



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thaís Oliveira Cassiano dos Santos Nogueira

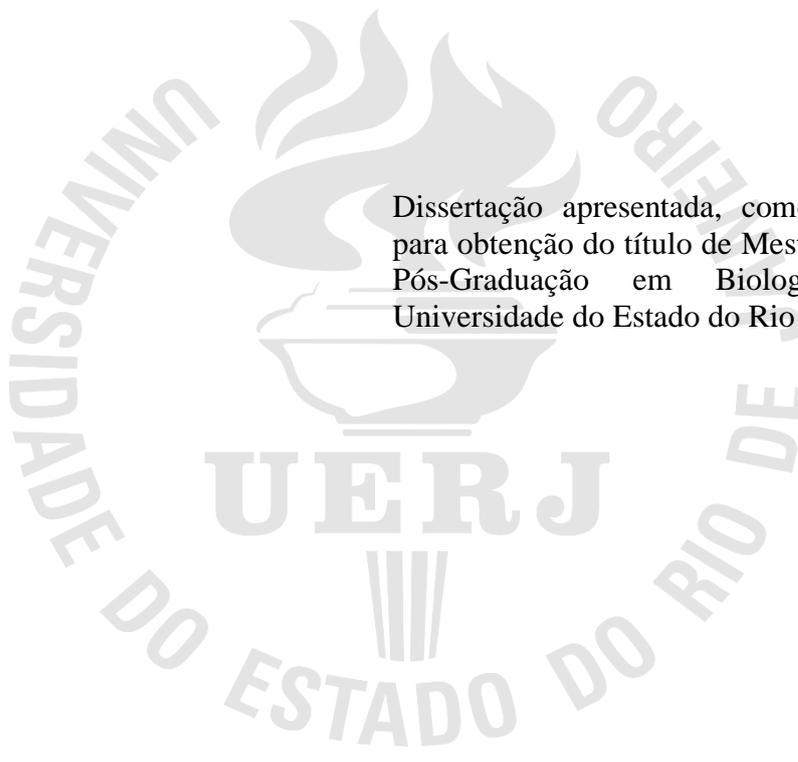
**Atividade antineoplásica do extrato glicólico comercial de *Aloe vera* (L.)
Burm. f. em linhagens de câncer de mama**

Rio de Janeiro

2021

Thaís Oliveira Cassiano dos Santos Nogueira

**Atividade antineoplásica do extrato glicólico comercial de *Aloe vera* (L.) Burm. f. em
linhagens de câncer de mama**



Dissertação apresentada, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre, ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Pelielo de Mattos

Coorientadora: Prof.^a Dra. Maria da Graça Justo Araújo

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

N778 Nogueira, Thaís Oliveira Cassiano dos Santos.
Atividade antineoplásica do extrato glicólico comercial de *Aloe vera* (L.)
Burm. f. em linhagens de câncer de mama/ Thaís Oliveira Cassiano dos Santos
Nogueira. – 2021.
110f. : il.

Orientadora: José Carlos Pelielo de Mattos.

Coorientadora: Maria da Graça Justo Araújo.

Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do
Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Plantas medicinais – Uso terapêutico - Teses. 2. Babosa – Teses. 3.
Neoplasias da mama – Teses. 4. Genotoxicidade – Teses. 5. Citotoxicidade –
Teses. I. Mattos, José Carlos Pelielo. II. Araújo, Maria da Graça Justo. III.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto
Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 633.88

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 -Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
dissertação, desde que citada a fonte.



14/04/2021

Assinatura

Data

Thaís Oliveira Cassiano dos Santos Nogueira

**Atividade antineoplásica do extrato glicólico comercial de *Aloe vera* (L.) Burm. f. em
linhagens de câncer de mama**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

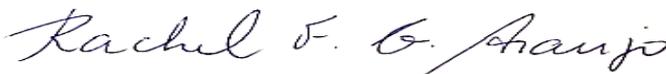
Aprovada em 25 de março de 2021.

Orientadores:

Prof. Dr. José Carlos Pelielo de Mattos
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Maria da Graça Justo Araujo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

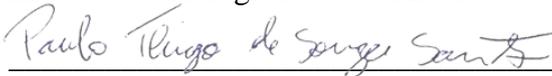
Banca examinadora:



Prof.^a Dra. Rachel Fátima Gagliardi Araujo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ



Prof.^a Dra. Ana Carolina Stumbo Machado
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ



Dr. Paulo Thiago de Souza Santos
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu avô Juarez (*in memorian*), que infelizmente foi vítima desta pandemia e nos deixou. Um homem de honra, honesto, bom e com uma grande inteligência que sempre admirei. Excelente marido, pai admirável e avô extraordinário. Agradeço por todos os ensinamentos, exemplos e amor que nos dedicou todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir chegar até aqui e me sustentar em todas as etapas, não só deste trabalho, mas da vida. Que toda honra e toda glória sejam dadas a Ele.

Agradeço ao meu esposo Felipe por estar sempre ao meu lado. Obrigada por ser meu porto seguro nos momentos de fraqueza ou desânimo, ombro amigo nos momentos de desabafo e por dar apoio e forças a todo momento. E também por se alegrar em cada conquista, ouvir os entusiasmos quando as coisas davam certo, sempre com brilho no olhar de orgulho. Obrigada por todos os incentivos e esforços para me fazer feliz e pelo grandioso amor que me dedica todos os dias. Amo você!

Agradeço aos meus pais, Eneas e Denise, que sempre incentivaram e apoiaram minhas escolhas. Sou grata por tudo que já fizeram por mim ao longo dos meus 25 anos e que continuam fazendo, sempre com muito amor e carinho. Vocês são exemplos de pais dedicados e amorosos. Obrigada por tudo!

Agradeço aos meus avós, Juarez (*in memoriam*) e Neia, pelo imenso amor que sentem um pelo outro e formou a base desta família. Obrigada por serem ótimos avós, por tanto amor e orações dedicados a mim. Agradeço porque sempre torceram por mim e minhas conquistas, e por todas as vezes que os vi contando aos amigos que tem uma neta cientista.

Agradeço ao meu irmão Erick e minha cunhada Lessane pelo apoio e por sempre acreditarem em mim e no meu potencial.

Agradeço à minha nova família, meus sogros e cunhados, por terem me recebido bem e torcerem sempre por mim.

Agradeço ao meu orientador Zé, que me orientou com muita estima, não medindo esforços para uma boa conclusão deste trabalho. Agradeço não somente por este trabalho, mas por todos os anos que estive no Laboratório de Radio e Fotobiologia. Obrigada por todos os conselhos, ensinamentos e por ser sempre muito acessível e prestativo no que eu precisasse.

Agradeço pelo tom leve e brincalhão que sempre mantivemos, não só nossa relação, mas de todo o lab.

Agradeço à minha co-orientadora Graça por ter aceitado o convite de me co-orientar e por dar todo o suporte que precisamos durante a execução do trabalho. Obrigada por abrir as portas do Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais UERJ.

Agradeço ao Murata, que além de um tutor no lab, também se tornou um grande amigo. Obrigada por todo apoio, motivação e dedicação desde o primeiro dia no lab. Você consegue ver potencial enorme em mim (mais do que eu mesma), e por isso sempre foi um dos meus maiores incentivadores. Obrigada por todas as conversas, longas ou curtas, presenciais ou por WhatsApp (com áudios enormes), “bobas” ou sérias, relacionadas ao lab ou à vida. Agradeço até mesmo os elogios que eu achava exagerados. Obrigada pelos ensinamentos e pela amizade dedicada todos esses anos. Sei que ela vai continuar e que posso contar contigo, não importa o caminho que trilhar daqui para frente. Muito obrigada!

Agradeço ao PV, que foi meu grande mestre no começo a minha jornada e agora também é um grande amigo. Você me ensinou muito no meu início no lab, e não só sobre técnicas e experimentos, mas como um ser um cientista. E hoje sei que parte do motivo de eu ter chegado até aqui e estar terminando um mestrado, é por causa da semente que plantou lá atrás. Sou grata por tudo isso e pelo imenso carinho e amizade que me oferece até hoje. Mesmo com a distância, nossa amizade ainda dura e vai durar muito. Muito obrigada!

Agradeço a todos os outros integrantes do Laboratório de Radio e Fotobiologia, em especial: Verônica (Vv), Dudu, Mariana, Gabriel e Mauricio. Vv, obrigada por todas nossas conversas e bate-papo do dia a dia, parceria, dicas de organização (da vida e do lab) e pela amizade que vamos levar. Dudu, obrigada por toda ajuda que sempre esteve disposto a me oferecer. Mariana, obrigada por me permitir te ensinar o que eu sabia, por toda ajuda nos experimentos, pela amizade e também por alegrar meus dias com suas histórias hilárias. Gabriel, também te agradeço por me dar a grata experiência de ensinar e pela imensa ajuda e disposição que me ofereceu durante os experimentos. Mauricio, obrigada pela cumplicidade do dia a dia no lab.

Agradeço ao LIA-BPPN (Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais) por ter aberto as portas e cedido espaço para execução dos meus experimentos de cultivo celular. Em especial agradeço aos técnicos Shirley, Paulinho e principalmente à Márcia, pela disposição.

Agradeço ao IPPN (Instituto de Pesquisa em Produtos Naturais – UFRJ), em nome da Profª Sônia Soares Costa e da doutoranda Lívia Marques Casanova, pela colaboração na análise fitoquímica do extrato utilizado no estudo. Lívia, obrigada por tamanha dedicação e qualidade dos resultados.

Agradeço à minha Grande Amiga Nathalia. Você esteve presente no início desta jornada e fez parte dela, por isso parte deste trabalho também é seu. Foi uma grande parceira de lab, a melhor eu que poderia imaginar, e juntas formamos a melhor dupla da história do lab. Escolhemos caminhos diferentes, mas não separados, pois estamos sempre juntas. Porque cada passo que escolhermos, sei que teremos o apoio uma da outra. A distância (mesmo que interestadual) não é nada para nossa amizade e amor. Obrigada por tudo isso, por tudo que me proporcionou dentro do lab e ainda mais fora dele. Obrigada por ser minha melhor amiga e melhor dupla!

Agradeço à minha amiga Natália Caetano por seu apoio desde o início da graduação. Por mais que pensemos e façamos escolhas diferentes, sempre temos o apoio uma da outra. Obrigada pela amizade de todos esses anos e por tudo que eu pude aprender através dela.

Agradeço à minha amiga Malu pela amizade e apoio nesses últimos anos. Nossa amizade e bate papos deixam meus dias mais leves e divertidos, e com certeza me ajudaram nesses anos do mestrado.

E agradeço a todos que torceram e torcem por mim, que por falha de memória posso ter deixado de mencionar aqui. Obrigada!

RESUMO

SANTOS-NOGUEIRA, T.O.C. *Atividade antineoplásica do extrato glicólico comercial de Aloe vera (L.) Burm. f. em linhagens de câncer de mama*. 2021. 101f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Desde os primórdios da humanidade, plantas vêm sendo utilizadas com propósitos medicinais para tratamento, cura e prevenção de diversas doenças. Uma planta muito usada pela população, tanto para fins cosméticos como medicinais, é a *Aloe vera*, conhecida popularmente como babosa. Numerosos estudos relatam que a folha da babosa possui muitas atividades biológicas, incluindo anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, hepatoprotetora, antiulcerosa e antidiabética. O câncer é umas das maiores causas de morte atualmente, e o câncer mamário é o segundo mais incidente. Diante disso, há uma demanda constante para o desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer eficazes e acessíveis, e o potencial antineoplásico do extrato glicólico de *Aloe vera* é de grande interesse. Por isso, este trabalho tem como objetivo avaliar atividade antineoplásica do extrato glicólico comercial de *Aloe vera*, através do tratamento de células tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e células não tumorais (Vero), a diferentes concentrações do extrato e por diferentes intervalos de tempo. Para tanto, a viabilidade celular foi avaliada por dois métodos: ensaio de proliferação WST-1 e o ensaio de exclusão por Azul de Tripán; enquanto a genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio cometa. Os resultados mostraram que o extrato de *Aloe vera* é citotóxico nas duas maiores concentrações testadas para todas as linhagens, e em 12,5% para as linhagens tumorais no maior tempo de tratamento (24 h) ($p < 0,05$). Nos ensaios de genotoxicidade, foi observado que a linhagem MDA-MB-231 tem um aumento da taxa de dano após 24 horas; enquanto as outras células parecem reparar os danos iniciais, indicando uma recuperação da viabilidade, porém não o suficiente para igualar-se ao controle. Esses resultados sugerem um potencial efeito antineoplásico no maior tempo de tratamento (24 h) e na concentração 12,5% de extrato de *Aloe vera* em células de câncer de mama.

Palavras-chave: Babosa. Câncer. Genotoxicidade. Citotoxicidade. Viabilidade Celular.

ABSTRACT

SANTOS-NOGUEIRA, T.O.C. *Antineoplastic activity of the commercial glycolic extract of Aloe vera (L.) Burm. f. in breast cancer cell lines*. 2021. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Since the beginning of humanity, plants has been used for medicinal purposes to treat, cure and prevent various diseases. A plant widely used by the population, both for cosmetic and medicinal purposes, is *Aloe vera*, popularly known as babosa. Numerous studies report that babosa's leaf has many biological activities, including anticancer, antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory, hepatoprotective, antiulcer and anti-diabetic. Nowadays, cancer is one of the biggest causes of death, and breast one is the second most common cancer overall. Given this, there is a constant demand for the development of new effective and affordable anticancer drugs, and investigation of the antineoplastic potential of the glycolic extract of *Aloe vera* could be interesting. Therefore, this work aims to evaluate an antineoplastic activity of the commercial glycolic extract of *Aloe vera*, through the treatment of breast tumor cells (MDA-MB-231 and MCF-7) and non-tumor cells (Vero), to different concentrations of extract and for different time intervals. Cell viability was evaluated through WST-1 proliferation and the Trypan Blue exclusion assays, while genotoxicity was assessed by the comet assay. *Aloe vera* extract was cytotoxic to all cell lineages for the two highest concentrations tested. Cytotoxicity was also observed for tumor cells, at the concentration of 12.5% in the longest treatment time (24 h) ($p < 0.05$). In genotoxicity tests, it was observed that the cell lineage MDA-MB-231 has an increasing damage rate after 24 hours; while the other cells appear to repair the initial damage, indicating a viability recovery, but not enough to match the control. These results suggest a potential antineoplastic effect of *Aloe vera* extract with concentration 12.5% in the longer exposure time (24 h) in breast cancer cells.

Keywords: Babosa. Cancer. Genotoxicity. Cytotoxicity. Cell Viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.....	20
Figura 2 –	Representação de um corte da folha de <i>Aloe vera</i>	22
Figura 3 –	Composição química do gel de <i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.	22
Figura 4 –	Dados do ano de 2012 e as previsões para 2020 de novos casos de casos de câncer e de mortalidade por câncer no Brasil.....	25
Figura 5 –	Estimativa do número de casos e mortes de câncer no mundo.	25
Figura 6 –	Imagens das células de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231 e MCF-7	27
Figura 7 –	Princípio do ensaio de proliferação WST-1.....	34
Figura 8 –	Protocolo do ensaio de proliferação WST-1.....	35
Figura 9 –	Princípio do ensaio de exclusão por Azul de Tripan.....	35
Figura 10 –	Protocolo do ensaio de exclusão por Azul de Tripan.....	36
Figura 11 –	Viabilidade celular da linhagem Vero tratada com extrato de <i>Aloe vera</i> por 2 e 24 h pelo ensaio de proliferação WST-1.....	46
Figura 12 –	Viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 tratada com extrato de <i>Aloe vera</i> por 2 e 24 h pelo ensaio de proliferação WST-1.	47
Figura 13 –	Viabilidade celular da linhagem MCF-7 tratada com extrato de <i>Aloe vera</i> por 2 e 24 h pelo ensaio de proliferação WST-1.....	48
Figura 14 –	Comparação da viabilidade celular das linhagens Vero, MDA-MB-231 e MCF-7 tratadas com extrato de <i>Aloe vera</i> por 2 e 24 h pelo ensaio de proliferação WST-1.....	49
Figura 15 –	Comparação da viabilidade celular das linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF-7 tratadas com extrato de <i>Aloe vera</i> por 2 e 24 h pelo ensaio de proliferação WST-1.....	50
Figura 16 –	Viabilidade celular da linhagem Vero tratada com extrato de <i>Aloe vera</i> por 2 e 24 h pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripan.	51
Figura 17 –	Viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 tratada com extrato de <i>Aloe vera</i> por 2 e 24 h pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripan.....	52
Figura 18 –	Comparação da viabilidade celular das linhagens Vero e MDA-MB-231 tratadas com extrato e <i>Aloe vera</i> por 2 e 24 h pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripan.	53

Figura 19 –	Genotoxicidade nas células da linhagem Vero tratadas com extrato de <i>Aloe vera</i> por 2 e 24 h pelo ensaio cometa.....	54
Figura 20 –	Distribuição de classes do ensaio cometa da linhagem Vero.....	55
Figura 21 –	Genotoxicidade nas células da linhagem MDA-MB-231 tratadas com extrato de <i>Aloe vera</i> por 2 e 24 h pelo ensaio cometa.....	56
Figura 22 –	Distribuição de classes do ensaio cometa da linhagem MDA-MB-231.	57
Figura 23 –	Genotoxicidade nas células da linhagem MCF-7 tratadas com extrato de <i>Aloe vera</i> por 2 e 24 h pelo ensaio cometa.....	58
Figura 24 –	Distribuição de classes do ensaio cometa da linhagem MCF-7.....	59
Figura 25 –	Comparação da genotoxicidade nas células das linhagens Vero, MDA-MB-231 e MCF-7 tratadas com extrato de <i>Aloe vera</i> por 2 e 24 h pelo ensaio cometa.....	60
Figura 26 –	Viabilidade celular da linhagem Vero tratada com extrato de <i>Aloe vera</i> por 24 h e 24 h+ pelo ensaio de proliferação WST-1.	62
Figura 27 –	Viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 tratada com extrato de <i>Aloe vera</i> por 24 h e 24 h+ pelo ensaio de proliferação WST-1.....	63
Figura 28 –	Viabilidade celular da linhagem MCF-7 tratada com extrato de <i>Aloe vera</i> por 24 h e 24 h+ pelo ensaio de proliferação WST-1.	64
Figura 29 –	Comparação da viabilidade celular das linhagens Vero, MDA-MB-231 e MCF-7 tratadas com extrato de <i>Aloe vera</i> por 24 h e 24 h+ pelo ensaio de proliferação WST-1.....	65
Figura 30 –	Cromatograma do extrato glicólico comercial de <i>Aloe vera</i>	66
Figura 31 –	Cromatograma (<i>base peak</i>) obtido por HPLC-DAD-MS/MS do extrato glicólico comercial de <i>Aloe vera</i>	67
Figura 32 –	Espectro de RMN de ¹ H do extrato de <i>Aloe vera</i>	68
Figura 33 –	¹ H- ¹³ C HSQC do extrato de <i>Aloe vera</i>	68
Figura 34 –	Viabilidade celular da linhagem MDA-MB231 tratada com PBS por 24 h e 24 h+ pelo ensaio de proliferação WST-1.....	69
Figura 35 –	Comparação da viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 tratada com extrato de <i>Aloe vera</i> e PBS por 24 h e 24 h+ pelo ensaio de proliferação WST-1.....	70

Figura 36 – Viabilidade celular da linhagem Vero após o tratamento por 24 h e 24 h+ com extrato de <i>Aloe vera</i> , com a substituição das soluções por PBS antes da reação do reagente WST-1.	71
Figura 37 – Comparação dos resultados de viabilidade celular da linhagem Vero tratada por 24 h ou 24 h+ com extrato de <i>Aloe vera</i> e em que a leitura foi feita com as soluções (meio de cultivo e extrato de <i>Aloe vera</i>) e com PBS.	71
Figura 38 – Fotografias da linhagem tumoral MDA-MB-231 tratada com extrato de <i>Aloe vera</i>	72
Figura 39 – Fotografias da linhagem tumoral MDA-MB-231 tratada com extrato de <i>Aloe vera</i>	73
Figura 40 – Fotografias da linhagem tumoral MDA-MB-231 incubadas com PBS..	74
Figura 41 – Fotografias da linhagem tumoral MCF-7 tratada com extrato de <i>Aloe vera</i>	75
Figura 42 – Fotografias da linhagem Vero tratada com extrato de <i>Aloe vera</i>	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Classificação taxonômica da Aloe vera (L.) Burm. f.....	19
Quadro 2 –	Composição química da folha de Aloe vera (L.) Burm. f.	21
Quadro 3 –	Fórmula utilizada para contagem de células na Câmara de Neubauer.	31
Quadro 4 –	Classificação visual dos cometas de acordo com os danos.	41
Quadro 5 –	Fórmula utilizada para taxa de dano no DNA.....	41

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	28
1.1	Objetivo geral	28
1.2	Objetivos específicos	28
2	MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1	Extrato de <i>Aloe vera</i>	29
2.2	Cultura de células	29
2.2.1	<u>Linhas celulares e suas condições de cultivo</u>	29
2.2.2	<u>Descongelamento celular</u>	29
2.2.3	<u>Cultivo, manutenção e tripsinização</u>	30
2.2.4	<u>Contagem celular na câmara de Neubauer</u>	31
2.2.5	<u>Plaqueamento das células</u>	31
2.3	Condições experimentais	32
2.4	Ensaio de proliferação WST-1	33
2.5	Ensaio de exclusão por Azul Tripán	35
2.6	Ensaio Cometa	36
2.6.1	<u>Preparo das lâminas com solução de agarose de ponto de fusão normal (agarose NMP)</u>	37
2.6.2	<u>Preparo da solução de agarose de ponto de fusão baixo (agarose LMP)</u>	37
2.6.3	<u>Aplicação da matriz biológica nas lâminas</u>	38
2.6.4	<u>Preparo das soluções de lise e imersão das lâminas</u>	38
2.6.5	<u>Eletroforese em gel em condições alcalinas</u>	39
2.6.6	<u>Neutralização</u>	39
2.6.7	<u>Coloração com prata</u>	40
2.6.8	<u>Classificação dos cometas</u>	40
2.7	Análise fitoquímica	41
2.7.1	<u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjos Diodos (CLAE-DAD ou HPLC-DAD)</u>	42

2.7.2	<u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjos Diodos acoplado à Espectrofotometria de Massa Sequencial (CLAE-DAD-ES/ES ou HPLC-DAD-MS/MS)</u>	43
2.7.3	<u>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</u>	44
2.8	Análise visual da morfologia celular	45
2.9	Análise estatística	45
3	RESULTADOS	45
3.1	Fase 1	45
3.1.1	<u>Citotoxicidade</u>	45
3.1.1.1	Ensaio de proliferação WST-1.....	45
3.1.1.2	Ensaio de exclusão por Azul de Tripán.....	50
3.1.2	<u>Genotoxicidade</u>	53
3.1.2.1	Ensaio Cometa.....	53
3.2	Fase 2	60
3.2.1	<u>Citotoxicidade</u>	60
3.2.1.1	Ensaio de proliferação WST-1.....	61
3.3	Perfil fitoquímico do extrato	65
3.3.1	<u>HPLC-DAD</u>	65
3.3.2	<u>HPLC-DAD-MS/MS</u>	66
3.3.3	<u>RMN</u>	67
3.4	Resultados complementares	68
3.4.1	<u>Ensaio de proliferação WST-1</u>	69
3.4.1.1	Substituição do extrato glicólico de <i>Aloe vera</i> por PBS durante a incubação.....	69
3.4.1.2	Substituição da solução por PBS somente antes da reação do WST-1.....	70
3.5	Análise visual da morfologia celular	71
4	DISCUSSÃO	77
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICE - Soluções utilizadas no ensaio cometa	107
	ANEXO - Bula do extrato cedida pelo fabricante	109

INTRODUÇÃO

Desde o início da história da humanidade, plantas vêm sendo utilizadas com propósitos medicinais e têm sido a base da medicina moderna (SOLOWEY, 2014). Diversos vegetais e formas de preparo são utilizados para diferentes fins terapêuticos e de prevenção no mundo inteiro, e muitas vezes seu uso é empírico, sem o devido conhecimento acerca de possíveis efeitos colaterais. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Os efeitos do uso dessas plantas como terapia podem ser diretos sobre as células ou indiretos, estimulando o sistema imunológico do indivíduo (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005; DJAFOUA *et al.*, 2015). Por causa do grande uso de vegetais na medicina popular, a pesquisa científica básica em torno desse tema, assim como a indústria farmacêutica, vem crescendo muito, principalmente devido ao uso estar baseado no empirismo e aos princípios ativos que podem ser isolados para promover atividade biológica.

O Brasil possui uma vasta biodiversidade, que corresponde a cerca de 22% do total existente no planeta, e assim como grande parte da população mundial, há uma longa tradição no uso de plantas medicinais (DUTRA *et al.*, 2016). Porém, plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005). A tradição e a crença popular na inocuidade de produtos naturais ainda são grandes, porém, algumas substâncias podem causar efeitos indesejados e até intoxicação, o que ocorre comumente em fitomedicamentos, através de possíveis adulterações e toxidez, como por ação sinérgica (interação) com outras drogas (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005). Por isso, pesquisas de efeitos biológicos com plantas medicinais são de grande interesse para elucidar os efeitos benéficos e prejudiciais do seu uso.

Há três categorias de medicamentos naturais que muitas vezes são vistos como sinônimos, mas na realidade não são. A OMS define planta medicinal como todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas

com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos (WHO, 1998). Já os fitoterápicos são definidos, segundo a ANVISA, como todo medicamento obtido e elaborado tecnicamente, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais, com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente. Não podem estar incluídas substâncias ativas de outras origens, não sendo considerado produto fitoterápico quaisquer substâncias ativas, ainda que de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas (portaria nº 6, de 31 de janeiro de 1995). Neste último caso encontra-se o fitofármaco, que por definição é a substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais ou mesmo, mistura de substâncias ativas de origem vegetal (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005). No Brasil, o SUS (Sistema Único de Saúde) promove desde 2006 o Programa Nacional de Plantas Medicináveis e Fitoterápicos (PNPMF) (Portaria Interministerial nº 2.960/2008), cujo objetivo é “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (Ministério da Saúde, 2015).

Uma planta comumente usada pela população em geral é a *Aloe vera*, conhecida popularmente como babosa e pertencente à família Aloaceae (Quadro 1). Ela possui um nome científico sinônimo, *Aloe barbadensis* Mill., porém, de acordo com a *International Rules of Botanical Nomenclature* (Regras Internacionais de Nomenclatura Botânica), *Aloe vera* (L.) Burm. f. é o nome legítimo desta espécie (WHO, 1999). A palavra “Aloe” tem suas raízes na palavra árabe “*alloeh*”, que significa substância amarga brilhante, enquanto “*vera*” em latim significa “verdade” (SÁNCHEZ-MACHADO *et al.*, 2017; BAJPAI, 2018). A planta cresce em uma grande variedade de climas, incluindo áreas temperadas e subtropicais e, embora seja nativa do sul e do leste da África, ao longo do Nilo, na região de Sudão, foi introduzida nos países do norte da África e do Mediterrâneo (SAHU *et al.*, 2013; MANVITHA e BIDYA, 2014; SÁNCHEZ-MACHADO *et al.*, 2017). Atualmente, ela cresce em todas as regiões de clima quente do globo, incluindo África, sul da Ásia e dos Estados Unidos, Brasil e outros países da América do Sul (BOZZI *et al.*, 2007; *Global Biodiversity Information Facility*, 2020).

Quadro 1 - Classificação taxonômica da *Aloe vera* (L.) Burm. f.

<u>Classificação taxonômica</u>
Reino – <i>Plantae</i>
Sub-reino – <i>Tracheobionta</i> (Plantas vasculares)
Superdivisão – <i>Espermatófita</i> (Plantas com sementes)
Divisão – <i>Magnoliophyta</i> (Plantas com flores)
Classe – <i>Liliopsida</i> (Monocotiledonea)
Subclasse - <i>Liliidae</i>
Ordem – <i>Liliales</i>
Família – <i>Aloaceae</i>
Gênero – <i>Aloe</i> L.
Espécie – <i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.

Nota: Conhecida popularmente como babosa.

Fonte: USDA – United States Department of Agriculture, 2018.

Sendo uma espécie xerófito, ou seja, que vive em ambientes com baixa disponibilidade de água, adaptou-se com um tecido de armazenamento de água, classificando-se como uma planta suculenta. *Aloe vera* é uma planta perene, resistente à seca (resiste a mais de sete anos sem água) com folhas grossas, afiladas, em forma de lanças verdes, suculentas, basais, afiadas e pontiagudas (JOSEPH e RAJ, 2010; MANVITHA & BIDYA, 2014; SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2017). As folhas se unem no pé formando uma roseta (SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2017) (Figura 1) e armazenam uma substância gelatinosa que pode ser facilmente extraída e incorporada em vários produtos comercializados livremente em muitos países (DE LIMA, 2016).

Figura 1 - *Aloe vera* (L.) Burm. f.



Fonte: *Global Biodiversity Information Facility* <<https://www.gbif.org/pt/occurrence/2856749386>>, 2020.

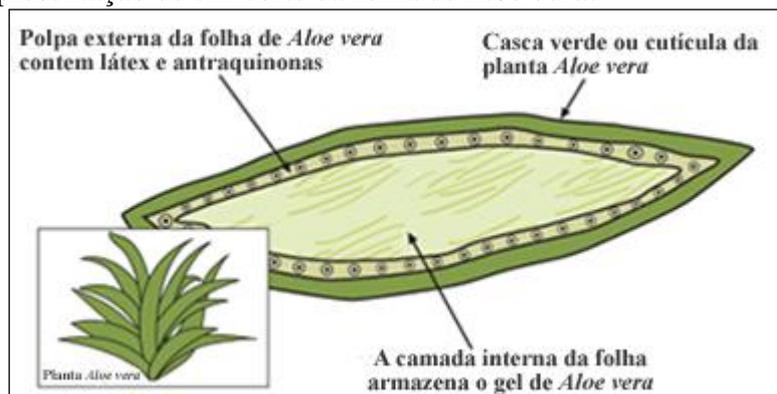
As folhas consistem em três camadas, isto é, gel, látex e camada externa (MAAN *et al.*, 2018) (Figura 2). O gel, também conhecido como suco de Aloe, é a camada interna constituída de tecidos moles, claros, úmidos e escorregadios, com grandes células de parênquima. Este é um material gelatinoso mucilaginoso transparente. O gel contém água (99%), glucomananas, aminoácidos, lipídios, esteróis e vitaminas (HAMMAN, 2008; RAMACHANDRA e RAO, 2008; BENÍTEZ *et al.*, 2015; MAAN *et al.*, 2018). Com base na matéria seca, o gel consiste em 55% de polissacarídeos, 17% de açúcares, 7% de proteínas, 4% de lipídios, 16% de minerais, 1% de compostos fenólicos e uma variedade de vitaminas, incluindo vitamina A, C, E, B1, B2 B12, niacina, colina e ácido fólico (FEMENIA *et al.*, 1999; NI *et al.*, 2004; RADHA e LAXMIPRIYA, 2014; AHLAWAT e KHATKAR, 2014; MAAN *et al.*, 2018) (Figura 3). Este produto da folha é o mais frequentemente usado para diversos fins devido à grande quantidade de vitaminas, enzimas, minerais e polissacarídeos. Já a camada média, o látex, é o exudado amarelo amargo das células pericíclicas que contém antraquinonas, seiva amarga amarelada e glicosídeos (HAMMAN, 2008; MAAN *et al.*, 2018). O látex é utilizado por suas propriedades laxativas. E a camada externa é uma epiderme espessa coberta com cutícula em torno do mesofilo, que consiste em 15 a 20 células, o que dá proteção à matriz de gel e ajuda na síntese de carboidratos e proteínas (MISIR, BRISHTI e HOQUE, 2014; MAAN *et al.*, 2018). A composição química da folha de *Aloe vera* (L.) Burm. f. está representada no Quadro 2 e mais especificamente do seu gel na Figura 3.

