A) Controle, no qual é possível observar as células com morfologia fibroblastóide (cabeça da seta). Células tratadas com a subfração Éter no período de 24 horas (B) 10 µg/poço (C) 20 µg/poço (D) 30 µg/poço (E) 40 µg/poço (F) 50 µg/poço (G) 100 µg/poço (H) 150 µg/poço. Leves alterações da morfologia celular nas primeiras concentrações, e presença de formação de precipitado nas concentrações mais altas.



**Figura 22. 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. Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas (A) MeOH (10 – 150 µg/poço). Células Hepa1c1c7 tratadas no período de 24 horas (B) Éter (10 – 150 µg/poço).



**Figura 23. Fotomicrografias das células Hepa1c1c7 com mitocôndrias marcadas com rodamina 123 (verde), analisadas por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com Éter e MeOH, nas concentrações de 37,38 e 36,36 µg/poço, durante um período 6 horas. Controle (A); Éter 37,38 µg/poço (B) MeOH 36,36 µg/poço (C).**



**Figura 24. Fotomicrografias das células FN1 com mitocôndrias marcadas com rodamina 123 (verde), analisadas por microscopia confocal a laser. As células foram tratadas com Éter e MeOH, nas concentrações de 37,38 e 36,36 µg/poço, durante um período 6 horas. Controle (A); Éter 37,38 µg/poço (B) MeOH 36,36 µg/poço (C).**

## GLOSSÁRIO

|           |  |
|-----------|--|
| A2780     | Câncer de ovário                         |
| A375      | Melanoma humano                          |
| A549      | Câncer de pulmão de não pequenas células |
| ATP       | Adenosina trifosfato                     |
| BHY       | Câncer de boca                           |
| BJAB      | Linfoma de Burkitt                       |
| CHC       | Hepatocarcinoma                          |
| C12       | Dícloro                                  |
| CNE1      | Câncer de nasofaringe                    |
| CRC       | Câncer colorretal                        |
| DMSO      | Dimetilsulfóxido                         |
| DNA       | Ácido Desoxirribonucleico                |
| DU145     | Câncer de próstata                       |
| EAC       | Carcinoma de Etilich Ascites             |
| EtOH      | Etanol                                   |
| FN1       | Fibroblasto Humano Normal                |
| HCCSCs    | Câncer de colon humano                   |
| HCT 116   | Câncer colorretal                        |
| HEC1A     | Câncer de endométrio                     |
| HeLa      | Câncer cervical humano                   |
| HEp-2     | Carcinoma epitelial da laringe humana    |
| Hepa1c1c7 | Hepatocarcinoma murino                   |
| HepG2     | Hepatocarcinoma humano                   |

|            |  |
|------------|--|
| Hex        | Hexano   |
| HFFF2      | Fibroblastos humano  |
| HRT-18     | Câncer colon íleocecal                                       |
| IC50%      | Concentração Inibitória de 50%                               |
| INCA       | Instituto Nacional de Câncer                                 |
| ISHIKAWA   | Câncer de endométrio   |
| LNCaP      | Câncer de próstata humano                                    |
| M777A.1    | Câncer de mama humano  |
| MCF-7      | Câncer de mama   |
| MDA-MB     | Câncer de mama   |
| ME45       | Células de melanoma  |
| MeOH       | Metanol  |
| MTT        | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) |
| NCI-H460   | Câncer de pulmão humano                                      |
| NIH 3T3    | Fibroblasto murino normal                                    |
| OVCAR3     | Câncer de ovário   |
| PC3        | Carcinoma de próstata  |
| ROS        | Espécies reativas de oxigênio                                |
| SCC-9      | Câncer de boca   |
| SKMEL-3    | Melanoma humano  |
| SKNMC      | Neuroblastoma  |
| SKOV3      | Câncer de ovário   |
| SNS SF-295 | Glioblastoma multiforme                                      |
| TRAMP-C2   | Câncer de próstata murino                                    |

|                |   |
|----------------|---|
| U266           | Mieloma múltiplo                            |
| UO-31          | Câncer renal                                |
| VHB            | Hepatite B                                  |
| $\Delta\Psi_m$ | Potencial elétrico da membrana mitocondrial |
| $\mu\text{g}$  | Micrograma                                  |
| $\mu\text{L}$  | Microlitro                                  |