



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO - CTC
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

MAIKON KELBERT

**EFEITO DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA CLOROFILIANO
PROVENIENTE DA *Aloe barbadensis* MILLER EM CÉLULAS
ANIMAIS**

**FLORIANÓPOLIS
2016**

Maikon Kelbert

**EFEITO DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA CLOROFILIANO
PROVENIENTE DA *Aloe barbadensis* MILLER EM CÉLULAS
ANIMAIS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia
Química da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia
Química.

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques
Porto

Coorientador: Dr^a Fernanda Vieira
Berti.

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kelbert, Maikon

Efeito do extrato do parênquima clorofiliano
proveniente da *Aloe barbadensis* Miller em células animais
/ Maikon Kelbert ; orientador, Luismar Marques Porto ;
coorientadora, Fernanda Vieira Berti. - Florianópolis, SC,
2016.

88 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Extrato do parênquima
clorofiliano . 3. Citotoxicidade. 4. Células endoteliais.
5. Melanoma. I. Porto, Luismar Marques . II. Berti,
Fernanda Vieira. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
IV. Título.

Maikon Kelbert

Efeito do extrato do parênquima clorofiliano proveniente da *Aloe barbadensis* Miller em células animais

Dissertação julgada adequada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Orientador

Dr.^a Fernanda Vieira Berti
Coorientadora

Prof.^a Dr.^a Cíntia Soares
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Débora de Oliveira.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Giannini Pasiznick Apati
Universidade da Região de Joinville

Dr.^a Talita da Silva Jeremias
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 15 de setembro de 2016

Dedico este trabalho aos meus pais, minha irmã, minha avó, minhas tias, minha prima e a todas as pessoas que passaram em minha vida e deixaram algo de bom pois graças a cada um pude chegar até esta etapa.

AGRADECIMENTOS

Minha mais profunda gratidão a minha mãe, meu pai e minha irmã por sempre apoiarem as minhas decisões, acreditarem incondicionalmente em mim e se sacrificarem para que eu pudesse chegar até aqui.

As minhas tias Helga e Ingrid, a minha prima Barbara e a minha avó Else pelo apoio, motivação e por serem essas pessoas magníficas.

Em especial, ao Professor Luismar Marques Porto e a Doutora Fernanda Vieira Berti pela orientação, ensinamentos e amizade.

A Emily por estar sempre disposta ajudar, discutir os experimentos e resultados e acima de tudo pela amizade, afinal nossas discussões sempre tornaram os dias mais divertidos.

A Karina por estar sempre disposta ajudar, por me acompanhar nas noites de estudo e acima de tudo pela amizade.

Ao Guilherme pela ajuda na análise de HPLC, por toda a ajuda no decorrer do mestrado e pela amizade.

A Drielle por toda a ajuda no decorrer do mestrado e pela amizade, afinal são quase 9 anos, né?

A Tuane pela amizade e por me ajudar em todos os momentos em que precisei.

A todo grupo do Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab): Ana, Andrea, Camila, Charles, Giovana, Julia, Samara, Vinicius e Vitor pelas contribuições dadas no trabalho.

Ana Paula Ruani do LQPN pela ajuda na realização da análise de HPLC.

A Veronica e ao NOLAB pela ajuda com as imagens de microscopia.

A Talita e ao LACERT pela ajuda com as imagens de microscopia.

Ao LAMEB pelas leituras de fluorescência realizadas no laboratório.

Aos meus queridos amigos Alex, Carol, Jefferson e Gabriel por terem me aguentado durante todo esse tempo e estarem sempre ao meu lado dispostos a ajudar.

A Aloia, Eduardo, Lucília e Francisco por todos os diversos conselhos, aprendizado e amizade, sem dúvida não seria quem sou se vocês não tivessem passado por minha vida.

Aos inúmeros amigos que participaram de alguma forma para que eu pudesse concluir essa etapa da minha vida, em especial ao Fabricio, Priscila, André Vinícius, Lya, Emerson, Alexandre, Maicon, Ju,

Alexandra, Amanda, Barbara, Juliana, Daniel, Valdir, Fernanda, Bruna e Eliza.

Aos meus queridos amigos de faculdade Ana, Ale, André, Géssica e Styfanie uma amizade da Univille para a vida.

As minhas orientadoras de iniciação científica Andrea, Ana Paula, Giannini e Michele sem dúvidas foi graças a vocês que adoro desenvolver atividades de pesquisa e resolvi realizar o mestrado e continuar no doutorado.

A todos que de maneira indireta ou direta, contribuíram para que esse trabalho se realizasse.

Aos membros da banca por aceitarem avaliar este trabalho e pelas contribuições dadas.

Especialmente ao Sr. Dionísio, a Sra. Cacilda e a empresa Naturama, pelo fornecimento do material de estudo sem o qual este trabalho não teria sido realizado.

Ao CNPq, CAPES e FINEP pelo apoio financeiro.

Efeito do extrato do parênquima clorofiliano proveniente da *Aloe barbadensis* Miller em células animais

RESUMO

Diversas culturas se baseiam na utilização de plantas para o tratamento de doenças. Plantas do gênero *Aloe* vem sendo utilizadas a séculos na medicina tradicional para cicatrização de feridas, como agente antibacteriano, como laxante e até mesmo para o tratamento do câncer. O extrato do parênquima clorofiliano (EPC) da *Aloe barbadensis* Miller é excretado quando a folha é cortada ou quebrada, este líquido de cor amarelada é rico em antronas, cromonas e seus derivados. Estudos com compostos isolados do EPC, aloína e Aloe emodina, mostram uma promissora atividade antitumoral dos mesmos. A incidência do melanoma cutâneo vem aumentando nos últimos anos, o que gera uma grande preocupação, uma vez que esse câncer é altamente agressivo apresentando alta possibilidade de metástase. Neste trabalho o EPC foi padronizado por HPLC, apresentando 5,6% em massa seca do isômero aloína B. A citotoxicidade foi avaliada do EPC em linhagens de fibroblastos L-929, assim como o efeito do EPC sobre a viabilidade, proliferação, morfologia e migração de duas linhagens de melanoma (SK-MEL-28 e B16-F10). De acordo com a ISO 10993-5, concentrações superiores a $185 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC são citotóxicas (decréscimo na viabilidade maior que 30%), sendo esse valor maior que o valor de IC_{50} de ambas as linhagens de melanoma, 125 e $165 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a SK-MEL-28 e B16-F10, respectivamente. Análise morfológica mostrou ponto de alta fluorescência, indicando uma reorganização dos filamentos de actina presentes no citoesqueleto. O resultado do ensaio de migração para ambas linhagens de melanoma mostrou que o EPC é mais eficaz em inibir a migração do melanoma humano SK-MEL-28. Células endoteliais (HUVEC) foram expostas ao EPC e os parâmetros de viabilidade celular, proliferação, morfologia, migração e formação de tubos foram avaliados. O EPC inibiu a migração de HUVECs mesmo em concentrações que não apresentaram efeito de decréscimo na atividade metabólica e proliferação celular. Pôde-se observar a retração das fibras de estresse em células tratadas com as concentrações de 10 e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC. A formação de tubos em células endoteliais foi inibida na maior concentração testada ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), contudo ainda se observa a formação de brotos vasculares. Em suma o EPC proveniente de *Aloe barbadensis* Miller causou um decréscimo na viabilidade e proliferação celular assim como uma diminuição da capacidade de migração e alterações morfológicas de células de melanoma e endoteliais, influenciando também na formação de tubos vasculares por células endoteliais.

Palavras-chave: Extrato do parênquima clorofiliano. *Aloe*. Melanoma. Células endoteliais. Citotoxicidade.

Effect of chlorophyll parenchyma extract from *Aloe barbadensis* Miller on animal cells

ABSTRACT

Several cultures are based on the use of plants for the treatment of diseases. Plants of the genus *Aloe* has been used for centuries in traditional medicine, in wound healing, such as antibacterial agent, laxative and even for the treatment of cancer. The chlorophyll parenchyma extract (EPC) from *Aloe barbadensis* Miller is excreted when the sheet is cut or broken, this yellowish liquid is rich in anthrones, chromones and their derivatives. Studies on compounds isolated EPC, aloin and Aloe emodin, showed promising antitumor activity. The incidence of melanoma has increased in recent years, creating a great concern, since this cancer is highly aggressive and presents high possibility of metastasis. In this work the EPC was standardized by HPLC, showing 5.6% of dry weight of aloin B isomer. The EPC cytotoxicity was evaluated on fibroblast L-929 cell line, as well as the effect of EPC in cell viability, proliferation, morphology alterations and migration on two melanoma cell lines (SK-MEL-28 and B16-F10). According to ISO 10993-5, concentrations higher than $185 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EPC are cytotoxic (decrease in viability was greater than 30%), this value being higher than the IC_{50} value of both melanoma cell lines, 125 and $165 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to SK-MEL-28 and B16-F10, respectively. Morphological analysis showed high fluorescence spots, indicating a reorganization of actin filaments present in the cytoskeleton. The result of the migration test for both melanoma cell lines showed that the EPC is more effective to inhibit the migration of human melanoma SK-MEL-28. Endothelial cells (HUVEC) were exposed to the EPC and parameters of cell viability, proliferation, morphology alterations, migration and tube formation was evaluated. The EPC inhibited HUVEC migration even at concentrations that has not shown effect in decrease of metabolic activity and cellular proliferation. It was observed the decrease of stress fibers in cells after treated with concentrations of 10 and $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of EPC. The tube formation on endothelial cells was inhibited at the highest concentration tested ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), however it was still possible to observe the formation of vascular sprouts. In short, the EPC from *Aloe barbadensis* Miller caused a decrease in cell viability and proliferation as well as reduced migration ability and morphological changes on melanoma and endothelial cells, also influencing the vascular tube formation by endothelial cells

Keywords: Chlorophyll parenchyma extract. *Aloe*. Melanoma. Endothelial cell. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Foto tirada de uma planta da *Aloe barbadensis* Miller na cidade de Paulo Lopes – SC, na plantação pertencente a empresa Naturama. A aproximação apresenta um corte da folha onde pode-se observar o parênquima clorofiliano e o parênquima de reserva.....35
- Figura 2: Representação das etapas experimentais realizadas na execução deste trabalho.39
- Figura 3: Cromatograma do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) proveniente da *Aloe barbadensis* Miller, apresentando os tempos de retenção dos isômeros aloína A e B.48
- Figura 4: Curva padrão do isômero aloína B utilizada para quantificar o percentual deste composto no EPC.49
- Figura 5: Efeito do EPC testado em diferentes concentrações (0,1 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) sobre a atividade metabólica de células de L-929 após 72 horas de cultivo. Resultado expresso em média \pm erro padrão de três experimentos independentes realizados em oito replicatas. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.50
- Figura 6: Imagens de microscopia de contraste de fase obtidas da linhagem de fibroblastos de camundongo (L-929) cultivadas em diferentes concentrações de EPC durante 72 horas.51
- Figura 7: Atividade metabólica da linhagem de melanoma humano SK-MEL-28 e melanoma de camundongo B16-F10, após tratamento com EPC durante 72 horas. Resultado expresso em média \pm erro padrão de três experimentos independentes utilizando-se oito replicatas para cada caso. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.....53
- Figura 8: Concentração de dsDNA da linhagem de melanoma humano SK-MEL-28 e melanoma de camundongo B16-F10, após tratamento com EPC durante 72 horas. Resultado expresso em média \pm erro padrão de três experimentos independentes utilizando-se quatro replicatas para cada caso. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.....54

- Figura 9: Microscopia de contraste de fase de melanoma humano SK-MEL-28 (A) e melanoma de camundongo B16-F10 (B) tratadas com diferentes concentrações EPC durante 72 horas. A barra preta representa a escala de 50 μm57
- Figura 10: Microscopia de fluorescência de melanoma humano SK-MEL-28 (A e B) e melanoma de camundongo B16-F10 (C e D) expostas ao EPC por 72 horas. Os filamentos de F-actina foram corados com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (imagens A e C) enquanto o núcleo foi corado com DAPI (imagens B e D). A barra branca representa a escala de 50 μm59
- Figura 11: Efeito das diferentes concentrações de EPC sobre a migração de células de melanoma humano SK-MEL-28. A) Imagens da migração das células SK-MEL-28 após 24 horas da abertura da ferida. B) Migração das células (expressa em porcentagem) em relação ao tempo inicial, o resultado foi expresso em média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos com $p < 0,05$61
- Figura 12: Efeito das concentrações de EPC sobre a migração de células de melanoma de camundongo B16-F10. A) Imagens da migração das células B16-F10 após 24 horas da abertura da ferida. B) Migração das células (expressa em porcentagem) em relação ao tempo inicial, o resultado foi expresso em média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos com $p < 0,05$63
- Figura 13: Atividade metabólica de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) após 72 horas de tratamento com diferentes concentrações de EPC. Resultado expresso em média \pm erro padrão de três experimentos independentes utilizando-se oito replicatas para cada caso. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.66
- Figura 14: Concentração de dsDNA de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) após tratamento com EPC durante 72 horas. Resultado expresso em média \pm erro padrão de três experimentos independentes utilizando-se quatro replicatas para cada caso. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.67

- Figura 15: Imagens obtidas por microscopia de contraste de fase de HUVECs cultivadas com a diferentes concentrações de EPC durante 72 horas. A barra preta representa a escala de 100 μm69
- Figura 16: Imagens obtidas por microscopia de fluorescência de células endoteliais cultivadas em diferentes concentrações de EPC durante 72 horas. (A) filamentos de F-actina foram corados com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina. (B) Núcleos foram corados com DAPI. A barra branca representa a escala de 50 μm71
- Figura 17: Efeito das concentrações de EPC sobre a migração de HUVECs. A) Imagens da migração das células HUVEC após 24 horas da abertura da ferida. B) Migração das células (expressa em porcentagem) em relação ao tempo inicial, o resultado expresso em média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos com $p < 0,05$73
- Figura 18: Efeito das diferentes concentrações de EPC sobre a formação de tubos vasculares. Rede de tubos vasculares formada após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de EPC em um aumento de 4 \times (A) e 20 \times (B). A barra preta representa a escala de 200 μm (A) e 50 μm (B).75
- Figura 19: Parâmetros obtidos da análise da rede de tubos formada após 24 horas de exposição de HUVECs a diferentes concentrações de EPC. A) Área coberta, B) Comprimento total dos tubos, C) Pontos de ramificação e D) Número total de tubos. Resultado expresso em média \pm SEM de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.76

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Dados referentes ao ano de 2013 sobre número total de mortes por câncer a nível mundial para ambos os sexos..... 30
- Tabela 2: Número de mortes decorrentes dos diversos tipos de câncer no Brasil no ano de 2013. 31
- Tabela 3: Comparativo da inibição da migração entre as duas linhagens de melanoma B16-F10 e SK-MEL-28 após 24 horas de tratamento com as diferentes concentrações de EPC..... 64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B16-F10: melanoma de camundongo da linhagem B16-F10
DAPI: sal dihidroclorídrico, 4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM: do inglês *Dulbecco's modified Eagle's medium*
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
dsDNA: DNA de fita dupla
EPC: extrato do parênquima clorofiliano
EPR: extrato do parênquima de reserva
HPLC: do inglês *High performance liquid chromatography*
HUVEC: célula endotelial de veia umbilical humana
L-929: fibroblasto de camundongo da linhagem L-929
MMP: metaloproteinases de matrix
MTS: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]
PBS: tampão fosfato-salino
OMS: Organização Mundial da Saúde
RPMI: do inglês *Roswell Park Memorial Institute*
SK-MEL-28: melanoma humano da linhagem SK-MEL-28
VEGF: do inglês *vascular endothelial growth factor*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 OBJETIVOS.....	27
1.1.1 Objetivo geral.....	27
1.1.2 Objetivos específicos.....	27
2 FUNDAMENTAÇÃO TEORICA.....	29
2.1 CÂNCER E MELANOMA CUTÂNEO.....	29
2.1.1 Aspectos do melanoma cutâneo.....	32
2.1.2 Metástase e angiogênese.....	33
2.2 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	34
2.2.1 <i>Aloe barbadensis</i> Miller.....	34
2.2.2 Extrato do parênquima clorofiliano (EPC).....	35
2.2.3 Estudos relacionando aloína e aloe emodina a células tumorais e endoteliais.....	37
3 METODOLOGIA.....	39
3.1 FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES.....	39
3.2 PADRONIZAÇÃO DA PERCENTAGEM DE ALOÍNA PRESENTE NO EPC PROVENIENTE DA PLANTA <i>Aloe Barbadensis</i> MILLER.....	39
3.2.1 Catalogação.....	39
3.2.2 Extrato do parênquima clorofiliano (EPC).....	40
3.2.3 Análise quantitativa de aloína no extrato do parênquima clorofiliano (EPC) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	40
3.2.3.1 Aloína.....	40
3.2.3.2 Preparação das amostras e da curva padrão.....	41
3.2.3.3 Análise de HPLC.....	41
3.3 CULTURA DE CÉLULAS.....	41
3.4 ESTERILIZAÇÃO E PREPARO DA SOLUÇÃO DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA CLOROFILIANO (EPC).....	42
3.5 TRATAMENTO COM EPC.....	42
3.5.1 Viabilidade.....	43
3.5.2 Proliferação.....	43
3.5.3 Microscopia de contraste de fase.....	43
3.6 MIGRAÇÃO.....	44
3.7 MORFOLOGIA.....	44
3.8 FORMAÇÃO DE TUBOS VASCULARES.....	45
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47

4.1	PADRONIZAÇÃO DA PERCENTAGEM DE ALOÍNA PRESENTE NO EXTRATO DO PARÊNQUIMA CLOROFILIANO (EPC) PROVENIENTE DA PLANTA <i>Aloe Barbadensis</i> MILLER....	47
4.1.1	Catlogação da planta.....	47
4.1.2	Quantificação de aloína.....	47
4.2	CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA CLOROFILIANO (EPC) EM LINHAGEM PADRÃO DE FIBROBLASTOS DE CAMUNDONGO L-929 DE ACORDO COM A ISO 10993-5.....	50
4.3	EFEITO DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA CLOROFILIANO (EPC) EM LINHAGENS DE MELANOMA DE CAMUNDONGO (B16-F10) E HUMANO (SK-MEL-28).....	52
4.4	EFEITO DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA CLOROFILIANO (EPC) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA UMBILICAL HUMANA (HUVEC).....	65
4.5	RESUMO COMPARATIVO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARAS CÉLULAS TESTADAS NO PRESENTE TRABALHO.....	77
4.5.1	Atividade metabólica.....	77
4.5.2	Proliferação.....	78
4.5.3	Morfologia.....	78
4.5.4	Migração.....	78
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	79
5.1	CONCLUSÕES.....	79
5.2	PERSPECTIVAS.....	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Dados de 2013 apontam o Brasil como o quarto país onde mais se morre por câncer, sendo o câncer de pele o mais frequente, totalizando 25% dos casos registrados. O câncer de pele melanoma é o mais grave, mesmo representando apenas 4% dos casos correspondentes ao órgão (pele). Sua gravidade se dá devido ao melanoma apresentar alta possibilidade de metástase, ou seja, disseminação do câncer para outros tecidos ou órgãos sadios.