Quadro 2 - Composição química da folha de *Aloe vera* (L.) Burm. f

Composição química de <i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.	
ANTRAQUINONA/ANTRONA	Aloe-emodin, ácido-aloiético, antranol, aloina A e B (ou de modo geral, barbaloina), isobarbaloina, emodina, éster de ácido cinâmico.
CARBOIDRATOS	Manana pura, acetilato de manana, acetilato glicomanana, glucogalactomanana, galactano, galactogalacturano, arabinogalactano, celulose, galactoglicoarabinomanana, substância péptica, xileno.
ENZIMAS	Fosfatase Alcalina, amilase, carboxipeptidase, catalase, ciclooxidase, ciclooxigenase, lipase, oxidase, carboxilase fosfoenolpiruvato, superóxido dismutase
COMPONENTES INORGÂNICOS	Cálcio, cloro, cromo, cobre, ferro, magnésio, manganês, potássio, fósforo, sódio, zinco.
AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS E NÃO ESSENCIAIS	Alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, treonina, tirosina, valina.
COMPONENTES ORGÂNICOS E LIPÍDICOS	Ácido araquidônico, ácido α -linolenico, esteróides (colesterol, campesterol, β sitosterol), triglicerídeos, ligninas, sorbato de potássio, triterpenóides, giberilina, ácido salicílico, ácido úrico.
PROTEÍNAS	Lectina, substância lectina-like.
SACARÍDEOS	Manose, glicose, aldopentose, L-rhamnose, celulose
VITAMINAS	Vitaminas A, B1, B2, B6, C, beta-caroteno, colina, ácido fólico, alfa-tocoferol.

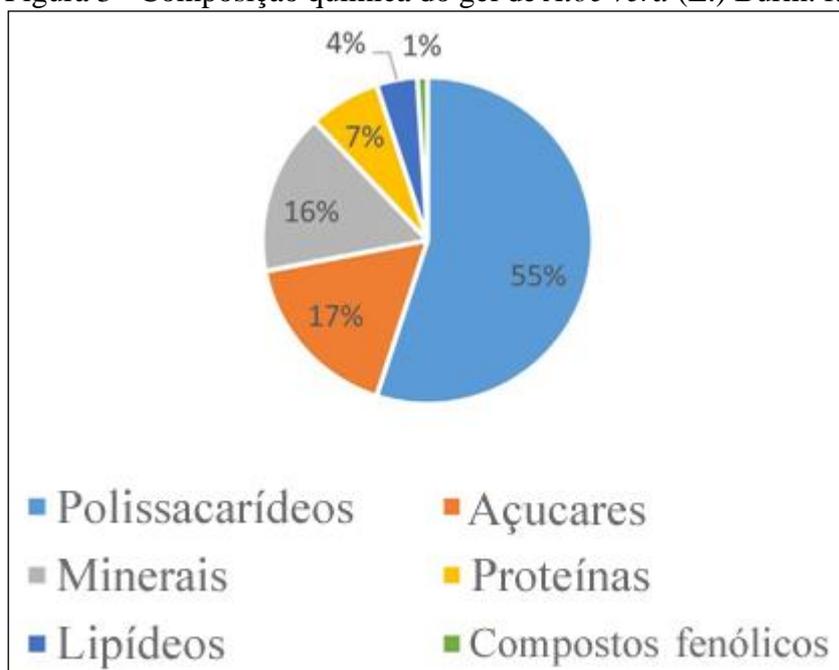
Fonte: Hamman, 2008 e Sharrif e Sandeep, 2011.

Figura 2 - Representação de um corte da folha de *Aloe vera*.



Nota: Na representação podem ser vistas as três camadas da folha: revestimento exterior, látex e gel.
 Fonte: traduzido de National Institute of Environmental Health Science, 2018.

Figura 3 - Composição química do gel de *Aloe vera* (L.) Burm. f.



Nota: Composição baseada na matéria seca.
 Fonte: traduzido de Maan, 2018.

A *Aloe vera* é amplamente estudada devido ao seu uso tanto na medicina popular quanto em cosméticos. Em todo o mundo é visto um aumento na pesquisa de plantas e um grande número de evidências aponta para o imenso potencial de plantas usadas em vários sistemas tradicionais (DAHANUKAR, KULKARNI e REGE, 2000; BAJPAI, 2018). E esta planta tem desfrutado de uma longa história de fornecimento de inúmeros benefícios para a saúde, constituindo-se um dos remédios fitoterápicos mais utilizados em todo o mundo (BAJPAI, 2018). Os registros de seu uso são bem antigos, como os tabletes de argila sumérios datados de 2100 a.C. (KRAMER, 1954; BAJPAI, 2018) e os

papiros egípcios de 1552 d.C. mencionando propriedades laxativas da babosa (TAYLOR, 1965; BAJPAI, 2018). *Aloe vera*, conhecida como a "planta da imortalidade" no início do Egito, é usada como uma medicina tradicional nas culturas árabe, chinesa, egípcia, grega, indiana, japonesa, coreana e romana (GRINDLAY e REYNOLDS, 1986; ATHERTON, 1998). Devido às suas atividades farmacológicas, a *Aloe vera* encontra seu lugar na ampla lista de aplicações terapêuticas de suas diferentes partes, que são empregadas na gestão tradicional de diversas doenças veterinárias e humanas (BLUMENTHAL *et al.*, 1998; BAJPAI, 2018). Reynolds e Dweck (1999), em sua revisão, citam diversos estudos indicando que a *Aloe vera* possui atividades biológicas que inclui: anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, hepatoprotetora, antiulcerosa, antidiabética, cicatrização de feridas, proteção contra danos da pele por raios X, proteção contra câncer de pulmão, proteção contra problemas intestinais, aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL), redução da lipoproteína de baixa densidade (LDL), tratamento de herpes genital e psoríase. Particularmente, sua atividade antineoplásica é de grande interesse para o presente estudo.

Agentes ativos contra neoplasias são muito procurados e as preparações de *Aloe vera* são candidatas óbvias (REYNOLDS & DWECK, 1999). As glicoproteínas (lectinas), antraquinonas e polissacarídeos, presente no gel de *A. vera*, foram relatados como tendo efeitos antitumorais e antiulcerosos, além de aumentar a proliferação de células dérmicas humanas normais (YAGI *et al.*, 1997; CHOI *et al.*, 2001; YAGI *et al.*, 2003; BAJPAI, 2018). Em especial, duas antraquinonas têm se destacado nas pesquisas anticâncer: aloína e aloe-emodina. Aloína inibe a secreção de VEGF em células cancerígenas. O VEGF (*vascular endothelial growth factor*) é uma citocina pró-angiogênica e induz a neovascularização tumoral (PECERE *et al.*, 2000; BAJPAI, 2018). Aloe-emodina é um derivado da antracenediona proveniente da folha de *A. vera* que possui efeito inibitório na expressão gênica de N-acetil transferase que desempenha um papel inicial no metabolismo de carcinógenos de aril amina em células humanas de melanoma (BAJPAI, 2018). Estudos mostram uma notável atividade antineoplásica da aloe-emodina através de mecanismos moleculares diversos, como a indução de apoptose, interrupção do ciclo celular, antimetástase e aumento da função imunológica, em diferentes células tumorais, como de pulmão, fígado e cólon (DIVYA *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2017).

O câncer é umas das maiores causas de morte da atualidade. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), em 2012, em todo o mundo, houve 14,1 milhões de novos casos, 8,2 milhões de mortes e 32,6 milhões de pessoas vivendo com câncer dentro de cinco anos de diagnóstico. A previsão para o Brasil em 2020 era de 553.050 novos casos de câncer (aumento de quase 21% comparado à 2012), com taxa de mortalidade de cerca de 52%, segundo estatísticas GLOBOCAN 2012 (IARC) (Figura 4). Diante disso, pesquisas relacionadas a esta doença são essenciais. Portanto, há uma demanda constante para o desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer eficazes e acessíveis (COSERI, 2009; SOLOWEY *et al.*, 2014). Muito já tem sido feito, tanto para compreensão dos seus mecanismos, formas de prevenção, diagnóstico e tratamento. Aproximadamente 60% das drogas usadas atualmente para o tratamento do câncer foram isoladas de produtos naturais (GORDALIZA, 2007; SOLOWEY *et al.*, 2014) e o reino vegetal tem sido a fonte mais significativa (SOLOWEY *et al.*, 2014). As plantas medicinais constituem uma alternativa comum para o tratamento do câncer em muitos países ao redor do mundo (GERSON-CWILICH, SERRANO-OLVERA e VILLALOBOSPRIETO, 2006; TASCILAR *et al.*, 2006; SOLOWEY *et al.*, 2014). Mais de 3000 plantas já foram relatadas por ter propriedades anticancerígenas, inclusive a *Aloe vera* (SOLOWEY *et al.*, 2014).

Entre os tipos de câncer mais frequentes, o câncer de mama é o câncer com maior incidência no mundo (GLOBOCAN, 2021) (Figura 5). A taxa de mortalidade deste câncer não é uma das maiores, porém ainda sim é significativa, sendo de aproximadamente 30%. De acordo com as previsões do IARC, no Brasil, em dois anos o número de casos de câncer de mama em mulheres aumentará 5,3% e em 2040 o aumento acumulado será de 55,4%, referente ao ano de 2018. Apesar de também atingir homens, a ocorrência nesses indivíduos é muito baixa.

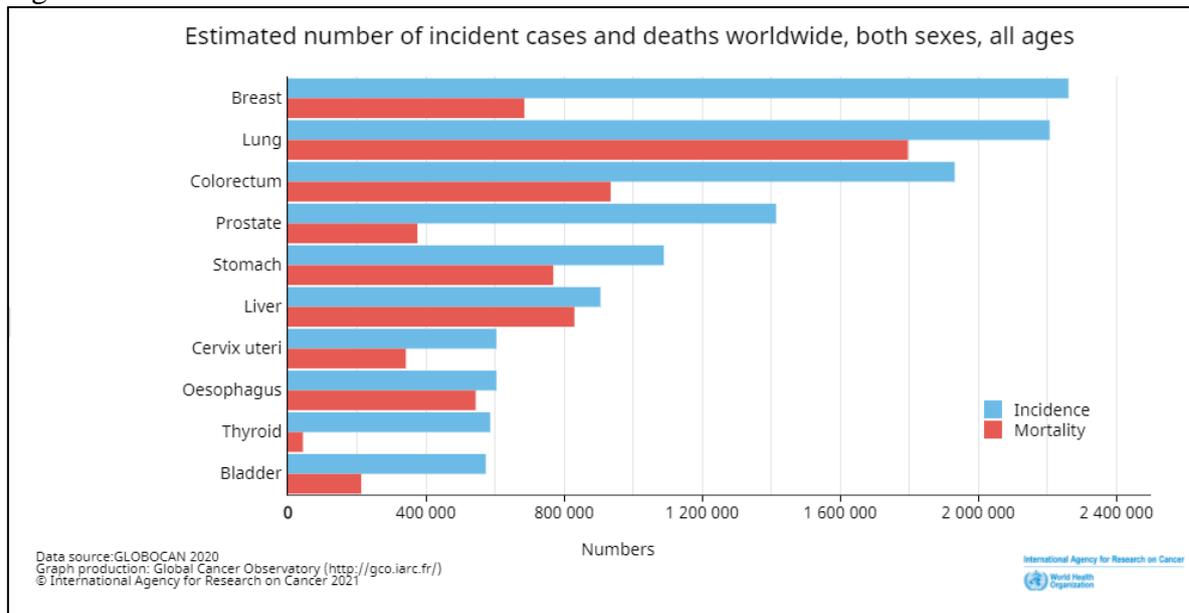
Figura 4 - Dados do ano de 2012 e as previsões para 2020 de novos casos de casos de câncer e de mortalidade por câncer no Brasil.

Brazil				
All cancers excl. non-melanoma skin cancer				
Year	Estimated number of new cancers (all ages)	Male	Female	Both sexes
2012		223077	214515	437592
	ages < 65	104505	127955	232460
	ages >= 65	118572	86560	205132
2020		285469	267581	553050
	ages < 65	125817	148997	274814
	ages >= 65	159652	118584	278236
Demographic change		62392	53066	115458
	ages < 65	21312	21042	42354
	ages >= 65	41080	32024	73104
GLOBOCAN 2012 (IARC) - 7.7.2018				
Brazil				
All cancers excl. non-melanoma skin cancer				
Year	Estimated number of cancer deaths (all ages)	Male	Female	Both sexes
2012		121088	103606	224694
	ages < 65	51484	49029	100513
	ages >= 65	69604	54577	124181
2020		155416	132806	288222
	ages < 65	62166	58213	120379
	ages >= 65	93250	74593	167843
Demographic change		34328	29200	63528
	ages < 65	10682	9184	19866
	ages >= 65	23646	20016	43662
GLOBOCAN 2012 (IARC) - 7.7.2018				

Legenda: novos casos de casos de câncer (a) e de mortalidade por câncer (b).

Fonte: *International Agency of Research on Cancer (IARC)* <<http://globocan.iarc.fr/>>, 2018.

Figura 5 - Estimativa do número de casos e mortes de câncer no mundo.

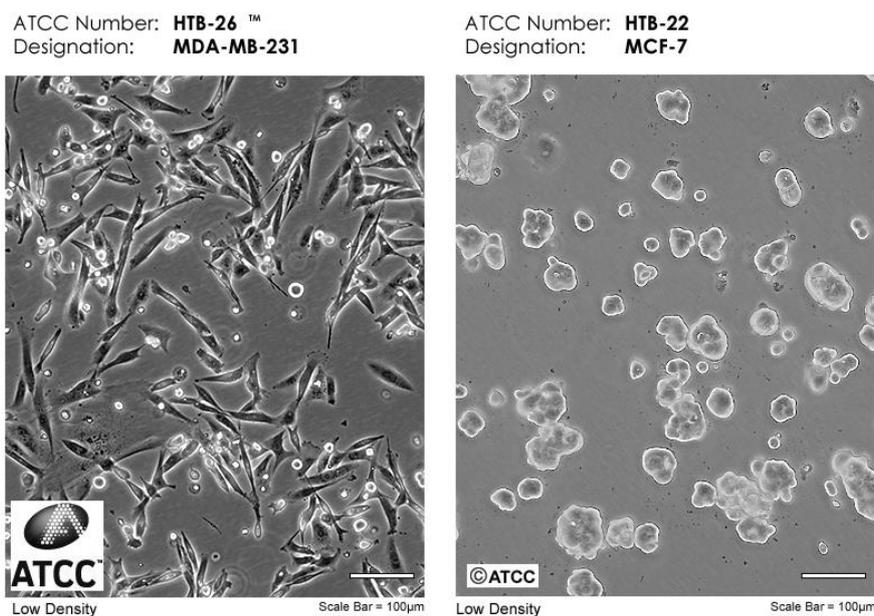


Legenda: número de casos (azul) e mortes (vermelho) de câncer no mundo, em ambos os sexos e todas as idades para 2020, realizado pela IARC.

Fonte: *International Agency of Research on Cancer (IARC)* <<http://globocan.iarc.fr/>>, 2021.

Métodos de análise *in vitro*, como a utilização de linhagens celulares de câncer mamário, auxiliam na compreensão da fisiologia da doença e também no desenvolvimento de medicamentos anticâncer (RAVI, SNEKA E JOSHIPURA, 2019). Duas linhagens celulares amplamente utilizadas no estudo do câncer de mama são a MDA-MB-231 e MCF-7 (Figura 6). O estudo com essas duas linhagens tem como vantagem o fato delas possuírem receptores distintos em suas membranas, sendo assim, representam o câncer de mama em estágios diferentes de desenvolvimento e podem apresentar respostas diferenciadas às condições do ambiente. Esses receptores são comumente utilizados para classificar linhagens de câncer de mama, e são: receptor de estrogênio (*estrogen receptor* - ER), receptor de progesterona (*progesterone receptor* - PR) e receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (*human epidermal growth factor receptor 2* - HER2). A linhagem MCF-7 possui receptores de estrogênio e progesterona, porém é negativa para o receptor fator HER2, sendo pouco agressiva e não invasiva (GEST *et al.*, 2013; COMŞA, CÎMPEAN e RAICA, 2015). A MDA-MB-231 é chamada de triplo-negativa por não ter tais receptores e é considerada altamente agressiva e invasiva (European Collection of Authenticated Cell Cultures - ECACC). Devido a essas diferenças, os tratamentos para cânceres de mama com tais características também são diferenciados, sendo indicado o hormonal (terapia alvo) no primeiro caso e o quimioterápico (inespecífica) no segundo (MOSES, EDWARDS e BRANTLEY, 2016).

Figura 6 - Imagens das células de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231 e MCF-7



Legenda: MDA-MB-231 (esquerda) e MCF-7 (direita), em baixa densidade.
Fonte: <<https://www.atcc.org/en.aspx>>, 2019.

Portanto, o câncer de mama pode ser tratado com quimioterapia, radioterapia, agente anti-hormonal e terapias alvo. No entanto, como a incidência de câncer de mama continua a aumentar, é necessário o desenvolvimento de terapias alternativas com maior eficácia (TSENG *et al.*, 2017). Por isso, a importância do presente trabalho está em estudar a possível ação antineoplásica do extrato glicólico de *Aloe vera* (L.) Burm. f. em linhagens de câncer de mama.

1 OBJETIVO

1.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antineoplásica do extrato glicólico comercial de *Aloe vera*, através do tratamento de células tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e células não tumorais (Vero).

1.2 Objetivos específicos

- Analisar a citotoxicidade do extrato através do ensaio de proliferação WST-1 e do ensaio de exclusão por Azul de Tripan;
- Analisar a genotoxicidade do extrato nas diferentes linhagens celulares através do ensaio cometa;
- Determinar o perfil fitoquímico do extrato glicólico comercial de *Aloe vera*;

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extrato de *Aloe vera*

O extrato glicólico de *Aloe vera* utilizado no presente estudo foi doado pela empresa Mapric® (São Paulo, Brasil) e foi extraído do suco condensado seco das folhas, segundo o fabricante (Anexo 1). As linhagens celulares foram incubadas com o extrato nas proporções de 1,56%, 3,12%, 6,25%, 12,5%, 18,75%, 25% e 50%, diluído em seus respectivos meios de cultivo.

2.2 Cultura de células

2.2.1 Linhagens celulares e suas condições de cultivo

As células das linhagens Vero (células epiteliais renais de *Cercopithecus aethiops*), MDA-MB-231 e MCF-7 (ambas derivadas de adenocarcinoma de células epiteliais da glândula mamária humana) (*American Type Culture Collection* - ATCC) foram cultivadas em diferentes meios de cultivo, ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina com antimicótico - Vitrocell) e 1% de glutamina. As células Vero foram cultivadas em Meio Dulbecco MEM (DMEM) enquanto as células MDA-MB-231 e MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI. Os três tipos celulares são aderentes e crescem em monocamada e foram cultivadas nas mesmas condições: em garrafas de 75 cm², em estufa à 37°C e 5% de CO₂.

2.2.2 Descongelamento celular

Para o início do cultivo, as células foram retiradas de um estoque congelado à temperatura de -80°C . Essas células foram congeladas em uma solução de congelamento composta por 90% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). O DMSO é um crioprotetor e evita a formação de cristais de gelo que perfurem a membrana celular, porém em temperatura ambiente pode ser tóxico às células (Weng e Beauchesne, 2020), por isso, deve ser eliminado após o descongelamento. As células estavam alocadas em um criotubo (2 mL) e foram descongeladas rapidamente em água ultrapura à 37°C em banho-maria. Após descongelamento total do conteúdo do criotubo, este foi transferido para um tubo de polipropileno de fundo cônico de 15 mL (tipo *falcon*) e diluído com PBS, e então centrifugado por 3 minutos à 1000 rpm (Centrífuga Excelsa Baby II – Modelo 206-R). O sobrenadante foi então descartado, eliminando assim os resquícios de DMSO. Após essa etapa, foi adicionado 1 mL do respectivo meio de cultivo ao tubo *falcon* para que o precipitado de células (*pellet*) fosse solubilizado, deixando as células em suspensão, e então esse conteúdo foi transferido para a garrafa de cultivo, onde foi adicionado mais meio (10 mL) para a nutrição e crescimento celular.

2.2.3 Cultivo, manutenção e tripsinização celular

Para o cultivo celular, as células foram mantidas em garrafas de 75 cm^2 na estufa à 37°C e 5% de CO_2 com seus respectivos meios suplementados. O meio de cultivo foi trocado a cada três ou quatro dias, ou conforme a necessidade (a variação no pH do meio pode ser observada através da mudança de cor, de rosado para alaranjado/amarelado), para repor os nutrientes e eliminar as excretas celulares.

Quando visualmente a confluência atingia 80% (densidade celular na área delimitada) na garrafa, as células foram dissociadas através da ação da tripsina, que é uma enzima que degrada as proteínas de adesão da membrana, para serem plaqueadas para os experimentos. O meio foi descartado e PBS adicionado para a limpeza da garrafa, eliminando qualquer proteína que pudesse interferir na ação da tripsina. Então foram adicionados 3 mL de tripsina (Tripsina EDTA 250 mg%) e a garrafa levada à estufa mais

uma vez, por 3 minutos. Após este tempo, foi possível observar através do microscópio óptico invertido (INV-100 – Bel Equipments) que as células não estavam mais aderidas à parede da garrafa. Foram então adicionados à garrafa 5 mL de meio suplementado para aumentar a oferta de substrato (proteínas presentes no meio de cultivo) para a enzima, e assim inibir a tripsina, impedindo que ela degradasse mais proteínas da membrana celular além daquelas que participam da adesão celular. Todo esse conteúdo foi transferido para um tubo *falcon* (15 mL) e centrifugado por 3 minutos à 1000 rpm (Centrífuga Excelsa Baby II – Modelo 206-R), e depois o sobrenadante foi descartado, e adicionado 1 mL de meio para solubilizar o *pellet*. Assim, foi retirada uma alíquota (10 µL) a qual foi transferida para um microtubo (1,5 mL) para a contagem.

2.2.4 Contagem celular na câmara de Neubauer

Para a contagem, foram adicionados mais 10 µL do corante azul de tripan e a solução foi homogeneizada. Desta solução, 10 µL foram transferidos à câmara de Neubauer, onde foi contabilizada a quantidade de células. Através das fórmulas apresentadas no Quadro 3, foi possível obter o número de células correspondente.

Quadro 3 - Fórmula utilizada para contagem de células na Câmara de Neubauer.

$$\frac{\text{Somatório do } n^{\circ} \text{ de células dos 4 quadrantes}}{4} \times 10^4 \times \text{Fator de diluição} = \text{Células/mL}$$

$$\text{Fator de diluição} = \frac{\text{Volume final (solução)}}{\text{Volume inicial (células)}}$$

Fonte: Peres & Curi, 2005.

2.2.5 Plaqueamento das células

Segundo a padronização realizada por De Lima (2016), a concentração ideal para semear nas placas de 96 poços é a de 3×10^3 células por poço. Nesta concentração, as células apresentarão confluência de aproximadamente 60% após as 48 horas de cultivo e após isso podem ser tratadas com os agentes. Posteriormente, foi utilizada a concentração de células de 10^4 células por poço cultivadas por somente 24 horas, pois segundo a mesma padronização, também se observa 60% de confluência. Para placas de 24 poços, a concentração padronizada e utilizada foi de $2,5 \times 10^4$ células por poço.

Após obter o número total de células da garrafa de cultivo através da contagem com câmara de Neubauer, foram então feitos cálculos utilizando a regra de três para plaquear a quantidade de células correspondente a padronização citada nos poços da placa de 96 poços. Após adicionar as células aos poços, o volume foi completado para chegar à 200 μ L e a placa foi mantida em estufa à 37°C e 5% de CO₂ pelo tempo padronizado.

2.3 Condições experimentais

Para o estudo, as células tinham o meio de cultivo substituído por uma solução contendo meio suplementado e extrato comercial de *Aloe vera* em diferentes concentrações (1,56%, 3,12%, 6,25%, 12,5%, 25% e 50%) e o controle (somente o meio de cultivo suplementado) (Tabela 1). As células foram tratadas com essas diferentes concentrações do extrato por 2 e 24 horas na estufa à 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, ao longo do estudo e de acordo com os resultados observados, foram selecionadas duas das concentrações já estudadas (12,5% e 25%) e uma intermediária a elas (18,75%) para a fase 2 dos experimentos. Além disto, mais um tempo de tratamento foi acrescentado, o qual foi chamado de 24 h+. Esse tempo consistia em expor as células por 24 horas ao extrato e após isso, lavar os poços com PBS, acrescentar meio de cultivo suplementado fresco e cultivar as células por mais 24 horas, sem a presença do extrato glicólico de *Aloe vera*.

No decorrer do estudo, as células também foram tratadas com uma solução contendo meio de cultivo e PBS, nas seguintes concentrações de PBS: 12,5%, 25% e

50%. O tempo que as células foram tratadas foi de 24 horas e posteriormente também houve a troca por meio de cultivo sem extrato e manutenção das células por mais 24 horas. Esse experimento foi realizado para garantir que a diminuição da viabilidade celular observada era resultado da ação do extrato glicólico de *Aloe vera*, e não devido ao fato da célula estar recebendo menor volume de meio de cultivo que o controle.

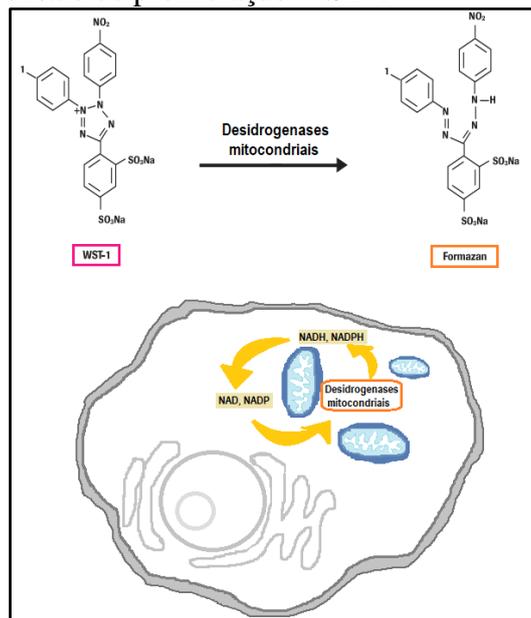
Tabela 1 - Quantidade de extrato e meio de cultivo referente a cada concentração por poço da placa de 96 poços (200 μL).

Concentrações de <i>Aloe vera</i>	Extrato	Meio
50%	100 μL	100 μL
25%	50 μL	150 μL
18,75%	37,5 μL	162,5 μL
12,5%	25 μL	175 μL
6,25%	12,5 μL	187,5 μL
3,12%	6,25 μL	193,75 μL
1,56%	3,12 μL	196,88 μL
0% (Controle)	0 μL	200 μL

2.4 Ensaio de proliferação WST-1

O Ensaio de proliferação por WST-1 é uma técnica colorimétrica que avalia o metabolismo celular, e com isso, indiretamente, também é capaz de medir a viabilidade celular. O princípio da técnica se baseia na clivagem do sal tetrazólio (WST-1) em formazan por enzimas desidrogenases mitocondriais (succinato-tetrazólio redutase) durante o metabolismo e a respiração celular (Figura 7). O formazan originado possui uma cor amarelo-alaranjado, o qual pode ser quantificado a 450 nm, utilizando um leitor de placa ELISA (Leitor de microplacas Polaris, Celer). Desta maneira, é possível relacionar a absorbância da amostra com o metabolismo mitocondrial e a viabilidade celular.

Figura 7 - Princípio do ensaio de proliferação WST-1.

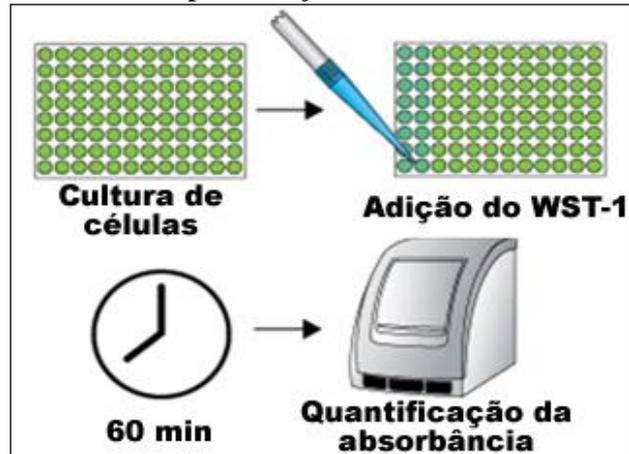


Fonte: A autora.

Após o período de tratamento das células ao extrato glicólico de *Aloe vera* foi realizado o ensaio de proliferação WST-1 adicionando 2 μ L do reagente e 8 μ L do respectivo meio de cultivo completo em cada poço. Depois disto, as culturas celulares foram incubadas na estufa à 37°C e 5% de CO₂ por 1 hora antes da leitura no leitor de placa de ELISA (Figura 8). A leitura fornece os resultados referentes à absorbância. O ensaio foi padronizado de acordo com as especificações da *Roche Applied Science* (Manual Versão 16/Fevereiro de 2011 – *Cell Proliferation Reagent WST-1*), com modificações.