Para que o tumor se desenvolva as células tumorais expressam moléculas sinalizadoras, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), responsáveis pelo recrutamento de novos vasos sanguíneos, a partir de vasos pré-existentes, que suprem a demanda de nutrientes e oxigênio necessários para a progressão tumoral. A formação desses novos vasos sanguíneos se dá por meio do processo denominado angiogênese, também responsável pela migração das células tumorais para outras áreas do corpo (metástase) (CARMELIET, 2003; QUESADA; MUÑOZ-CHÁPULI; MEDINA, 2006).

O tratamento de pacientes diagnosticados com melanoma ocorre através de intervenção cirúrgica seguido de quimioterapia e/ou radioterapia. Nos últimos anos o conhecimento referente a biologia do melanoma tem progredido muito e com isso a taxa de sobrevivência dos pacientes tem aumentando, contudo os quimioterápicos ainda causam diversos efeitos secundários (TABOLACCI et al., 2013), o que gera um desgaste físico e psicológico aos pacientes. Neste sentido, o estudo de novos agentes com promissora atividade antitumoral, que não causem tantos efeitos secundários são de grande interesse, principalmente se proveniente de uma fonte natural.

A *Aloe barbadensis* Miller, conhecida popularmente como babosa, vêm sendo utilizada por séculos para diversas finalidades farmacêuticas e cosméticas, já que possui em sua composição química diversos compostos bioativos. O extrato do parênquima clorofiliano (EPC) desta planta apresenta em sua composição mais de 80 constituintes (CAMPESTRINI, 2007), dentre os quais, destacam-se a aloína e aloe emodina como possíveis compostos com atividade antitumoral (CÁRDENAS; QUESADA; MEDINA, 2006; LEE et al., 2014).

No Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab) estudos com a planta *Aloe barbadensis* Miller vem sendo desenvolvendo desde o

ano de 2006. Campestrini (2007) demonstrou que o extrato do parênquima de reserva (EPR), a fração polissacarídica isolada deste EPR e acemanana (composto isolado do EPR) apresentaram efeito anti-vasculogênico e anti-angiogênico, estes resultados foram obtidos através dos ensaios de vascularização realizados na vesícula vitelínica e na membrana córioalantóica de *Gallus domesticus*. Godinho e colaboradores (2016) desenvolveram hidrogéis de nanocelulose bacteriana incorporando in situ de diferentes porções de Aloe visando aplicações na área biomédica. Berti (2008) demonstrou, através de ensaios in vitro, que altas concentrações tanto de EPC quanto de aloína promoveram a morte de células de melanoma B16-F10, enquanto em modelos in vivo de ovos embrionados da espécie *Gallus domesticus* estes compostos estimularam a vasculogênese e angiogênese.

Partindo do estudo de Berti (2008) o presente estudo tem como intuito elucidar conhecimentos sobre a ação do EPC em células tumorais e endoteliais, sendo de grande valia, uma vez que tanto propriedades pró-angiogênicas e antitumorais foram relatadas na literatura.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar e quantificar o efeito citotóxico in vitro do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) proveniente da *Aloe barbadensis* Miller.

1.1.2 Objetivos específicos

- 1) Padronizar a medida da percentagem de aloína presente no EPC proveniente da planta *Aloe barbadensis* Miller.
 - ✓ Para alcançar este objetivo, a planta primeiramente foi catalogada com intuito de confirmar a origem botânica (*Aloe barbadensis* Miller). O EPC após coletado e beneficiado foi padronizado quanto ao seu teor de aloína por HPLC.

- 2) Determinar a faixa de concentração citotóxica do EPC.
 - ✓ A faixa de concentração citotóxica do EPC foi determinada por meio de uma análise quantitativa (atividade metabólica, por ensaio de MTS) e qualitativa (morfologia, por microscopia de contraste de fase).

- 3) Quantificar a viabilidade, proliferação e migração de linhagens de melanoma de camundongo (B16-F10) e melanoma humano (SK-MEL-28).
 - ✓ Efeito do EPC sobre ambas linhagens de melanoma foi avaliado por meio dos ensaios de atividade metabólica (pelo reagente de MTS), proliferação (pelo kit de PicoGreen[®]) e migração (pelo ensaio de cicatrização da ferida).

- 4) Avaliar alterações morfológicas em B16-F10 e SK-MEL-28.
 - ✓ Alterações morfológicas ocasionadas pelo EPC em ambas linhagens de melanoma foram visualizadas por meio de microscopia de contraste de fase e microscopia de fluorescência.

- 5) Quantificar a viabilidade, proliferação e migração em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).
 - ✓ Efeito do EPC sobre as células endoteliais humanas (HUVEC) foi avaliado por meio dos ensaios de atividade metabólica (pelo reagente de MTS), proliferação (pelo kit de PicoGreen[®]) e migração (pelo ensaio de cicatrização da ferida).

- 6) Avaliar alterações morfológicas em HUVEC.
 - ✓ Alterações morfológicas ocasionadas pelo EPC em HUVEC foram visualizadas por meio de microscopia de contraste de fase e microscopia de fluorescência.

- 7) Avaliar e quantificar a formação de tubos vasculares por HUVEC.
 - ✓ Efeito do EPC sobre a formação de tubos vasculares de HUVEC foi realizado em Geltrex[®].

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CÂNCER E MELANOMA CUTÂNEO

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Como característica comum células anormais começam a proliferar desordenadamente podendo espalhar-se para tecidos circundantes ou outros órgãos, este fenômeno é chamado de metástase (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS, 2015).

Os tumores podem ser considerados benignos ou malignos. Tumores benignos podem ser constituídos por grandes “massas” tumorais, porém quando removidos em geral não voltam a crescer, também não se espalham ou invadem tecidos circundantes. Enquanto tumores malignos, uma vez que crescem, além de invadir tecidos próximos, podem liberar/desprender células e migrar para locais distantes do tumor principal (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

Tumores malignos geram grande preocupação uma vez que além de intervenção cirúrgica, necessitam de tratamentos posteriores a cirurgia, como quimioterapia e radioterapia, além de acompanhamento periódico dos pacientes. Mesmo com os avanços na área, o número de mortes resultantes desta doença ainda é muito grande. A Tabela 1 mostra o ranking dos países, com dados de 2013, referentes ao número de mortes por câncer para ambos os sexos.

Tabela 1: Dados referentes ao ano de 2013 sobre número total de mortes por câncer a nível mundial para ambos os sexos

<i>Mulheres</i>		<i>Homens</i>	
País	Mortes	País	Mortes
 Estados Unidos da América	277.449	 Estados Unidos da América	308.068
 Japão	147.897	 Japão	216.964
 Alemanha	102.100	 Alemanha	121.782
 Brasil	89.955	 Brasil	103.475
 Reino Unido	76.429	 Reino Unido	85.592
 Polónia	41.924	 Spain	65.734
 Espanha	41.510	 Polónia	52.207
 México	36.605	 República da Coreia	47.094
 Argentina	28.575	 México	35.477
 República da Coreia	28.255	 Argentina	31.393
 Holanda	19.457	 Holanda	22.897
 África do Sul	18.713	 África do Sul	18.678
 Hungria	14.933	 Hungria	17.816
 República Checa	12.045	 Portugal	15.506
 Chile	11.795	 República Checa	15.040
 Suécia	10.720	 Cuba	13.065
 Portugal	10.465	 Chile	12.871
 Cuba	9.955	 Sérvia	12.106
 Peru	9.714	 Suécia	11.465

Fonte : Adaptado de IARC (2013).

Em 2013 no Brasil, mais de 193 mil pessoas morreram de câncer, sendo 89.955 mulheres e 103.475 homens, figurando em quarto lugar no ranking mundial para ambos os sexos. A Tabela 2 apresenta os tipos de câncer e o número de mortes decorrentes do mesmo no ano de 2013.

Tabela 2: Número de mortes decorrentes dos diversos tipos de câncer no Brasil no ano de 2013.

Mulher		Homem	
Tipo	Mortes	Tipo	Mortes
Todos os tipos	89.955	Todos os tipos	103.475
Mama	14.204	Pulmão	14.804
Pulmão	9.672	Próstata	13.770
Útero	8.800	Estômago	9.139
Intestino	8.407	Intestino	7.812
Fígado e passagens biliares	5.821	Esôfago	6.202
Colo do útero	5.430	Fígado e passagens biliares	6.050
Cólon	5.119	Lábios, cavidade oral e faringe	5.642
Estômago	5.039	Fígado	5.010
Pâncreas	4.335	Cólon	4.572
Cérebro, sistema nervoso central	3.983	Pâncreas	4.373
Fígado	3.759	Cérebro e sistema nervoso central	4.370
Ovário	3.283	Laringe	3.635
Reto e ânus	2.904	Leucemia	3.439
Leucemia	2.877	Reto e ânus	2.816
Vesícula biliar	2.062	Bexiga	2.542
Linfoma não-Hodgkin	1.858	Linfoma não-Hodgkin	2.309
Esôfago	1.727	Rim	1.764
Lábios, cavidade oral e faringe	1.499	Mieloma múltiplo	1.309
Corpus uterí	1.290	Vesícula biliar	1.040
Mieloma múltiplo	1.287	Melanoma cutâneo	903
Bexiga	1.099	Testículo	343
Rim	1.041	Linfoma de Hodgkin	291
Melanoma cutâneo	644	Tiróide	243
Laringe	506	Nasofaringe	226
Tiróide	459	Mesotelioma	59

Fonte: Adaptado de IARC (2013)

O número de mortes referentes ao melanoma cutâneo totalizou 1.547, sendo que 903 homens e 644 mulheres vieram a óbito. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil para o ano de 2016 estima-se o surgimento de 5.670 novos casos de melanoma, sendo 3.000 referentes ao sexo masculino e 2.670 ao sexo feminino.

Devido à sua natureza altamente agressiva, pacientes diagnosticados com melanoma necessitam de uma combinação de terapias para que as chances de sucesso no tratamento sejam maiores (DAVEY; WESTHUIZEN; BOWDEN, 2014). Comparado a outros tumores sólidos a incidência de melanoma tem aumentado nos últimos anos o que torna estes dados ainda mais preocupantes (EGGERMONT; SPATZ; ROBERT, 2014).

2.1.1 Aspectos do melanoma cutâneo

O melanoma cutâneo é originado dos melanócitos, que são células pigmentadas da pele com morfologia tipo dendrítica que são derivadas da crista neural (CHANG; KARNELL; MENCK, 1998). É considerado o câncer de pele mais agressivo, pois apresentam alta possibilidade de metástase e em estágio avançado é resistente a quimioterapia sendo que poucas drogas são eficazes para o tratamento (MAIO, 2012; EGGERMONT; SPATZ; ROBERT, 2014; THEODOSAKIS et al., 2014).

Entre os tipos de câncer de pele o melanoma representa apenas 4% dos casos de neoplasias malignas, contudo este também é o responsável pelo maior número de mortes relacionadas ao órgão (pele) no cenário mundial (MAIO, 2012).

Até o ano de 2010 o tratamento para esse tipo de câncer apresentava grande possibilidade de insucesso, uma vez que se tinha pouco conhecimento da biologia do melanoma e os quimioterápicos tradicionais eram pouco eficazes. Desta forma, tratamentos específicos a este tipo de câncer vem sendo desenvolvidos e tem aumentado drasticamente as taxas de sobrevivência dos pacientes (DAVEY; WESTHUIZEN; BOWDEN, 2014).

Como referido anteriormente o melanoma é um câncer altamente metastático. E em um cenário geral a maioria das mortes relacionadas ao câncer são devido a esta característica de inatividade, desta forma vias moleculares e celulares referentes a progressão da metástase continuam a ser grande foco de estudo (POULIOT; PEARSON; BURROWS, 2000).

2.1.2 Metástase e angiogênese

Para que um tumor sólido sobreviva, cresça e propague o fornecimento de nutrientes é necessário. Células tumorais expressam proteínas sinalizadoras, como o VEGF, e estas proteínas desencadeiam uma série de mecanismos que levam ao processo de angiogênese. Na angiogênese as células endoteliais formam vasos sanguíneos, a partir de vasos já existentes, e estes vasos levam oxigênio e nutrientes através do sangue ao tumor (SENGER et al., 1993). Em paralelo, esses vasos sanguíneos permitem que as células tumorais penetrem a parede do vaso sanguíneo e se disseminem para outras partes do corpo, processo denominado metástase (WEIS et al., 2004).

Em suma, a metástase é um processo complexo onde após uma proliferação desordenada as células tumorais rompem a membrana basal invadem o sistema sanguíneo ou linfático e migram para outros tecidos ou órgãos (POULIOT; PEARSON; BURROWS, 2000).

Quando se fala de angiogênese é necessário definir alguns conceitos como por exemplo a diferença entre a vasculogênese e a angiogênese.

Na fase embrionária, células mesodermiais precursoras se diferenciam a angioblastos estes por sua vez geram o sistema de vasos primários que após remodelamento formam o sistema vascular, processo esse denominado vasculogênese (RISAU, 1997). Angiogênese, além de fazer parte do remodelamento na fase embrionária está presente na fase adulta, podendo estar associado a um efeito fisiológico natural ou à uma doença (CARMELIET, 2003; ADAIR; MONTANI, 2011).

Este processo, denominado angiogênese, consiste basicamente no brotamento, formação, estabilização e maturação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes (CARMELIET, 2003). Células endoteliais denominadas células *tip* são responsáveis por orientar o processo de brotamento, fazendo uma leitura do ambiente, estas células possuem uma morfologia específica apresentando-se na forma de uma extensão filopodial (KURZ et al., 1996). Seguindo as células *tip* estão as células denominadas *stalk*, estas células por sua vez são proliferativas e atuam na construção do broto vascular (BETZ et al., 2016). O brotamento e formação dos vasos sanguíneos ocorre rapidamente, ao longo do tempo esse processo desacelera até chegar em equilíbrio ocorrendo então a maturação (KORN; AUGUSTIN, 2015). Os vasos sanguíneos depois de formados continuam ligados ao vaso sanguíneo ao qual foram gerados (BETZ et al., 2016).

2.2 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS

A medicina tradicional de várias culturas baseia-se na utilização de plantas para o tratamento de várias doenças (SAFE; KASIAPPAN, 2016). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 80% da população mundial faz uso de medicamentos derivados de plantas.

Plantas do gênero *Aloe* têm sido utilizadas por gerações em todo o mundo devido as suas importantes propriedades farmacológicas (ALGERI et al., 2015; HUSSAIN et al., 2015), apresentando efeitos tais como: laxativo (BOZZI et al., 2007), anti-inflamatório (VIJAYALAKSHMI et al., 2012), antioxidante (MIRANDA et al., 2009), antiprotozoário (DUTTA et al., 2007), antimicrobiano (HABEEB et al., 2007) e antitumoral (LEE et al., 2014).

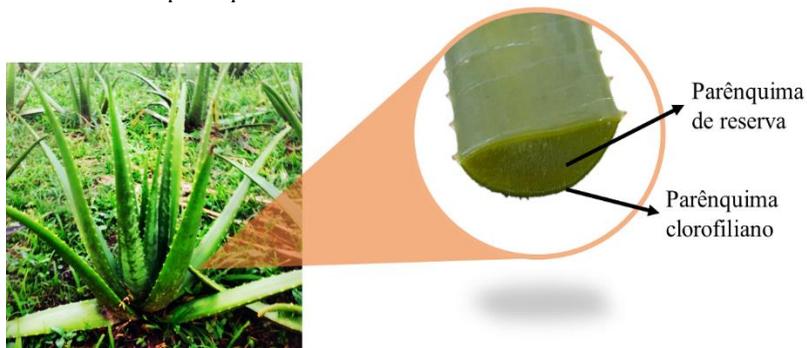
Aloe barbadensis Miller atualmente é o tipo de *Aloe* mais utilizado em todo mundo, devido a sua robustez, alta produção de folhas e elevada concentração de princípios ativos, quando comparado a outras espécies do mesmo gênero (CHINCHILLA et al., 2013).

2.2.1 *Aloe barbadensis* Miller

Segundo regras internacionais de nomenclatura botânica, *Aloe vera* (L.) Burm. f. é o nome legítimo da espécie, sendo conhecida e referenciada em artigos e livros principalmente como *Aloe barbadensis* Miller (OMS, 1999). Taxonomicamente, *Aloe barbadensis* Miller é uma das diversas espécies pertencentes ao gênero *Aloe*, que por sua vez é pertencente à família aloeaceae (REYNOLDS, 2004).

A Figura 1 mostra uma planta da *Aloe barbadensis* Miller, descrita por Grindlay e Reynolds (1986) como uma planta arbustiva que possui de 15 a 30 folhas, disposta em forma de roseta, com comprimento variando entre 30 a 60 cm e largura entre 7 a 8 cm. Estes arbustos possuem folhas verdes túrgidas que se estreitam da base para o ápice apresentando também rebordos espinhosos.

Figura 1: Foto tirada de uma planta da *Aloe barbadensis* Miller na cidade de Paulo Lopes –SC, na plantação pertencente a empresa Naturama. A aproximação apresenta um corte da folha onde pode-se observar o parênquima clorofiliano e o parênquima de reserva.



Fonte: Desenvolvida pelo autor.

As folhas da *Aloe barbadensis* Miller apresentam uma camada externa de casca verde, denominada de parênquima clorofiliano e uma interna, denominado parênquima de reserva (Figura 1). A face superior de suas folhas apresenta uma superfície côncava enquanto a face inferior uma superfície convexa (PINTO, 2012).

2.2.2 Extrato do parênquima clorofiliano (EPC)

Quando as folhas da Aloe são cortadas ou quebradas liberam um líquido de cor amarela que aparece com um exsudato, esse líquido tem sabor amargo, consistência leitosa e um cheiro forte e desagradável (FANALI et al., 2010). Neste trabalho este exsudato é denominado extrato do parênquima clorofiliano (EPC), seguindo a nomenclatura utilizada por outros autores (CAMPESTRINI, 2007; BERTI, 2008; PINTO, 2012). Outros autores também denominam este líquido como: exsudato amarelo da folha (PAEZ et al., 2000), exsudato amarelo amargo (ZHONG et al., 2015), acibar (MIRANDA et al., 2009), seiva amarela (DEY; BERA; CHAKRABARTY, 2015) entre outros. O EPC é produzido por células excretoras dos mesófilos que estão localizadas logo abaixo da epiderme das folhas (CHINCHILLA et al., 2013). Sua composição química conhecida é rica em compostos fenólicos do tipo antronas, cromonas e antraquinonas assim como seus derivados (CHINCHILLA et al., 2013). O EPC possui elevado teor dos isômeros aloína A e B, aloesina, aloeresina, possuindo também em menor

quantidade aloe emodina, aloinosídeo, entre outros. (REYNOLDS, 1985; SALEEM et al., 1997; SACCÙ; BOGONI; PROCIDA, 2001; CHINCHILLA et al., 2013).

O EPC apresenta aplicação farmacológica como agente catártico e também aplicação industrial sendo utilizado como agente de amargor em bebidas alcoólicas (SACCÙ; BOGONI; PROCIDA, 2001). Pesquisas mostram também outras finalidades para o extrato, uma vez que apresenta uma rica composição de compostos bioativos.

Dutta e colaboradores (2007) observaram que o exsudato da *Aloe barbadensis* Miller apresenta atividade leishmanicida em diversas espécies de protozoários causadores de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral.

Extratos provenientes de oito espécies da Aloe, incluindo da *Aloe barbadensis* Miller apresentaram atividade anti-inflamatória significativa em modelos in vivo de ratos após administração oral. Em paralelo utilizando-se modelo in vivo de ratos diabéticos a cicatrização de feridas foi acelerada após aplicação tópica destes extratos (EL SAYED et al., 2016).

Ensaio in vitro demonstraram que em altas concentrações o EPC apresentou atividade antiproliferativa em linhagem de células melanoma, enquanto ensaio in vivo demonstraram que o mesmo promoveu a formação de vasos sanguíneos iniciais (vasculogênese) no ensaio da membrana vitelínica, promovendo também a angiogênese no ensaio da membrana corioalantóica (BERTI, 2008).

Estudos demonstram que metabólitos isolados do EPC, como aloína, aloe emodina, aloesina e emodina, apresentam importantes propriedades farmacológicas, como atividade catártica, anti-inflamatória, antibacteriana, antioxidante, promovendo também a proliferação celular, entre outras propriedades (CHOI; CHUNG, 2003; NIĆIFOROVIĆ et al., 2007; PATEL et al., 2013). Dentre estes compostos provenientes da Aloe, a aloína e a aloe emodina ganham enfoque uma vez que diversos estudos relacionados ao efeito destes compostos em células tumorais e células endoteliais vem sendo realizados (CHEN et al., 2004; CÁRDENAS; QUESADA; MEDINA, 2006; ESMAT; TOMASETTO; RIO, 2006; SUBOJ et al., 2012; PAN et al., 2013; TABOLACCI et al., 2013, 2015).

2.2.3 Estudos relacionando aloína e aloe emodina a células tumorais e endoteliais

Aloína é uma antrona C-glicosídica de aloe emodina (GROOM; REYNOLDS, 1987), presente em exsudatos de Aloe como uma mistura de diastereoisômeros aloína A e B (LOGARANJAN; DEVASENA; PANDIAN, 2013). A aloína é sensível à luz, ao pH e à temperatura, podendo ser degradada à aloe emodina (SACCÙ; BOGONI; PROCIDA, 2001).

Estudos com aloína ou aloe emodina em várias linhagens celulares de câncer (MCF-7, MDA-MB-453, SK-MEL-28, A375, B16-F10) relatam o seu efeito antiproliferativa (HUANG et al., 2013; TABOLACCI et al., 2013, 2015), podendo influenciar o processo de replicação do DNA, causando danos e inibindo o reparo do mesmo, influenciando desta forma no processo de mitose (ESMAT; TOMASETTO; RIO, 2006; CHEN et al., 2010a).

Estudos *in vitro* com células tumorais mostram que estes compostos (aloína e aloe emodina) interferem na migração, invasão e adesão celular, (CHEN et al., 2010b; SUBOJ et al., 2012; TABOLACCI et al., 2013). Somado a isso, a aloína é capaz de inibir a atividade dos granulócitos das metaloproteínas de matriz (MMPs) (BARRANTES; GUINEA, 2003) enquanto a sub expressão as MMPs foi demonstrada pela aloe emodina (CHEN et al., 2010b; SUBOJ et al., 2012).

Além de influenciar no processo de proliferação celular, estudos demonstram que tanto a aloína quanto a aloe emodina promovem a morte celular por apoptose em linhagens de tumorais humanas (Hep G2, H1299, A549, A375 entre outras) (KUO, PO-LIN; LIN, TA-CHEN; LIN, 2002; ESMAT; TOMASETTO; RIO, 2006; RADOVIC et al., 2012; LEE et al., 2014).

Estudos *in vitro* com células endoteliais mostraram que estes compostos afetam a capacidade de migração, invasão e formação do tubo, sugerindo um efeito inibitório da aloína em vias referentes ao processo de angiogênese (CÁRDENAS; QUESADA; MEDINA, 2006; SUBOJ et al., 2012; PAN et al., 2013). Entretanto, Berti (2008) demonstrou que a aloína padrão estimulou a vasculogênese e angiogênese em modelos *in vivo* da membrana vitelínica e membrana corioalantóica, respectivamente, em ovos embrionados da espécie *Gallus domesticus*.

Baseando-se nestes relatos da literatura e nos resultados ambíguos obtidos até o momento quanto ao efeito dos compostos químicos presentes no EPC no que se refere ao efeito anti/pró-angiogênico e antitumoral; este trabalho propõem o estudo do

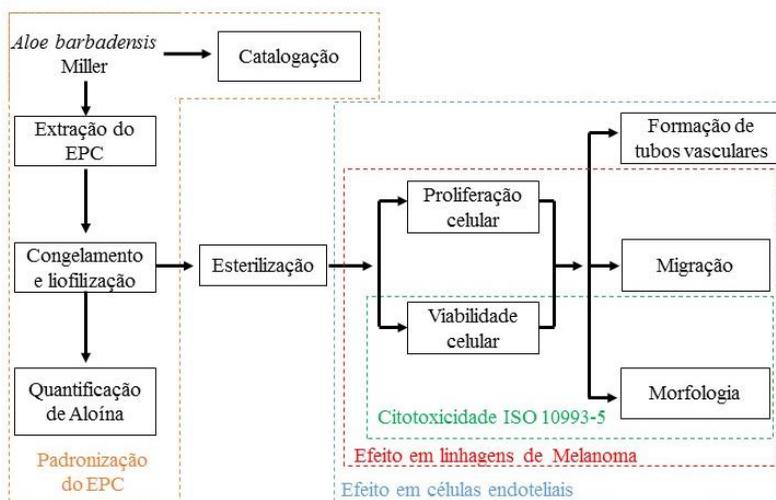
comportamento das células tumorais de melanoma e endoteliais sob o efeito de diferentes concentrações do EPC proveniente da *Aloe barbadensis* Miller.

3 METODOLOGIA

3.1 FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES

A Figura 2 mostra a estrutura do trabalho experimental desenvolvido nesta dissertação. O extrato do parênquima clorofiliano (EPC) usado em todos os experimentos foi obtido das folhas da planta *Aloe barbadensis* Miller. A catalogação da planta foi realizada para confirmar a espécie. O EPC, após beneficiado, foi testado em diferentes concentrações sob contato direto com células L-929, B16-F10, SK-MEL-28 e HUVEC, para avaliar o seu efeito sobre o comportamento celular. A padronização do EPC foi realizada através da quantificação de aloína presente no extrato total.

Figura 2: Representação das etapas experimentais realizadas nas execução deste trabalho.



3.2 PADRONIZAÇÃO DA PERCENTAGEM DE ALOÍNA PRESENTE NO EPC PROVENIENTE DA PLANTA *Aloe Barbadensis* MILLER

3.2.1 Catalogação

As folhas de *Aloe barbadensis* Miller foram coletadas no dia 04/10/2015 e as flores no dia 20/10/2015. A coleta foi realizada na

fazenda pertencente à empresa Naturama – Produção Orgânica, situada na Fazenda Cafezal na Estrada Geral Santa Rita, em Paulo Lopes – SC, CEP: 88490-000. As amostras botânicas foram herborizadas conforme as técnicas usuais de secagem e montagem de exsiccatas (NETO et al., 2013). Folhas e flores foram acondicionadas em lâminas de papel, prensadas e secadas em estufa com circulação de ar a 25 °C. As flores ficaram em estufa por 7 dias, enquanto as folhas permaneceram por 14 dias, após as mesmas foram catalogadas e depositadas no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina – FLOR.

3.2.2 Extrato do parênquima clorofiliano (EPC)

A extração do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) foi realizada no local da coleta das folhas que, após cortadas em sua base, foram acondicionadas na vertical e pela ação da gravidade o EPC foi retirado. O EPC foi então imediatamente armazenado em frasco âmbar e acondicionado para não sofrer influência tanto da luz quanto da temperatura. A coleta foi realizada no dia 22/06/2015, à temperatura de 26 °C, na fazenda pertencente à empresa Naturama – Produção Orgânica, situada na Fazenda Cafezal na Estrada Geral Santa Rita, em Paulo Lopes - SC, CEP: 88490-000.

No Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab) – EQA/UFSC, o EPC foi transferido do frasco âmbar para um tubo falcon de 50 mL, congelado a -80 °C em ultrafreezer (Nuair, EUA) por 24 horas, em seguida liofilizado (Liofilizador - Liotop, Brasil) há temperatura de -50 °C e pressão menor que 300 µmHg, durante 48 horas e armazenado em geladeira a 4 °C ao abrigo da luz.

3.2.3 Análise quantitativa de aloína no extrato do parênquima clorofiliano (EPC) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

3.2.3.1 Aloína

O padrão de aloína foi adquirido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Essa substância é proveniente das folhas de *Aloe barbadensis* Miller, com um teor de pureza $\geq 97\%$.

3.2.3.2 Preparação das amostras e da curva padrão

A padronização do Extrato do Parênquima Clorofiliano (EPC) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), por meio da quantificação de aloína. Para isso, preparou-se uma solução de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC e uma solução de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de aloína padrão, ambas em metanol/água (90:10 v/v). As soluções de EPC ficaram 2 horas sob agitação, em seguida foram centrifugadas (Centurion Scientific K3 Series, EUA) por 16 min a 2000 g e o sobrenadante foi transferido para outro frasco para posterior análise. As soluções de aloína foram diluídas para concentrações de 0 a $1000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e estas foram diretamente injetadas no HPLC.

3.2.3.3 Análise de HPLC

A análise cromatográfica de fase isocrática foi conduzida utilizando-se o HPLC Agilent (Santa Clara, CA, EUA), acoplado com espectrofotômetro ultravioleta – UV, coluna C_{18} com comprimento de 250 mm e diâmetro interno de 4,6 mm com recheio Waters X-Terra RP-18 (água ligada a partículas de sílica modificadas de $5 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro) e injetor automático com purga.

A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água (22:78 v/v), o comprimento de onda de detecção foi de 220 nm e a taxa de fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, com volume de injeção e $20 \text{ }\mu\text{L}$ e a temperatura da coluna mantida a temperatura ambiente (LOGARANJAN; DEVASENA; PANDIAN, 2013).

3.3 CULTURA DE CÉLULAS

As células L-929 e B16-F10 são linhagens de células aderentes da espécie de camundongo *Mus musculus*. L929 é um tipo de fibroblasto isolado do tecido conjuntivo subcutâneo, areolar ou adiposo do camundongo. B16-F10 é um melanoma espontâneo isolado de um tumor presente na pele do camundongo. Ambas as células foram cultivadas em placas de cultura de tecidos contendo meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* - DMEM (Gibco® – Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco® – Invitrogen), $3,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio (Sigma – Aldrich) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco® – Invitrogen).

A linhagem aderente SK-MEL-28 é um tipo de melanoma proveniente da espécie *Homo sapiens* isolada de um tumor situado na

pele. Esta foi cultivada em placas de cultura de tecidos contendo meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* - DMEM (Gibco® – Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco® – Invitrogen), $3,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio (Sigma – Aldrich) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco® – Invitrogen).

A linhagem imortalizada de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) foi cultivada em placas de cultura de tecidos contendo meio *Roswell Park Memorial Institute* - RPMI (Gibco® – Invitrogen) suplementado com $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio (Sigma – Aldrich), 1% penicilina/streptomicina (Gibco® – Invitrogen) e 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco® – Invitrogen).

Todas as linhagens celulares foram mantidas em estufa (Ultrasafe, HF 212UV) com atmosfera de 5% de CO_2 e a temperatura de 37°C , até atingirem confluência de 70 - 85%, para então serem utilizadas nos experimentos.

3.4 ESTERILIZAÇÃO E PREPARO DA SOLUÇÃO DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA CLOROFILIANO (EPC)

O EPC foi esterilizado por óxido de etileno e após esterilização preparou-se uma solução de $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC, em 25% de dimetilsulfóxido (DMSO) em PBS, esta foi então armazenada a -20°C . Diluições partindo desta solução foram realizadas em meio de cultura (DMEM ou RPMI) e diretamente utilizadas nos experimentos. Meio de cultura contendo 0,25% de DMSO e sem a presença de EPC foi utilizado como controle em todos os experimentos.

3.5 TRATAMENTO COM EPC

Em placas de 96 poços, as linhagens de L929, B16F10, SK-MEL-28 e HUVEC foram semeadas na densidade de 2500 células por poço, estas foram mantidas em estufa (Ultrasafe, HF 212UV) com atmosfera de 5% de CO_2 e à temperatura de 37°C por 24 horas. Após o meio de cultura foi removido e um novo meio de cultura contendo as concentrações de EPC (0, 0,1, 1, 10, 100, 250, 500, 750 e $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi adicionado. Decorridos 3 dias de exposição das linhagens às concentrações testadas, foram realizados os ensaios de viabilidade celular e morfologia (por microscopia de contraste de fase) nas linhagens L929, B16F10, SK-MEL-28 e HUVEC. O ensaio de proliferação celular foi avaliado nas linhagens B16F10, SK-MEL-28 e HUVEC.