Ao longo do estudo, foi realizado teste de comprovação de interferência da cor dos respectivos extratos nas leituras realizadas. Para isto, antes da adição do reagente WST-1, todas as soluções foram substituídas por PBS, assim não teria influência da cor, visto que todos os grupos estariam iguais e transparentes. E as células, por estarem aderidas, não sofreriam modificações no seu número além daquelas provocadas anteriormente pela exposição ao extrato. A diferença seria, após a adição de WST-1 e o tempo de incubação na estufa (1 h), apenas em decorrência à quantidade de formazan produzido, que seria proporcional a quantidade de células viáveis.

Figura 8 - Protocolo do ensaio de proliferação WST-1.

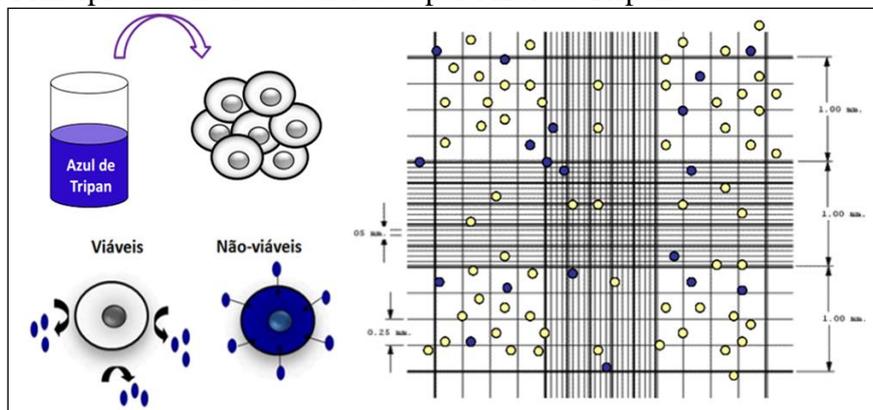


Fonte: adaptado de <<https://www.takarabio.com/products/cell-biology-assays/cell-biology-reagents/wst-1-cell-proliferation/>>

2.5 Ensaio de exclusão por Azul de Tripán

O ensaio de exclusão por Azul de Tripán é uma técnica muito utilizada para avaliar citotoxicidade por meio da visualização e diferenciação das células vivas e mortas (PERES e CURI, 2005). O princípio do ensaio é baseado na seletividade da membrana plasmática, que é perdida quando a célula se torna inviável. A célula morta, sem a seletividade da membrana, permite que o corante penetre o citoplasma, tornando-se azul, enquanto as que permanecem viáveis se mantêm transparentes sem o corante (Figura 9).

Figura 9 - Princípio do ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

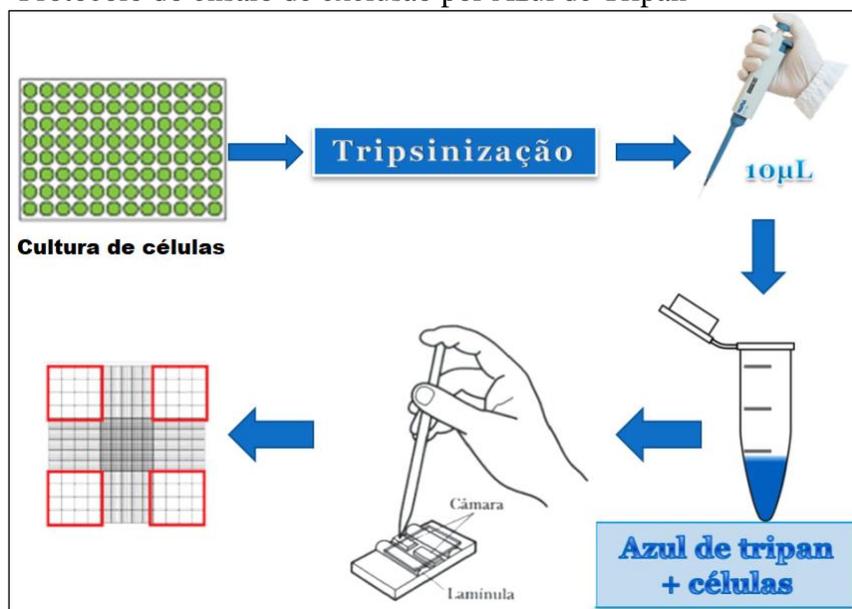


Fonte: A autora.

Para esse ensaio, após o tratamento por 2 e 24 horas, as células foram retiradas da placa de 96 poços com 70 μ L de tripsina, ficando por 5 minutos na estufa e a tripsina foi

inativada com 100 μL de meio. Então as células foram retiradas das placas e transferidas para microtubos, os quais foram centrifugados por 10 minutos a 5000 rpm (MiniSpin plus® - Eppendorf) para a eliminação do sobrenadante contendo tripsina. Em seguida, 10 μL de meio foram adicionados a cada microtubo contendo as células e foram adicionados 10 μL do corante de azul de tripan (proporção 1:1), totalizando 20 μL de solução, que foi homogeneizada. Então, 10 μL da solução foram transferidos para uma Câmara de Neubauer e foi feita a contagem de células mortas e vivas através do microscópio óptico (Figura 10).

Figura 10 - Protocolo do ensaio de exclusão por Azul de Tripán



Fonte: A autora.

2.6 Ensaio Cometa

O ensaio cometa, ou também chamado *single-cell gel electrophoresis* (eletroforese em gel de célula única) ou pela abreviação SCG, é uma técnica de eletroforese em microgel desenvolvida para detectar danos no DNA em nível celular, individualmente. Este ensaio recebe tal nome devido ao formato que o nucleóide ganha após ser submetido a uma diferença de potencial durante a eletroforese, onde os

fragmentos de DNA formam uma espécie de uma cauda, assemelhando-se a um cometa. Uma vez que as lesões detectáveis por este teste são passíveis de correção, o ensaio cometa pode também ser utilizado para estudar, não só danos, mas também reparo no DNA, trazendo informação sobre a cinética e o tipo de lesão reparada. O ensaio cometa é um método rápido, sensível e relativamente simples para medir danos no DNA: quebras de DNA de cadeia simples e fita dupla, dano álcali-lábil, sítios de reparo de excisão incompletos e cross-linking DNA (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2011; Neri *et al.*, 2015; Pu, Wang e Klaunig, 2015).

2.6.1 Preparo das lâminas com solução de agarose de ponto de fusão normal (agarose NMP)

A solução de agarose NMP (*Normal melting point* ou ponto de fusão normal) foi preparada dissolvendo-se 3g de agarose NMP em 200mL de tampão PBS (concentração final de 1,5%). A solução foi fervida até ficar translúcida e, após esfriar e gelificar, o processo foi repetido por mais 2 vezes. Foi adicionado PBS para compensar o volume perdido, decorrente da fervura. A solução foi armazenada em geladeira a 4°C.

Para preparo das lâminas, a solução de agarose gelificada foi aquecida novamente para retornar ao estado líquido e mantida em banho-maria a 65°C para manutenção da temperatura. As lâminas de microscopia foram mergulhadas na solução, até o início da região fosca da lâmina. Foram então escorridas e sua face posterior foi limpa com papel seco, sendo então colocadas na posição horizontal, permanecendo secando em temperatura ambiente por pelo menos 24 horas.

2.6.2 Preparo da solução de agarose de ponto de fusão baixo (agarose LMP)

A solução de agarose LMP (*Low melting point* ou baixo ponto de fusão) foi preparada dissolvendo-se 1g de agarose LMP em 200mL de tampão PBS (concentração final de 0,5%), sendo realizado o mesmo procedimento descrito acima para homogeneização. Para a manutenção do seu estado líquido, a solução era mantida em banho-maria a 37°C.

2.6.3 Aplicação da matriz biológica nas lâminas

Terminado o período de exposição ao extrato, as soluções contendo meio de cultivo celular e o extrato foram removidas de todos os poços da placa de 24 poços e cada poço foi lavado com 400 μL de PBS. Adicionou-se 100 μL de tripsina em cada poço e a placa foi incubada em à estufa (37°C, 5% de CO₂) por 5 minutos. Após o isolamento das células, visualizado em microscópio invertido, adicionou-se 150 μL de meio cultivo suplementado e o volume de cada poço foi transferido para tubos individuais do tipo eppendorf, centrifugados por 10 minutos a 5000 rpm (MiniSpin plus® - Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 80 μL de agarose LMP. Todo o volume foi, então, aplicado nas lâminas pré-cobertas com agarose NMP e uma lamínula foi colocada sobre a lâmina. Posteriormente, as lâminas foram levadas à geladeira até que solidificassem (aproximadamente 1h).

2.6.4 Preparo das soluções de lise e imersão das lâminas

A solução de lise consiste nas soluções solução 1 e solução 2, cujas composições estão apresentadas no Apêndice A. A solução 2 deve ser preparada imediatamente antes do uso e misturada a solução 1, preparada com antecedência. Essa mistura era depositada em uma cuba de vidro horizontal protegida da luz e mantida na geladeira a 4°C. Antes das lâminas serem colocadas na cuba de vidro, as lamínulas foram retiradas, e então as lâminas foram imersas na solução de lise, onde ficavam por 48h a 4°C.

Nessa etapa, reagentes com propriedades detergentes agem sobre as membranas celular e nuclear, rompendo-as e expondo o material genético. Por isso, é importante

proteger as amostras da luz e de temperaturas elevadas, visto que o DNA é sensível a esses fatores.

2.6.5 Eletroforese em gel em condições alcalinas

Em um ambiente com ausência de luz direta, as lâminas foram retiradas da solução de lise e organizadas em uma cuba horizontal de eletroforese 25x20cm (Digel), todas na mesma orientação. Em seguida, 800 mL de tampão de corrida alcalino (Apêndice A) foi vertido sobre elas. As lâminas permaneciam imersas no tampão de corrida por 20 minutos, para o rompimento das pontes de hidrogênio e para que o DNA fosse completamente desnaturado (*Unwinding time*). Assim, pode-se quantificar quebras simples e duplas.

A etapa de eletroforese foi realizada por 25 minutos (25V, 300mA), utilizando-se uma fonte marca GE, modelo EPS301. A corrente elétrica proporciona a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, em direção ao anodo.

2.6.6 Neutralização

Ao final da eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e a solução de neutralização foi gotejada sobre as lâminas. Esse processo foi realizado três vezes, com intervalos de cinco minutos entre eles. Em seguida, as lâminas foram hidratadas duas vezes com água ultrapura e permaneceram secando em posição horizontal por 24h.

Nesta etapa, a dupla fita do DNA, que antes havia sido separada, foi unida novamente, devido a alteração do pH. Esta etapa é imprescindível para a próxima, de coloração, visto que o corante é intercalante.

2.6.7 Coloração com prata

Primeiramente, a solução fixadora foi gotejada sobre as lâminas, e após 10 minutos, estas foram lavadas com água ultrapura três vezes e permaneceram secando por 24h. Depois disto, essas lâminas foram hidratadas por 5 minutos.

Em uma cuba de vidro, em banho-maria a 37°C, 66% de solução A (Apêndice A) era misturada a 34% de solução B (Apêndice A). Ambas eram preparadas no dia do uso. A cuba era mantida por 35 minutos sob agitação até que a reação ocorresse e fosse visualizada por mudança de cor.

Terminada a reação de coloração, as lâminas foram lavadas com água ultrapura por 3 vezes e depois eram imersas em uma outra cuba de vidro horizontal com a solução STOP (Apêndice A) por 10 minutos para interromper o processo de fixação da prata. Posteriormente, elas foram hidratadas por mais três vezes e secaram em temperatura ambiente para serem observadas em microscópio de luz.

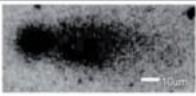
O protocolo da coloração por prata utilizado neste estudo foi adaptado de Christofolletti e colaboradores (2013).

2.6.8 Classificação dos cometas

A classificação foi feita segundo Villela et al., 2006 (Quadro 4). O cálculo da taxa de dano foi realizado da seguinte forma: em cada lâmina observada ao microscópio (aumento de 400x), 100 nucleoides foram escolhidos aleatoriamente (no sentido da esquerda para a direita), analisados quanto à forma e o tamanho da cauda e então

classificados em uma de cinco classes (desde 0 - não lesado, até 4 - nível máximo de lesão).

Quadro 4 – Classificação visual dos cometas de acordo com os danos.

Imagem Observada	Cauda/Cabeça	Classes de Danos
	sem cauda	0
	≤1	1
	1 – 2	2
	≥2	3
	sem cabeça	4

Fonte: traduzido de Villela et al., 2006.

Posteriormente, foi feito o cálculo da taxa de dano, que consiste no somatório dos valores obtidos na multiplicação do número de cometas pela sua respectiva classe. Esse somatório foi então dividido por 100, encontrando-se o valor da taxa de dano em unidades arbitrárias (Quadro 5).

Quadro 5 - Fórmula utilizada para taxa de dano no DNA

$$\text{Taxa de dano} = \frac{\sum(\text{classe} \times \text{frequência})}{100}$$

Legenda: Na fórmula, “classe” é 0, 1, 2, 3, ou 4 de acordo com a classificação, e “frequência” é o número de cometas classificados nesta classe.

2.7 Análise fitoquímica

A análise fitoquímica do extrato glicólico comercial de *Aloe vera* usado no estudo foi realizada em colaboração com o Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais

(IPPN/UFRJ), através da Dr^a. Livia Marques Casanova e da Prof^a. Dr^a. Sonia da Costa Soares.

2.7.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjos Diodos (CLAE-DAD ou HPLC-DAD)

Para a análise por HPLC-DAD, 500 µl do extrato glicólico foram diluídos em 500 µl de acetonitrila. A solução resultante foi centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos e, a seguir, filtrada em filtro de PVDF (0.45 µm).

Utilizou-se um cromatógrafo Shimadzu® LC-20AT com detector de arranjos fotodiodos (Shimadzu® SPDM20A) e módulo de comunicação Shimadzu® CBM-20A, amostrador automático Shimadzu® SIL-20A e coluna de fase inversa RP-18 (5 µm x 4 mm x 250 mm, Merck Lichospher100). Os espectros de UV foram adquiridos na faixa de 200-400 nm. O sistema de eluentes utilizado foi água (purificada por sistema Milli-Q) acidificada com 0,1% de ácido fórmico (96%, HPLC- Tedia®) (A) e acetonitrila (grau HPLC - Tedia®) (B), conforme o gradiente mostrado na Tabela 2. Uma alíquota de 20 µl da amostra foi injetada para análise. O tempo de corrida foi de 50 min, com um fluxo de eluição de 1 ml/min a 25°C.

Tabela 2 - Gradiente de eluentes utilizado nas análises por HPLC-DAD

<i>Tempo (min)</i>	<i>Solvente A (%)</i>	<i>Solvente B (%)</i>
0	95	5
10	80	20
20	78	22
35	75	25
40	70	30
45	0	100
50	0	100

2.7.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjos Diodos acoplado à Espectrofotometria de Massa Sequencial (CLAE-DAD-ES/ES ou HPLC-DAD-MS/MS)

Para a análise por HPLC-DAD-MS/MS, 100 µl do extrato glicólico foram diluídos em 900 µl de acetonitrila. A solução resultante foi centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos e, a seguir, filtrada em filtro de PVDF (0.45 µm).

Utilizou-se um equipamento Thermo Scientific® LCQFLEET, que consiste em um sistema CLUE (Daian U3000, Dionex Corporation®), compreendendo uma bomba CLUE, um detector de arranjos diodos (DAD), um espectrômetro de massas LCQFLEET (Thermo Fisher Scientific®) equipado com fontes de ionização ESI (ionização por eletrospray) e um analisador de massas ion trap. A coluna e o gradiente utilizados foram os mesmos empregados nas análises por HPLC-DAD. Uma alíquota de 10 µl da amostra foi injetada para análise. O fluxo foi 0,6 ml/min. Os espectros de massas foram obtidos no modo negativo.

2.7.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para as análises por RMN, 2 ml do extrato foram diluídos em 8 ml de água destilada e liofilizados, resultando em 7,7 mg de material seco. A amostra foi solubilizada em 600 µl de DMSO-*d*₆ com TMS e acondicionada em um tubo de 5 mm.

Espectros de RMN de ¹H e ¹H-¹³C HSQC foram obtidos à 25°C em um espectrômetro Varian VNMRS-500 (1H: 499,77 MHz; 13C: 125,68 MHz) (LAMAR - Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, UFRJ).

2.8 Análise visual da morfologia celular

Ao observar mudanças morfológicas nas células durante o tratamento, foram tiradas fotografias de um poço de cada grupo. As fotografias foram feitas por câmera acoplada à microscópio de luz, em aumento de 20x do Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (LIA-BPPN / UERJ) antes do tratamento (0 h), durante (24 h) e após (24 h+).

2.9 Análise estatística

Para a análise estatística de todos os ensaios experimentais foi utilizado o programa GraphPad InStat 4.0. Os dados experimentais obtidos foram previamente submetidos ao teste de normalidade, o que permitiu a utilização de testes paramétricos. Foram então aplicados os testes de análise de variância unidirecional (ANOVA *oneway*), seguido do Teste de comparações múltiplas de Tukey, para comparar uma linhagem celular individualmente dentro de um tempo de tratamento. Já para analisar diferentes linhagens dentro do mesmo tempo de tratamento foi utilizada análise de variância bidirecional (ANOVA *two-way*) com pós-teste Bonferroni. Também foi empregado o Teste T para comparar a mesma linhagem com duas exposições diferentes. O nível de confiança adotado foi de 95% e todos os experimentos foram realizados pelo menos em triplicata e repetidos três vezes.

3 RESULTADOS

3.1 Fase 1

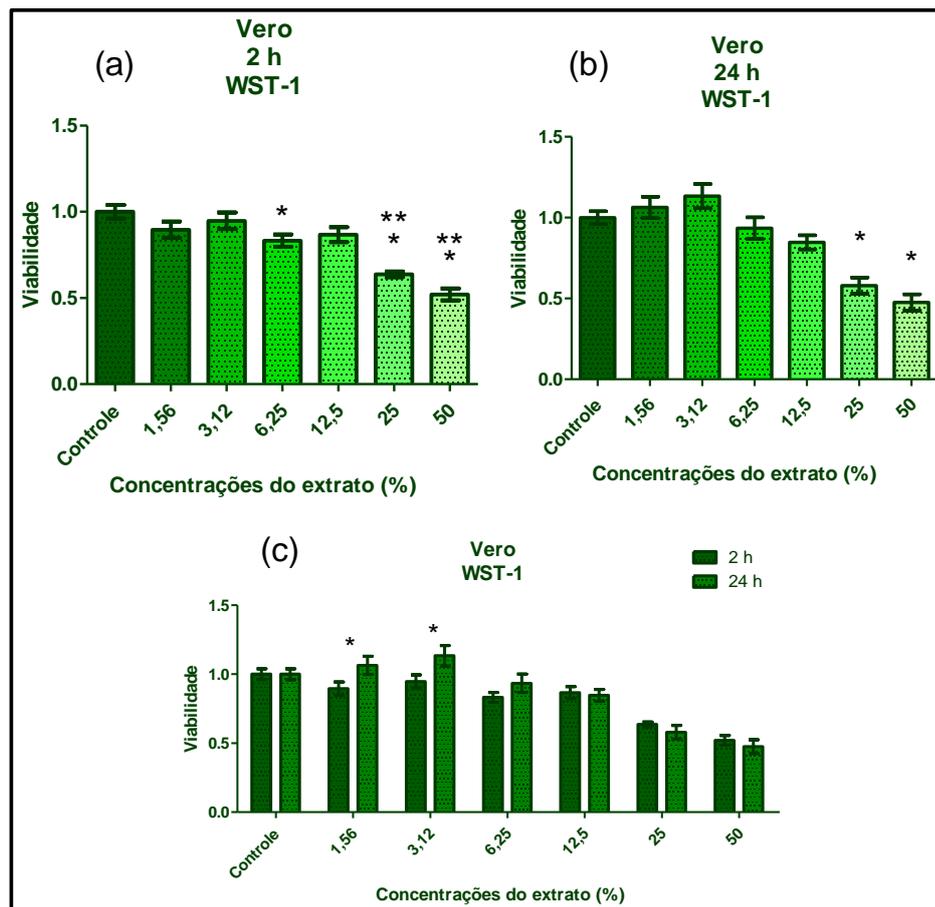
3.1.1 Citotoxicidade

3.1.1.1 Ensaio de proliferação WST-1

Foram feitas comparações entre os diferentes tempos (2 e 24 horas) de incubação com concentrações variadas (1,56%, 3,12%, 6,25%, 12,5%, 25% e 50%) do extrato em uma mesma linhagem celular, bem como comparações entre as diferentes linhagens celulares no mesmo tempo de tratamento.

A viabilidade das células da linhagem Vero incubadas com o extrato de *Aloe vera* apresentou diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$) nas duas maiores concentrações (50% e 25%) em ambos os tempos de tratamento (Figura 11 a e b), na concentração de 6,25% no tempo de 2 horas, sendo que esta é significativamente diferente de 25% e 50% (Figura 11 a). Quando comparados em relação ao tempo de tratamento (2 e 24 horas), foi observada diferença entre os tempos de tratamento ao extrato nos grupos 1,56% e 3,12% (Figura 11 c).

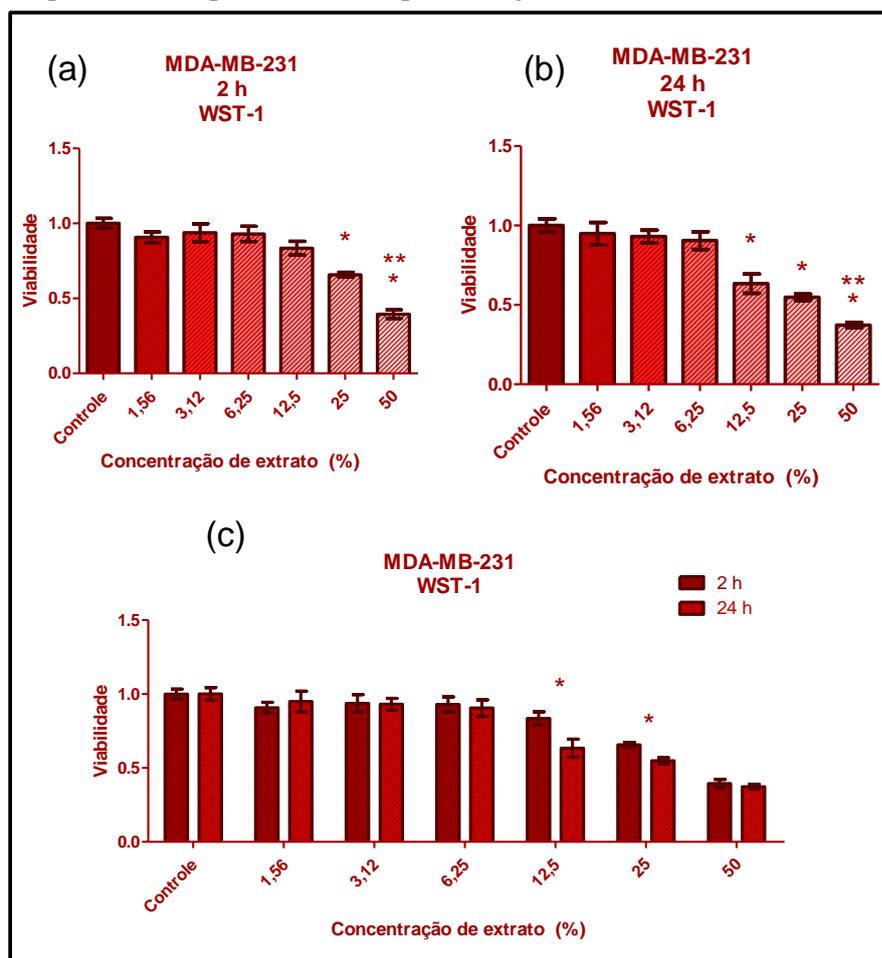
Figura 11 - Viabilidade celular da linhagem Vero tratada com extrato de *Aloe vera* por 2 e 24 h pelo ensaio de proliferação WST-1.



Legenda: Tratamento de 2 h (a), 24 h (b) e a comparação dos resultados de ambas as exposições (c). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle (a e b) ou em relação as barras de uma mesma concentração tratada por diferentes intervalos de tempo (c), e ** diferença em relação ao controle e 6,25% (a) ($p < 0,05$) – Teste One way ANOVA/ Pós-teste Tukey (a e b) e Teste T (c).

A linhagem MDA-MB-231 também apresentou diferença significativa em relação ao controle em 2 e 24 horas de tratamento nas duas maiores concentrações (Figura 12 a e b), e também na de 12,5%, na exposição mais longa (Figura 12 b). Em ambos os casos, o grupo 50% também foi significativamente diferente dos demais mencionados. Na comparação entre os diferentes tempos de tratamento nessa linhagem, houve diferença significativa entre os tempos somente nos grupos de 12,5% e 25%, indicando menor viabilidade em 24 horas nesta concentração (Figura 12 c).

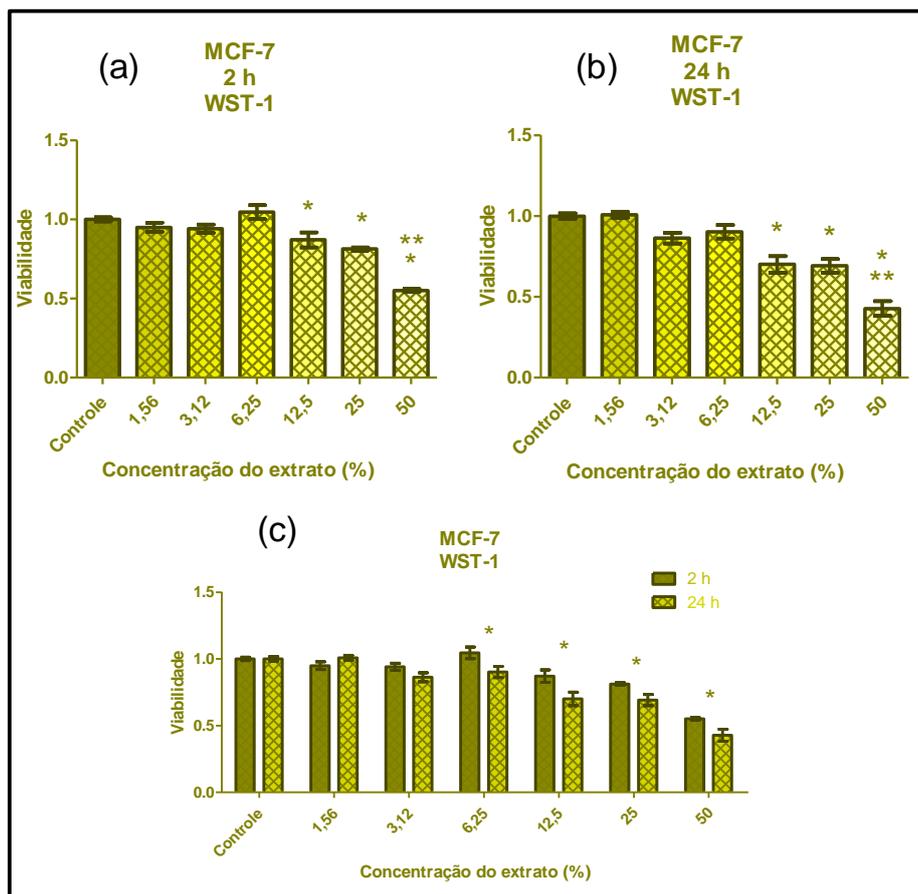
Figura 12 - Viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 tratada com extrato de *Aloe vera* por 2 e 24 h pelo ensaio de proliferação WST-1.



Legenda: Tratamento de 2 h (a), 24 h (b) e a comparação dos resultados de ambas as exposições (c). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle (a e b) ou em relação as barras de uma mesma concentração tratada por diferentes intervalos de tempo (c), e ** diferença em relação ao controle e 25% (a) ou controle, 12,5% e 25% (b) ($p < 0,05$) – Teste One way ANOVA/ Pós-teste Tukey (a e b) e Teste T (c).

A linhagem MCF-7 apresentou comportamento similar à outra linhagem tumoral: diferença significativa em ambos os tempos de tratamento em relação ao controle nas concentrações 25% e 50% e também na concentração de 12,5%, desta vez nas duas exposições, sendo o grupo 50% diferente significativamente dos demais nos dois tempos (Figura 13 a e b). A comparação entre esses dois tempos mostrou diferença significativa entre os tempos nas concentrações de 6,25%, 12,5%, 25%, e 50%. Neste caso, é observado menor viabilidade em 24 horas em relação à 2 horas nas concentrações referidas de extrato de *A. vera* (Figura 13 c).

Figura 13 - Viabilidade celular da linhagem MCF-7 tratada com extrato de *Aloe vera* por 2 e 24 h pelo ensaio de proliferação WST-1.

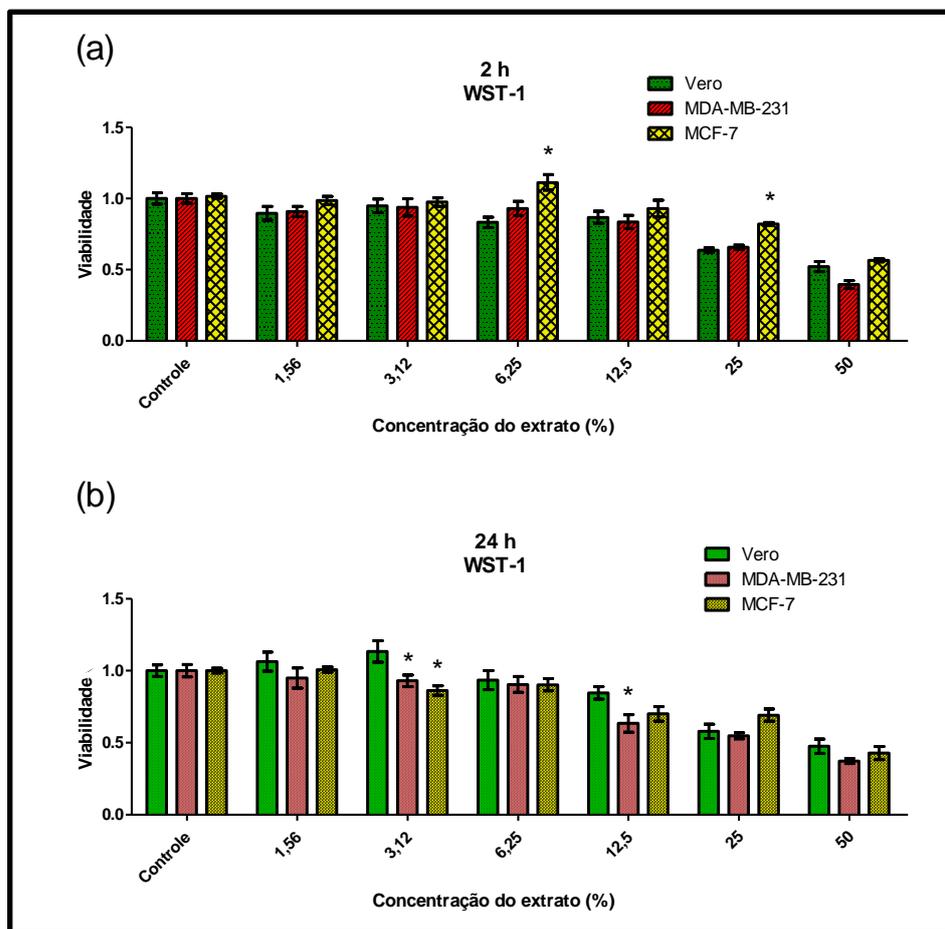


Legenda: Tratamento de 2 h (a), 24 h (b) e a comparação dos resultados de ambas as exposições (c). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle (a e b) ou em relação as barras de uma mesma concentração tratada por diferentes intervalos de tempo (c), e ** diferença em relação ao controle, 12,5% e 25% (a e b) ($p < 0,05$) – Teste One way ANOVA/ Pós-teste Tukey (a e b) e Teste T (c).