3.5.1 Viabilidade

A viabilidade celular foi medida do ensaio de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] (Promega, EUA), que avalia a atividade metabólica celular. Para isto, o meio foi removido e as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato-salino (PBS), então, 100 μL de meio de cultura (cada linhagem com seu respectivo meio, sem adição de nenhuma substância) e 20 μL do reagente de MTS foram adicionados em cada poço. As células foram mantidas em estufa (Ultrasafe, HF 212UV) com atmosfera de 5% de CO_2 e a temperatura de 37 °C por 2 horas. Após, 100 μL de sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços e foi realizada a leitura de absorbância. As leituras de absorbância foram realizadas no espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA) no comprimento de onda de 490 nm.

3.5.2 Proliferação

A proliferação das células foi medida através do Kit PicoGreen[®] (Promega, EUA), que mede a concentração de dsDNA total das células. O meio foi removido e as células foram lavadas três vezes com PBS, e 100 μL água ultrapura foi adicionado em cada poço de cultura e as células foram mantidas em estufa a 37 °C por 1 hora. Logo após as células foram congeladas a -80 °C em ultrafreezer (Nuair, EUA) e mantidas até 1 hora antes da realização com o procedimento do Kit PicoGreen[®].

Em cada poço de placas de 96 poços foram adicionados 28,7 μL de amostra, 71,3 μL do reagente de quantificação de dsDNA PicoGreen[®] e 100 μL de tampão TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5). As amostras foram então incubadas no escuro por 10 min. As leituras de fluorescência foram realizadas no espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA) com excitação de 480 nm e emissão de 520 nm e comparadas com a curva de calibração. A curva de calibração foi preparada utilizando dsDNA de Lambda com concentração variando de 0 a 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.5.3 Microscopia de contraste de fase

As células foram lavadas três vezes com PBS, em seguida foram fixadas com uma solução de formaldeído 3,7%, após as células foram novamente lavadas três vezes com PBS então mantidas em

geladeira a 4 °C, imersas em PBS, até o dia em que as fotos foram capturadas. As fotos foram capturadas com o auxílio de um microscópio invertido de contrastes de fase (Leica, Alemanha).

3.6 MIGRAÇÃO

Em placas para cultura de células de 6 poços, as linhagens de melanoma (B16F10 e SK-MEL-28) e a linhagem de célula endotelial (HUVEC) foram cultivadas até atingirem uma monocamada confluenta. Após certificada a formação desta monocamada (por microscopia óptica, microscópio Medilux NA03), uma zona livre de células foi aberta com o auxílio de uma ponteira p1000 (Kasvi, Brasil). Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, para remoção de debris celulares. Em cada poço foi adicionado 2 mL de meio de cultura (DMEM ou RPMI, de acordo com a célula) contendo as soluções de EPC com as concentrações de 10, 100 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para as linhagens de melanoma SK-MEL-28 e B16-F10 e nas concentrações de EPC de 1, 10 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a linhagem de célula endotelial HUVEC.

O acompanhamento da migração se deu nos tempos de 0 e 24 horas, quando as imagens das células foram capturadas utilizando o microscópio (Nikon Eclipse Ci-L, Japão). Os resultados da migração foram expressos como percentagem de fechamento da ferida, onde foi quantificado o quanto a ferida fechou após 24 horas de tratamento com as diferentes concentrações de EPC.

3.7 MORFOLOGIA

Alterações morfológicas foram analisadas por meio da marcação fluorescente de núcleo e citoplasma celular. Após decorridos 3 dias de exposição das células endoteliais (HUVEC) e tumorais (B16-F10 e SK-MEL-28) às diferentes concentrações EPC, as células foram lavadas duas vezes com PBS, em seguida foram fixadas com uma solução de formaldeído 3,7% e permeabilizadas com uma solução de 0,1% de Triton X-100. O corante Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (Life Technologies Corporation, EUA) foi utilizado para visualização dos filamentos de F-actina, enquanto o núcleo das células foi corado com DAPI (sal dihidroclorídrico, 4',6-diamino-2-fenilindol) (Life Technologies Corporation, EUA). As células foram então visualizadas em microscópio invertido de fluorescência (Leica, Alemanha).

3.8 FORMAÇÃO DE TUBOS VASCULARES

O ensaio de formação de tubos vasculares foi realizado em células endoteliais (HUVEC). Para realizar o mesmo, 50 μL de Geltrex® (Thermo Fisher Scientific) foi adicionado em cada poço de uma placa de 96 poços para cultura de células. Após, deixou-se o gel polimerizar a 37 °C por 60 min em estufa (Ultrasafe, HF 212UV).

Células endoteliais foram adicionadas ao meio de cultura contendo as concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EPC, então 100 μL da suspensão celular foi adicionado em cada poço (1×10^4 células por poço) já contendo o Geltrex® polimerizado. As células foram incubadas em estufa (Ultrasafe, HF 212UV) a 37 °C e 5% de CO_2 . Após 24 horas de cultivo a formação de tubos vasculares foi analisada qualitativamente e quantitativamente com o auxílio de um microscópio invertido (Olympus, Japão). Dados referentes ao comprimento dos tubos, número total de tubos, pontos de ramificação e área coberta foram obtidos utilizando o software WimTube (Wimasis Image Analysis, Alemanha).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados gerados foi realizada utilizando-se o software OriginPro 8.0. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e comparados entre si por meio da análise de variância one-way (ANOVA) e do teste de Tukey, os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PADRONIZAÇÃO DA PERCENTAGEM DE ALOÍNA PRESENTE NO EXTRATO DO PARÊNQUIMA CLOROFILIANO (EPC) PROVENIENTE DA PLANTA *Aloe Barbadensis* MILLER

4.1.1 Catalogação da planta

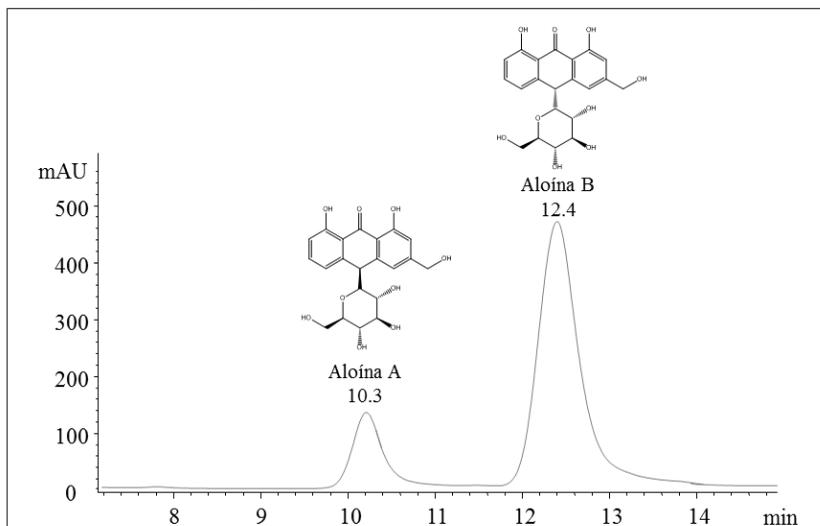
A catalogação do espécime depositado no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina – FLOR, confirmou que a planta ao qual o EPC foi extraído era a *Aloe barbadensis* Miller. A mesma encontra-se depositada no herbário sob código de localização FLOR0030476. As informações podem ser consultadas no link a seguir: <http://goo.gl/bRofow>

4.1.2 Quantificação de aloína

O isômero aloína B é um dos compostos majoritários do extrato isolado da *Aloe barbadensis* Miller, sendo este considerado um *fingerprinting* do extrato desta planta. A porcentagem em massa seca da aloína presente em extratos obtidos de plantas do gênero *Aloe* foi previamente reportada, esta porcentagem pode variar de 2,5 a 34,5%, dependendo da espécie (GROOM; REYNOLDS, 1987; PAEZ et al., 2000; SILVA et al., 2014).

A Figura 3 mostra o cromatograma do EPC, onde o tempo de retenção referente os isômeros aloína A e aloína B foi de 10,3 e 12,4 min, respectivamente.

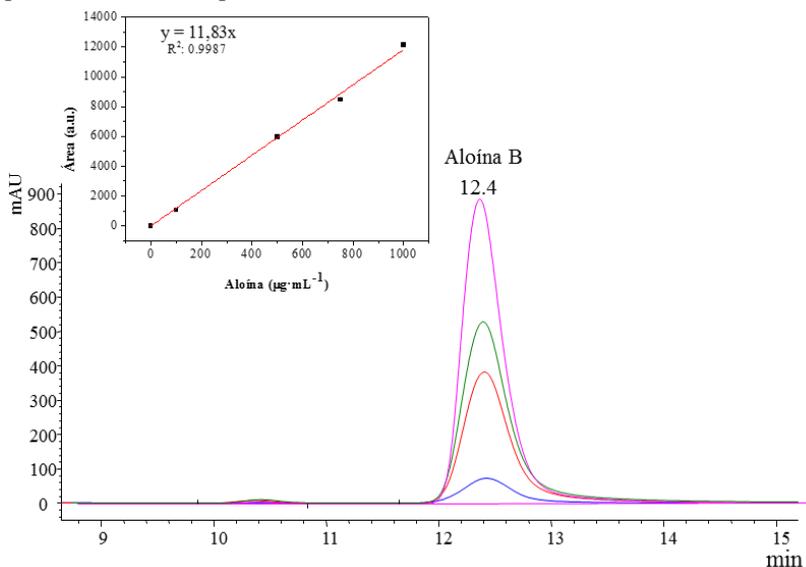
Figura 3: Cromatograma do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) proveniente da *Aloe barbadensis* Miller, apresentando os tempos de retenção dos isômeros aloína A e B.



O cromatograma apresentado na Figura 3 mostra que o EPC possui em sua composição os dois diastereoisômeros aloína A e B, contudo somente a aloína B foi quantificada. Saccù e colaboradores (2001) relatam um alto teor de aloína A e B no exsudato proveniente da *Aloe barbadensis* Miller, relatando também a presença de aloesina, aloeresina e em menor quantidade aloe emodina, aloinosídeo, entre outros.

Com o auxílio de uma curva de calibração o isômero aloína B foi quantificado por HPLC (Figura 4).

Figura 4: Curva padrão do isômero aloína B utilizada para quantificar o percentual deste composto no EPC.



A concentração de aloína B no extrato foi $564,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, o que indicou que no volume injetado ($20 \mu\text{L}$) temos $11,3 \mu\text{g}$, correspondendo a 5,6% da composição total do EPC ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

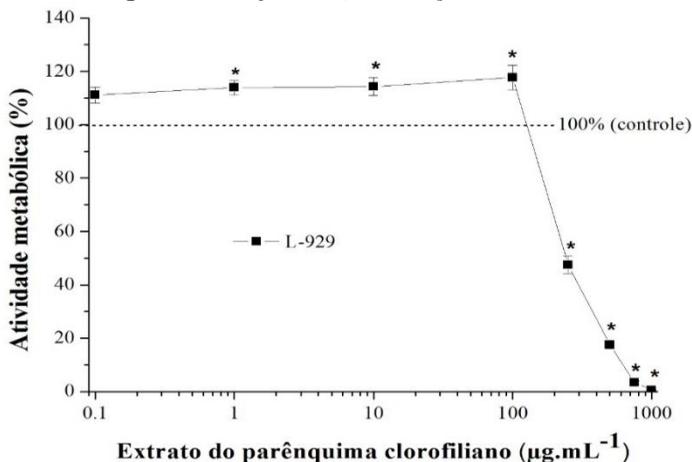
Extratos provenientes das folhas de Aloe são descritos por possuírem uma rica composição em antronas, cromonas e seus derivados como antraquinonas (GROOM; REYNOLDS, 1987; CHINCHILLA et al., 2013). A percentagem de aloína no EPC foi de 5,6%, contudo segundo Silva (2004) as mudanças sazonais alteram a biologia das plantas e conseqüentemente a concentração dos metabólitos produzidos pela planta pode variar no decorrer do ano. O EPC utilizado neste trabalho foi coletado no dia 22/06/2015, no início do inverno. Campestrini (2007) quantificou aloína A no EPC da *Aloe barbadensis* Miller em diversas épocas do ano e observou que a maior concentração de aloína A foi na coleta referente ao mês de julho. Contudo, a quantidade de irradiação por si só não é um fator que afeta a concentração de aloína produzida pela planta (PAEZ et al., 2000).

4.2 CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA CLOROFILIANO (EPC) EM LINHAGEM PADRÃO DE FIBROBLASTOS DE CAMUNDONGO L-929 DE ACORDO COM A ISO 10993-5

A citotoxicidade do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) foi avaliada segundo a *International Organization for Standardization* (ISO 10993-5 Avaliação biológica de dispositivos médicos — Parte 5: Testes de citotoxicidade in vitro, terceira edição de 2009). Esta normativa prevê avaliação quantitativa e qualitativa para determinar a citotoxicidade, estas análises foram realizadas utilizando-se uma linhagem celular padrão, o fibroblasto isolado de camundongo da linhagem L-929.

A análise quantitativa da citotoxicidade foi realizada por meio da medição da atividade metabólica das células, no qual concentrações que geram uma redução maior que 30% na viabilidade celular são consideradas citotóxicas. A Figura 5 mostra o efeito das crescentes concentrações de EPC na atividade metabólica das células de L-929.

Figura 5: Efeito do EPC testado em diferentes concentrações (0,1 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) sobre a atividade metabólica de células de L-929 após 72 horas de cultivo. Resultado expresso em média \pm erro padrão de três experimentos independentes realizados em oito replicatas. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.



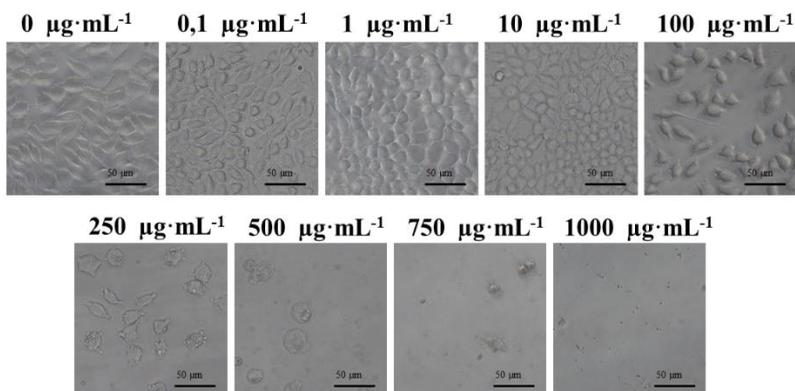
Concentrações de EPC menores que 185 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentam viabilidade superior a 70% não sendo consideradas citotóxicas pela

ISO 10993-5. Geralmente, em compostos químicos que apresentam concentrações citotóxicas define-se o valor de IC_{50} (concentração inibitória onde a viabilidade ou sobrevivência celular é reduzida em 50%). Neste estudo a concentração de $242 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC apresentou a redução de 50% da população de células de L-929 quando comparado com o controle.

Observando o efeito do EPC sobre a linhagem de L-929 observa-se um aumento na atividade metabólica destas células nas concentrações mais baixas, sendo este valor significativo nas concentrações que variam de 1 a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A partir da concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ um efeito de redução dose-dependente pode ser observado. Na concentração de $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ tem-se um decréscimo de $52,5 \pm 3,3\%$ na atividade metabólica e na maior concentração testada ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a atividade metabólica foi 0%.

A análise qualitativa da citotoxicidade foi realizada por meio de observações morfológicas das células registradas através do microscópio Leica (Alemanha) por contraste de fase. A Figura 6 apresenta as imagens das células L-929 cultivadas com diferentes concentrações de EPC após 72 horas de cultivo.

Figura 6: Imagens de microscopia de contraste de fase obtidas da linhagem de fibroblastos de camundongo (L-929) cultivadas em diferentes concentrações de EPC durante 72 horas.



Nas concentrações de 0,1 e $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nenhuma alteração na morfologia celular pode ser observada. Na concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC algumas células apresentaram morfologia arredondadas. A normativa imposta pela ISO regulamenta que quando menos de 20% das

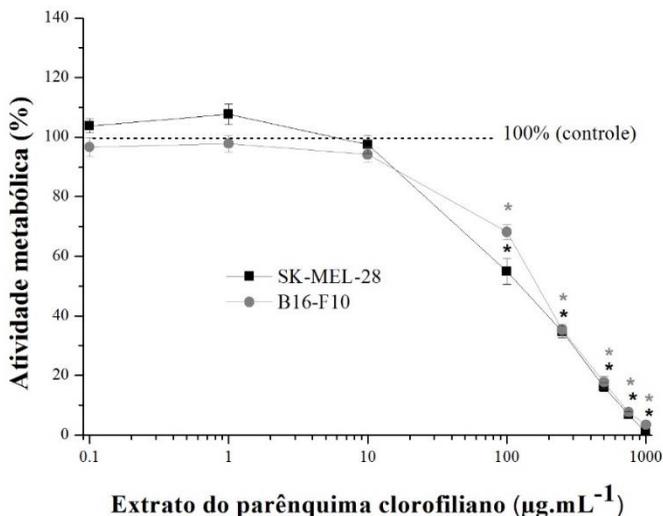
células se apresentem nesta conformação arredondada, a reatividade do composto é considerada leve. As células cultivadas com $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC não apresentam grandes alterações morfológicas, mas uma redução considerável no número de células viáveis é observável, atingindo um valor menor que 50%, ocasionando um efeito citotóxico de leve a moderado. Na concentração de $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ o EPC ocasionou alterações morfológicas e redução do crescimento celular (50 a 70%), sugerindo um efeito citotóxico de ligeiro a moderado. A exposição das células as concentrações de 500, 750 e $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC mostrou um efeito citotóxico grave.

4.3 EFEITO DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA CLOROFILIANO (EPC) EM LINHAGENS DE MELANOMA DE CAMUNDONGO (B16-F10) E HUMANO (SK-MEL-28)

O EPC apresenta em sua composição aloína e aloe emodina. Estudos com estes compostos demonstram uma promissora atividade antitumoral (RADOVIC et al., 2012; TABOLACCI et al., 2013). Com o objetivo de investigar o efeito combinado dos compostos presentes no extrato em células de melanoma, ensaio in vitro de viabilidade celular, proliferação, morfologia e migração foram realizados.

O ensaio colorimétrico de MTS avalia a viabilidade celular, este reagente é bioreduzido pelas células a um anel de formazan. Esta conversão é determinada pela atividade mitocondrial de células metabolicamente ativas sendo relacionado ao número de células vivas em cultura (SITTAMPALAM et al., 2016). Alterações na atividade metabólica das linhagens de melanoma SK-MEL-28 (humano) e B16-F10 (camundongo) são apresentadas na Figura 7.

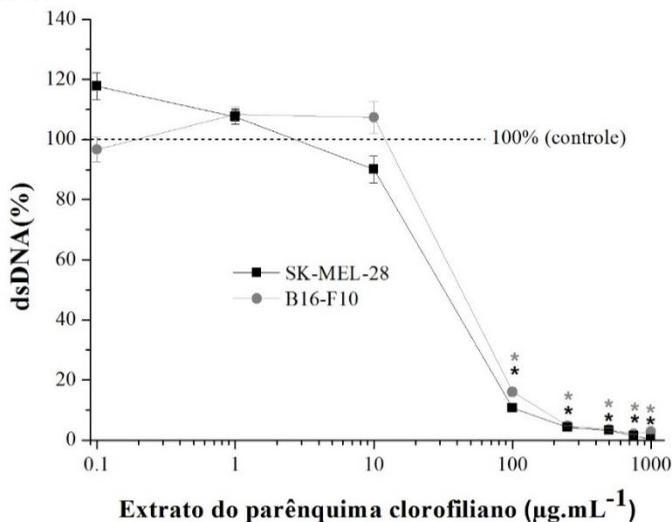
Figura 7: Atividade metabólica da linhagem de melanoma humano SK-MEL-28 e melanoma de camundongo B16-F10, após tratamento com EPC durante 72 horas. Resultado expresso em média \pm erro padrão de três experimentos independentes utilizando-se oito replicatas para cada caso. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.



Ambas linhagens de melanoma testadas apresentaram comportamento semelhante quando em contato com o EPC, o decréscimo na atividade metabólica de forma dose-dependente foi observado a partir da concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O efeito do extrato foi analisado estatisticamente em relação às células não tratadas (controle) para $p < 0,05$. As linhagens reduziram significativamente a atividade metabólica a partir da concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, as células SK-MEL-28 apresentaram uma redução de $45 \pm 4,4\%$ enquanto as células B16-F10 reduziram a atividade metabólica em $31,8 \pm 2,5\%$. O valor de IC_{50} obtido para SK-MEL-28 foi de $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e para B16-F10 foi de $165 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A maior concentração testada ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) promoveu a morte celular para ambas a linhagens de melanoma testadas.

O reagente de quantificação de dsDNA PicoGreen[®] é um intercalante de DNA na forma de dupla fita. Quando intercalado com o DNA, este emite uma alta fluorescência. A Figura 8 mostra o efeito do EPC sobre a proliferação das linhagens de melanoma, avaliado pela quantificação de dsDNA total.

Figura 8: Concentração de dsDNA da linhagem de melanoma humano SK-MEL-28 e melanoma de camundongo B16-F10, após tratamento com EPC durante 72 horas. Resultado expresso em média \pm erro padrão de três experimentos independentes utilizando-se quatro replicatas para cada caso. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.



Alterações significativas ($p < 0,05$, relativo ao controle) foram observadas a partir da concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ onde para a SK-MEL-28 o decréscimo na concentração de dsDNA foi de $89,3 \pm 0,6\%$ e para a B16-F10 foi de $84 \pm 0,7\%$. Como apresentado na Figura 8, para células de melanoma humano SK-MEL-28, na concentração de $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC há um aumento na concentração de dsDNA em relação ao grupo controle e de maneira dose-dependente esta concentração diminui com o aumento da concentração de EPC. Para a linhagem de melanoma de camundongo B16-F10 nas concentrações de 1 e $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC houve um aumento na concentração de dsDNA em relação ao grupo controle seguido por um grande decréscimo na concentração de dsDNA quando as células são tratadas com $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC. Nas concentrações de EPC de 250, 500, 750 e $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ o comportamento de ambas as células foi semelhante. No presente estudo os dados de proliferação mostram que em concentrações mais baixa de EPC as linhagens de melanoma apresentaram comportamento distinto. Radovic e colaboradores (2012) observaram que quando

tratadas com aloe emodina diferentes linhagens de melanoma apresentam um comportamento distinto, sendo que na linhagem de melanoma humano A375 a aloe emodina induziu a apoptose enquanto que na linhagem de melanoma de camundongo B16 a aloe emodina induziu a diferenciação celular.

A redução na atividade metabólica e na concentração de dsDNA (proliferação) sugere uma atividade antiproliferativa do EPC sobre as linhagens de melanoma testadas em concentrações iguais e superiores a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Berti (2008) realizou no intelLab um estudo do efeito do EPC sobre a viabilidade na linhagem de melanoma B16-F10, após tratamento a autora relata que houve o decréscimo estatisticamente significativo na concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, onde a viabilidade decaiu 65% em relação ao controle, enquanto que no presente trabalho uma redução de 65% foi obtida após o tratamento com $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC, uma concentração 2,5 vezes maior. Enfatizando-se que o EPC por se tratar de um extrato apresenta uma composição complexa e a concentração dos compostos presentes varia de acordo com a época do ano (CAMPESTRINI, 2007; ZAPATA et al., 2013). Sugere-se que o efeito que este exerce sobre as células é a combinação de todas as partes (componentes químicos) o que justifica a diferença no decréscimo da viabilidade em uma mesma linhagem celular.

Como apresentado anteriormente o isômero aloína B foi quantificado no extrato (5,6%), desta forma para a concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC temos $5,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de aloína B. Diversos autores relatam o efeito de aloína comercial em diversas linhagens celulares. Em concentrações acima de $41,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a aloína (não informado qual isômero) apresentou efeito citotóxico em linhagem de melanoma B16-F10 (TABOLACCI et al., 2013). Em altas concentrações, a aloína foi capaz também de induzir a via de apoptose em diversas linhagens tumorais (NIĆIFOROVIC et al., 2007; PAN et al., 2013), sugere-se que esta indução está relacionada a expressão da proteína p53 (LEE et al., 2014).

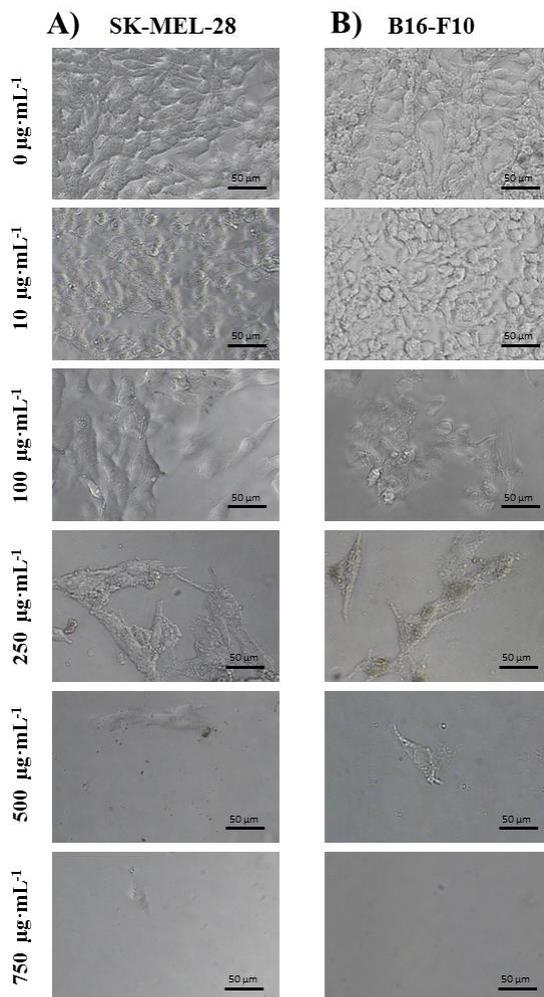
Aloe emodina, outro composto isolado da Aloe (REYNOLDS et al., 1985) é descrita por apresentar efeito antiproliferativo in vitro em células tumorais. Na concentração de $8,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ este composto acarretou a inibição da proliferação da linhagem de melanoma humano A375 (TABOLACCI et al., 2015), induzindo apoptose na concentração de $10,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por meio da inibição da expressão da molécula citoprotetora Bcl-2 (RADOVIC et al., 2012). Em células SK-MEL-28 aloe emodina inibiu a proliferação de maneira dose-dependente em

concentrações na ordem de 1,3 a 16,6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (TABOLACCI et al., 2015). Em células de melanoma de camundongo B16, após tratamento, aloe emodina estimulou a diferenciação celular, o que foi demonstrado pelo aumento da atividade de tirosinase e consequente aumento da produção de melanina (RADOVIC et al., 2012).

Sugere-se então um efeito acumulativo da aloína com estes demais compostos presentes no EPC, como por exemplo aloe emodina, resultando na inibição da proliferação e sobrevivência das células tumorais testadas.

A fim de identificar alterações morfológicas ocasionadas pela exposição ao EPC, imagens da cultura de células sob o efeito do EPC foram capturadas por microscopia de contraste de fase e microscopia de fluorescência. A Figura 9 mostra as alterações morfológicas ocasionadas pelas crescentes concentrações de EPC. Ambas a linhagens de melanoma testadas, SK-MEL-28 (Figura 9 A) e B16-F10 (Figura 9 B), apresentaram comportamento morfológico semelhante conforme a concentração de EPC foi aumentando.

Figura 9: Microscopia de contraste de fase de melanoma humano SK-MEL-28 (A) e melanoma de camundongo B16-F10 (B) tratadas com diferentes concentrações EPC durante 72 horas. A barra preta representa a escala de 50 μm .



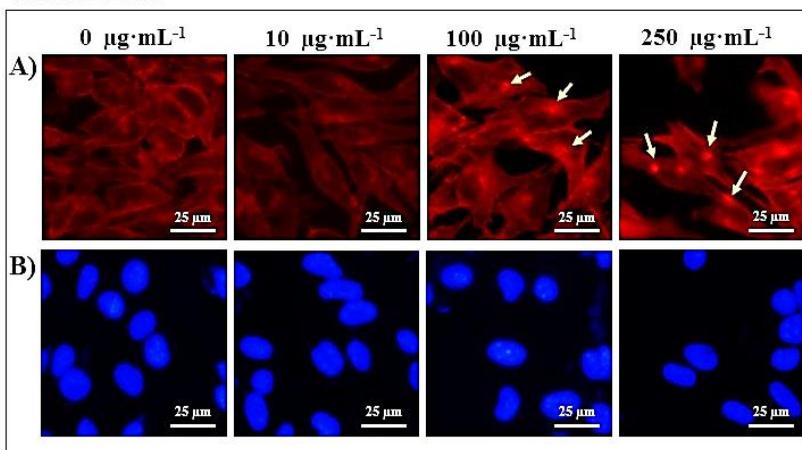
Após tratamento com 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC nenhuma alteração de morfologia foi observada, as células tratadas e as do grupo controle apresentaram morfologia poligonal, típica destas linhagens celulares, como observado por Radovic e colaboradores (2012). Filopódios são

projetadas das células para as células vizinhas fazendo uma conexão célula-célula. Em ambas as linhagens de melanoma, as células tratadas com $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC apresentam um acúmulo de grânulos por entorno de todo o citoesqueleto e sua morfologia é alterada de poligonal para estrela dendrítica e algumas células apresentam uma conformação disforme. As características observadas nas células tratadas com $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC se repetem nas células tratadas com $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC, contudo a quantidade de células é muito menor. A concentração de $750 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC resultou na morte das células para ambas as linhagens celulares.

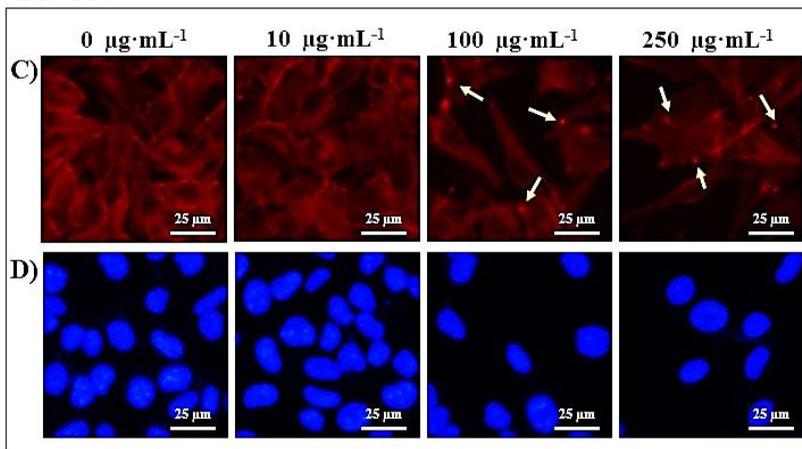
As diferenças morfológicas observadas na Figura 9 por microscopia de contraste de fase foram melhor investigadas por microscopia de fluorescência. A Figura 10 mostra as alterações morfológicas ocasionadas pelo tratamento com EPC nas concentrações de 10, 100 e $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O corante Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina permitiu a visualização da distribuição dos filamentos de F-actina por todo o citoesqueleto enquanto o corante DAPI permitiu a visualização do núcleo das células.

Figura 10: Microscopia de fluorescência de melanoma humano SK-MEL-28 (A e B) e melanoma de camundongo B16-F10 (C e D) expostas ao EPC por 72 horas. Os filamentos de F-actina foram corados com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (imagens A e C) enquanto o núcleo foi corado com DAPI (imagens B e D). A barra branca representa a escala de 50 μm .

SK-MEL-28



B16-F10



Analisando-se as imagens obtidas por microscopia de fluorescência observa-se que assim como no grupo controle as células de melanoma tratadas com na 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC apresentam a morfologia

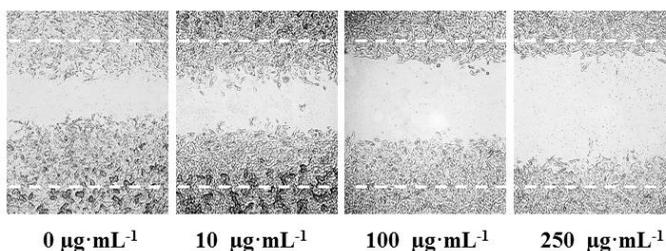
poligonal e não há pontos de alta fluorescência, o que sugere que as fibras de actina estão bem distribuídas por todo o citoesqueleto. Também se percebe a presença de filopódios projetadas das células para as células vizinhas. Na concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC ambas as células tumorais começam a apresentar alterações morfológicas que ficam mais evidentes quando se observa as células tratadas com $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC. Nestas concentrações pode-se observar a presença de pontos de alta intensidade de fluorescência na membrana plasmática, indicados pelas setas amarelas nas Figura 10 A e C. Tabolacci e colaboradores (2010) também observaram pontos com alta intensidade de fluorescência nos dendritos e na membrana plasmática de células de melanoma B16-F10 e atribuíram esse fenômeno a uma reorganização das fibras de actina do citoesqueleto. Além destes pontos de alta fluorescência atribuídos a uma reorganização do citoesqueleto, as células apresentaram alterações em sua morfologia, de poligonal para estrela dendrítica ocorrendo também a indução do crescimento de filamentos tipo dendritos (Figura 10 A e C). Nenhuma alteração nos núcleos das células tumorais pode ser observada em todas as concentrações testadas, conforme é apresentado nas imagens da Figura 10 B e C.

O efeito do EPC sobre a migração das células tumorais foi avaliado pelo ensaio conhecido como ensaio da cicatrização da ferida (*wound healing assay*). As concentrações de 10, 100 e $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram escolhidas para a realização deste ensaio. As concentrações de 100 e $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram escolhidas pois apresentaram efeito significativo de inibição sobre viabilidade e proliferação celular e $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi escolhida com intuito de verificar se o EPC interfere na migração celular em baixas concentrações. A Figura 11 mostra o efeito do EPC sobre a migração de células de melanoma humano SK-MEL-28.