As comparações entre as três linhagens celulares permitiram observar diferentes comportamentos diante da exposição ao extrato glicólico de *Aloe vera*. Ao comparar, no tempo de 2 horas, Vero, MDA-MB-231 e MCF-7, tendo como referência a célula não-tumoral, observou-se diferença somente entre Vero e MCF-7 nas concentrações 6,25% e 25% (Figura 14 a). Já as comparações no tempo de 24 horas de tratamento mostraram um comportamento diferenciado. A comparação entre as linhagens na exposição prolongada mostra diferença significativa das duas células neoplásicas em relação à Vero na concentração 3,12%, e em 12,5% entre a Vero e MDA-MB-231 (Figura 14 b). Diferentemente do gráfico de 2 horas, em 24 horas de tratamento é observado uma maior viabilidade da linhagem Vero nas concentrações em que foram observadas diferença das

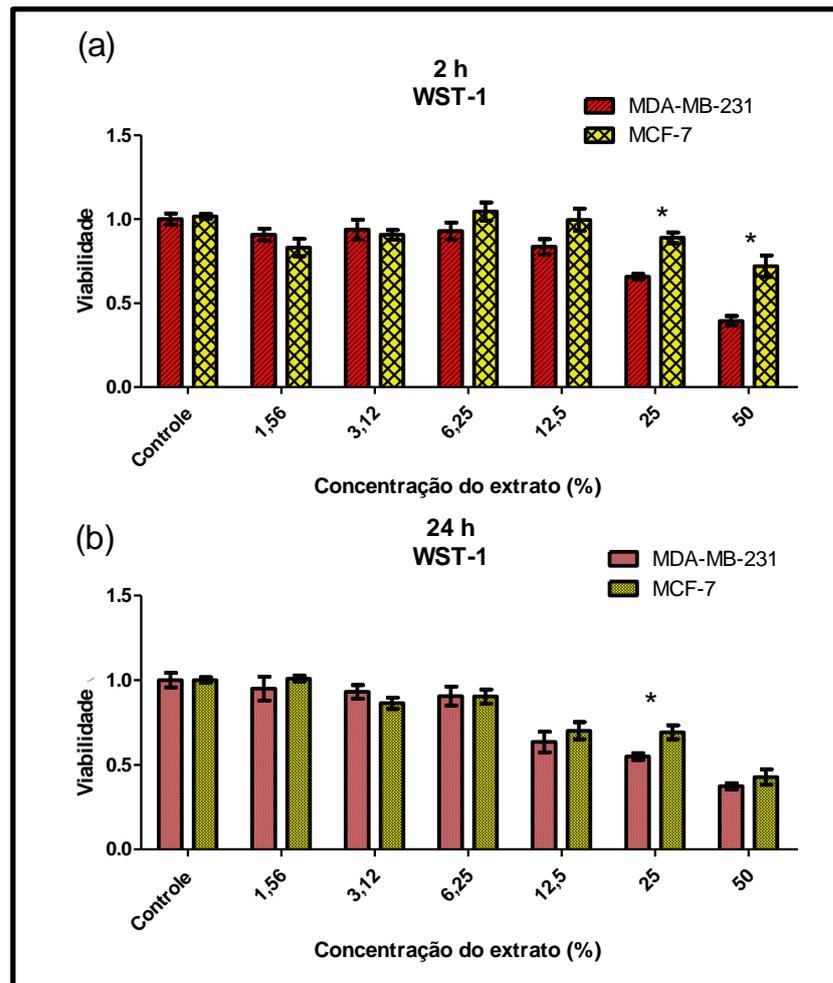
demais. Já a comparação entre as linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF-7 em 2 horas de tratamento mostrou diferença apenas nas concentrações 25% e 50%, mostrando maior viabilidade para a MCF-7 (Figura 15 a). E em 24 horas de exposição, a comparação entre as células tumorais revelou um comportamento similar entre elas, apresentando diferença somente no grupo 25% (Figura 15 b).

Figura 14 - Comparação da viabilidade celular das linhagens Vero, MDA-MB-231 e MCF-7 tratadas com extrato de *Aloe vera* por 2 e 24 h pelo ensaio de proliferação WST-1.



Legenda: Tratamento de 2 h (a) e 24 h (b). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa entre os diferentes tipos celulares em uma mesma concentração, tendo como referência a linhagem Vero ($p < 0,05$) – Teste Two-way ANOVA/ Pós-teste Bonferroni.

Figura 15 - Comparação da viabilidade celular das linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF-7 tratadas com extrato de *Aloe vera* por 2 e 24 h pelo ensaio de proliferação WST-1.



Legenda: Tratamento de 2 h (a) e 24 h (b). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa entre os diferentes tipos celulares em uma mesma concentração ($p < 0,05$) – Teste T.

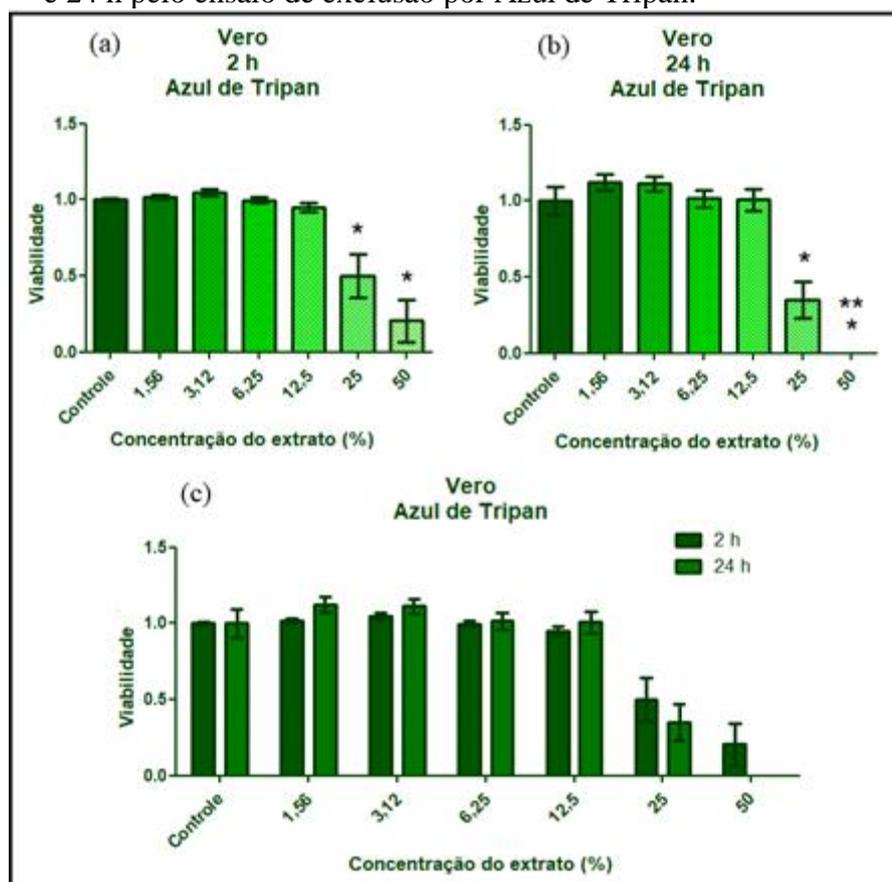
3.1.1.2 Ensaio de exclusão por Azul de Tripán

Foi realizado o ensaio de exclusão com Azul de Tripán nas linhagens celulares Vero e MDA-MB-231 para avaliação da citotoxicidade. Foram feitas comparações entre

os diferentes tempos de tratamento em um mesmo tipo celular, assim como comparações entre as diferentes linhagens.

Nas células Vero, assim como no ensaio de proliferação WST-1, houve diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$) em ambos os tempos de exposição (2 e 24 horas) nas concentrações 25% e 50% (Figura 16 a e b). O gráfico de comparação entre os tempos de tratamento não apresentou diferença significativa entre os tempos avaliados, em nenhuma concentração (Figura 16 c).

Figura 16 - Viabilidade celular da linhagem Vero tratada com extrato de *Aloe vera* por 2 e 24 h pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

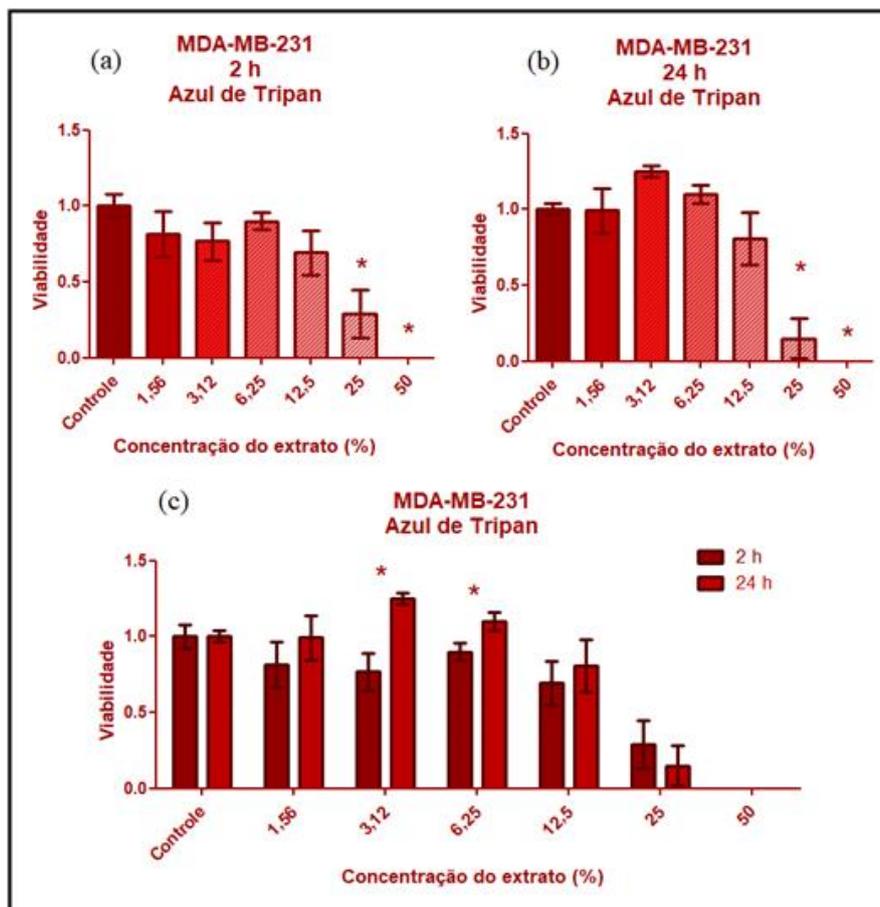


Legenda: Tratamento de 2 h (a), 24 h (b) e a comparação dos resultados de ambas as exposições (c). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle (a e b); ** diferença em relação ao controle e 25% (b) ($p < 0,05$) – Teste One way ANOVA/ Pós-teste Tukey (a e b) e Teste T (c).

A linhagem MDA-MB-231 também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle nas concentrações 25% e 50% em 2 e 24 horas (Figuras 17 a e b), confirmando os resultados observados através do ensaio de proliferação WST-1. Na comparação entre esses tempos, houve um aumento na viabilidade em 24 horas de

exposição com diferença significativa entre os tempos somente na concentração 3,12% e 6,25% (Figura 17 c).

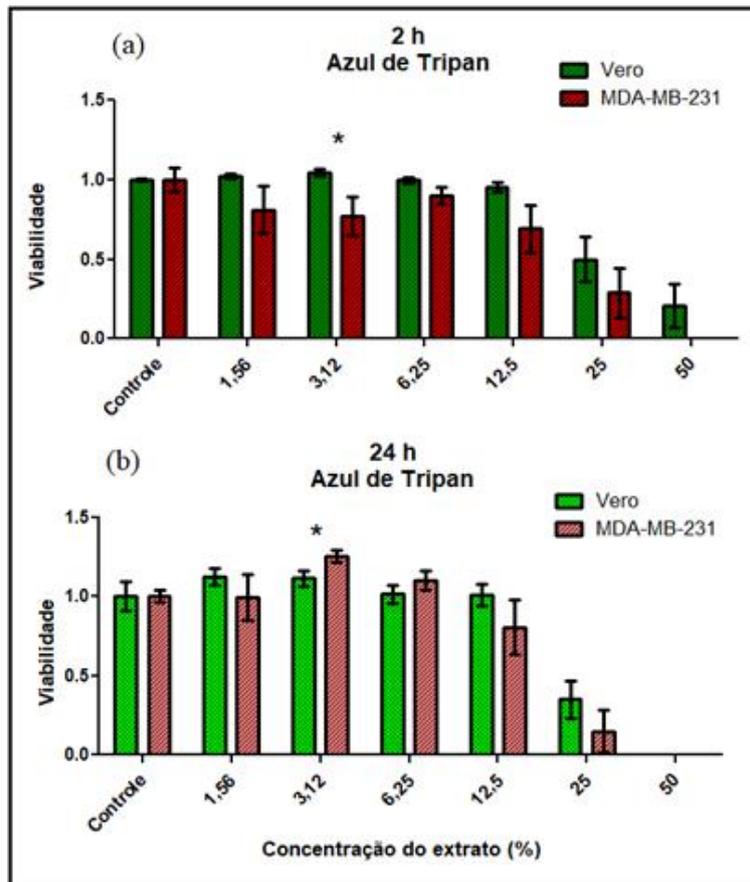
Figura 17 - Viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 tratada com extrato de *Aloe vera* por 2 e 24 h pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán.



Legenda: Tratamento de 2 h (a), 24 h (b) e a comparação dos resultados de ambas as exposições (c). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle (a e b) ou em relação as barras de uma mesma concentração tratada por diferentes intervalos de tempo (c) ($p < 0,05$) – Teste One way ANOVA/ Pós-teste Tukey (a e b) e Teste T (c).

A comparação entre os dois tipos celulares apresentou diferença significativa apenas no grupo 3,12% em ambos os tempos de tratamento (Figura 18). No primeiro caso, indica maior viabilidade da célula Vero, no segundo é o oposto.

Figura 18 - Comparação da viabilidade celular das linhagens Vero e MDA-MB-231 tratadas com extrato e *Aloe vera* por 2 e 24 h pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán.



Legenda: Tratamento de 2 h (a) e 24 h (b). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa entre os diferentes tipos celulares em uma mesma concentração ($p < 0,05$) – Teste T.

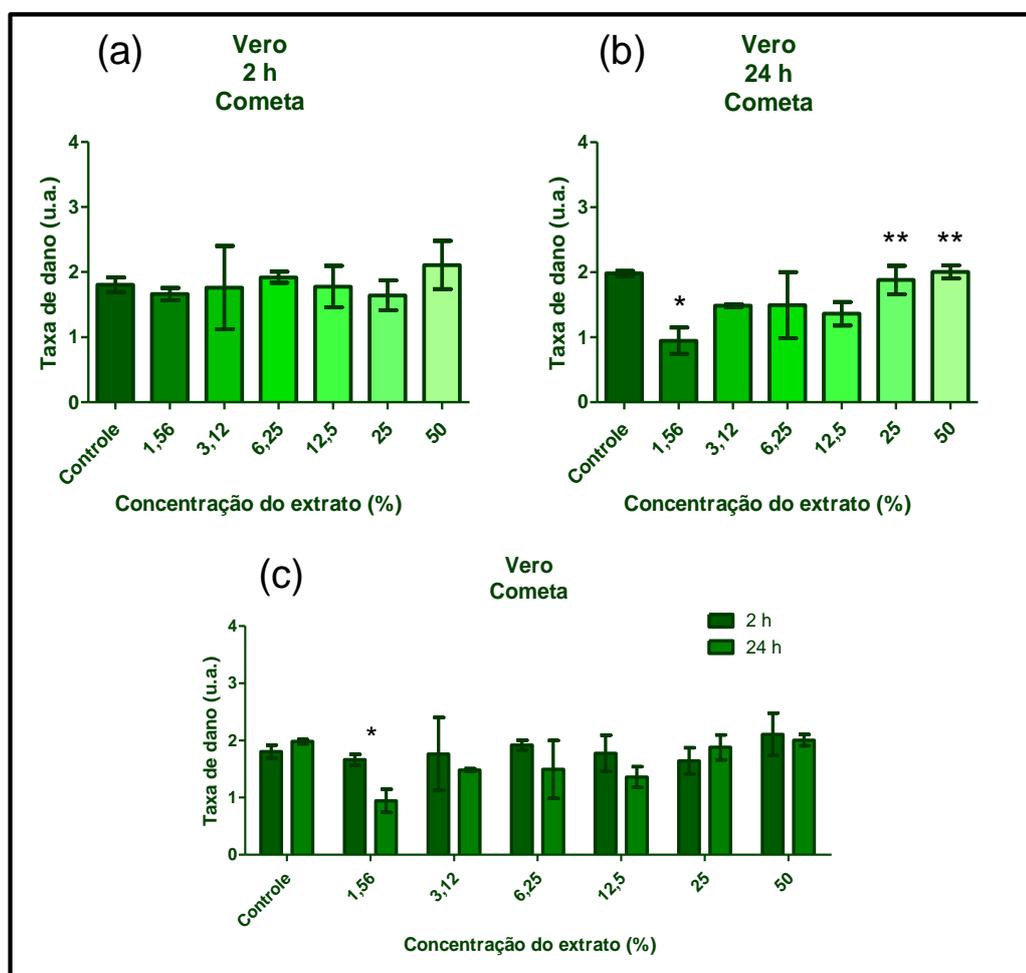
3.1.2 Genotoxicidade

3.1.2.1 Ensaio Cometa

Na análise da genotoxicidade, também foram feitas comparações entre os diferentes tempos de incubação com o extrato em um mesmo tipo celular, assim como comparações entre os diferentes tipos celulares no mesmo tempo de tratamento.

A linhagem Vero não apresentou diferença significativa na taxa de dano quando incubada com o extrato de *A. vera* por duas horas em nenhuma das concentrações analisadas ($p < 0,05$). Porém, em 24 horas de tratamento, houve uma significativa diminuição da taxa de dano na menor concentração de extrato utilizada (1,56%), com diferença significativa para o controle, 25% e 50% (Figura 19 b). A comparação entre esses dois intervalos de tratamento apresentou diferença somente na concentração 1,56%, evidenciando a diminuição dos danos no tratamento prolongado (Figura 19 c). Observando a distribuição de classes do cometa, no tempo curto de incubação (2 h) há prevalência de cometas classe 2, isto é, classe intermediária de danos (Figura 20 a); enquanto no tempo longo (24 h), a classe de danos mais abundante é a classe 1 (Figura 20 b).

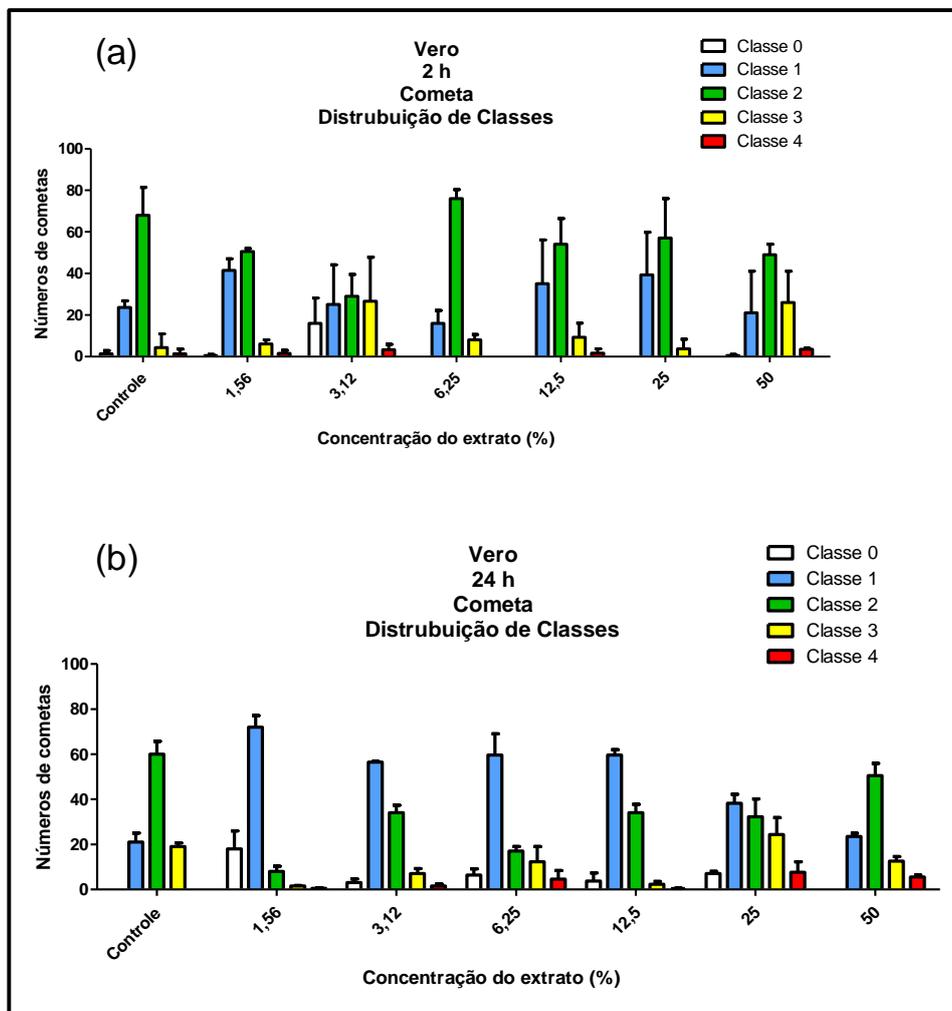
Figura 19 - Genotoxicidade nas células da linhagem Vero tratadas com extrato de *Aloe vera* por 2 e 24 h pelo ensaio cometa.



Legenda: Tratamento de 2 h (a), 24 h (b) e a comparação dos resultados de ambas as exposições (c). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle (b) ou em relação

as barras de uma mesma concentração exposta por diferentes intervalos de tempo (c); ** diferença em relação 1,56% (b) ($p < 0,05$) – Teste One way ANOVA/ Pós-teste Tukey (a e b) e Teste T (c).

Figura 20 – Distribuição de classes do ensaio cometa da linhagem Vero.

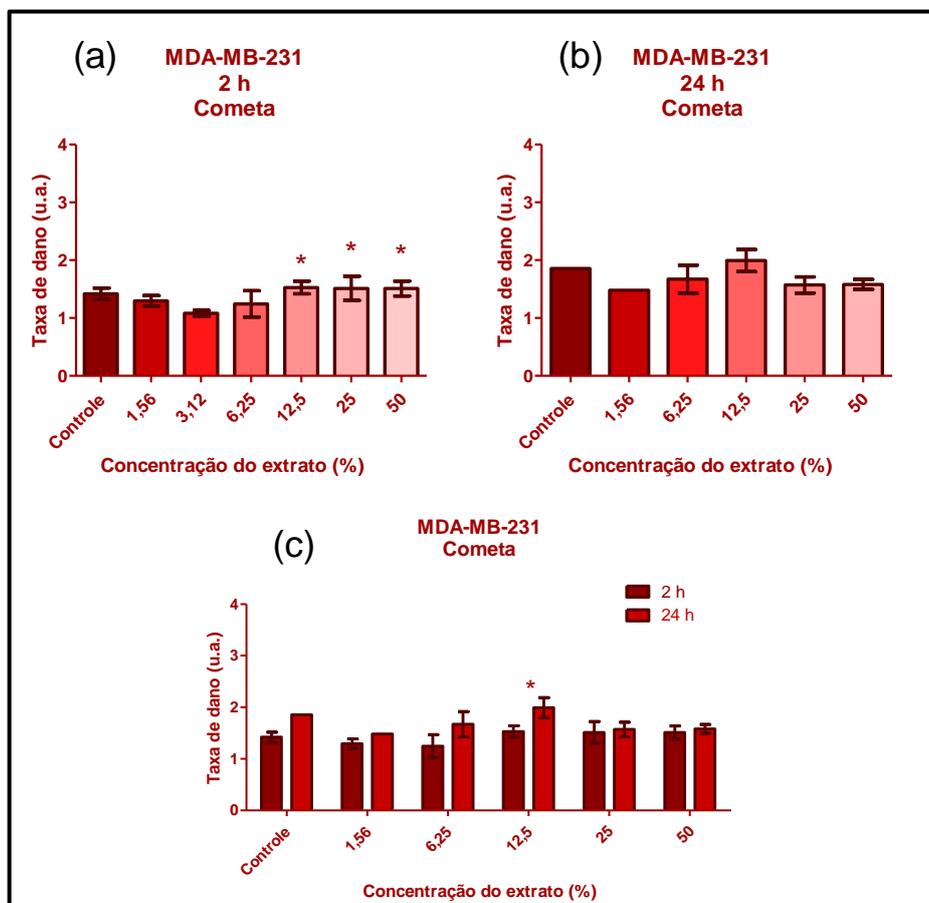


Legenda: Número de cometas classificados em classes de 0 a 4 de acordo com o dano das células Vero tratadas com extrato glicólico comercial de *Aloe vera* por 2 h (a) e 24 h (b).

Nas células tumorais MDA-MB-231, não houve diferença significativa de taxa de dano em relação ao controle em nenhuma das exposições, entretanto, no tratamento de 2 horas, as três maiores concentrações (12,5%, 25% e 50%) foram significativamente diferentes da concentração 3,12% ($p < 0,05$) (Figura 21 a). No tempo de 24 horas, não foi possível analisar o grupo 3,12% pois não foram encontrados nucleóides o suficiente nas lâminas dos três experimentos, e nos grupos controle e 1,56% só foi possível contabilizar um experimento (Figura 21 b). A comparação entre tempos de tratamento apresentou diferença na concentração 12,5%, indicando o aumento da taxa de dano em 24 horas (Figura 21 c). A distribuição de classes do cometa, evidenciou um predomínio da classe

1 com surgimento de classe 4 somente nas concentrações mais altas em 2 horas de exposição ao extrato (Figura 22 a); enquanto em 24 horas há um aumento expressivo da classe 2 (Figura 22 b).

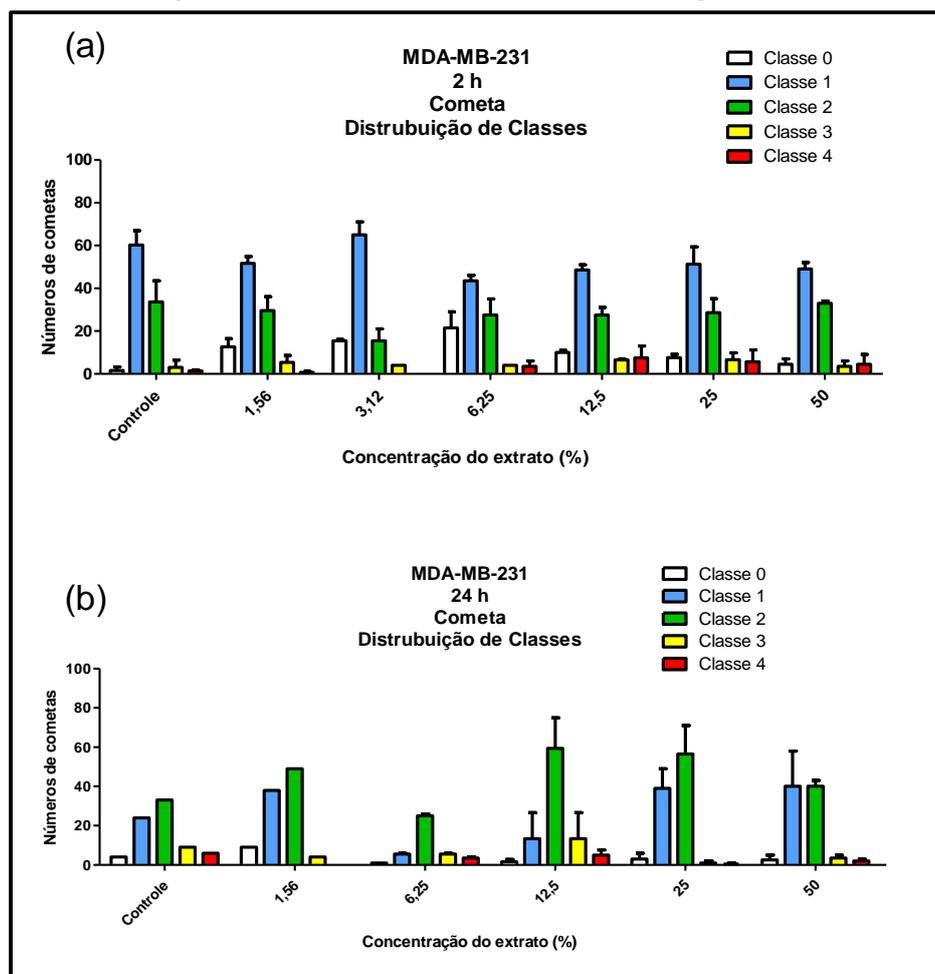
Figura 21 - Genotoxicidade nas células da linhagem MDA-MB-231 tratadas com extrato de *Aloe vera* por 2 e 24 h pelo ensaio cometa.



Legenda: Tratamento de 2 h (a), 24 h (b) e a comparação dos resultados de ambas as exposições (c). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa em relação a 3,12% (a) ou em relação as

barras de uma mesma concentração exposta por diferentes intervalos de tempo (c) ($p < 0,05$) – Teste One way ANOVA/ Pós-teste Tukey (a e b) e Teste T (c).