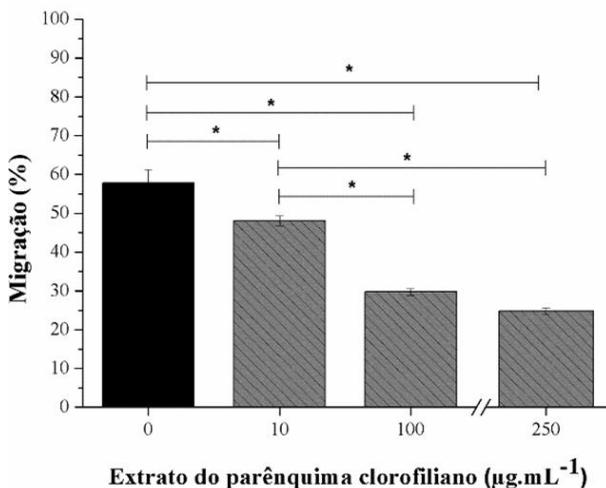
Figura 11: Efeito das diferentes concentrações de EPC sobre a migração de células de melanoma humano SK-MEL-28. A) Imagens da migração das células SK-MEL-28 após 24 horas da abertura da ferida. B) Migração das células (expressa em porcentagem) em relação ao tempo inicial, o resultado foi expresso em média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos com $p < 0,05$.

SK-MEL-28

A)



B)

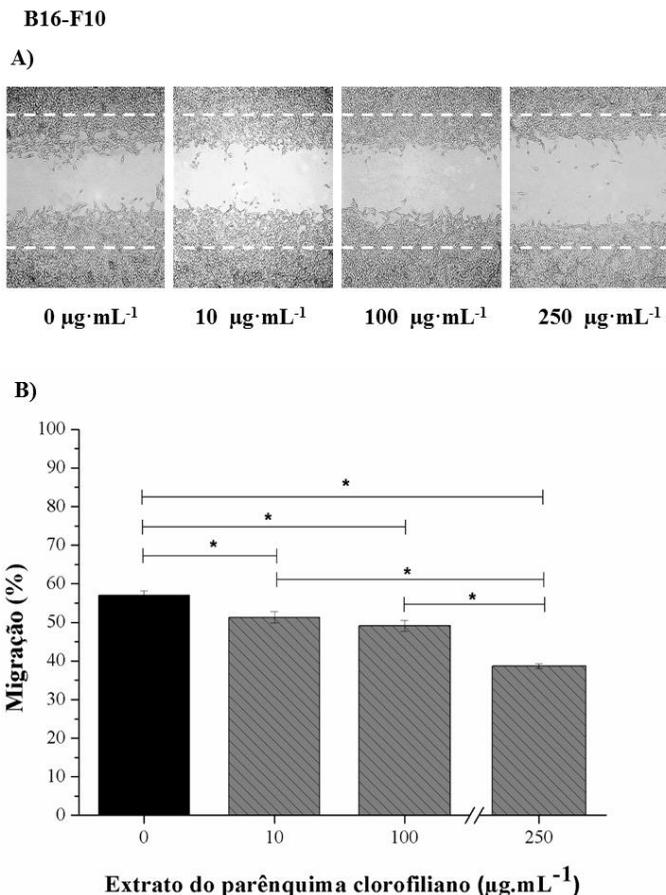


A Figura 11 A mostra imagens capturadas das células de SK-MEL-28 após 24 horas de exposição as diferentes concentrações de EPC, comparando-as com a área inicial da ferida, todas as concentrações

testadas de EPC apresentaram efeito de inibição da migração. Como apresentado na Figura 11 B as células de SK-MEL-28 sem tratamento apresentaram um fechamento de $57,8 \pm 3,4\%$ da área ferida, enquanto para as células de SK-MEL-28 tratadas com 10, 100 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ este fechamento foi de $48 \pm 1,3$, $29,7 \pm 0,9$ e $24,8 \pm 0,9\%$, respectivamente. Comparado com o grupo controle todas as concentrações de EPC inibiram significativamente a migração de SK-MEL-28. Quase todas as concentrações testadas apresentam diferenças significativas entre si, somente quando se aumentou a concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a percentagem de migração não apresentou resultado significativo, sugerindo-se que o efeito de inibição se estabiliza entre essas duas concentrações.

A Figura 12 mostra o efeito do EPC sobre a migração de células de melanoma de camundongo B16-F10.

Figura 12: Efeito das concentrações de EPC sobre a migração de células de melanoma de camundongo B16-F10. A) Imagens da migração das células B16-F10 após 24 horas da abertura da ferida. B) Migração das células (expressa em percentagem) em relação ao tempo inicial, o resultado foi expresso em média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos com $p < 0,05$.



Todas as concentrações testadas de EPC apresentaram efeito de inibição na migração de células de melanoma B16-F10 após de tratamento (Figura 12 A). A células B16-F10 não expostas ao EPC

apresentaram um fechamento de $57 \pm 1,2\%$ da área ferida. A capacidade de migração foi reduzida significativamente para $51,3 \pm 1,5\%$, $49,7 \pm 1,4\%$ e $38,7 \pm 0,6\%$ quando as células foram tratadas com 10, 100 e $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC, respectivamente (Figura 12 B). Com exceção de quando se compara as concentrações de 10 e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, todas as demais concentrações de EPC apresentaram efeito significativo de inibição da migração em si.

A Tabela 3 mostra um comparativo do resultado de migração entre o melanoma B1-F10 e o SK-MEL-28. O EPC foi capaz de inibir a migração de ambas as células tumorais (SK-MEL-28 e B16-F10) mesmo na menor concentração testada. Em concentrações mais altas (100 e $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) o EPC mostrou ser mais eficaz na inibição da migração das células de melanoma humano SK-MEL-28.

Tabela 3: Comparativo da inibição da migração entre as duas linhagens de melanoma B16-F10 e SK-MEL-28 após 24 horas de tratamento com as diferentes concentrações de EPC.

Concentração de EPC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Migração de B16-F10 (%)	Migração de SK-MEL-28 (%)	Relação (migração B16-F10/migração SK-MEL-28)
0	$57,0 \pm 1,1$	$57,8 \pm 3,4$	0,99
10	$51,3 \pm 1,5$	$48 \pm 1,3$	1,07
100	$49 \pm 1,4$	$29,7 \pm 0,9$	1,65
250	$38,7 \pm 0,6$	$24,8 \pm 0,8$	1,56

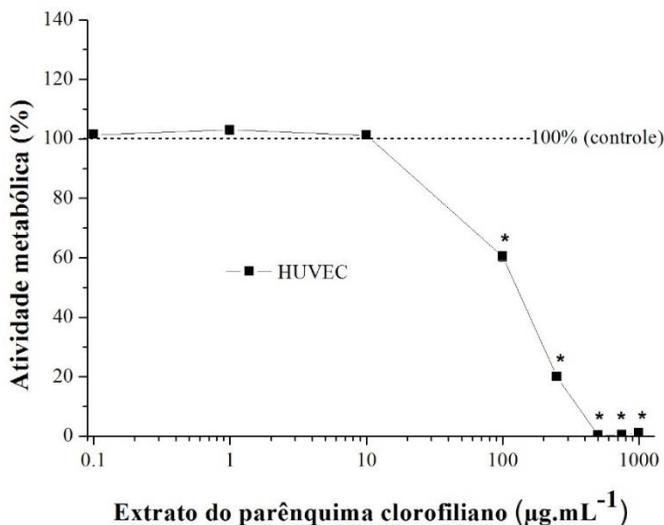
Fazendo uma relação da migração do melanoma B16-F10 e SK-MEL-28 observa-se que na concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC a migração foi 1,65 vezes maior que para as células de B16-F10. Na concentração de $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC a migração foi 1,56 vezes maior para as células de B16-F10. Este comparativo mostra que o EPC apresenta uma maior especificidade em inibir a migração de melanoma humano SK-MEL-28, uma vez que as células não tratadas e tratadas com $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC apresentam valores semelhantes de migração celular.

4.4 EFEITO DO EXTRATO DO PARÊNQUIMA CLOROFILIANO (EPC) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA UMBILICAL HUMANA (HUVEC)

Para que o tumor principal se desenvolva é necessário um suprimento de sangue para suas necessidades metabólicas (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002). Células tumorais expressam VEGF o que desencadeia uma rede de vias de sinalização que promovem a angiogênese (SUBOJ et al., 2012). O brotamento e a formação de novos vasos (a partir de vasos existentes) promove ao tumor a capacidade de sobrevivência e crescimento, adicionalmente possibilita uma rota de escape para estas células (SOOD; FLETCHER; HENDRIX, 2002), mostrando a importância da angiogênese tanto para a sobrevivência do tumor como para o processo de metástase. Desta forma, avaliou-se a influência do EPC sobre a atividade metabólica, proliferação, morfologia, migração e formação de tubos vasculares por células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).

A Figura 13 mostra as alterações na atividade metabólica em células endoteliais após tratadas com diferentes concentrações de EPC.

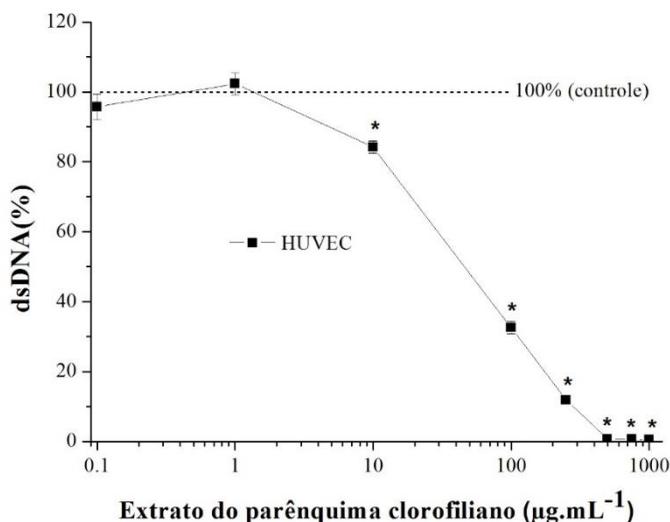
Figura 13: Atividade metabólica de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) após 72 horas de tratamento com diferentes concentrações de EPC. Resultado expresso em média \pm erro padrão de três experimentos independentes utilizando-se oito replicatas para cada caso. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.



As concentrações de 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC não apresentaram nenhum efeito sobre as células endoteliais, nem de estímulo nem de inibição. Decréscimo significativo ($p < 0,05$ em relação ao controle) da atividade metabólica de HUVECs pode ser observado em concentrações de EPC partindo de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, nesta concentração a atividade metabólica decaiu $39,5 \pm 1,6\%$. O valor de IC_{50} obtido para o EPC em células endoteliais foi de 127 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As células endoteliais quando expostas à concentrações superiores a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC não sobreviveram (Figura 13).

A Figura 14 apresenta o efeito do EPC sobre a proliferação de células endoteliais, esta proliferação foi avaliada pela quantificação de dsDNA total.

Figura 14: Concentração de dsDNA de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) após tratamento com EPC durante 72 horas. Resultado expresso em média \pm erro padrão de três experimentos independentes utilizando-se quatro replicatas para cada caso. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.



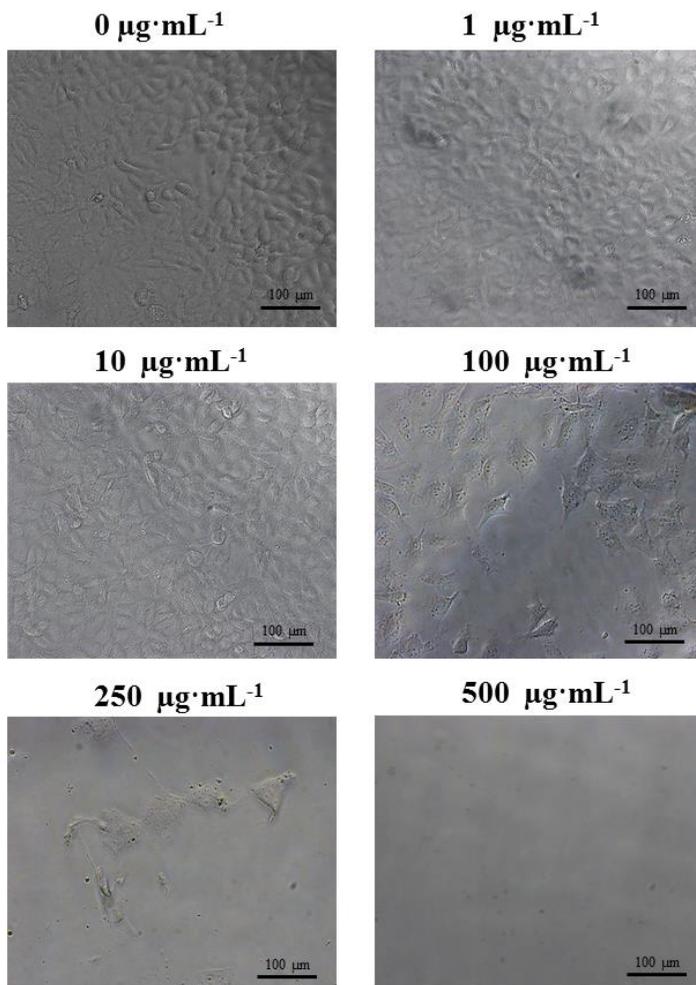
Decréscimo significativo na concentração de dsDNA pode ser observado a partir da concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC, onde a redução da proliferação celular foi de $15,8 \pm 1,6\%$, já na concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ este efeito foi mais expressivo ($67,5 \pm 1,8\%$) e corroborando com o resultado do ensaio de viabilidade celular em concentrações superiores a $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ocorreu a morte de todas as células (Figura 14).

Concentrações superiores a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC ocasionaram uma grande redução na viabilidade e proliferação das células tratadas, esta concentração corresponde a $5,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de aloína B. Pan e colaboradores (2013) demonstraram que exposição de HUVECs a aloína comercial resultou em uma redução na atividade metabólica de 57 e 48% para concentrações de 25,1 e $33,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Um estudo com aloe emodina mostrou efeito desta na proliferação de células endoteliais de maneira dose-dependente (SUBOJ et al., 2012).

Para a realização dos experimentos de microscopia de fluorescência, migração e formação de tubos vasculares foram escolhidas as concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC. A concentração de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi utilizada com o intuito de avaliar o efeito em baixas concentrações do extrato, mesmo que a concentração de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ não tenha apresentado efeito sobre a viabilidade celular está apresentou efeito sobre a proliferação das células endoteliais e a concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ uma vez que esta apresentou efeito de decréscimo sobre a viabilidade e proliferação das HUVECs.

Microscopia de contraste de fase foi realizada a fim de identificar alterações morfológicas ocasionadas pelo tratamento das HUVECs com diferentes concentrações de EPC, conforme apresentado na Figura 15.

Figura 15: Imagens obtidas por microscopia de contraste de fase de HUVECs cultivadas com a diferentes concentrações de EPC durante 72 horas. A barra preta representa a escala de 100 μm .

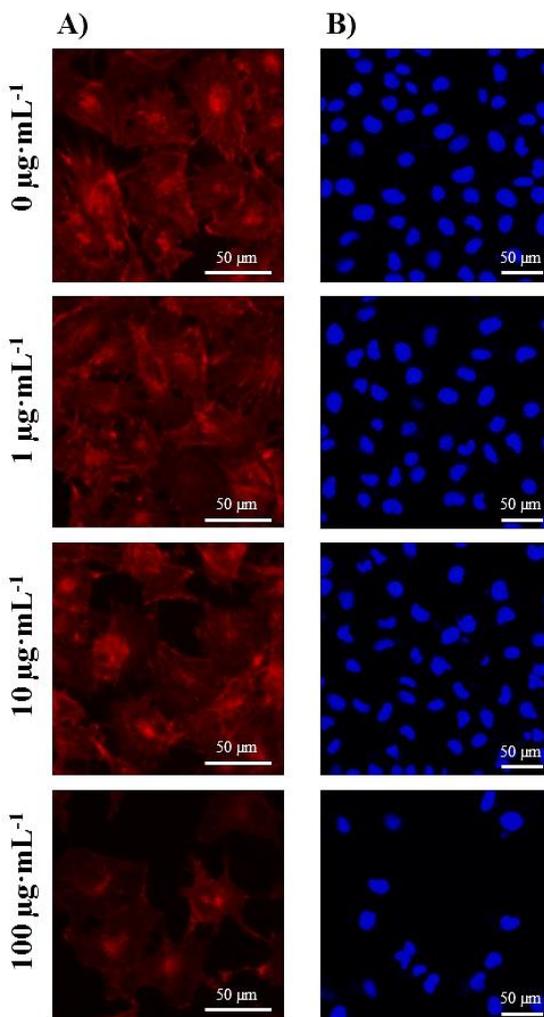


As células expostas as concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ não apresentaram alterações morfológicas quando comparadas ao grupo controle, apresentaram morfologia típica de células endoteliais. Nas concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ alterações podem ser observadas em relação à conformação do citoesqueleto que está arranjado de forma

irregular, corroborando com os resultados de atividade metabólica e concentração de dsDNA, na concentração de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ as HUVECs não sobreviveram (Figura 15).

Os resultados obtidos pela microscopia de contraste de fase (Figura 15) foram melhor investigados por microscópio de fluorescência (Figura 16). O corante Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina permitiu a visualização da distribuição dos filamentos de F-actina por todo o citoesqueleto enquanto DAPI permitiu a visualização do núcleo das células.

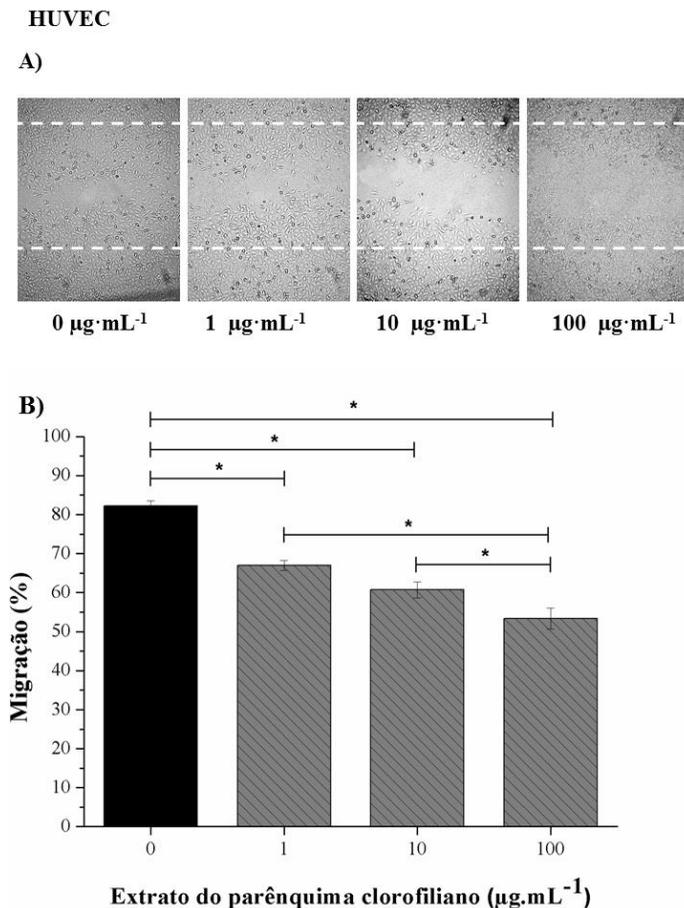
Figura 16: Imagens obtidas por microscopia de fluorescência de células endoteliais cultivadas em diferentes concentrações de EPC durante 72 horas. (A) filamentos de F-actina foram corados com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina. (B) Núcleos foram corados com DAPI. A barra branca representa a escala de 50 μm .



Células endoteliais cultivadas com $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC apresentaram características morfológicas semelhantes ao controle, com fibras de estresse bem distribuídas por todo o citoesqueleto e os filamentos de filopódios estão projetados por todo o perímetro das células fazendo conexões célula-célula. Células endoteliais tratadas com $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC não apresentam alterações na conformação do citoesqueleto, observa-se também a presença dos filamentos de filopódios projetados por todo o perímetro das células fazendo a conexão entre as mesmas, porém pode-se observar um início de retração das fibras de estresse, o que fica mais evidente na concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC. Nesta concentração, além da retração das fibras de estresse pode-se observar uma retração dos filopódios. Como apresentado na Figura 16 B não se pode observar mudança no núcleo das células em função das concentrações testadas.

A migração de células endoteliais é amplamente estudada, uma vez que esta é associada a uma das etapas da angiogênese e pode ocorrer por diversas vias (BETZ et al., 2016). Com o intuito de avaliar o efeito do EPC sobre a migração de células endoteliais o ensaio de cicatrização da ferida foi realizado. A Figura 17 mostra o efeito de diferentes concentrações do EPC sobre a migração das células endoteliais humanas.

Figura 17: Efeito das concentrações de EPC sobre a migração de HUVECs. A) Imagens da migração das células HUVEC após 24 horas da abertura da ferida. B) Migração das células (expressa em porcentagem) em relação ao tempo inicial, o resultado expresso em média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos com $p < 0,05$.



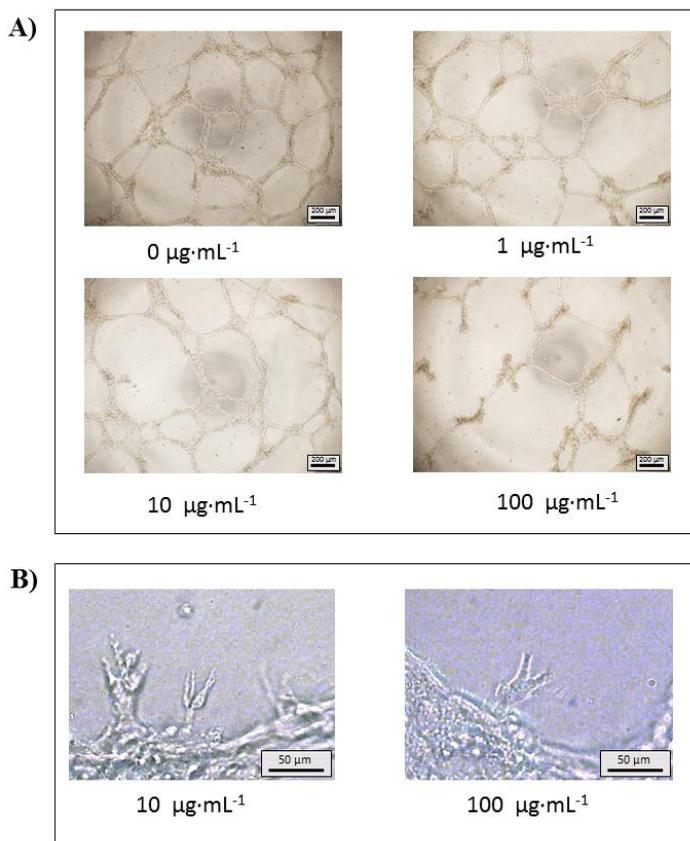
Comparando-se com as células não expostas ao EPC (fechamento da área ferida de $82,2 \pm 1,3\%$) a capacidade de migração diminuiu significativamente, uma vez que nas concentrações de 1, 10 e

100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentaram um percentual de fechamento da área de $66,9 \pm 1,3\%$, $60,7 \pm 2,1\%$ e $53,3 \pm 2,6\%$, respectivamente (Figura 17 B). Entre as concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ não houve diferença significativa na migração das células, porém entre as demais concentrações as diferenças foram significativas.

O EPC promoveu a inibição *in vitro* da capacidade migratória das HUVECs (Figura 17), esta inibição pôde ser observada até na menor concentração de EPC testada. O EPC apresenta em sua composição 5,6% de aloína B, o que representa para concentrações testadas de 1, 10 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentrações de aloína B de 0,056, 0,56 e 5,6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente. Estudos mostram que a aloína comercial promoveu inibição da migração de HUVECs em concentrações de partindo de 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (PAN et al., 2013), enquanto aloe emodina na concentração de 5,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ também foi capaz de inibir a migração e invasão de células endoteliais (SUBOJ et al., 2012).

Para que o processo de angiogênese por brotamento ocorra, as etapas de degradação proteolítica da matriz extracelular seguido pela motilidade quimiotática de células endoteliais vasculares e pôr fim a migração, são de extrema importância (RISAU, 1997; PAN et al., 2013). Após estas etapas o processo de brotamento ocorre rapidamente e de maneira coordenada e direcional (CARMELIET, 2003). A organização de células endoteliais em uma rede tridimensional de tubos é o passo final da angiogênese. Desta forma, foi realizado o ensaio de formação de tubos vasculares para investigar o efeito do EPC sobre as células endoteliais quanto à capacidade de formação e inibição de tubulogênese. A Figura 18 mostra que após 24 horas de tratamento das células endoteliais com diferentes concentrações de EPC ocorreu inibição da formação de tubos.

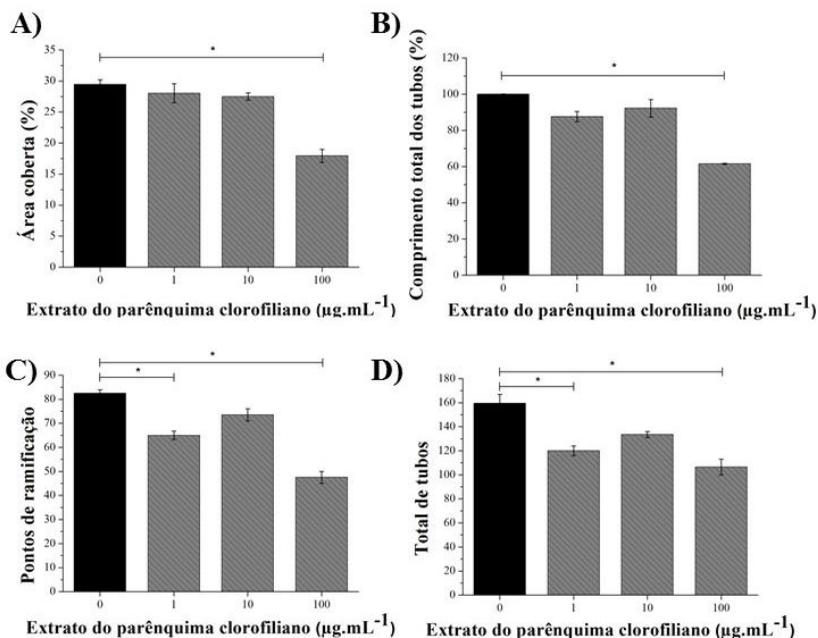
Figura 18: Efeito das diferentes concentrações de EPC sobre a formação de tubos vasculares. Rede de tubos vasculares formada após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de EPC em um aumento de 4× (A) e 20× (B). A barra preta representa a escala de 200 μm (A) e 50 μm (B).



As células endoteliais que não foram expostas ao EPC e as células endoteliais tratadas a concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentaram uma rede de tubos bem definida, o que não foi observado na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 18 A), porém nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pontos de brotamento foram identificados (Figura 18 B). A exposição a altas concentrações de EPC retarda o processo de formação de tubos in vitro, mas observou-se a presença de brotos vasculares nestas condições.

As imagens obtidas dos tubos formados após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de EPC (Figura 18 A) foram analisadas e os parâmetros área coberta, comprimento total dos tubos, pontos de ramificação e número total de tubos foram obtidos e apresentados na Figura 19.

Figura 19: Parâmetros obtidos da análise da rede de tubos formada após 24 horas de exposição de HUVECs a diferentes concentrações de EPC. A) Área coberta, B) Comprimento total dos tubos, C) Pontos de ramificação e D) Número total de tubos. Resultado expresso em média \pm SEM de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. Pontos no gráfico indicados com asterisco (*) são referentes a concentrações que apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.



Todos os parâmetros medidos: área coberta (Figura 19 A), comprimento total dos tubos (Figura 19 B), pontos de ramificação (Figura 19 C) e número total de tubos (Figura 19 D) apresentaram decréscimo significativo ($p < 0,05$) na maior concentração de EPC testada (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Pode-se observar também que o número de pontos de ramificação decaiu de 0 para 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, porém este valor de

decréscimo não foi considerado significativo quando 0 para $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC foi utilizado (Figura 19 C), a mesma tendência foi observada para o número total de tubos (Figura 19 D).

PAN e colaboradores (2013) observaram que a concentração de $8,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de aloína foi capaz de inibir a formação de tubos in vitro. aloe emodina, por sua vez, capaz de inibir a formação de tubos na concentração de $5,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (SUBOJ et al., 2012). Neste trabalho, a concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC claramente inibiu a formação in vitro de tubos vasculares, esta concentração de EPC corresponde a uma concentração de aloína B de $5,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, porém como dito anteriormente o efeito do EPC sobre as células é resultante de todos os compostos presentes no mesmo. Estudos in vivo realizados no inteLab em ovos embrionados da espécie *Gallus domesticus* demonstraram que o EPC estimulou a vasculogênese no intervalo de concentrações de 80 e $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e a angiogênese no intervalo de concentração entre 80 e $320 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (BERTI, 2008). Esta diferença nos resultados pode ser atribuída a duas variáveis, a primeira é a variabilidade na concentração dos compostos presentes no EPC e a segunda é a diferença no microambiente do ensaio in vitro para o ensaio in vivo.

4.5 RESUMO COMPARATIVO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARAS CÉLULAS TESTADAS NO PRESENTE TRABALHO

4.5.1 Atividade metabólica

Segundo resultados da atividade metabólica em fibroblastos de camundongo da linhagem L-929 a concentração citotóxica de EPC, onde há uma redução maior que 30% da viabilidade celular, foi de $185 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e o valor de IC_{50} foi de $242 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (item 4.2). Comparando estas concentrações com as concentrações referentes ao valor de IC_{50} de ambas as linhagens de melanoma testadas, para SK-MEL-28 a concentração foi $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC e B16-F10 a concentração foi $165 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC, percebe-se que o EPC apresenta um efeito mais nocivo sobre a atividade metabólica em linhagens de melanoma (item 4.3). O valor de IC_{50} obtido para as células endoteliais (HUVEC) foi de $127 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, semelhante ao obtido do melanoma humano SK-MEL-28 (item 4.4).

4.5.2 Proliferação

Os resultados do ensaio de proliferação, mediados por meio da percentagem de dsDNA, mostram que quando tratadas com a concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC as células apresentam percentagem de dsDNA de 107% para o melanoma B16-F10, 90% para o melanoma SK-MEL-28 e 84% para as células endoteliais HUVEC, sendo somente o resultado de decréscimo da HUVEC estatisticamente significativo em relação ao controle. Já quando tratadas com $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC as células apresentam o resultado de percentagem de dsDNA de 16% para B16-F10, de 11% para SK-MEL-28 e 32% para HUVEC, mostrando que apesar de concentrações mais baixas o EPC apresentaram um maior efeito de decréscimo em células HUVEC, estas apresentam uma maior concentração de dsDNA em concentrações mais altas de EPC, quando comparadas as duas linhagens de melanoma testadas.

4.5.3 Morfologia

Em linhagens de melanoma (SK-MEL-28 e B16-F10) uma reorganização do citoesqueleto (visualizada pelos pontos de alta fluorescência) é observada em concentrações superiores a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (item 4.3). Em células endoteliais observa-se a retração de fibras de estresse em concentrações superiores a $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (item 4.4).

4.5.4 Migração

Tanta para a HUVEC (concentrações testadas de 1, 10 e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC) quanto para as linhagens de melanoma (concentração testadas de 10, 100 e $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC) tem-se uma inibição da migração, até nas menores concentrações testadas, mesmo as que não apresentaram efeito sobre a atividade metabólica ou proliferação celular (item 4.3 e 4.4). Contudo, quando se compara as duas linhagens de melanoma (SK-MEL-28 e B16-F10) o EPC se mostra mais eficaz em inibir a migração do melanoma humano SK-MEL-28 (item 4.3).

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSÕES

Plantas são um importante objeto de estudo, uma vez que estas sintetizam uma infinidade de compostos bioativos. Estes compostos podem ser utilizados de forma bruta ou purificados, desta forma torna-se interessante estudar o efeito destes sobre as células. A catalogação da planta permitiu confirmar que o EPC é proveniente da *Aloe barbadensis* Miller, enquanto a análise de HPLC permitiu a padronização do EPC, sendo a percentagem de aloína B no mesmo de 5,6%.

Por meio de uma análise quantitativa e uma qualitativa pode-se verificar faixas de concentração citotóxicas do EPC (em linhagem L-929), sendo que, para concentrações superiores a $185 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ o mesmo foi citotóxico.

O efeito do EPC sobre a atividade metabólica e a morfologia celular mostrou-se semelhante nas duas linhagens de melanoma testadas, contudo no ensaio de proliferação celular, em baixas concentrações (0, 1 a $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), o tratamento com EPC resultou em um comportamento distinto entre estas linhagens (B16-F10 e SK-MEL-28). A concentração citotóxica (IC_{50}) em linhagens de L-929 é maior do que em ambas as linhagens de melanoma testadas (SK-MEL-28 e B16-F10), mostrando que o este apresenta um efeito mais nocivo para as linhagens de melanoma. O EPC inibiu a migração celular para ambas as linhagens de melanoma em todas as concentrações testadas. Entretanto, nas maiores concentrações (100 e $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) este se mostrou mais eficaz para as células de melanoma humano SK-MEL-28. O EPC inibiu a migração celular em todas as concentrações testadas, mesmo em concentração que não apresentaram efeito significativo na atividade metabólica e proliferação ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

A formação de tubos em células endoteliais também foi inibida na maior concentração testada ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), contudo mais estudos devem ser realizados, já que ainda se observa a formação de brotos vasculares nas concentrações de 10 e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EPC.