Figura 22 – Distribuição de classes do ensaio cometa da linhagem MDA-MB-231.

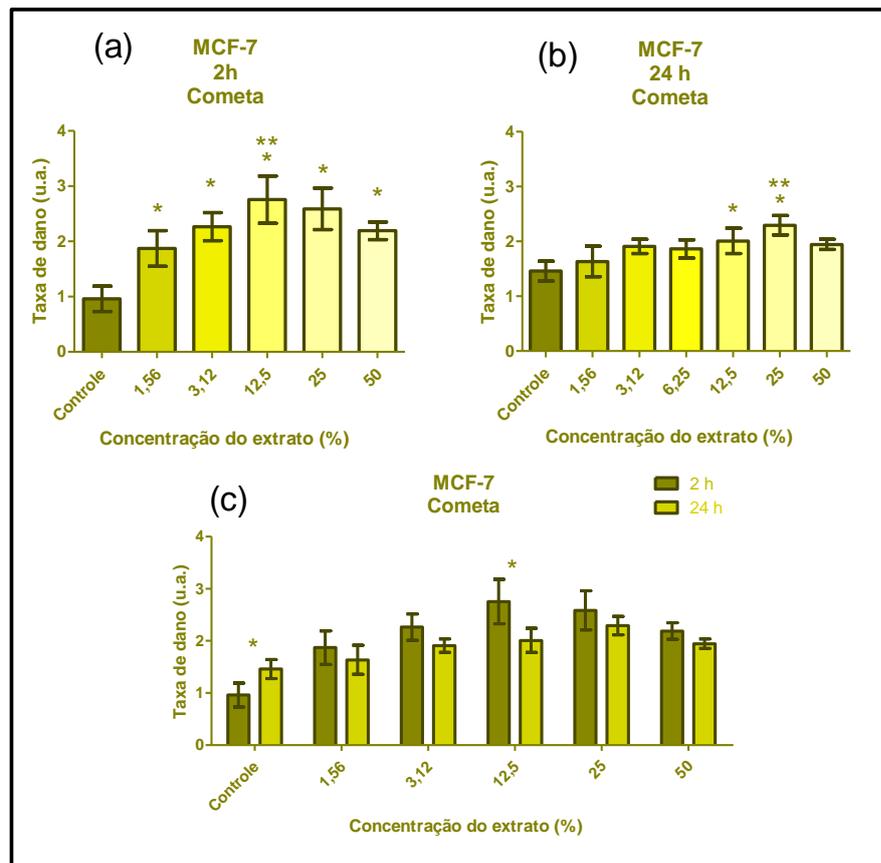


Legenda: Número de cometas classificados em classes de 0 a 4 de acordo com o dano das células MDA-MB-231 tratadas com extrato glicólico comercial de *Aloe vera* por 2 h (a) e 24 h (b).

Diferentemente dos outros casos, na linhagem MCF-7 o controle teve uma taxa de dano bem mais baixa, e por isso todas as concentrações de extrato foram significativamente diferentes do controle em 2 horas de tratamento ($p < 0,05$) (Figura 23 a). Em 24 horas de incubação com o extrato, as concentrações 12,5% e 25% também foram diferentes do seu controle ($p < 0,05$) (Figura 23 b). A concentração 1,56% se diferenciou também da 12,5% em 2 h e de 25% em 24 h. Como o número necessário de nucleóides nos experimentos na contração 6,25% em 2 horas não foi encontrado, impossibilitou a sua análise e inclusão nos gráficos. Ao comparar as exposições, foi evidente a diferença na concentração 12,5% com diminuição da taxa de dano em 24 h, e

também no controle, porém com aumento na taxa no mesmo tempo (Figura 23 c). A distribuição de classes do cometa desta linhagem mostrou uma distribuição mais homogênea dos cometas classificados e, diferentemente das outras linhagens, uma quantidade expressiva de cometas classe 4 em ambos os tempos (Figura 24 a e b). No tratamento longo (24 h), a classe 1 se destacou mais que no tratamento curto (2 h) (Figura 24 b).

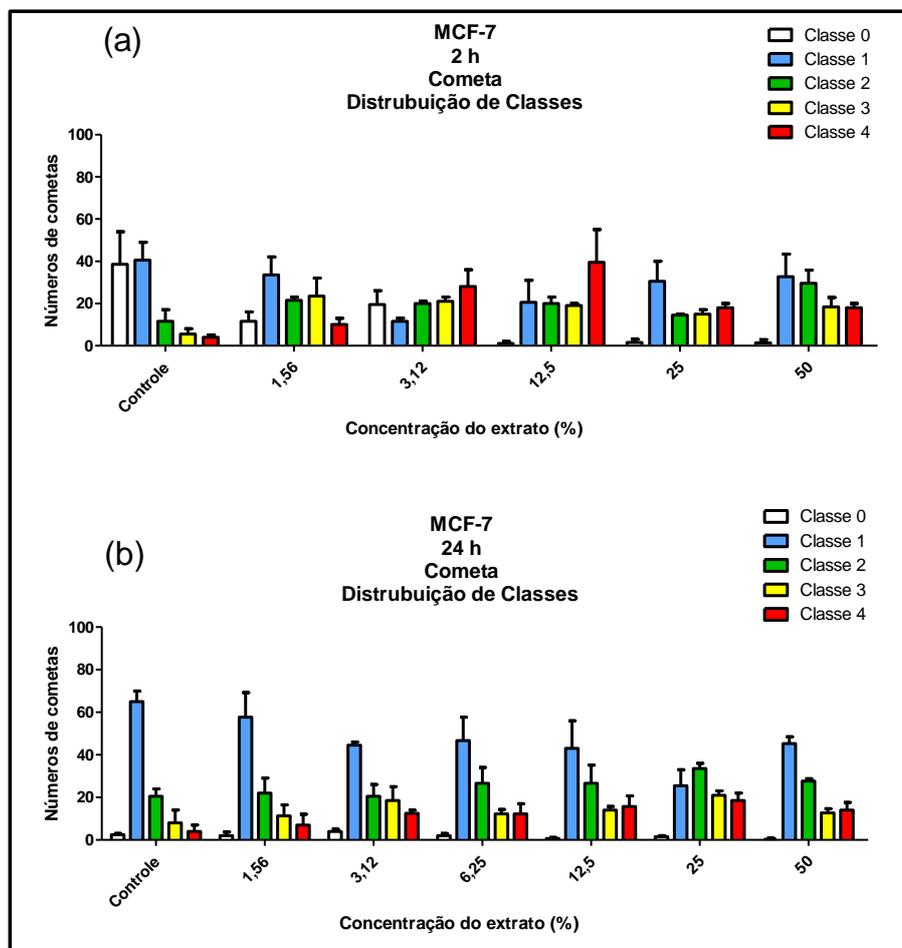
Figura 23 - Genotoxicidade nas células da linhagem MCF-7 tratadas com extrato de *Aloe vera* por 2 e 24 h pelo ensaio cometa.



Legenda: Tratamento de 2 h (a), 24 h (b) e a comparação dos resultados de ambas as exposições (c). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle (a e b) ou em relação as barras de uma mesma concentração exposta por diferentes intervalos de tempo (c); **

diferença em relação ao controle e 1,56% (a e b) ($p < 0,05$) – Teste One way ANOVA/ Pós-teste Tukey (a e b) e Teste T (c).

Figura 24 – Distribuição de classes do ensaio cometa da linhagem MCF-7.

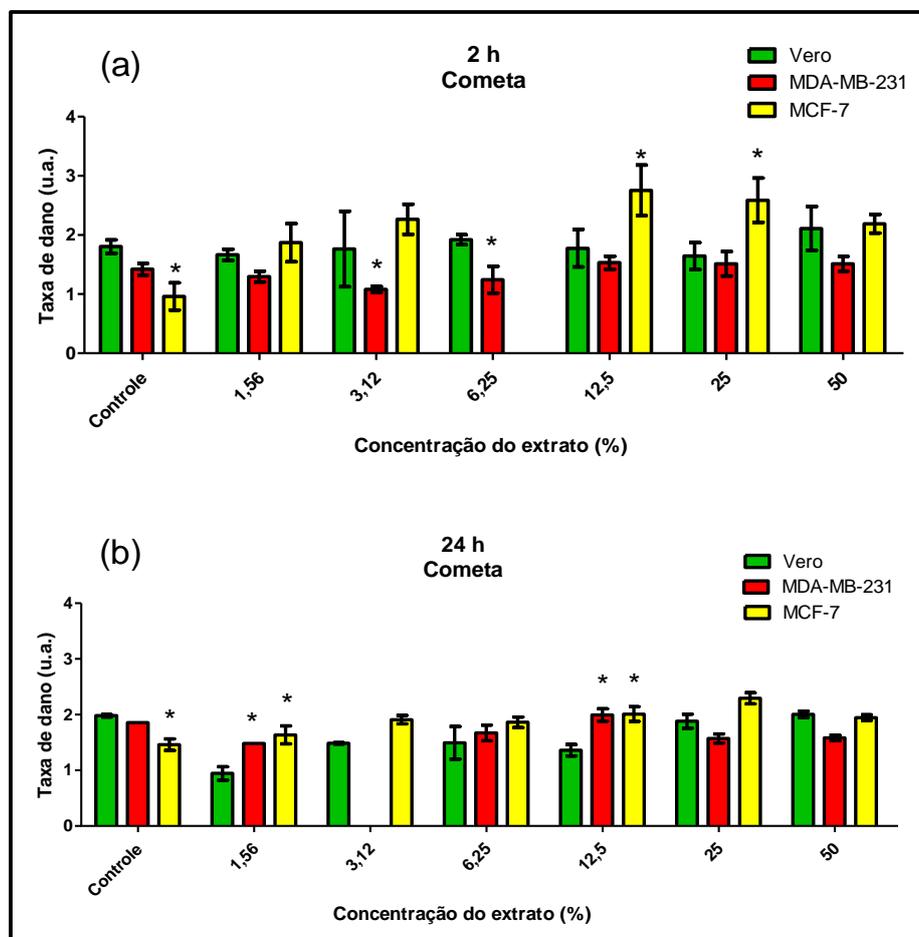


Legenda: Número de cometas classificados em classes de 0 a 4 de acordo com o dano das células MCF-7 tratadas com extrato glicólico comercial de *Aloe vera* por 2 h (a) e 24 h (b).

A comparação entre as linhagens celulares é interessante para analisar a ação genotóxica ou antígeno-tóxica como um potencial antineoplásico. Usando como referência a célula não-tumoral (Vero), na exposição curta de 2 horas, a célula MDA-MB-231 apresentou menor taxa de dano, com diferença significativa nas concentrações 3,12% e 6,25%; já a célula MCF-7 indicou maior taxa de dano com diferença em 12,5% e 25% (Figura 25 a). Já as comparações na maior exposição (24 h), o oposto foi observado (Figura 25 b). O gráfico de comparação, também tendo o referencial da linhagem Vero, indicou uma diminuição da taxa de dano desta linhagem em relação as outras (MDA-MB-231 e MCF-7), principalmente nas concentrações 1,56% e 12,5%, onde há diferença significativa. É interessante mencionar que em ambos os tempos de tratamento, a

linhagem MCF-7 apresentou uma menor taxa de dano na amostra controle, indicando que naturalmente essa célula possui menos danos no DNA que as demais.

Figura 25 – Comparação da genotoxicidade nas células das linhagens Vero, MDA-MB-231 e MCF-7 tratadas com extrato de *Aloe vera* por 2 e 24 h pelo ensaio cometa.



Legenda: Tratamento de 2 h (a) e 24 h (b). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa entre os diferentes tipos celulares em uma mesma concentração, tendo como referência a linhagem Vero ($p < 0,05$) – Teste Two-way ANOVA/ Pós-teste Bonferroni.

3.2 Fase 2

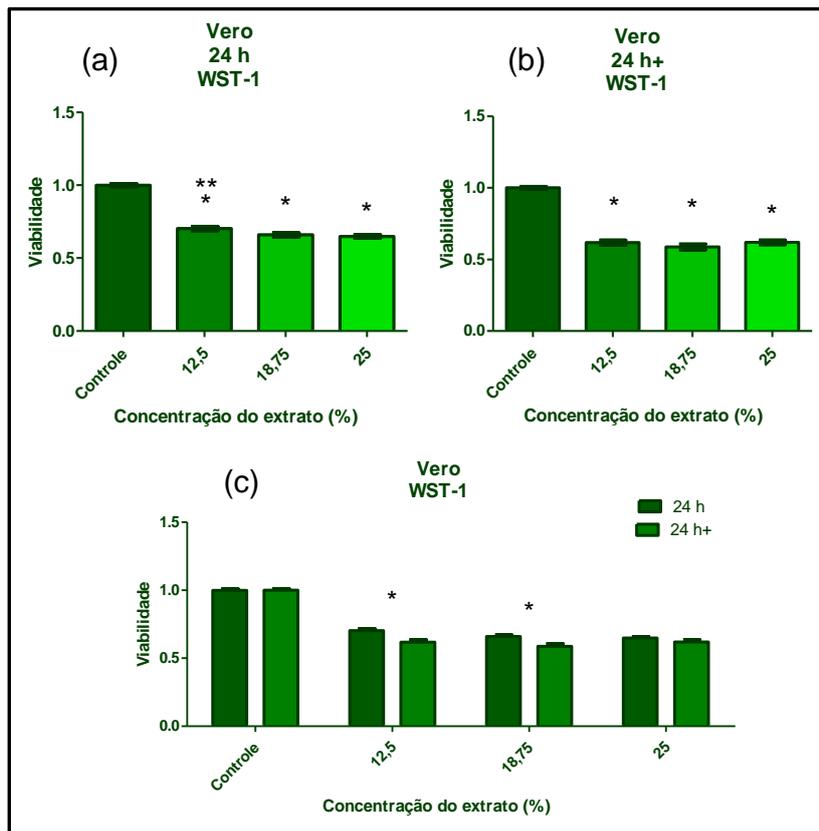
3.2.1 Citotoxicidade

3.2.1.1 Ensaio de proliferação WST-1

Na segunda fase de experimentos, foram testadas apenas três concentrações do extrato glicólico de *Aloe vera* (12,5%, 18,75% e 25%) por 24 horas. Além disto, a viabilidade também foi avaliada 24 horas após o encerramento deste tratamento (24 h+). Em seguida foram feitas comparações entre essas duas diferentes incubações em uma mesma linhagem celular, assim como comparações entre as diferentes linhagens celulares no mesmo tempo de tratamento.

Os resultados da fase 2 na célula Vero mostraram diferença significativa em relação ao controle em todas as concentrações, tanto em 24 horas de tratamento (24 h) como nas 24 horas seguintes após o fim do tratamento (24 h+) (Figura 26 a e b). E na comparação entre esses dois intervalos, houve diferença no grupo 12,5% e 18,75%, indicando maior viabilidade em 24 horas (Figura 26 c).

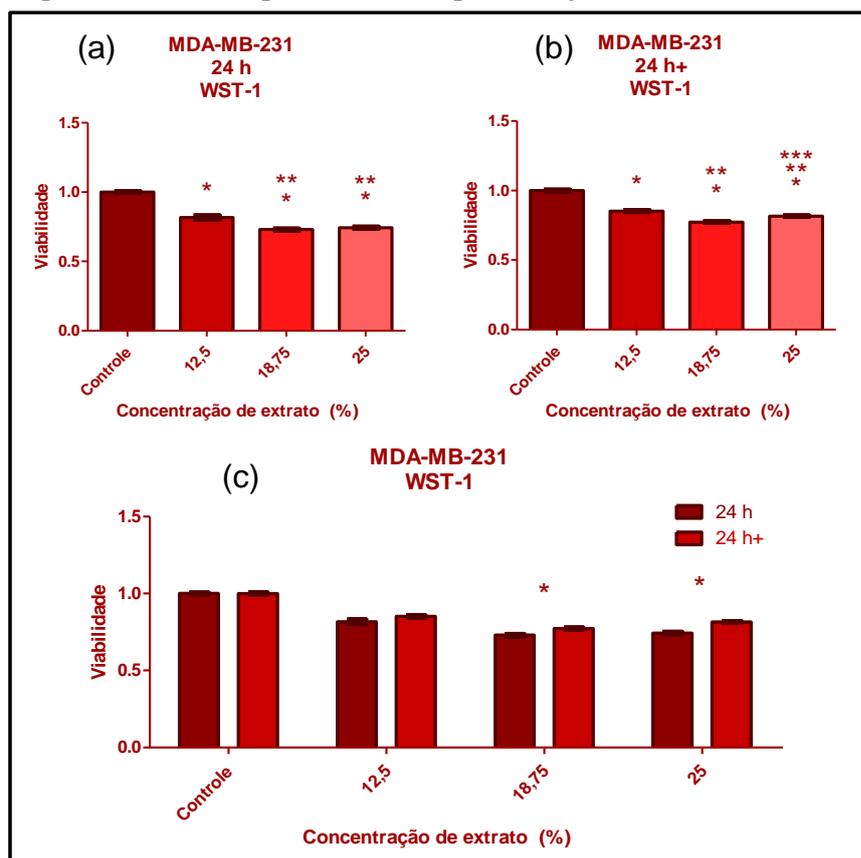
Figura 26 - Viabilidade celular da linhagem Vero tratada com extrato de *Aloe vera* por 24 h e 24 h+ pelo ensaio de proliferação WST-1.



Legenda: Tratamento de 24 h (a), 24 h+ (b) e a comparação dos resultados de ambas as exposições (c). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle (a e b) ou em relação as barras de uma mesma concentração tratadas por diferentes intervalos de tempo (c), e ** diferença em relação ao controle e 25% (a) ($p < 0,05$) – Teste One way ANOVA/ Pós-teste Tukey (a e b) e Teste T (c).

Na linhagem MDA-MB-231 houve diferença significativa em relação ao controle em ambos os tempos de exposição testados (24 h e 24 h+) em todos os grupos (Figura 27 a e b). No tempo de 24 horas, a concentração 12,5% mostrou-se diferentes das outras concentrações; enquanto em 24 h+ todos os grupos foram diferentes entre si (Figura 27 a). Quando as duas exposições citadas foram comparadas, foi observada diferença entre os grupos nas concentrações 18,75% e 25% (Figura 27 c).

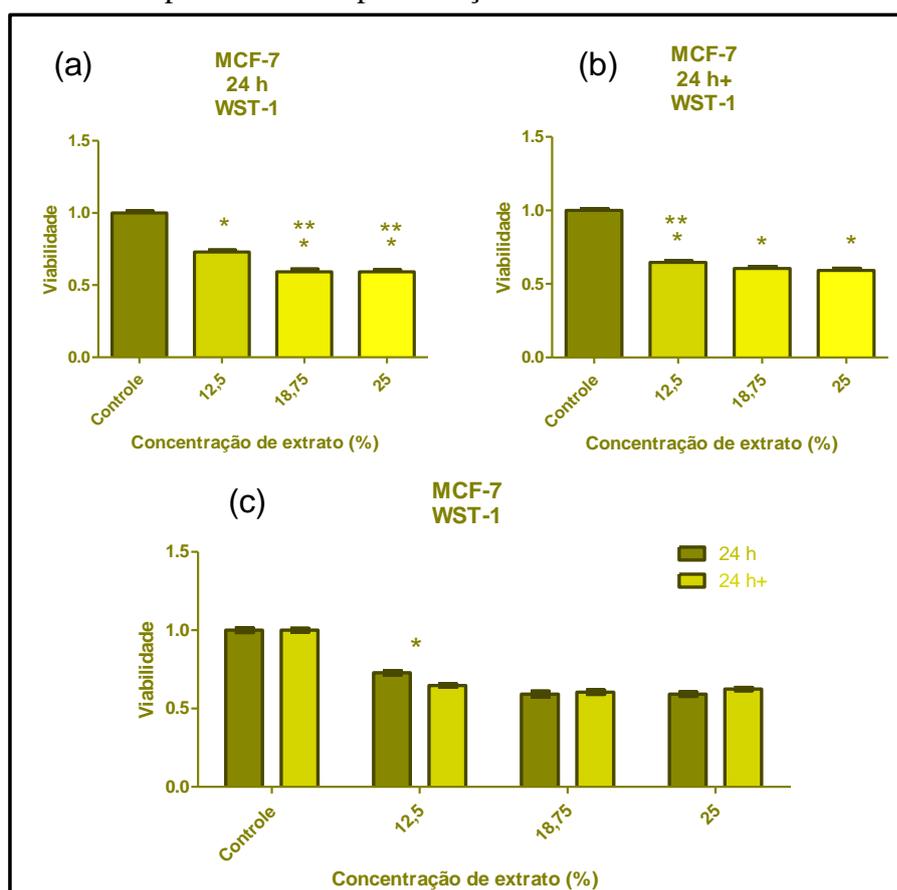
Figura 27 - Viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 tratada com extrato de *Aloe vera* por 24 h e 24 h+ pelo ensaio de proliferação WST-1.



Legenda: Tratamento de 24 h (a), 24 h+ (b) e a comparação dos resultados de ambas as exposições (c). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle (a e b) ou em relação as barras de uma mesma concentração tratada por diferentes intervalos de tempo (c), ** diferença em relação ao controle e 12,5% (a e b) ou controle, 12,5% e 18,75% (b) ($p < 0,05$) – Teste One way ANOVA/ Pós-teste Tukey (a e b) e Teste T (c).

Na MCF-7 todas as três concentrações testadas foram diferentes do controle em 24 h e 24 h+, sendo o grupo 12,5% diferente dos demais em 24 horas e diferente de 25% em 24 h+ (Figura 28 a e b). A comparação entre esses dois resultados indicou diferença significativa somente no grupo 12,5%, com diminuição da viabilidade 24 horas após o fim da exposição ao extrato utilizado (Figura 28 c).

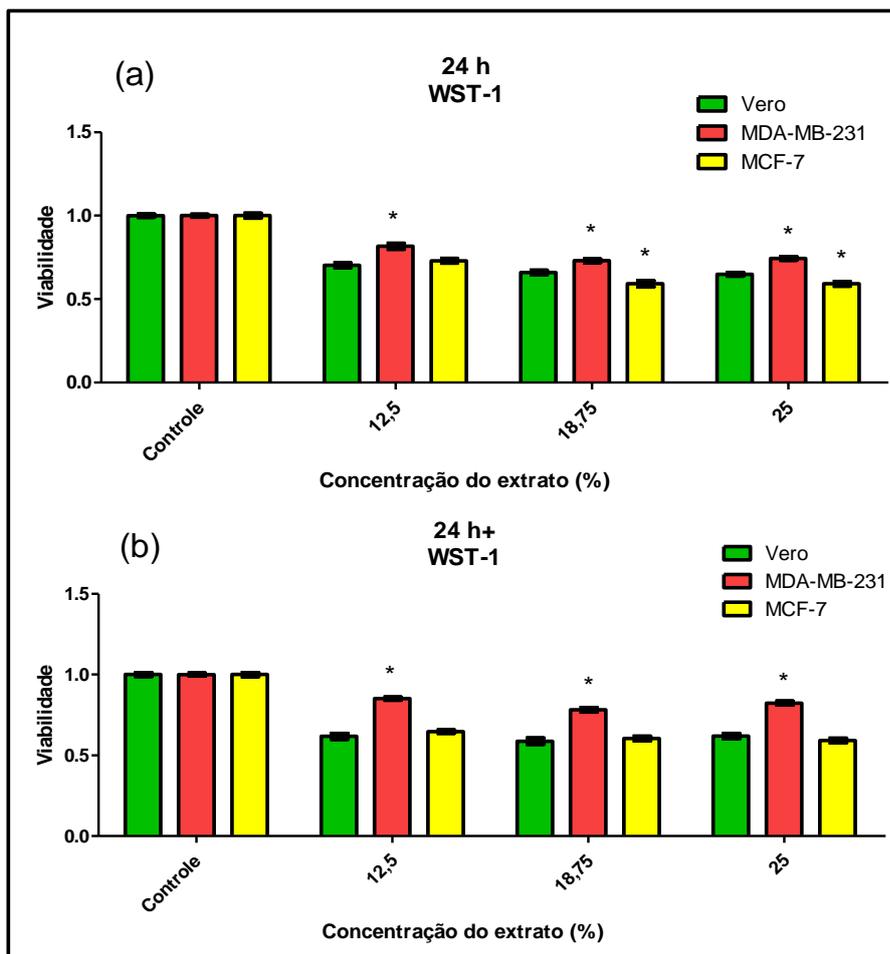
Figura 28 - Viabilidade celular da linhagem MCF-7 tratada com extrato de *Aloe vera* por 24 h e 24 h+ pelo ensaio de proliferação WST-1.



Legenda: Tratamento de 24 h (a), 24 h+ (b) e a comparação dos resultados de ambas as exposições (c). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle (a e b) ou em relação as barras de uma mesma concentração tratada por diferentes intervalos de tempo (c), e ** diferença em relação ao controle e 12,5% (a) ou controle e 25% (b) ($p < 0,05$) – Teste One way ANOVA/ Pós-teste Tukey (a e b) e Teste T (c).

A comparação das concentrações escolhidas e dos novos tempos de exposição revelou um resultado inesperado. A célula tumoral MDA-MB-231 obteve maior viabilidade que a linhagem Vero em todas as concentrações de extrato testadas em ambos os tempos (Figura 29). Isto foi diferente do observado em 24 horas anteriormente (Figura 14). Já a linhagem neoplásica MCF-7, em 24 horas, não foi diferente da linhagem Vero somente na concentração 12,5% (Figura 29 a). E, 24 horas após esse tratamento (24 h+), ela se igualou a Vero em todas as concentrações (Figura 29 b).

Figura 29 - Comparação da viabilidade celular das linhagens Vero, MDA-MB-231 e MCF-7 tratadas com extrato de *Aloe vera* por 24 h e 24 h+ pelo ensaio de proliferação WST-1.



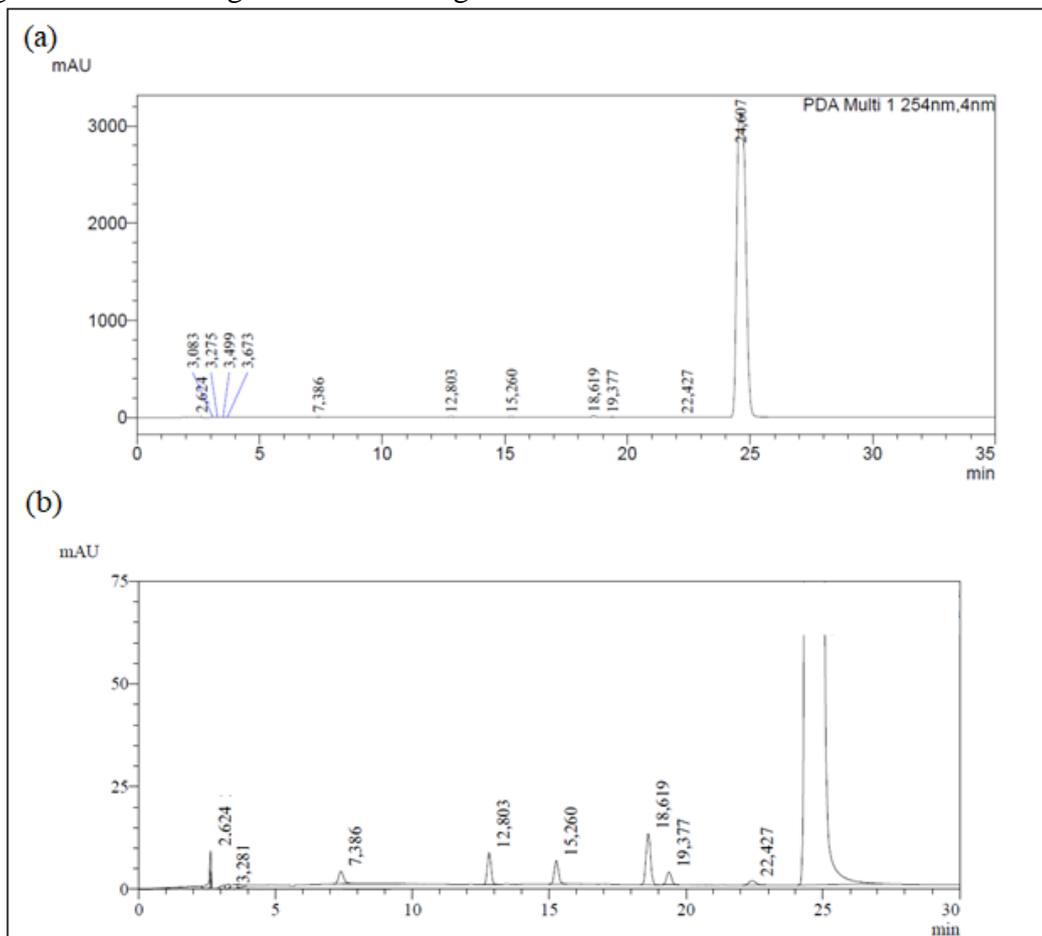
Legenda: Tratamento de 24 h (a) e 24 h+ (b). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa entre os diferentes tipos celulares em uma mesma concentração, tendo como referência a linhagem Vero ($p < 0,05$) – Teste Two-way ANOVA/ Pós-teste Bonferroni.

3.3 Perfil fitoquímico do extrato

3.3.1 HPLC-DAD

O cromatograma do extrato de *A. vera* mostrou uma substância majoritária em 24,6 min, com máximo de absorção (λ_{\max}) em 248 nm. Foram observados também picos minoritários entre 7 e 25 minutos, com λ_{\max} entre 220 e 280 nm (Figura 30).

Figura 30 - Cromatograma do extrato glicólico comercial de *Aloe vera*.