5.2 PERSPECTIVAS

Para continuidade deste trabalho, sugere-se explorar os seguintes aspectos:

- Caracterizar o EPC, realizando primeiramente uma análise de HPLC-MS para identificar e confirmar a presença de outros compostos presentes e em seguida quantificá-los por análise de HPLC.
- Analisar a expressão de genes de células de melanoma associados a mecanismos de migração, como as metaloproteinases de matriz, e outras proteínas/enzimas relacionadas à morte celular, como o gene p53.
- Realizar estudos in vivo em modelo de camundongo para avaliar o efeito do EPC sobre a sobrevivência e proliferação do tumor.
- Utilizar outros modelos in vivo como o zebrafish para avaliar o efeito do EPC sobre a angiogênese.
- Avaliar o efeito do EPC em modelo tumoral 3D.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAIR, T. H.; MONTANI, J.-P. Angiogenesis. **Colloquim Series on Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease**, 2011.
- ALGIERI, F.; RODRIGUEZ-NOGALES, A.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E.; RISCO, S.; OCETE, M. A.; GALVEZ, J. Botanical Drugs as an Emerging Strategy in Inflammatory Bowel Disease: A Review. **Mediators of Inflammation**, 2015.
- BARRANTES, E.; GUINEA, M. Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and Aloe gel. **Life Sciences**, v. 72, n. 7, p. 843–850, 2003.
- BERTI, F. V. **Efeito da aloína e do extrato do parênquima clorofiliano da *Aloe barbadensis* na viabilidade de células tumorais e na formação de vasos sanguíneos**. 2008. (Mestrado). Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.
- BETZ, C.; LENARD, A.; BELTING, H.-G.; AFFOLTER, M. Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. **Development**, v. 143, n. 13, p. 2249–2260, 2016.
- BOZZI, A.; PERRIN, C.; AUSTIN, S.; ARCE VERA, F. Quality and authenticity of commercial Aloe vera gel powders. **Food Chemistry**, v. 103, n. 1, p. 22–30, 2007.
- CAMPESTRINI, L. H. **Aloe barbadensis miller: análise do perfil metabólico e estudos dos efeitos vasculogênicos e angiogênicos do extrato do parênquima de reserva, da fração polissacarídica (fp) e da acemanana**. 2007. (Mestrado) Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.
- CÁRDENAS, C.; QUESADA, A. R.; MEDINA, M. A. Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 3083–3089, 2006.

- CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 9, 2003.
- CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563–572, 2002.
- CHANG, A. E.; KARNELL, L. H.; MENCK, H. R. The National Cancer Data Base Report on Cutaneous and Noncutaneous Melanoma. **American Cancer Society**, v. 83, n. 8, p. 1664–1678, 1998.
- CHEN, H. C.; HSIEH, W. T.; CHANG, W. C.; CHUNG, J. G. Aloe-emodin induced in vitro G2/M arrest of cell cycle in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 8, p. 1251–1257, 2004.
- CHEN, Y. Y.; CHIANG, S. Y.; LIN, J. G.; YANG, J. S.; YI-SHIH, M.; LIAO, C. L.; LAI, T. Y.; TANG, N. Y.; CHUNG, J. G. Emodin, aloe-emodin and rhein induced DNA damage and inhibited DNA repair gene expression in SCC-4 human tongue cancer cells. **Anticancer Research**, v. 30, n. 3, p. 945–952, 2010a.
- CHEN, Y.-Y.; CHIANG, S.-Y.; LIN, J.-G.; MA, Y.-S.; LIAO, C.-L.; WENG, S.-W.; LAI, T.-Y.; CHUNG, J.-G. Emodin, aloe-emodin and rhein inhibit migration and invasion in human tongue cancer SCC-4 cells through the inhibition of gene expression of matrix metalloproteinase-9. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY**, v. 36, p. 1113–1120, 2010b.
- CHINCHILLA, N.; CARRERA, C.; DURÁN, A. G.; MACÍAS, M.; TORRES, A.; MACÍAS, F. A. *Aloe barbadensis*: How a miraculous plant becomes reality. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 4, p. 581–602, 2013.
- CHOI, S.; CHUNG, M. H. A review on the relationship between Aloe vera components and their biologic effects. **Seminars in Integrative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 53–62, 2003.
- DAVEY, R. J.; WESTHUIZEN, A. van der; BOWDEN, N. A. Metastatic melanoma treatment: Combining old and new therapies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 98, p. 242–253, 2014.

- DEY, A.; BERA, R.; CHAKRABARTY, D. Influence of Aloe vera on the properties of N-vinylpyrrolidone-Acrylamide copolymer hydrogel. **Materials Chemistry and Physics**, v. 168, p. 168–179, 2015.
- DUTTA, A.; MANDAL, G.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. In vitro antileishmanial activity of Aloe vera leaf exudate: A potential herbal therapy in leishmaniasis. **Glycoconjugate Journal**, v. 24, n. 1, p. 81–86, 2007.
- EGGERMONT, A. M. M.; SPATZ, A.; ROBERT, C. Cutaneous melanoma. **The Lancet**, v. 383, n. 9919, p. 816–827, 2014.
- EL SAYED, A. M.; EZZAT, S. M.; EL NAGGAR, M. M.; EL HAWARY, S. S. In vivo diabetic wound healing effect and HPLC–DAD–ESI–MS/MS profiling of the methanol extracts of eight Aloe species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 3, p. 352–362, 2016.
- ESMAT, A. Y.; TOMASETTO, C.; RIO, M.-C. Cytotoxicity of a natural anthraquinone (Aloin) against human breast cancer cell lines with and without ErbB-2: topoisomerase II α coamplification. **Cancer biology & therapy**, v. 5, n. 1, p. 97–103, 2006.
- FANALI, S.; ATURKI, Z.; D’ORAZIO, G.; ROCCO, A.; FERRANTI, A.; MERCOLINI, L.; RAGGI, M. A. Analysis of Aloe-based phytotherapeutic products by using nano-LC-MS. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 17–18, p. 2663–2670, 2010.
- GODINHO, J. F.; BERTI, F. V.; MÜLLER, D.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Incorporation of Aloe vera extracts into nanocellulose during biosynthesis. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 545–555, 2016.
- GRINDLAY, D.; REYNOLDS, T. The Aloe vera phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 16, n. 2–3, p. 117–151, 1986.
- GROOM, Q. J.; REYNOLDS, T. Barbaloin in Aloe species. **Planta Medica**, v. 53, n. 4, p. 345–348, 1987.
- HABEEB, F.; SHAKIR, E.; BRADBURY, F.; CAMERON, P.;

- TARAVATI, M. R.; DRUMMOND, A. J.; GRAY, A. I.; FERRO, V. a. Screening methods used to determine the anti-microbial properties of Aloe vera inner gel. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 315–320, 2007.
- HUANG, P.-H.; HUANG, C.-Y.; CHEN, M.-C.; LEE, Y.-T.; YUE, C.-H.; WANG, H.-Y.; LIN, H. Emodin and Aloe-Emodin Suppress Breast Cancer Cell Proliferation through ER α Inhibition. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2013, p. 376123, 2013.
- HUSSAIN, A.; SHARMA, C.; KHAN, S.; SHAH, K.; HAQUE, S. Aloe vera Inhibits Proliferation of Human Breast and Cervical Cancer Cells and Acts Synergistically with Cisplatin. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, p. 2939–2946, 2015.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC**.
Disponível em: <<http://www-dep.iarc.fr/WHOdb/WHOdb.htm>>.
- KORN, C.; AUGUSTIN, H. G. Mechanisms of Vessel Pruning and Regression. **Developmental Cell**, v. 34, n. 1, p. 5–17, 2015.
- KUO, PO-LIN; LIN, TA-CHEN; LIN, C.-C. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. **Life sciences**, v. 71, n. 16, p. 1879–1892, 2002.
- KURZ, H.; GÄRTNER, T.; EGGLI, P. S.; CHRIST, B. First blood vessels in the avian neural tube are formed by a combination of dorsal angioblast immigration and ventral sprouting of endothelial cells. **Developmental Biology**, v. 173, n. 1, p. 133–147, 1996.
- LEE, M.-C.; LIAO, J.-D.; HUANG, W.-L.; JIANG, F.-Y.; JHENG, Y.-Z.; JIN, Y.-Y.; TSENG, Y.-S. Aloin-induced cell growth arrest, cell apoptosis, and autophagy in human non-small cell lung cancer cells. **Biomarkers and Genomic Medicine**, v. 6, n. 4, p. 144–149, 2014.
- LOGARANJAN, K.; DEVASENA, T.; PANDIAN, K. Quantitative Detection of Aloin and Related Compounds Present in Herbal Products and Aloe vera Plant Extract Using HPLC Method. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 4, n. October, p. 600–605, 2013.

- MAIO, M. Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. **Annals of Oncology**, v. 23, 2012.
- MIRANDA, M.; MAUREIRA, H.; RODRÍGUEZ, K.; VEGA-GÁLVEZ, A. Influence of temperature on the drying kinetics, physicochemical properties, and antioxidant capacity of Aloe Vera (*Aloe Barbadensis* Miller) gel. **Journal of Food Engineering**, v. 91, n. 2, p. 297–304, 2009.
- NETO, P. D. C. G.; LIMA, J. R. De; BARBOSA, M. R. D. V.; BARBOSA, M. D. A.; MENEZES, M.; PÔRTO, K. C.; WARTCHOW, F.; GILBERTONI, T. B. **Manual de procedimentos para herbários**. Recife: Editora Universitária UFPE, 2013.
- NIĆIFOROVIĆ, A.; ADŽIĆ, M.; SPASIĆ, S. D.; RADOJČIĆ, M. B. Antitumor effects of a natural anthracycline analog (aloin) involve altered activity of antioxidant enzymes in HeLaS3 cells. **Cancer Biology and Therapy**, v. 6, n. 8, p. 1200–1205, 2007.
- OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). WHO monographs on selected medicinal plants. **Geneva: WHO Publications**, v. 1, 1999.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>.
- PAEZ, A.; MICHAEL GEBRE, G.; GONZALEZ, M. E.; TSCHAPLINSKI, T. J. Growth, soluble carbohydrates, and aloin concentration of Aloe vera plants exposed to three irradiance levels. **Environmental and Experimental Botany**, v. 44, n. 2, p. 133–139, 2000.
- PAN, Q.; PAN, H.; LOU, H.; XU, Y.; TIAN, L. Inhibition of the angiogenesis and growth of Aloin in human colorectal cancer in vitro and in vivo. **Cancer cell international**, v. 13, n. 1, p. 69, 2013.
- PATEL, K.; GADEWAR, M.; TAHILYANI, V.; PATEL, D. K. Medicinal importance, pharmacological activities, and analytical aspects of aloin: A concise report. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 19, n. 10, p. 792–800, 2013.
- PINTO, J. V. T. **Estudo da velocidade de difusão da aloína em meio**

aquoso e em membrana de celulose bacteriana. 2012. (Doutorado). Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC

POULIOT, NORMAND; PEARSON, HELEN B; BURROWS, A. Investigating Metastasis Using In Vitro Platforms. **Metastatic Cancer: Clinical and Biological Perspectives**, p. 77–100, 2000.

QUESADA, A. R.; MUÑOZ-CHÁPULI, R.; MEDINA, M. A. Anti-angiogenic drugs: From bench to clinical trials. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 4, p. 483–530, 2006.

RADOVIC, J.; MAKSIMOVIC-IVANIC, D.; TIMOTIJEVIC, G.; POPADIC, S.; RAMIC, Z.; TRAJKOVIC, V.; MILJKOVIC, D.; STOSIC-GRUJICIC, S.; MIJATOVIC, S. Cell-type dependent response of melanoma cells to aloe emodin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 9, p. 3181–3189, 2012.

REYNOLDS, T. Observations on the phytochemistry of the Aloë leaf-exudate compounds. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 90, n. 3, p. 179–199, 1985.

REYNOLDS, T. **Aloes - the genus aloe**. CRC Press ed. [s.l: s.n.]

REYNOLDS, T.; LABORATMY, J.; GARDENS, R. B.; TW, S. The compounds in Aloe leaf exudates: a review. p. 157–177, 1985.

RISAU, W. **Mechanisms of angiogenesis**. *Nature*, 1997. .

SACCÙ, D.; BOGONI, P.; PROCIDA, G. Aloe Exudate : Characterization by Reversed Phase HPLC and Headspace GC-MS Aloe Exudate: Characterization by Reversed Phase HPLC and Headspace GC-MS. **Journal of agricultural and food chemistry**, p. 4526–4530, 2001.

SAFE, S.; KASIAPPAN, R. Natural Products as Mechanism-based Anticancer Agents: Sp Transcription Factors as Targets. **Phytotherapy Research**, 2016.

SALEEM, R.; FAIZI, S.; DEEBA, F.; SIDDIQUI, B. S.; QAZI, M. H.

- Anthrones from *Aloe barbadensis*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 6, p. 1279–1282, 1997.
- SENGER, D. R.; VAN DE WATER, L.; BROWN, L. F.; NAGY, J. A.; YEO, K. T.; YEO, T. K.; BERSE, B.; JACKMAN, R. W.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. **Cancer metastasis reviews**, v. 12, n. 3–4, p. 303–324, 1993.
- SILVA, M. A.; TREVISAN, G.; HOFFMEISTER, C.; ROSSATO, M. F.; BOLIGON, A. A.; WALKER, C. I. B.; KLAFKE, J. Z.; OLIVEIRA, S. M.; SILVA, C. R.; ATHAYDE, M. L.; FERREIRA, J. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Aloe saponaria* Haw in a model of UVB-induced paw sunburn in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 133, p. 47–54, 2014.
- SILVA, P. C. de S. C. e. **Efeito da variação sazonal na produção de compostos ativos em *tithonia diversifolia* (hemsl) gray, utilizando ensaio com microrganismos.** 2004. (Mestrado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP
- SITTAMPALAM, G. S.; COUSSENS, N. P.; EDITOR, A. S.; ARKIN, M.; AULD, D.; AUSTIN, C.; BEJCEK, B.; GLICKSMAN, M.; INGLESE, J.; IVERSEN, P. W.; MCGEE, J.; MCMANUS, O.; MINOR, L.; NAPPER, A.; PELTIER, J. M.; RISS, T.; TRASK, O. J.; WEIDNER, J. Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual**, n. Md, p. 261–263, 2016.
- SOOD, A. K.; FLETCHER, M. S.; HENDRIX, M. J. C. The Embryonic-Like Properties of Aggressive Human Tumor Cells. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 9, 2002.
- SUBOJ, P.; BABYKUTTY, S.; VALIYAPARAMBIL GOPI, D. R.; NAIR, R. S.; SRINIVAS, P.; GOPALA, S. Aloe emodin inhibits colon cancer cell migration/angiogenesis by downregulating MMP-2/9, RhoB and VEGF via reduced DNA binding activity of NF- κ B. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 5, p. 581–591, 2012.

- TABOLACCI, C.; CORDELLA, M.; TURCANO, L.; ROSSI, S.; LENTINI, A.; MARIOTTI, S.; NISINI, R.; SETTE, G.; ERAMO, A.; PIREDDA, L.; DE MARIA, R.; FACCHIANO, F.; BENINATI, S. Aloe-emodin exerts a potent anticancer and immunomodulatory activity on BRAF-mutated human melanoma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 762, p. 283–292, 2015.
- TABOLACCI, C.; LENTINI, A.; MATTIOLI, P.; PROVENZANO, B.; OLIVERIO, S.; CARLOMOSTI, F.; BENINATI, S. Antitumor properties of aloe-emodin and induction of transglutaminase 2 activity in B16-F10 melanoma cells. **Life Sciences**, v. 87, n. 9–10, p. 316–324, 2010.
- TABOLACCI, C.; ROSSI, S.; LENTINI, A.; PROVENZANO, B.; TURCANO, L.; FACCHIANO, F.; BENINATI, S. Aloin enhances cisplatin antineoplastic activity in B16-F10 melanoma cells by transglutaminase-induced differentiation. **Amino Acids**, v. 44, n. 1, p. 293–300, 2013.
- THEODOSAKIS, N.; MICEVIC, G.; KELLY, D. P.; BOSENBERG, M. Mitochondrial function in melanoma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 563, p. 56–59, 2014.
- VIJAYALAKSHMI, D.; DHANDAPANI, R.; JAYAVENI, S.; JITHENDRA, P. S.; ROSE, C.; MANDAL, A. B. In vitro anti inflammatory activity of Aloe vera by down regulation of MMP-9 in peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 1, p. 542–546, 2012.
- WEIS, S.; CUI, J.; BARNES, L.; CHERESH, D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. **Journal of Cell Biology**, v. 167, n. 2, p. 223–229, 2004.
- ZAPATA, P. J.; NAVARRO, D.; GUILLÉN, F.; CASTILLO, S.; MARTÍNEZ-ROMERO, D.; VALERO, D.; SERRANO, M. Characterisation of gels from different *Aloe spp.* as antifungal treatment: Potential crops for industrial applications. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 223–230, 2013.
- ZHONG, J. S.; HUANG, Y. Y.; ZHANG, T. H.; LIU, Y. P.; DING, W. J.;

WU, X. F.; XIE, Z. Y.; LUO, H. Bin; WAN, J. Z. Natural phosphodiesterase-4 inhibitors from the leaf skin of *Aloe barbadensis* Miller. **Fitoterapia**, v. 100, p. 68–74, 2015.