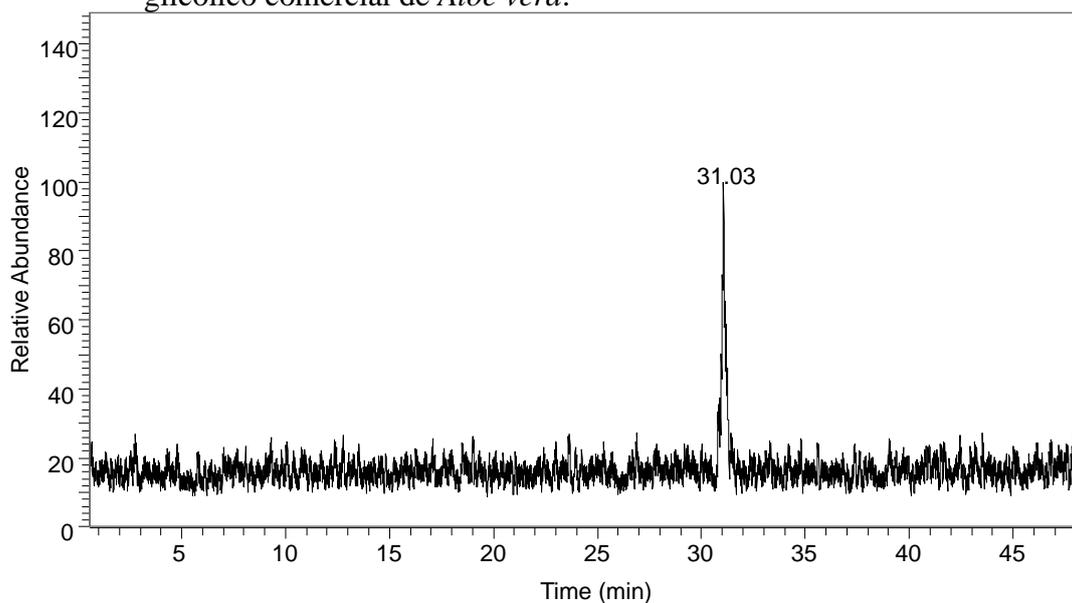
Legenda: Cromatograma (254 nm) do extrato glicólico comercial de *Aloe vera* (a) ampliado evidenciando picos minoritários (b).

3.3.2 HPLC-DAD-MS/MS

Nas condições utilizadas, foi possível detectar uma única substância (Figura 31) com tempo de retenção de 31 min. Tal pico apresentou $[M-H]^- = 151$ e fragmentos de m/z 136 e 92, compatíveis com as perdas sucessivas de metila e CO_2 .

As substâncias minoritárias detectadas previamente no ensaio por HPLC-DAD não foram detectadas nessa análise. As possíveis razões para isso são a fraca ionização das mesmas nas condições utilizadas e sua baixa concentração na amostra.

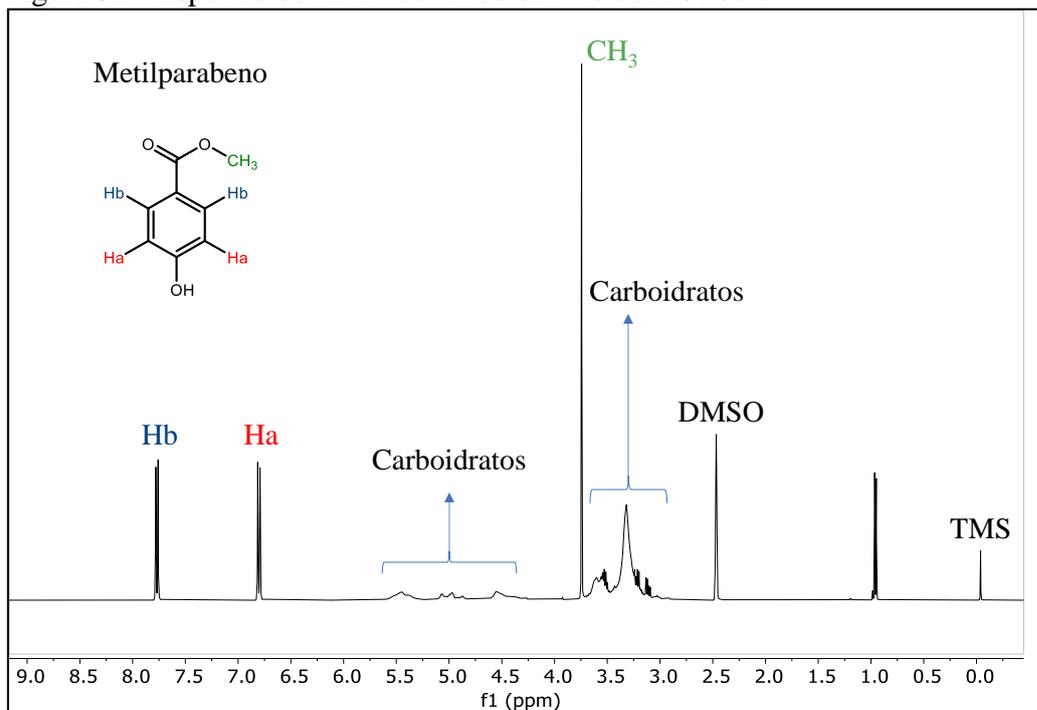
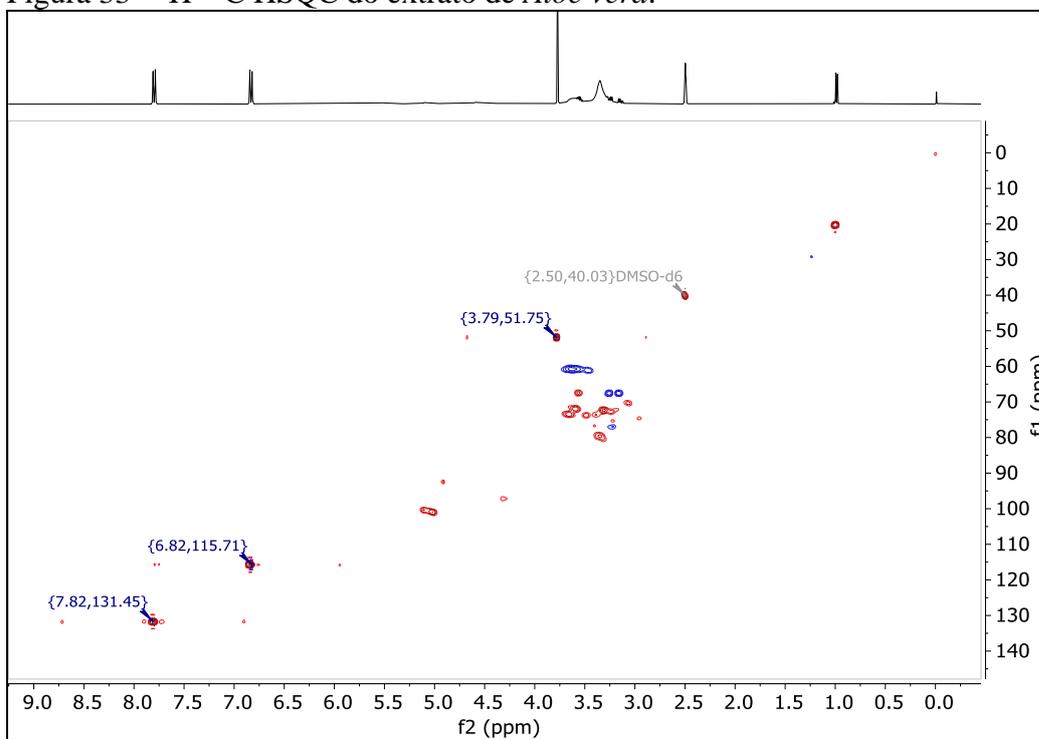
Figura 31 - Cromatograma (*base peak*) obtido por HPLC-DAD-MS/MS do extrato glicólico comercial de *Aloe vera*.



3.3.3 RMN

O espectro de RMN de ^1H (Figura 32) do extrato de *A. vera* evidenciou dois conjuntos distintos de sinais. O primeiro, composto por dois dupletos em 7,77 ($J = 8,8$ Hz) e 6,60 ppm ($J = 8,8$ Hz) e um simpleto em 3,74 ppm, com integrais de 2:2:3. O segundo conjunto de sinais encontra-se nas regiões entre 5,5 e 4,5 ppm e entre 4,0 e 3,0 ppm.

O espectro bidimensional HSQC (Figura33), que mostra a correlação entre hidrogênios e carbonos diretamente ligados.

Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H do extrato de *Aloe vera*.Figura 33 - ^1H - ^{13}C HSQC do extrato de *Aloe vera*.

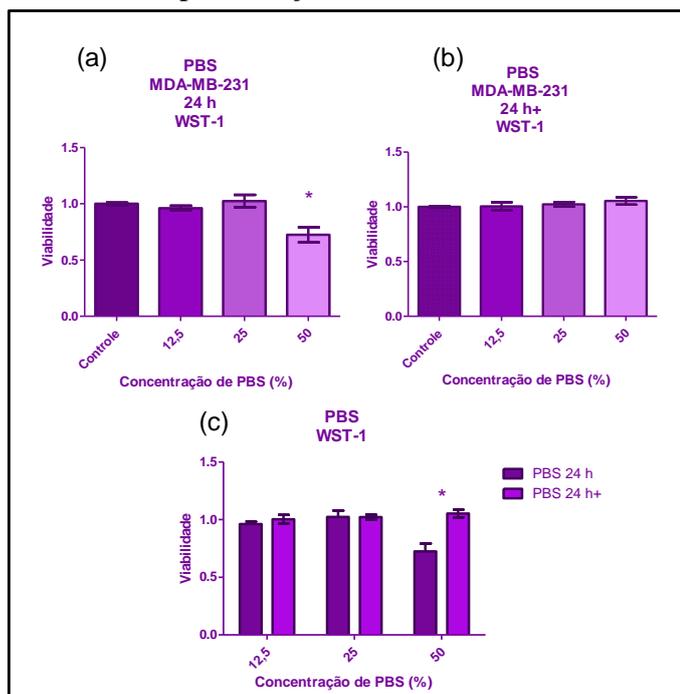
3.4 Resultados complementares

3.4.1 Ensaio de proliferação WST-1

3.4.1.1 Substituição do extrato glicólico de *Aloe vera* por PBS durante a incubação

Quando as células foram mantidas em soluções contendo PBS, somente após 24 horas de incubação, a amostra com 50% de PBS apresentou diferença significativa em relação ao controle (Figura 34 a). Após a lavagem das células e incubação com meio fresco por mais 24 horas (24 h+), a amostra 50% apresentou diferença quando comparada com a viabilidade após as primeiras 24 horas (Figura 34 c). Quando comparado aos resultados da exposição ao extrato, houve diferença significativa entre as duas condições de crescimento, com as amostras mantidas em PBS apresentando maior viabilidade do que aquelas incubadas com extrato (Figura 35).

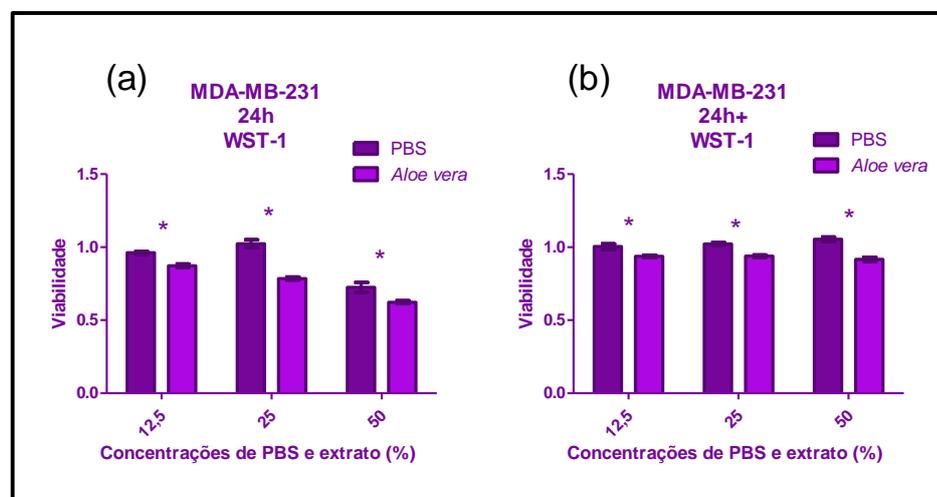
Figura 34 - Viabilidade celular da linhagem MDA-MB231 tratada com PBS por 24 h e 24 h+ pelo ensaio de proliferação WST-1.



Legenda: Tratamento de 24 h (a), 24 h+ (b) e a comparação dos resultados de ambos os tratamentos (c). Cada barra representa as diferentes concentrações de PBS com as quais as células foram tratadas

e o controle. O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle (a) ou em relação as barras de uma mesma concentração exposta por diferentes intervalos de tempo (c) ($p < 0,05$) – Teste One way ANOVA/ Pós-teste Tukey (a e b) e Teste T (c).

Figura 35 - Comparação da viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 tratada com extrato de *Aloe vera* e PBS por 24 h e 24 h+ pelo ensaio de proliferação WST-1.

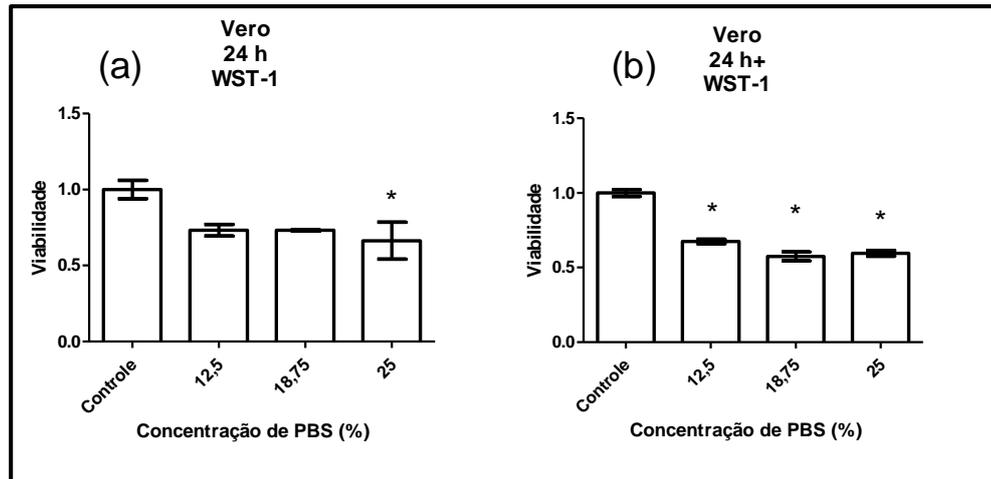


Legenda: Tratamento de 24 h (a) e 24 h+ (b). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato e PBS com as quais as células foram tratadas. O símbolo * indica diferença significativa em relação as barras de uma mesma concentração exposta ao extrato e ao PBS ($p < 0,05$) – Teste T.

3.4.1.2 Substituição da solução por PBS somente antes da reação do WST-1

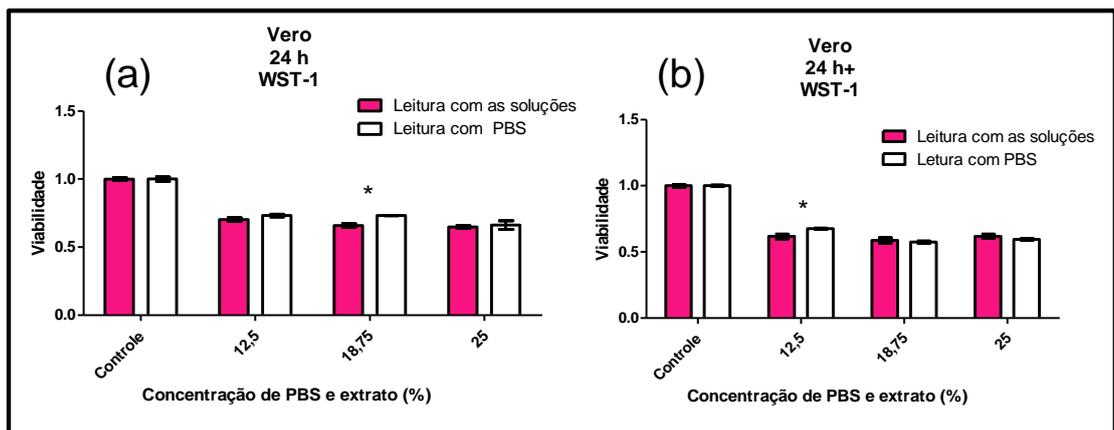
Quando as soluções foram substituídas por PBS somente antes da aplicação do WST-1 para a reação de conversão em formazan, os resultados da viabilidade nas células da linhagem Vero mantiveram o padrão que era observado antes da substituição (Figura 36). E isto se confirma ainda mais ao comparar as leituras realizadas com troca das soluções ou não (Figura 37).

Figura 36 - Viabilidade celular da linhagem Vero após o tratamento por 24 h e 24 h+ com extrato de *Aloe vera*, com a substituição das soluções por PBS antes da reação do reagente WST-1.



Legenda: Tratamento de 24 h (a) e 24 h+ (b). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas e o controle. O símbolo * indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$) – Teste One way ANOVA/ Pós-teste Tukey.

Figura 37 - Comparação dos resultados de viabilidade celular da linhagem Vero tratada por 24 h ou 24 h+ com extrato de *Aloe vera* e em que a leitura foi feita com as soluções (meio de cultivo e extrato de *Aloe vera*) e com PBS.



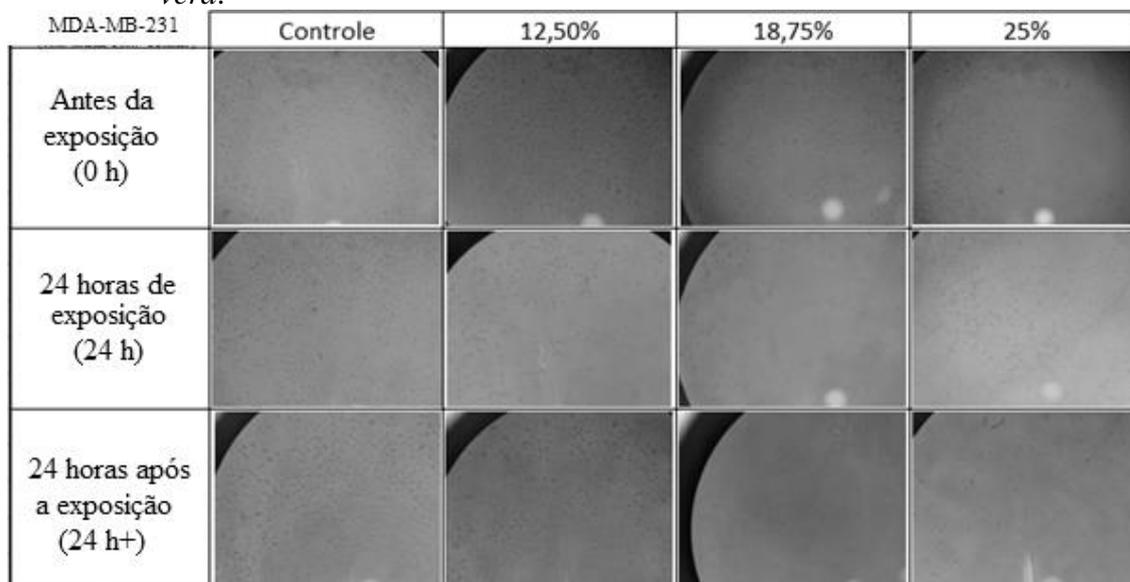
Legenda: Tratamento de 24 h (a) ou 24 h+ (b). Cada barra representa as diferentes concentrações do extrato com as quais as células foram tratadas. O símbolo * indica diferença significativa em relação as barras de uma mesma concentração ($p < 0,05$) – Teste T.

3.5 Análise visual da morfologia celular

Ao observar as células no microscópio invertido de luz, foi notado, além da esperada diminuição do número de células, uma mudança na morfologia celular. Foi então fotografado um poço por grupo, e este mesmo poço foi fotografado nas diferentes exposições. As fotos foram organizadas em tabelas para comparação.

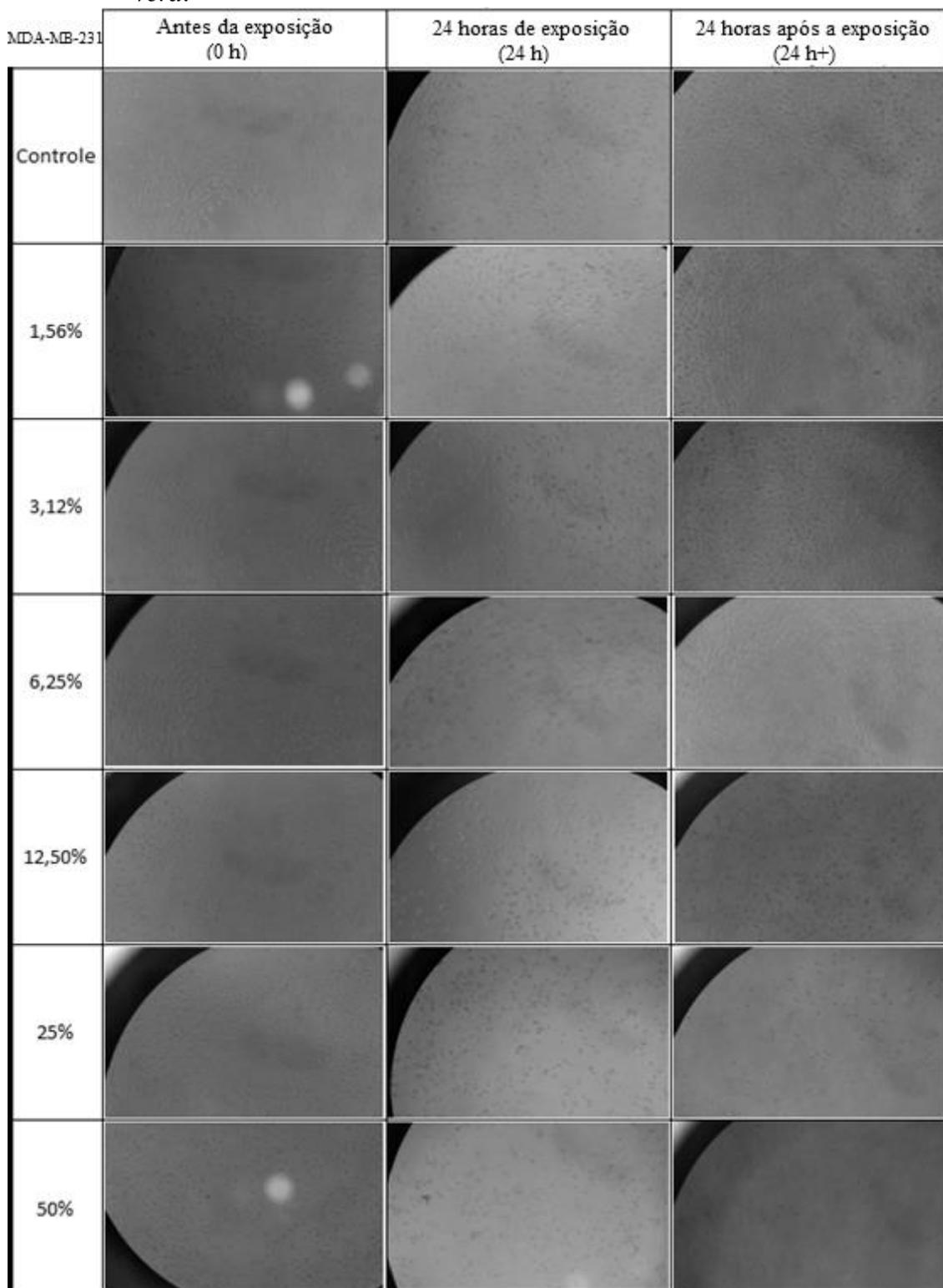
A célula MDA-MB-231 possui um fenótipo afilado e esticado quando aderidas. Na presença do extrato glicólico de *Aloe vera*, a partir da concentração 6,25%, foi possível notar que a mesma começou a modificar sua morfologia, que passou a ser arredondada, mesmo ainda estando aderida. A partir da concentração 12,5%, todas as células do poço se mostraram arredondas (Figuras 38 e 39). Na exposição 24 h+, após a retirada do extrato e substituição pelo meio de cultivo, as concentrações 6,25% e 12,5% retornaram ao seu fenótipo anterior, enquanto as maiores não. No tratamento com PBS, não houve diferença no fenótipo das células (Figura 40).

Figura 38 - Fotografias da linhagem tumoral MDA-MB-231 tratada com extrato de *Aloe vera*.



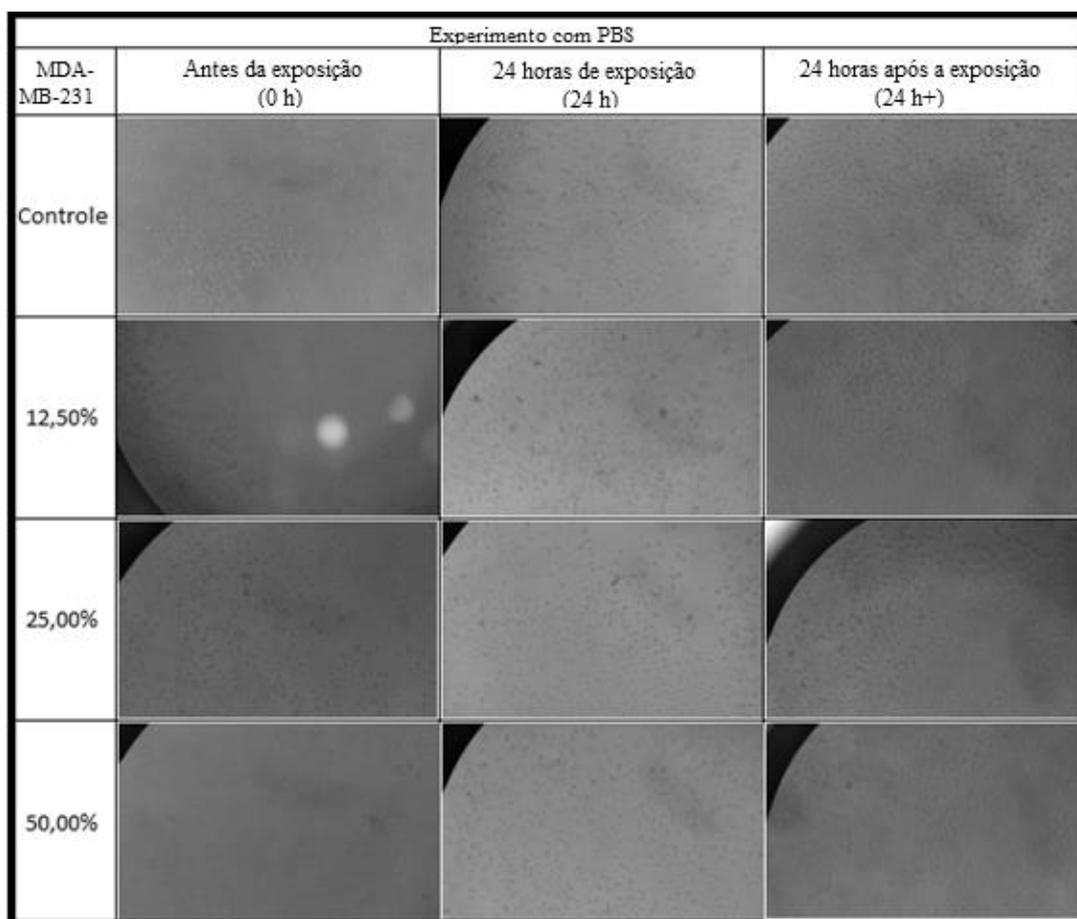
Legenda: As células foram tratadas com diferentes concentrações (0%, 12,5%, 18,75% e 25%) por diferentes tempos (0 h, 24 h e 24 h+) e fotografadas em microscópio de luz invertido com aumento 10x.

Figura 39 - Fotografias da linhagem tumoral MDA-MB-231 tratada com extrato de *Aloe vera*.



Legenda: As células foram tratadas com diferentes concentrações (0%, 1,56 %, 3,12%, 6,25%, 12,5%, 25% e 50%) por diferentes tempos (0 h, 24 h e 24 h+) e fotografadas tiradas em microscópio de luz invertido com aumento 10x.

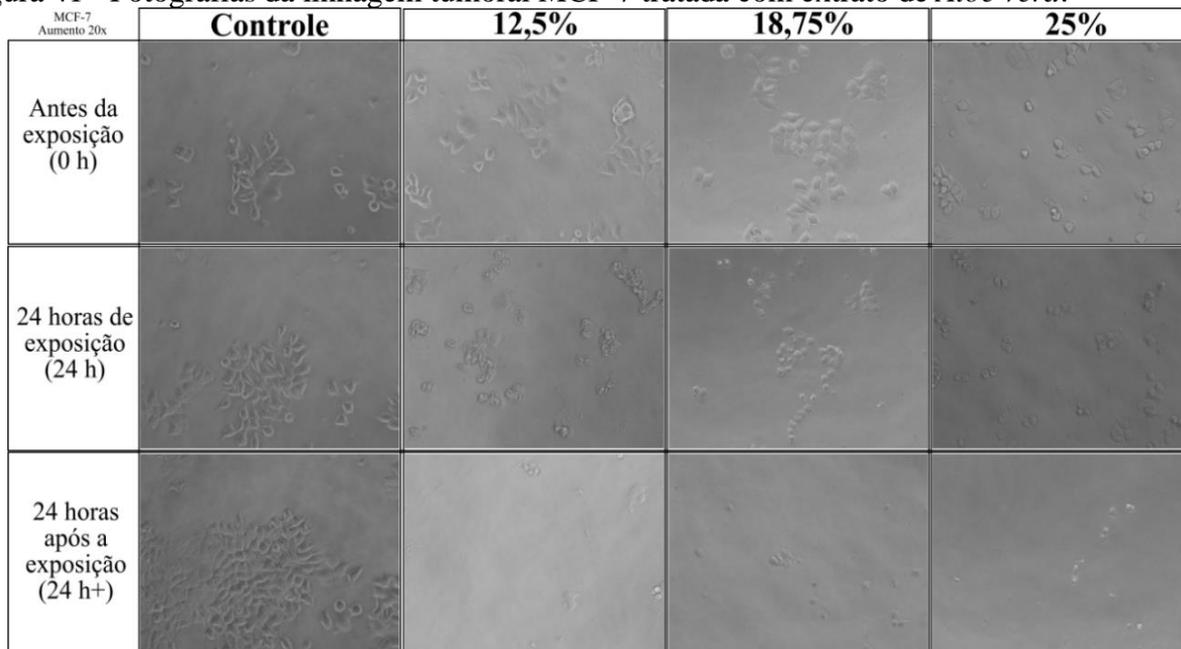
Figura 40 - Fotografias da linhagem tumoral MDA-MB-231 incubadas com PBS.



Legenda: As células foram tratadas com diferentes concentrações (0%, 12,5%, 25% e 50%) por diferentes tempos (0 h, 24 h e 24 h+) e fotografadas em microscópio de luz invertido com aumento 10x.

As células da linhagem MCF-7 também apresentaram diferença na morfologia na presença do extrato testado. Apesar de possuir um fenótipo diferente da outra linhagem tumoral, as células MCF-7 também se tornaram arredondadas e aparentemente contraídas, por ocupar menor área. Isto pode ser observado claramente nas três concentrações selecionadas, que diferem visualmente do controle (Figura 41). Algumas poucas células retornaram ao seu formato original 24 horas após o fim do tratamento (24 h+) na concentração 12,5%, porém isto não foi observado nas demais concentrações. As células permaneceram aderidas e organizando-se em ilhotas, como antes da mudança de morfologia.

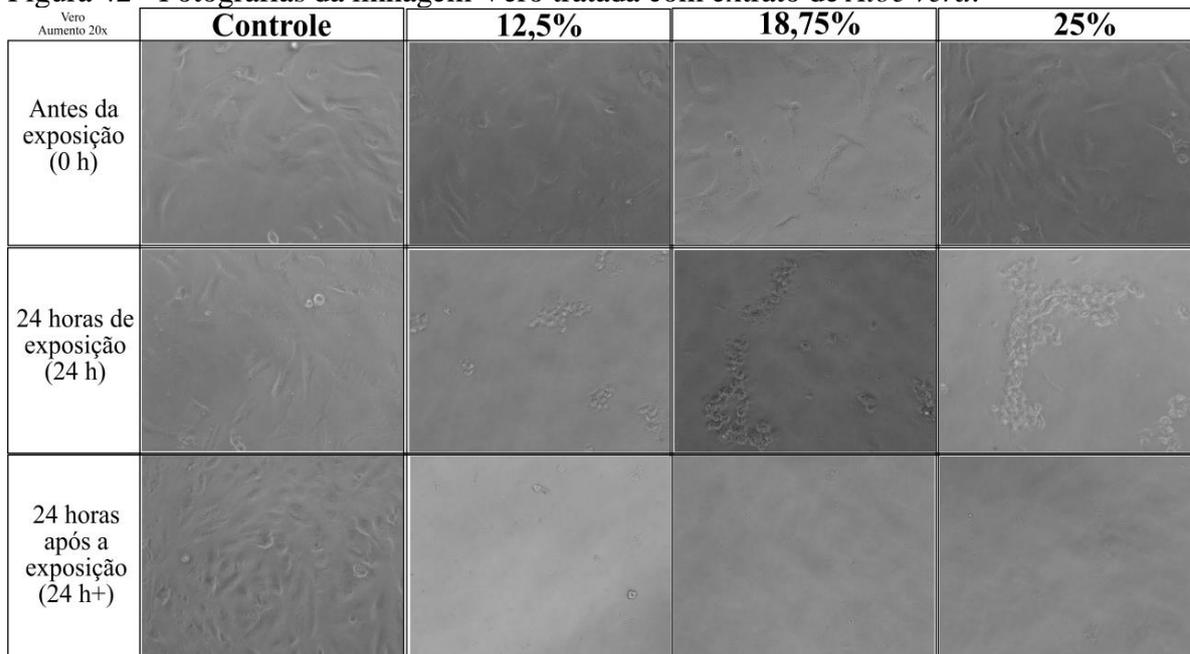
Figura 41 - Fotografias da linhagem tumoral MCF-7 tratada com extrato de *Aloe vera*.



Legenda: As células foram tratadas com diferentes concentrações (0%, 12,5%, 18,75% e 25%) por diferentes tempos (0 h, 24 h e 24 h+) e fotografadas em microscópio de luz invertido com aumento de 20x.

A linhagem Vero, não neoplásica, também apresentou a modificação morfológica, assim como as tumorais. Na presença do extrato de babosa, as células mudaram seu fenótipo para redondo, ao invés de afiladas e esticadas. As células mantiveram-se aderidas, e desta vez, se organizaram em formas de ilhotas, diferentemente de antes da exposição ao extrato. E não foi observado um retorno ao fenótipo original, nem mesmo em 12,5% de extrato de *Aloe vera* (Figura 42).

Figura 42 - Fotografias da linhagem Vero tratada com extrato de *Aloe vera*.



Legenda: As células foram tratadas com diferentes concentrações (0%, 12,5%, 18,75% e 25%) por diferentes tempos (0 h, 24 h e 24 h+) e fotografadas em microscópio de luz invertido com aumento de 20x.

4 DISCUSSÃO

Muitas são as atividades biológicas já descritas da *Aloe vera* e seus efeitos muitas vezes podem estar associados também à forma de preparo do vegetal, afinal, são diversos extratos (com diluentes distintos) e diferentes constituintes da planta para serem utilizados, dos quais o uso do gel é o mais comum. Guo e Mei (2016), em seu trabalho de revisão, divulgaram diferentes efeitos clínicos e tóxicos (citotóxicos, genotóxicos e carcinogênicos) do extrato de folhas inteiras de *A. vera*, do gel e do látex, pois apresentam composição química diferenciada. Na literatura científica é possível encontrar muitos trabalhos utilizando extratos brutos, aquoso, alcoólico (metanólico, etanólico) e hidroalcoólico de *Aloe vera* (L.) Burm f. para diversos fins, porém poucos estudos são encontrados acerca do extrato glicólico. O extrato glicólico de *Aloe vera* já foi estudado em relação a cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos (FALEIRO *et al.*, 2009); redução do crescimento e formação de tubos germinativos por *Candida albicans* (BERNARDES *et al.*, 2012); atividade antimicrobiana *in vitro* em canais de raízes dentárias (VALERA *et al.*, 2013); e atividade coagulante na remoção da turbidez da água (BORRI, FREIRE e BOINA, 2014), porém nada ainda foi descrito a respeito de sua atividade antineoplásica. É importante notar que todos os trabalhos mencionados que usaram o extrato glicólico de *Aloe vera* são brasileiros e, além disso, em todos os casos, o extrato utilizado foi comercial, assim como o do presente trabalho. Outro estudo, que também utilizou o extrato glicólico comercial de *A. vera* da Mapric®, foi o de De Lima (2016), também realizado pelo Laboratório de Radio e Fotobiologia UERJ, testando a associação do extrato com radiação UVA em células de adenocarcinoma pulmonar (A549).

No presente estudo, os resultados da primeira fase evidenciam citotoxicidade nas maiores concentrações, onde metade ou um quarto da solução era composto pelo extrato glicólico comercial de *Aloe vera*. Isto foi observado através dos dois testes aplicados para avaliar a viabilidade celular nas linhagens testadas e em ambos os tempos de tratamento (Figuras 11-18). Resultados como os de De Lima (2016) corroboram esses dados. Já as menores concentrações não mostraram citotoxicidade, exceto no tempo de 2 horas de incubação nas células Vero, onde foi encontrada diferença significativa em relação ao controle na concentração 6,25% pelo ensaio de proliferação WST-1 (Figura 11). No

entanto, o nível de significância estatística, embora menor do que 0,05, ficou muito próximo desse valor. Além disso, o grupo da concentração de 6,25% não apresenta diferença significativa em relação à concentração 12,5%, a qual não foi diferente do controle. Sendo assim, talvez com o aumento do número amostral neste grupo, essa diferença significativa em relação ao controle não apareça. Segundo a bula do extrato comercial de *Aloe vera* produzido pela empresa Mapric® (Anexo 1), o produto deve ser utilizado na preparação de cosméticos em concentrações abaixo de 10%. Então, de acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais do presente trabalho, é possível sugerir que em relação à citotoxicidade essas concentrações parecem ser seguras para uso externo.

A concentração 12,5% foi citotóxica para a célula MDA-MB-231 em 24 horas de tratamento e para linhagem MCF-7 em 2 e 24 horas de tratamento (Figuras 12 e 13). A citotoxicidade nesta concentração foi evidenciada somente pelo ensaio de proliferação WST-1, provavelmente devido à sensibilidade de cada método. Diferentes ensaios de citotoxicidade podem apresentar resultados distintos dependendo da intervenção experimental e do ensaio usado (WEYERMANN, LOCHMANN e ZIMMER, 2005; FOTAKIS e TIMBRELL, 2006). Além disso, sensibilidade do ensaio também pode variar com esses parâmetros. Zwolak (2015) comparou cinco diferentes testes de viabilidade celular usados na análise da citotoxicidade do vanádio em células da linhagem CHO-K1, dentre os quais havia o teste de exclusão por azul de tripan e o XTT, que utiliza o mesmo princípio do ensaio de proliferação WST-1. O autor concluiu que, neste caso, o ensaio de exclusão por Azul de Tripan mostrou-se o menos sensível dentre todos os testados, indicando que perturbações mitocondriais causadas pelo tratamento ocorrem antes dos danos à integridade da membrana plasmática. No atual trabalho, o ensaio de proliferação WST-1 mostrou-se mais sensível nas células tumorais, comparado ao ensaio de exclusão por Azul de Tripan, por indicar citotoxicidade do extrato a partir da concentração 12,5%. Isto sugere que o extrato glicólico de *Aloe vera* causa alterações no metabolismo mitocondrial das células tumorais antes de afetar a integridade da membrana celular.

Tratando-se ainda da mesma concentração abordada no parágrafo anterior, a linhagem não neoplásica (Vero) foi a única que não apresentou diferença significativa em 12,5% de extrato (Figura 11) nos experimentos iniciais (2 e 24 horas). Os resultados das células tumorais mostram um mesmo comportamento observado no trabalho de De Lima (2016), que também utiliza uma célula tumoral (A549 – adenocarcinoma pulmonar). Nos tempos de 2 e 24 horas o autor observa citotoxicidade induzida pelo mesmo extrato

glicólico de *Aloe vera* nas células da linhagem A549 na concentração 12,5%. Ele ainda afirma que tais dados podem indicar uma possível atividade antitumoral desse extrato em concentrações acima de 12,5% (DE LIMA, 2016).

Nos experimentos de fase 1, onde a cito e genotoxicidade do extrato foi testada nas três linhagens celulares, em seis diferentes concentrações, e por 2 e 24 horas, foi evidenciado maior potencial antineoplásico do extrato glicólico comercial de *Aloe vera* em 24 horas de tratamento. Isto porque ao comparar os dois tempos de cada célula, há uma tendência de aumento da viabilidade da célula não-neoplásica Vero; enquanto há um decréscimo dessa viabilidade em ambas as células tumorais nesta exposição prolongada (Figura 14). Isto pode indicar que uma exposição curta é mais facilmente suportada pelas células neoplásicas, porém, a exposição prolongada garante tempo suficiente para a célula não neoplásica se recuperar dos danos causados pela exposição inicial. Possivelmente, o acúmulo de lesões de um tratamento prolongado não é suportado nas células tumorais e isso pode indicar uma eventual deficiência no sistema de reparo a danos causados pelo tratamento. Já é fato conhecido que dentre as etapas da carcinogênese há alterações genéticas em genes responsáveis pelo sistema de reparo do DNA (KENTSIS, 2020), o que aumenta o número de mutações no DNA e a instabilidade genética destas células. Deste modo, considerando que tais células possuam essa deficiência, é possível supor que o extrato cause lesões no DNA que afetem a viabilidade celular. Em concordância com isto, temos os resultados sobre a genotoxicidade obtidos pelo ensaio cometa. Na comparação das três linhagens celulares, a célula Vero obteve menor taxa de dano que as demais em 24 horas, com diferença significativa em 1,56% e 12,5% (Figura 25). Observando atentamente a distribuição de classes do cometa, é possível notar que há um crescimento de classes 0 e 1, que indicam pouco ou nenhum dano, em 24 h na célula Vero (Figura 20). Essa mesma linhagem apresentou a classe 2 como predominante (classificação intermediária de danos), após duas horas de tratamento com extrato de *A. vera* (Figura 20). Isto confirma a ideia de que o maior tempo de tratamento fornece condição suficiente para o sistema de reparo atuar na correção dos danos que foram causados pelo extrato. Já na linhagem MDA-MB-231, a distribuição de classes demonstrou o contrário. Enquanto havia poucos danos na exposição de duas horas (predominância de classe 0 e 1), em 24 horas há um maior acúmulo de danos, com prevalência da classe mediana de danos (classe 2) (Figura 22). Todavia, os resultados da outra linhagem neoplásica (MCF-7), foram diferentes do esperado. A linhagem MCF-7 mostrou uma distribuição de classes bem equilibrada em duas horas de tratamento, e em

24 horas a classe 1 se destacou das demais (Figura 24), indicando menos danos e possivelmente maior atividade de reparo que as outras linhagens.

Apesar das duas células tumorais usadas no trabalho serem provenientes de epitélio de adenocarcinoma mamário humano, estas possuem características distintas, o que pode explicar diferentes respostas ao tratamento. A linhagem MCF-7 possui receptores de estrogênio e progesterona e é pouco invasiva (LEVENSON e JORDAN, 1997). Esta linhagem representa um fenótipo de câncer mamário em estágio inicial que manteve os controles do ponto de verificação do ciclo celular mediado por p53 (ACU *et al*, 2010; EL-MASRY, BROWN e DOBSON, 2019). Já a MDA-MB-231 é chamada de triplo-negativa por não ter os receptores de estrogênio, progesterona e fator de crescimento epidérmico humano (HER2), sendo considerada altamente agressiva e invasiva (*European Collection of Authenticated Cell Cultures - ECACC*). Diferentemente da primeira, esta tem características de fenótipo de câncer de mama avançado com propriedades metastáticas agressivas, perda de controle de pontos de verificação mediado por p53, devido a inativação do seu gene por mutação, e um alto grau de instabilidade genômica (ACU *et al*, 2010; EL-MASRY, BROWN e DOBSON, 2019). Isto eleva o risco da doença e dificuldade do tratamento. As terapias indicadas para câncer com tais características também são diferenciadas, sendo hormonal (terapia alvo) no primeiro caso e quimioterapia (inespecífica) no segundo (MOSES, EDWARDS e BRANTLEY, 2016). Todas essas desigualdades entre as duas linhagens podem fazer com que as respostas ao tratamento com extrato glicólico de *Aloe vera* também sejam distintas. Os resultados referentes à genotoxicidade das células neoplásicas foram divergentes, pois, enquanto os danos da linhagem MDA-MB-231 aumentaram com o passar do tempo de tratamento, na linhagem MCF-7 eles diminuíram, indicando um reparo. Como mencionado anteriormente, Acu e colaboradores (2010) afirmam que a MCF-7 ainda mantém seus pontos de checagem no ciclo celular, pois não sofre mutação no gene da proteína p53, dando possibilidade de o sistema de reparo agir. Os mesmos pesquisadores sugerem que o sistema de reparo de DNA e controle da homeostase da MCF-7 mantém-se intacto, enquanto o da MDA-MB-231 não. Ainda, o estudo afirma que a MDA-MB-231 também possui deficiência na expressão da proteína de complementação do xeroderma pigmentosum do grupo C (XPC), a qual participa do sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (ACU *et al*, 2010). Além da diferença dos resultados na genotoxicidade, também houve uma pequena diferença na viabilidade. Quando as células tumorais são comparadas entre si, há maior viabilidade da linhagem MCF-7 nas concentrações 25%

(em 2 e 24 h) e em 50% (em 2 h) (Figura 15). Isso indica um comportamento similar entre as células tumorais, porém nas concentrações comprovadamente citotóxicas, é manifestada maior sensibilidade ao tratamento na linhagem MDA-MB-231.

Através das comparações dos resultados dos experimentos iniciais foi possível chegar a uma concentração e um tempo de tratamento com extrato glicólico comercial de *Aloe vera* que indicou maior potencial antineoplásico. A exposição longa mostrou melhores resultados por aumentar a viabilidade e oferecer tempo suficiente para reparar os danos no DNA causados pelo extrato na linhagem Vero. Nas células tumorais a viabilidade diminuiu neste tempo (Figuras 11-14). Tratando-se da genotoxicidade, a MDA-MB-231 teve um aumento e a MCF-7 uma diminuição, assim como a Vero em 24 h. Contudo, mesmo com a diminuição dos danos ao DNA, ainda assim a taxa de dano da MCF-7 em 24 h de exposição é superior à taxa da linhagem Vero (Figura 25). Já em relação às concentrações, a solução que continha 12,5% de extrato de *Aloe vera* mostrou-se mais promissora. Isto porque, a célula não tumoral (Vero) não apresentou diferença significativa em relação ao controle na viabilidade em nenhuma das duas exposições (Figura 11 e 16); enquanto que essa diferença foi observada em ambas as células de adenocarcinoma mamário em 24 horas (Figuras 12 e 13). Na comparação das exposições das células tumorais, foi evidenciada, com diferença significativa ($p < 0,05$), a diminuição da viabilidade com o prolongamento do tempo que as células eram mantidas em contato com o extrato. Os resultados do ensaio cometa na linhagem MDA-MB-231 reforçou o potencial da concentração 12,5% de extrato de *A. vera*, visto que foi a única concentração que apresentou diferença significativa ao comparar os dois tempos de tratamento, indicando aumento da taxa de dano no DNA no tempo de 24 horas (Figura 21). Na linhagem MCF-7 também foi observada diferença significativa na concentração 12,5% na comparação das exposições (Figura 23). Contudo, neste caso, a taxa de dano decresceu, provavelmente devido ao funcionamento do sistema de reparo de DNA, como discutido anteriormente. Na linhagem não tumoral, apesar de haver uma diminuição da taxa de dano em 24 h, não foi o suficiente para apresentar diferença significativa (Figura 19).

Diante das análises dos resultados fase 1, o estudo seguiu para uma segunda fase com algumas seleções. Primeiramente, selecionou-se o tempo de 24 horas de tratamento, e além deste, foi adicionado o tratamento 24 h+. Esse tratamento consistiu em incubar as células com extrato glicólico de *Aloe vera* por 24 horas e, em seguida, lavar os poços com PBS e substituir as soluções que continham extrato por meio de cultivo suplementado, por mais 24 horas. Desta maneira, foi possível avaliar se as células conseguem recuperar

sua viabilidade após a exposição ao extrato ser interrompida. Apesar de o extrato ter sido retirado do contato com as células, sabe-se que parte dele já foi incorporado pela mesma, então a questão seria saber se essa quantidade no interior da célula foi o suficiente para continuar sua ação citotóxica. Em uma possível situação terapêutica, seria interessante que viabilidade das células tumorais não se reestabeleça nesse segundo tratamento, pois desta maneira o tratamento poderia ser feito em algumas sessões, e não precisaria ser de forma constante. A segunda seleção feita no estudo foi em relação às concentrações. Foi observado que a concentração com potencial antineoplásico, dentre as estudadas, foi a de 12,5%. Assim sendo, ela foi selecionada juntamente com uma concentração superior a esta (25%). Além destas duas, também foi acrescentada uma concentração intermediária às mesmas: 18,75%. Com essas concentrações, foi possível avaliar qual é o limite para as células não-neoplásicas quanto à citotoxicidade do extrato.

Após essas seleções, foram obtidos novos resultados de viabilidade, por meio do ensaio de proliferação WST-1. Iniciando pela célula Vero, este segundo resultado foi diferente do esperado, levando em consideração o primeiro. Isto porque, inicialmente, em 24 horas de tratamento, a concentração 12,5% não apresentou diferença significativa em relação ao controle (Figura 11). No entanto, nesta segunda fase, foi constatada citotoxicidade na concentração mencionada (Figura 26). Isto pode ter ocorrido devido ao aumento do número amostral nos experimentos. Enquanto nos experimentos da primeira fase os testes foram feitos em quintuplicatas, nos experimentos posteriores o número de réplicas dobrou em cada teste. Vale mencionar que, além de diferenciar-se do grupo controle, esta também diferenciou-se significativamente de 25%, a qual já era diferente do controle nos primeiros experimentos. Em 24 h+, todas as concentrações mantiveram a diferença ao controle sem diferenciar-se entre si, indicando que não conseguiram recuperar a viabilidade o suficiente para igualar ao controle (Figura 26). A comparação dos dois tratamentos mostrou diferença nos grupos 12,5% e 18,75%, com queda da viabilidade em 24 h+. Apesar dos resultados de genotoxicidade das células Vero indicar a ativação do sistema de reparo, talvez o tempo de 24 horas sem a presença do extrato não seja o suficiente para que haja uma recuperação e aumento da viabilidade em decorrência destes reparos. Uma resposta similar a esta foi vista na célula de câncer mamário menos agressiva (MCF-7). Com um comportamento semelhante à Vero, tanto em 24 h como em 24 h+, todas as concentrações foram diferentes significativamente do controle (Figura 28). E na comparação entre as duas exposições, somente a concentração 12,5% apresentou diferença significativa, indicando menor viabilidade em 24 h+. A

análise da genotoxicidade desta célula também indicou reparo do DNA. Porém, assim como no caso da Vero, talvez seja necessário um tempo superior a 24 horas para que as consequências do reparo genético sejam refletidas na viabilidade da linhagem. Ou, talvez isto possa indicar que a quantidade de extrato incorporada pela célula nas primeiras 24 horas seja suficiente para ainda ser citotóxica nas 24 horas seguintes. Na linhagem mais agressiva MDA-MB-231, em 24 horas de tratamento, todas as concentrações foram menores significativamente do controle, sendo a viabilidade do grupo com 12,5% um pouco maior que as demais, como esperado de acordo com os primeiros resultados (Figura 27). Depois de 24 horas após o encerramento do tratamento, todos os grupos foram diferentes entre si. Na comparação dos tratamentos, houve diferença significativa somente nos grupos 18,75% e 25%, indicando aumento na viabilidade celular em 24 h+, ou seja, recuperação. Isto aponta que a MDA-MB-231 consegue recuperar parte da sua viabilidade, mas não o suficiente para se igualar ao controle. É interessante notar que no grupo 12,5%, a recuperação não foi significativa, o que pode ser mais uma evidência de que esta concentração do extrato seja a mais promissora no que diz respeito a ação antineoplásica.

O extrato de *Aloe vera* é rico em antraquinonas, as quais são estudadas por apresentarem diversas atividades biológicas, inclusive contra células cancerígenas. De acordo com resultados já obtidos pelo Laboratório de Radio e Fotobiologia da UERJ (De Lima, 2016), no extrato comercial utilizado no presente estudo não há emodina, uma antraquinona descrita com ações de interesse para o estudo, como indução de citotoxicidade, apoptose e inibição da migração, invasão e metástase em células de câncer de mama (SUN *et al.*, 2015). Entretanto, a literatura afirma que há outros componentes do extrato de *Aloe vera*, que também tem mostrado potencial antineoplásico. A aloína é uma antraquinona que vem sendo estudada sobre seus efeitos contra o câncer, com ação de indução de apoptose em células de câncer de pulmão (WAN *et al.*, 2017), estômago (WANG *et al.*, 2018) e colorretal (PAN *et al.*, 2013). A aloesina, outra antraquinona encontrada na *Aloe vera*, exibiu a supressão do crescimento e metástase de células de câncer de ovário (ZHANG *et al.*, 2017). E a aloe-emodina, a mais conhecida dentre as substâncias dessa classe contidas na planta estudada, tem sido amplamente pesquisada por suas mais diversas atividades biológicas. Pesquisas mostraram que a aloe-emodina é capaz de induzir a apoptose e suprimir a proliferação em células escamosas de carcinoma de pulmão (SCC) (WU *et al.*, 2017), em MH7A (células sinoviais), inclusive podendo substituir o metotrexato, uma droga muito utilizada no tratamento de tumores malignos

(HASHIGUCHI *et al.*, 2017) e em MIA PaCa-2 e PANC-1 (células de carcinoma pancreático humano). Além disso, também é capaz de parar o ciclo celular, causar perturbação ao potencial de membrana mitocondrial e ativar a autofagia nessas células (DU *et al.*, 2019). Também há estudos em que atua em sinergismo aumentando a eficiência de drogas já utilizadas no tratamento do câncer, como é o caso do tamoxifeno, usado em terapia de câncer mamário positivos para receptores de estrogênio (TSENG *et al.*, 2017). Devido a essa grande quantidade de resultados já descritos, a aloe-emodina foi descrita por Özenver e colaboradores (2018) como uma droga candidata a terapia de câncer. Sendo assim, há possibilidades de substâncias da classe das antraquinonas serem responsáveis pelos efeitos que estão sendo observados no presente trabalho devido aos seus potenciais antineoplásicos.

Mais testes de análise fitoquímica do extrato são necessários para confirmar a presença de antraquinonas, no entanto foram detectados carboidratos, possivelmente polissacarídeos, além de substâncias fenólicas, que podem ser as substâncias de interesse. Picos minoritários entre 7 e 25 minutos, com λ_{\max} entre 220 e 280 nm, foram observados no cromatograma de HPLC-DAD, indicando ser substâncias fenólicas simples (Figura 30). A técnica RMN é empregada para a elucidação estrutural de substâncias isoladas e também para determinar a composição global de misturas complexas, como extratos de plantas, uma vez que permite a detecção de qualquer substância que contenha hidrogênios e carbonos (KIM, CHOI e VERPOORTE, 2011; WOLFENDER *et al.*, 2013; SIMMLER *et al.*, 2014). Através deste método foi possível caracterizar as substâncias fenólicas simples observadas por HPLC-DAD no extrato glicólico de *Aloe vera* (Figura 32), pois foi evidenciado um conjunto de sinais que se encontram nas regiões entre 5,5 e 4,5 ppm e entre 4,0 e 3,0 ppm, os quais, com elevado grau de sobreposição, são característicos de carboidratos (CASANOVA *et al.*, 2016). É provável que correspondam a polissacarídeos, conhecidos por fazer parte da composição do gel das folhas de *A. vera* (HAMMAN, 2008). Além disso, o estudo da composição do extrato também revelou uma única substância muito majoritária, o que é incomum para extratos de plantas, que costumam apresentar diversos constituintes fenólicos em baixas concentrações. O cromatograma do HPLC-DAD apresentou um pico em 24,6 min, com máximo de absorção (λ_{\max}) em 248 nm, evidenciando tratar-se de uma substância fenólica com cromóforo simples (um único anel aromático) (Figura 30). Através do HPLC-DAD-MS/MS, o qual permite obter informações sobre a massa molecular e estrutura das substâncias presentes em uma amostra através da obtenção de espectros de massas de seus constituintes (NICULAU *et*

al., 2016; WOLFENDER, MARTI e FERREIRA QUEIROZ, 2010), foi possível obter resultados que detectaram uma única substância com tempo de retenção de 31 min (Figura 31). Tal pico apresentou $[M-H]^- = 151$ e fragmentos de m/z 136 e 92, compatíveis com as perdas sucessivas de metila e CO_2 . Essa massa e padrão de fragmentação são compatíveis com o metilparabeno, um conservante amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (GRECCO *et al.*, 2018). Complementando e confirmando a identificação dessa substância, os resultados da análise por RMN apresentaram sinais compostos por dois dupletos em 7,77 ($J = 8,8$ Hz) e 6,60 ppm ($J = 8,8$ Hz) e um simpleto em 3,74 ppm, com integrais de 2:2:3 (Figuras 32 e 33). Os dupletos são correspondentes a um anel aromático para-substituído, enquanto o simpleto é característico de uma metoxila. Esses sinais são compatíveis com a estrutura do metilparabeno (WISHART *et al.*, 2018), confirmando a presença de tal substância no extrato.

Segundo a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), conservantes são definidos como “substâncias que são adicionadas como ingrediente aos Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes com a finalidade de inibir o crescimento de micro-organismos durante sua fabricação e estocagem, ou para proteger os produtos da contaminação inadvertida durante o uso”. Conforme a RCD nº 29/2012 da mesma agência, o metilparabeno é um conservante permitido para uso em uma concentração máxima de 0,4% (individual) ou 0,8% (mistura), sem limitações, advertências ou condições de uso. Apesar do uso do conservante metilparabeno não ter sido informado pelo fabricante na bula do extrato (Anexo 1), através da análise fitoquímica foi possível atestar sua presença. Como o extrato utilizado no estudo é comercializado principalmente para compor formulação de cosméticos, como cremes, loções, shampoos e outros, é compreendida a razão do uso de metilparabeno. Apesar de liberado pelo órgão regulador (Anvisa), o uso de parabenos no geral é controverso. Isto porque alguns estudos relacionam a presença de parabenos em tumores de mama como possíveis causadores destes (DARBRE *et al.*, 2004; DARBRE e HARVEY, 2014; AMIN *et al.*, 2019). Além disso, os parabenos possuem propriedades parecidas com as do estrogênio (xenoestrógeno), como aumento da proliferação do epitélio mamário tanto normal como neoplásico (PARENTE *et al.*, 2015). No entanto, um estudo de 1998 afirmou que, dentre os parabenos testados (metil-, etil-, propil, e butilparabeno), todos foram considerados fracamente estrogênicos, com o mais potente (butilparabeno) sendo 10.000 vezes menos potente do que o 17 beta-estradiol (ROUTLEDGE *et al.*, 1998). Porém, ainda não há de

fato comprovação científica de que os parabenos sejam carcinogênicos. Os sites de duas agências governamentais americanas, a FDA (*Food and Drug Administration* – órgão governamental dos EUA responsável pelo controle de alimentos, medicamentos, cosméticos e materiais médicos) e o Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute*), respondem perguntas a respeito disto, afirmando não haver evidências científicas que relacionem o uso de parabenos com risco a saúde humana ou câncer de mama. Na lista de classificação de agentes cancerígenos para humanos da IARC não há nenhum parabeno. Tratando-se do presente estudo, não houve possibilidades de executar experimentos controle somente com o metilparabeno. No entanto, há estudos na literatura que mostram resultados seguros de metilparabeno, por não induzir citotoxicidade. Carvalho e colaboradores (2012) testaram a indução *in vitro* de apoptose, necrose e genotoxicidade de diferentes conservantes (fenoxietanol, propilparabeno, metilparabeno, álcool benzílico e etilhexil glicerina), e o metilparabeno foi o segundo menos citotóxico da lista, porém apresentou a maior média de genotoxicidade considerando todas as concentrações testadas. Porém, o próprio autor afirma que é possível que qualquer genotoxicidade aparente possa ser devido à fragmentação normal do DNA que ocorre no estágio final de apoptose (CARVALHO *et al*, 2012). O estudo de Kizhedatha, Wilkinsonb e Glassey (2019) que testou a hepato e dermatocixidade *in vitro* do butil e metilparabeno, evidenciou que, nas concentrações testadas, o metilparabeno não provocou diminuição da viabilidade, níveis de ATP e nem de GSH. Uma revisão realizada no ano de 2008 sobre a segurança de diversos conservantes usados em cosméticos cita um trabalho em que a genotoxicidade do metilparabeno foi testada com três diferentes ensaios, e em todos eles o conservante mostrou-se seguro (Litton Bionetics, 1974; ANDERSEN, 2008). Diante disso, é possível que os efeitos observados no presente estudo sejam frutos dos componentes do extrato de *Aloe vera*, sem interferências do conservante adicionado.

Para avaliar se os efeitos que estão sendo observados no trabalho são promovidos pelo extrato glicólico de *Aloe vera* e /ou seus componentes, e não devido a um menor volume de meio fornecido às células, foi realizado com a linhagem MDA-MB-231 um teste que consistiu em substituir o extrato glicólico por PBS nos grupos que continham as maiores concentrações do mesmo. Para averiguar se havia a diminuição da viabilidade das células tratadas com PBS, foi realizado o ensaio de proliferação WST-1. O PBS, por ser uma solução tampão fosfato salina, não traria riscos à célula, sendo assim um bom candidato para tal investigação. Os resultados que comparam os grupos mantidos em PBS

por 24 horas com o controle não apresentaram citotoxicidade, exceto a concentração de 50% (Figura 34). Porém, esse resultado pode estar sendo mascarado devido ao fato de a solução ter sua cor bem mais diluída (clara) por metade do seu conteúdo ser PBS, o qual é incolor e transparente. Pode-se sugerir isso com o fato de que, na observação visual, não houve uma grande diferença na quantidade de células nos grupos expostos. Já em 24 h+, nenhuma diferença significativa em relação ao controle foi observada. Ao comparar os tratamentos com PBS e o com extrato de *Aloe vera*, foi evidenciada diferença significativa em todos os casos, inclusive no grupo 50% em 24h onde aparentemente haveria citotoxicidade pela incubação com PBS e na exposição de 24h+ que está relacionada à recuperação de viabilidade das células (Figura 35). O extrato glicólico comercial de *Aloe vera* também é incolor, no entanto, mesmo que o resultado de viabilidade deste estivesse sendo mascarado pela cor da solução, ainda assim houve diferença significativa quando comparado com o tratamento com PBS. Além disso, a observação visual mostrou um número menor de células e exibiu morfologia alterada nas concentrações mais altas. Para averiguar a questão da cor do extrato, foram realizados testes onde as soluções (meio suplementado + extrato) de todos os grupos, inclusive o controle, eram substituídas por PBS antes da reação que converte o sal tetrazólio WST-1 em formazan. Isso porque, como o extrato é incolor e o meio de cultivo é rosa, ao adicionar o extrato, a cor acaba sendo diluída. Quanto mais extrato (transparente) e menos meio (rosa), mais claro fica, tornando a cor diferente de grupo para grupo. Foram utilizadas as células Vero para este segundo teste a fim de conferir se a cor influenciaria os resultados da leitura do WST-1. Com a leitura sendo realizada após a substituição das soluções por PBS, os resultados da viabilidade mantiveram o padrão tanto em 24 h como em 24 h+, com os grupos expostos ao extrato com menor viabilidade que o controle (Figura 36). E a comparação dos resultados da leitura com as soluções e com PBS, confirma isto, visto que em ambos os resultados tiveram o mesmo comportamento, apesar de ser vista uma discreta diferença significativa (Figura 37). No caso anterior, onde metade da solução era extrato, a mudança de cor era muito maior, podendo ser vista a olho nu. Desta forma, é mais provável que haja interferência na leitura. Sendo assim, é possível afirmar que os efeitos observados no trabalho estão sendo causados pelo extrato glicólico de *Aloe vera*, e não porque os grupos de células estão recebendo menor volume de meio ou que a cor das soluções possa estar interferindo nos resultados.

A observação visual trouxe dados novos e complementares ao estudo. Ao observar em microscópio de luz invertido os poços onde as células foram plaqueadas,

após a exposição ao extrato, foi observada uma alteração na morfologia celular de todas elas. A MDA-MB-231 é uma célula aderente que possui fenótipo afilado e alongado. Sua morfologia se alterou na presença do extrato para formas arredondadas, principalmente nas concentrações acima de 12,5%, mesmo ainda estando aderidas (Figuras 38 e 39). Para atestar que tal alteração era devido ao extrato, foram tiradas fotos das células tratadas com PBS, e o mesmo não foi observado (Figura 40). Não foi possível fotografar através de câmeras acopladas ao microscópio esta linhagem, portanto as fotos dos resultados da linhagem MDA-MB-231 foram tiradas através de celular. Em superfícies bidimensionais *in vitro*, as células cancerígenas MDA-MB-231 assumem diversas morfologias relacionadas ao modo de migração e rigidez do substrato, relevantes para os mecanismos de invasão do câncer *in vivo* (LAM *et al.*, 2018). Kiso e colaboradores (2018), também observaram mudança na morfologia da MDA-MB-231. Ao transformar a célula em “*nocaut*” para VEGF, a célula também se tornou arredondada. VEGF é a sigla em inglês para fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*), responsável por promover a formação de vasos sanguíneos (angiogênese) e o crescimento de tumores, estando, portanto, também associado à metástase. Estudos indicam inibição da secreção de VEGF e da ativação dos seus receptores pela aloína (PECERE *et al.*, 2000; PAN *et al.*, 2013; BAJPAI, 2018). Tudo isso pode ser evidência de que o extrato possa estar agindo na inibição deste fator, o que é mais um indicativo apontando para sua ação antineoplásica, visto que a supressão da metástase é uma importante etapa da terapia anticâncer. A linhagem MCF-7 possui uma morfologia um pouco diferente da MDA-MB-231, pois não é tão esticada. Uma característica que esta célula tem é de crescer mais agrupada, formando ilhotas de células. Essa linhagem é interessante por manter características semelhantes ao epitélio mamário e as monocamadas formam estruturas em cúpula devido ao acúmulo de fluido entre a placa de cultura e a monocamada celular (*European Collection of Authenticated Cell Culture*). Também houve alteração em seu fenótipo, tornando-se mais redondas e aparentemente contraídas (Figura 41). As células permaneceram aderidas à superfície da placa, porém ocupando uma área menor. As duas células tumorais evoluem para fenótipo mais arredondado, perdendo fuso e saliências invasivas (D’ANSEMI *et al.*, 2011), o que pode indicar um perfil menos agressivo e invasivo. Essa mudança morfológica de “*encolhimento*” das células pode estar relacionada a mecanismos de morte celular por apoptose (MOSES, EDWARDS e BRANTLEY, 2016; MADUNIĆ *et al.*, 2018; ZARANDI, MIRAKABADI e SOTOODEHNEJADNEMATALAHI, 2019). Fasco e colaboradores (2003) descrevem

diferentes mudanças fenotípicas da linhagem MCF-7 quando esta é exposta de forma prolongada ao tamoxifeno, um fármaco amplamente utilizado no tratamento de câncer de mama. Estudos com apigenina, substância que vem sendo estudada pelo seu potencial terapêutico, inclusive no combate ao câncer, também relatam a mesma alteração na forma das células MCF-7 e MDA-MB-231 (BAI *et al*, 2014; MADUNIC *et al*, 2018). Esses resultados são interessantes por contribuir na indicação do potencial antineoplásico do estudo em questão, visto que outras substâncias com tal característica produzem o mesmo resultado. Entretanto, diferentemente do esperado, as células Vero também apresentaram tal alteração. Seu fenótipo longo e afilado também se tornou arredondado (Figura 42). Contudo, foi observado um comportamento diferente das outras células na presença do extrato. Além de ficarem redondas, as células Vero, que antes cresciam espaçadas, na presença do extrato passaram a ficar mais próximas, formando ilhotas. Isto talvez seja uma estratégia para aumentar a comunicação intercelular. Gonçalves e pesquisadores (2006) estudaram os efeitos da cisplatina, um fármaco antineoplásico utilizado em quimioterapia de diversos tipos de câncer, no crescimento e morfologia da linhagem Vero. Apesar de provocar alterações morfológicas, as concentrações testadas de cisplatina não foram capazes de diminuir viabilidade celular, ou seja, não foi citotóxica (GONÇALVES *et al*, 2006). Então, mesmo com a modificação do fenótipo da célula não tumoral, o potencial antineoplásico do extrato em estudo ainda deve ser considerado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato glicólico de *Aloe vera* é citotóxico em concentrações acima de 25%;

As células tumorais mostraram-se mais sensíveis, evidenciando citotoxicidade a partir da concentração de extrato de 12,5%;

O ensaio de proliferação WST-1 mostrou-se mais preciso e sensível para as análises de viabilidade celular deste estudo;

A linhagem tumoral MDA-MB-231 apresentou um maior acúmulo de danos ao DNA com o aumento do tempo de contato com extrato de *Aloe vera*, possivelmente por deficiência no sistema de reparo. E as outras duas linhagens apresentaram diminuição da taxa de dano ao DNA, indicando eficiência neste reparo;

A linhagem não-neoplásica Vero sofre menos efeitos genotóxicos de uma longa exposição que as demais;

Após 24 horas de tratamento com 12,5% do extrato glicólico de *Aloe vera*, não há uma recuperação significativa da viabilidade celular das linhagens nas 24 horas seguintes.

Analisados em conjunto, os resultados do presente estudo sugerem um potencial efeito antineoplásico do extrato glicólico comercial de *Aloe vera* (L.) Burm. f. na concentração 12,5%, em 24 horas de tratamento. No entanto, a avaliação de outros parâmetros de interesse em terapias antineoplásicas, como via de morte, ciclo celular, migração celular e invasão são importantes para permitir um entendimento mais amplo da ação anticâncer da *Aloe vera*. Os resultados da análise fitoquímica foram inconclusivos, necessitando de mais testes para confirmar a presença do metilparabeno, bem como de outros componentes do extrato.

REFERÊNCIAS

ACU, I.D. et al. Coordination of centrosome homeostasis and DNA repair is intact in MCF-7 and disrupted in MDA-MB 231 breast cancer cells. **Cancer Research**, 70(8):3320-8, 2010.

AHLAWAT, K. S.; KHATKAR, B. Processing, food applications and safety of *Aloe vera* products: a review. Journal of food science and technology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 525-33, 2014.

AMIN, M.M. et al. Paraben Content in Adjacent Normal-malignant Breast Tissues from Women with Breast Cancer. **Biomedical and Environmental Sciences**, 32(12), 893-904, 2019.

ANDESEN, F.A. Final Amended Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in Cosmetic Products. **International Journal of Toxicology**, 27(Suppl. 4):1-82, 2008.

ATHERTON, P. *Aloe vera*: Magic or medicine? **Nurs Stand**, v. 12, p. 49-54, 1998.

BAI, H. et al. Apigenin induced MCF-7 cell apoptosis-associated reactive oxygen species. **Scanning**, 36(6), 622-31, 2014.

BAJPAI, S. Biological importance of *Aloe vera* and its active constituents. In: BAJPAI, S. **Synthesis of Medicinal Agents from Plants**. [S.l.]: Elsevier, 2018. Cap. 8, p. 177-203.

BENÍTEZ, S. et al. *Aloe vera* as an alternative to traditional edible coatings used in fresh-cut fruits: A case of study with kiwifruit slices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 184-193, April 2015.

BERNARDES, I. et al. *Aloe vera* extract reduces both growth and germ tube formation by *Candida albicans*, v. 55, n. 3, p. 257-261, May 2012.

BLUMENTHAL, M. et al. The complete commission e monographs: therapeutic guide to herbal medicines. **Integrative Medicine Communication**, 1998.

BORRI, R. B.; FREIRE, R.; BOINA, W. L. D. O. Remoção da turbidez da água usando *Aloe vera* como coagulante natural. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, 10, n. 12, 2014. 01-11.

BOZZI, A. et al. Quality and authenticity of commercial *Aloe vera* gel powders. **Food Chemistry**, v. 103, p. 22-30, 2007.

CARVALHO, C.M. et al. In vitro induction of apoptosis, necrosis and genotoxicity by cosmetic preservatives: Application of flow cytometry as a complementary analysis by NRU. **International Journal of Cosmetic Science**, 34(2), 176-182, 2012.

CASANOVA, L. M. et al. The use of NMR metabolite profiling and in vivo hypoglycemic assay for comparison of unfractionated aqueous leaf extracts of two *Ocimum* species. **Chemistry & Biodiversity**, 13(6), 686–694, 2016.

CHOI, S. W. et al. The wound healing effect of a glycoprotein fraction isolated from *Aloe vera*. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 4, p. 535-545, 2001.

COMŞA, Ş.; CÎMPEAN, A. M.; RAICA, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. **Anticancer Research**, v. 35, n. 6, p. 3147-3154, Junho 2015.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E.I. et al. New application of the comet assay: chromosome--comet assay. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, 59(7), 655–660, 2011.

COSERI, S. Natural products and their analogues as efficient anticancer drugs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 560-571, 2009.

DAHANUKAR, S. A.; KULKARNI, R. A.; REGE, N. N. Pharmacology of medicinal plants and natural products. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 32, p. S81-S118, 2000.

D'ANSELMINI, F. et al. Metabolism and cell shape in cancer: A fractal analysis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 43(7), 1052-1058, 2011.

DARBRE, P.D. et al. Concentrations of parabens in human breast tumours. **Journal of applied toxicology**, 24(1), 5-13, 2004.

DARBRE, P.D.; HARVEY, P.W. Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. **Journal of applied toxicology**, 34(9), 925-38, 2014.

DE LIMA, P. V. S. Avaliação da toxicidade induzida pelo extrato glicólico comercial de *Aloe vera* (L.) Burm. f. associado à radiação ultravioleta A em células da linhagem A549. **Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2016.

DIVYA, G. et al. Acitretin and aloe-emodin loaded chitin nanogel for the treatment of psoriasis. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 107, p. 97-109, 2016.

DJAFOUA Y.M. et al. Immunomodulatory activity of methanol leaf extracts of Cameroonian medicinal plants. **Journal Complementary Integral Medicine**, v. 12 (4), p. 267-275, 2015.

DU, Y. et al. Aloe emodin exerts potent anticancer effects in MIAPaCa-2 and PANC-1 human pancreatic adenocarcinoma cell lines through activation of both apoptotic and autophagic pathways, sub-G1 cell cycle arrest and disruption of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). **J Buon**, v. 24, n. 2, p. 746-753, 2019.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, p. 4-29, 2016.

EL-MASRY, O.S.; BROWN, B.L.; DOBSON, P.R.M. AMPK Activation of Apoptotic Markers in Human Breast Cancer Cell Lines with Different p53 Backgrounds: MCF-7,

MDA-MB-231 and T47D Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 20(12), 3763-3770, 2019.

European Collection of Authenticated Cell Cultures - ECACC. **Public Health England**. Disponível em: <<https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/ecacc.aspx>>. Acesso em: Agosto 2019.

FALEIRO, C. C. et al. O extrato das folhas de babosa, *Aloe vera* na cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos, num ensaio controlado por placebo. **Natureza on line**, v. 7, n. 2, p. 56-60, 2009.

FASCO, M.J. et al. Phenotypic changes in MCF-7 cells during prolonged exposure to tamoxifen. **Molecular and cellular endocrinology**, 206(1-2), 33-47, 2003.

FEMENIA, A. et al. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 109-117, 1999.

Food and Drug Administração (FDA). Disponível em: <<https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetic-ingredients/parabens-cosmetics/>>. Acesso em: 2020.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171-177, 2006.

GERSON-CWILICH, R.; SERRANO-OLVERA, A.; VILLALOBOSPRIETO, A. Complementary and alternative medicine (CAM) in Mexican patients with cancer. **Clinical and Translational Oncology**, v. 8, n. 3, p. 200-207, 2006.

GEST, C. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. **BMC Cancer**, v. 13, n. 63, Fevereiro 2013.

Global Biodiversity Information Facility (GBIF). Disponível em : <<https://www.gbif.org/pt/species/2777724>>. Acesso em: 2020.

Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 2019, 2020 e 2021.

GONÇALVES, E.M. et al. Morphological and growth alterations in Vero cells transformed by cisplatin. **Cell Biology International**, 30(6), 485-494, 2006.

GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clinical and Translational Oncology**, v. 9, n. 12, p. 767-776, 2007.

GRECCO, C. et al. Determination of parabens in breast milk samples by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and ultra- high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 30(1), 48–59, 2018.

GRINDLAY, D.; REYNOLDS, T. The *Aloe vera* phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. **J Ethnopharmacol**, v. 16, n. 2-3, p. 117-51, 1986.

GUO, X.; MEI, N. *Aloe vera*: A review of toxicity and adverse clinical. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 34, n. 2, p. 77-96, 2016.

HAMMAN, J. H. Composition and Applications of *Aloe vera* Leaf Gel. **Molecules**, v. 13, p. 1599-1616, 2008.

HAN, M. et al. Limitations of the use of MTT assay for screening in drug discovery. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 3, p. 195-200, 2010.

HASHIGUCHI, M. et al. Effect of aloe-emodin on the proliferation and apoptosis of human synovial MH7A cells; a comparison with methotrexate. **MOLECULAR MEDICINE REPORTS**, v. 15, p. 4398-4404, 2017.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Disponível em: <<https://www.iarc.fr/>>. Acesso em: 2019.

JOSEPH, B.; RAJ, S. J. Pharmacognostic and phytochemical properties of *Aloe vera* Linn –an overview. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 4, p. 106-110, 2010.

KENTSIS, A. Why do young people get cancer? **Pediatric Blood & Cancer**, v. 67(7):e28335, 2020.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? **Trends in Biotechnology**, 29(6), 267–275, 2011.

KISO, M. et al. Long isoform of VEGF stimulates cell migration of breast cancer by filopodia formation via NRP1/ARHGAP17/Cdc42 regulatory network. **International Journal of Cancer**, v. 143, p. 2905-2918, 2018.

KIZHEDATH, A.; WILKINSON, S.; GLASSEY, J. Assessment of hepatotoxicity and dermal toxicity of butyl paraben and methyl paraben using HepG2 and HDFn in vitro models. **Toxicology in vitro**, 55, 108-115, 2019.

KRAMER, S. N. First pharmacopeia in man's recorded history. **American Journal of Pharmaceuticals**, v. 126, p. 76-84, 1954.

LAM, V. K. et al. Quantitative Assessment of Cancer Cell Morphology and Motility Using Telecentric Digital Holographic Microscopy and Machine Learning. **Journal of Quantitative Cell Science**, v. 93, n. 3, p. 334-345, 2018.

LEVENSON, A.S.; JORDAN, V.C. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. **Cancer Research**, 57(15), 3071-8, 1997.

LITTON BIONETICS. Mutagenic evaluation of Compound 71–38, Methylparaben. **NTIS Report PB-245 459**, 1974.

MAAN, A. A. et al. The therapeutic properties and applications of *Aloe vera*: A review. **Journal of Herbal Medicine**, v. Volume 12, p. 1-10, June 2018.

MADUNIC, I.V. et al. Apigenin, a dietary flavonoid, induces apoptosis, DNA damage, and oxidative stress in human breast cancer MCF-7 and MDA MB-231 cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 391(5):537-550, 2018.

MANVITHA, K.; BIDYA, B. *Aloe vera*: a wonder plant its history, cultivation and medicinal uses. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, p. 85-88, 2014.

Ministério da Saúde. Acesso em: < <https://www.gov.br/saude/pt-br/acao-a-informacao/acoes-e-programas/programa-de-fitoterapico-e-plantas-mediciniais/>>. Acesso em: março 2021.

MISIR, J.; BRISHTI, F. H.; HOQUE, M. M. *Aloe vera* gel as a Novel Edible Coating for Fresh Fruits: A Review. **American Journal of Food Science and Technology**, v. 2, n. 3, p. 93-94, 2014.

MOSES, S.; EDWARDS, V.; BRANTLEY, E. Cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells, without Harming MCF-10A Healthy Cells. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 7, n. 2, 2016.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Disponível em: < <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/myths/antiperspirants-fact-sheet/>>. Acesso em: 2020.

National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: <<https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/aloel/index.cfm>>. Acesso em: Julho 2018.

NERI, M. et al. Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study. **Mutagenesis**, v. 30(1), p. 155-163, 2015.

NI, Y. et al. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 14, p. 1745-1755, 2004.

NICULAU, E. S. et al. Quantitative analysis of natural products in plants by LC-MS. **Revista Virtual de Química**, 8(1), 204–230, 2016.

ÖZENVER, N. et al. Aloe-emodin as drug candidate for cancer therapy. **Oncotarget**, v. 9, n. 25, p. 17770-17796, 2018.

PAN, Q. et al. Inhibition of the angiogenesis and growth of Aloiin in human colorectal cancer in vitro and in vivo. **Cancer Cell International**, v. 13, n. 1, p. 69, 2013.

PECERE, T. et al. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. **Cancer Research**, v. 60, n. 11, p. 2800-2804, 2000.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. [S.l.]: Guanabara Koogan, 2005.

PLANTS Database. **UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE.**

Disponível em:

<<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=ALVE2>>.

Acesso em: 2019.

PU, X.; WANG, Z.; KLAUNIG, J.E. Alkaline Comet Assay for Assessing DNA Damage in Individual Cells. **Current protocols in toxicology**, 65:3.12.1-3.12.11, 2015

RADHA, M. H.; LAXMIPRIYA, N. P. Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of *Aloe vera*: A systematic review. **J Tradit Complement Med**, v. 5, n. 1, p. 21-26, 2014.

RAMACHANDRA, C. T.; RAO, P. S. Processing of *Aloe vera* Leaf Gel: A Review. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 3, p. 502-510, 2008.

RAVI, M.; SNEKA, M. K.; JOSHIPURA, A. The culture conditions and outputs from breast cancer cell line in vitro experiments. **Experimental Cell Research**, v. 383, n. 2, 2019.

Reynolds, T.; Dweck, A.C. *Aloe vera* Leaf Gel: A Review Update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 3-37, 1999.

ROUTLEDGE, E.J. et al. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. **Toxicology and applied pharmacology**, 153(1), 12-19, 1998.

SAHU, P. K. et al. Therapeutic and Medicinal Uses of *Aloe vera*: A Review. **Pharmacology & Pharmacy**, v. Vol.4, n. No.8, 2013.

SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. et al. *Aloe vera*: ancient knowledge with new frontiers. **Trends in Food Science & Technology**, p. 94-102, March 2017.

SHARRIF, M. M.; SANDEEP, K. V. *Aloe vera* their chemicals composition and applications: A review. **International Journal of Biological & Medical Research**, v. 2, n. 1, p. 466-471, 2011.

SIMMLER, C. et al. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. **Current Opinion in Biotechnology**, 25, 51–59, 2014.

SOLOWEY, E. E. A. Evaluating of medicinal plants for anticancer activity. **The Scientific World Journal**, p. 12, 2014.

SUN, Y. et al. Inhibitory effect of emodin on migration, invasion and metastasis of human breast cancer MDA-MB-231 cells in vitro and in vivo. **Oncology Reports**, v. 33, p. 338-346, 2015.

TASCILAR, M. et al. Complementary and alternative medicine during cancer treatment: beyond innocence. **Oncologist**, v. 11, n. 7, p. 732-741, 2006.

TAYLOR, N. *The Cathartic Racket –A Bitter Purge In Plant Drugs That Changed The World*. **Dodd Mead & Company**, p. 158-165, 1965.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TSENG, H. S. et al. Aloe-Emodin Enhances Tamoxifen Cytotoxicity by Suppressing Ras/ERK and PI3K/mTOR in Breast Cancer Cells. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 45, n. 2, p. 1-14, 2017.

United States Department of Agriculture (USDA). Disponível em : <
<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=ALVE2/>>.
Acesso em: agosto de 2018.

VALERA, M. C. et al. In vitro antimicrobial activity of auxiliary chemical substances and natural extracts on *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in root canals. **Journal of Applied Oral Science**, v. 21, n. 2, p. 118-123, 2013.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, São Paulo, v. vol.28 no.3, p. 519-528, May/June 2005.

VILLELA, I. V., OLIVEIRA, I.M., SILVA, J., HENRIQUES, J.A. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research** 605:78-86, 2006.

WAN, L. et al. Aloin promotes A549 cell apoptosis via the reactive oxygen species-mitogen activated protein kinase signaling pathway and p53 phosphorylation. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 5, p. 5159-5168, 2017.

WANG, S.; YU, H.; WICKLIFFE, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 2147-2151, 2011.

WANG, Z. et al. Aloin induces apoptosis via regulating the activation of MAPKs signaling pathway in human gastric cancer cells in vitro. **Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University**, v. 38, n. 9, p. 1025-1031, 2018.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 288, p. 369-376, 2005.

WENG, L.; BEAUCHESNE, P.R. Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation for cell therapy: A review. **Cryobiology**, 94:9-17, 2020.

WISHART, D.; FEUNANG, Y.; MARCU, A.; GUO, A.; LIANG, K. HMDB 4.0 — The Human Metabolome Database for 2018. **Nucleic Acids Res**, 2018.

WHO, W. H. O. **Regulatory situation of herbal medicines : a worldwide review**. World Health Organization. [S.l.]. 1998.

WHO, W. H. O. **WHO monographs on selected medicinal plants**. World Health Organization. [S.l.], p. Vol. 1. 1999.

WOLFENDER, J. L. et al. Plant metabolomics: From holistic data to relevant biomarkers. **Current Medicinal Chemistry**, 20(8), 1056–1090, 2013.

WOLFENDER, J. L.; MARTI, G.; FERREIRA QUEIROZ, E. Advances in techniques for profiling crude extracts and for the rapid identification of natural products: dereplication, quality control and metabolomics. **Current Organic Chemistry**, 14(16), 1808–1832, 2010.

WU, Y. et al. Aloe-emodin (AE) nanoparticles suppresses proliferation and induces apoptosis in human lung squamous carcinoma via ROS generation in vitro and in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 490, n. 3, p. 601-607, 2017.

YAGI, A. et al. Isolation and characterization of the glycoprotein fraction with a proliferation promoting activity on human and hamster cells in vitro from *Aloe vera* gel. **Planta Medica**, v. 63, n. 1, p. 18-21, 1997.

YAGI, A. et al. Radical scavenging glycoprotein inhibiting cyclooxygenase-2 and thromboxane a2 synthase from *Aloe vera* Gel. **Planta Medica**, v. 69, n. 3, p. 269-271, 2003.

YANG, M. et al. Aloe-Emodin Induces Chondrogenic Differentiation of ATDC5 Cells via MAP Kinases and BMP-2 Signaling Pathways. **Biomol Ther (Seoul)**, v. 24, n. 4, p. 395-401, 2016.

ZARANDI, P.K.; MIRAKABADI, A.Z.; SOTOODEHNEJADNEMATALAHI, F. Cytotoxic and Anticancer Effects of ICD-85 (Venom Derived Peptides) in Human Breast Adenocarcinoma and Normal Human Dermal Fibroblasts. **Iranian Journal of pharmaceutical research**, 18(1), 232-240, 2019.

ZHANG, L.-Q. et al. Aloesin Suppresses Cell Growth and Metastasis in Ovarian Cancer SKOV3 Cells through the Inhibition of the MAPK Signaling Pathway. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2017, p. 1-9, 2017.

ZWOLAK, I. Comparison of five different in vitro assays for assessment of sodium metavanadate cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1 line). **Toxicology and Industrial Health**, v. 31, n. 8, p. 677-690, 2015.

APÊNDICE - Soluções utilizadas no ensaio cometa

Soluções e Meios	Composição e Concentração
Agarose NMP 1,5%	Agarose NMP – 1,5% PBS
Agarose LMP 0,5%	Agarose LMP – 0,5% PBS
Solução de Lise 1	NaCl – 14,61% Laurilsarcosinato de sódio - 1% NaOH - 0,8% EDTA - 3,72% Tris - 0,12 % Água Ultrapura pH 10
Solução de Lise 2 (8°C)	Solução de lise 1 – 89% Triton X-100 – 1% DMSO – 10%
Solução de NaOH	NaOH – 40% Água ultrapura
Solução de EDTA dissódico 200mM	EDTA – 14,89% Água Ultrapura pH 10
Tampão Alcalino para eletroforese (2°C - 8°C)	Solução de NaOH 10N – 3% Solução de EDTA dissódico 200mM – 0,5% Água Ultrapura pH > 13

Tampão de Neutralização	Tris-Cl 0,4M – 4,85% Água ultrapura pH 7,5
Solução Fixadora ácido	Tricloroacético – 15% Sulfato de Zinco – 5% Glicerol – 5% Água ultrapura
Solução A - Coloração por Prata	Carbonato de Sódio – 5% Água ultrapura
Solução B – Coloração por Prata	Nitrato de Amônio – 0,1% Nitrato de Prata – 0,1% Ácido Tungstosilicico - 0,25% Formaldeído – 0,15% Água ultrapura
Solução STOP	Ácido Acético – 1% Água ultrapura

ANEXO - Bula do extrato cedida pelo fabricante



EXTRATO GLICÓLICO DE *ALOE VERA* (HG)

Nome Científico: *Aloe barbadensis*

INCI: Aloe (*Aloe vera*) Leaf Extract

Nº CAS: 85507-69-3; 57-55-6; 64-17-5; 7732-18-5; 26172-55-4/2682-20-4; 99-76-3

Parte Utilizada: Suco condensado seco das

folhas **Fórmula Molecular:** N.A

Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

Compostos antracênicos (aloína, aloe-emodina, aloinase); mucilagem; carboidratos; polissacarídeos; ácido crisofânico; enzimas (celulose, carboxipeptídeos, catalase, amilase, oxidase), aminoácidos; vitaminas B, C e E; e sais minerais.

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

O Extrato Glicólico de *Aloe vera* tem ação emoliente, cicatrizante, tonificante, anti-inflamatória, suavizante, lenitiva, refrescante, hidratante, protetora e restauradora de tecidos. Usado em preparações lenitivas para peles delicadas, sensíveis, irritadiças e/ou secas. Também é indicado para tratamento da acne, psoríase, coceiras, eczemas, erisipela, picadas de insetos e de pequenos ferimentos (como cicatrizante). Poderá ser incorporado em cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, em shampoos, géis, cremes para banho, loção de limpeza, filtros solares e outros produtos cosméticos.

DOSAGEM

Em cremes, géis, leites e loções de tratamento - 1,0 a 5,0%. Em cremes dentais - 1,0 a 3,0%.

Em shampoos, condicionadores e sabonetes - 2,0 e 10,0%. Em desodorantes cremosos ou líquidos - 1,0 e 5,0%.

Atenção: O Extrato Glicólico de *Aloe vera* deve ser adicionado no final da preparação cosmética, com o produto em temperatura abaixo de 45°C. Uso Externo.

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo do calor e da luz solar direta. Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação.

Obs.:

- Poderá ocorrer formação de precipitado e/ou turbidez durante a estocagem, sem alterar as propriedades.
- Alterações da cor são esperadas por modificações dos compostos coloridos das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J.R.; Tratado de Fitomedicina – Bases Clínicas e Farmacológicas. ISIS Ediciones SRL, 1998.

Balmé, F.; Plantas Medicinais. Ed. Helmus, 1994.

Coimbra, R.; Manual de Fitoterapia. Ed. CEJUP, 1994.

Encyclopédie des Plantes Médicinales. Ed. Larousse-Bordas, 1997.

Av. Gentil de Moura, 194 CEP 04278 080 Ipiranga São Paulo SP Tel/Fax 55 (11) 5061.5282
mapric@mapric.com.br www.mapric.com.br