

UNIVERSIDADE FRANCISCANA
CURSO DE BIOMEDICINA

AMANDA STIEVEN

**AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE E ESPÉCIES REATIVAS DO EXTRATO
HIDROALCÓOLICO DE *Vassobia breviflora* FRENTE A LINHAGEM DE
CARCINOMA HEPATOCELULAR**

SANTA MARIA- RS

2021

AMANDA STIEVEN

**AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE E ESPÉCIES REATIVAS DO EXTRATO
HIDROALCÓOLICO DE *Vassobia breviflora* FRENTE A LINHAGEM DE
CARCINOMA HEPATOCELULAR**

Projeto de trabalho final de graduação (TFG) apresentado ao Curso de Biomedicina, Área de Ciências da Saúde, da Universidade Franciscana - UFN, como requisito parcial para aprovação na disciplina TFG II.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciana Maria Fontanari Krause

Santa Maria - RS

2021

Avaliação de citotoxicidade e espécies reativas do extrato hidroalcolico de *Vassobia breviflora* frente à linhagem de carcinoma hepatocelular

Amanda Stieven¹, Altevir Rossato Viana², Isadora Fank Nicola³, Aline Grohe Schirmer
Pigatto⁴ e Luciana Maria Fontanari Krause⁵

Atividade citotóxica da *Vassobia breviflora* em carcinoma hepatocelular

1. Graduanda do Curso de Biomedicina, Universidade Franciscana (UFN). R. dos Andradas nº1614, 97010032, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

2. Universidade Franciscana (UFN).

3. Universidade Franciscana (UFN).

4. Universidade Franciscana (UFN).

5. Universidade Franciscana (UFN).

* Autor para contato. E-mail: lfontanari@yahoo.com.br

RESUMO: A busca por tratamentos anticancerígenos tem aumentado na tentativa de encontrar novas formas de impedir o avanço da doença, tanto pela via de apoptose, como pela inibição da angiogênese. Com esse intuito, compostos bioativos vem sendo estudados na terapêutica de várias patologias, principalmente no câncer. A *Vassobia breviflora* (*V. breviflora*), presente no sul do continente americano, em países como Argentina, Uruguai e Brasil pode representar uma opção para tal tratamento, uma vez que tem sido estudada e os seus bioativos caracterizados como potentes agentes antitumorais, anti-inflamatórios, entre outras propriedades. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial citotóxico da fração hidroalcolólica da *V. breviflora* frente a linhagem HEPG2. Neste estudo, pode-se observar a atividade citotóxica desta fração da espécie na linhagem de carcinoma hepatocelular, por meio dos testes de MTT, vermelho neutro, cristal violeta, *PicoGreen*, diclorofluoresceína e óxido nítrico.

Palavras-chave: Bioativos, Carcinoma Hepatocelular, HEPG2, cultura celular, citotoxicidade.

Evaluation of cytotoxicity and reactive species of the hydroalcoholic extract of *Vassobia breviflora* against the hepatocelular carcinoma lineage

ABSTRACT: The search for anticancer treatments has increased in an attempt to find new ways to prevent the disease from advancing, both through apoptosis and through the inhibition of angiogenesis. To this end, bioactive compounds have been studied in the treatment of various pathologies, mainly in cancer. *Vassobia breviflora*, present in the south of the American continent, in countries like Argentina, Uruguay and Brazil, may represent an option for such treatment, since it has been studied and its bioactive agents are characterized as potent antitumor and anti-inflammatory agents, among other properties. The objective of this work was to evaluate the cytotoxic potential of the hydroalcoholic fraction of *V. breviflora* against the HEP G2 strain. In this study, it is possible to observe the cytotoxic activity of the hydroalcoholic

fraction of the species in the hepatocellular carcinoma lineage, through MTT, neutral red, violet crystal, PicoGreen, dichlorofluorescein and nitric oxide tests.

Key words: Bioactive, hepatocellular carcinoma, HEPG2, cellular culture, cytotoxicity.

INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um tumor primário das principais células hepáticas – os hepatócitos. Como as demais neoplasias, surge quando há mutação nos genes de uma célula que a faz se multiplicar desordenadamente (Gomes *et al.*2013).

O CHC constitui 70-85% das neoplasias hepáticas primárias, é o tumor primário do fígado mais frequentemente observado e se constitui em um dos tumores malignos mais comuns mundialmente. Ele tem por característica ser muito agressivo, com alto índice de óbito após o início dos sintomas (Gomes *et al.*2013).

Na última década vários tratamentos que afetam os mecanismos moleculares específicos do carcinoma passaram por avaliações, dentre esse o Sorafenib, o qual apresentou os melhores resultados. Sorafenib é um inibidor oral multicanal que atua bloqueando diferentes vias de sinalização, aumentando a apoptose, retardando a proliferação celular e reduzindo a angiogênese (Armengol *et al.* 2018).

A busca por medicamentos anticancerígenos tem aumentado na tentativa de se encontrar tratamentos mais efetivos e seletivos, ou que visem à descoberta de novas estratégias que impeçam o avanço da doença (Brandão *et al.* 2010).

Nesse contexto, nos últimos anos, vários estudos têm apresentado produtos naturais com atividade biológica e medicinal, com abordagem no envolvimento de mecanismos de morte como parada do ciclo celular, indução de apoptose, supressão de inflamação e inibição de angiogênese (Chen *et al.*2020).

Nas últimas décadas, produtos de origem natural têm sido promissores para a indústria de medicamentos e cosméticos, pois apresentam grande fonte de compostos bioativos. O uso de substâncias provenientes de espécies vegetais na terapêutica de várias patologias é bem

consolidado. Aproximadamente 83% dos fármacos anticâncer, por exemplo, são derivados dessa fonte (Newman & Cragg 2016).

A *V. breviflora* (Sendtn.) Hunz., popularmente conhecida como Esporão de Galo, é uma espécie presente no Rio Grande do Sul, pertencente à família *Solanaceae*. A sua espécie Argentina foi estudada quanto a sua atividade antitumoral, anti-inflamatória e antibacteriana, principalmente devido ao seu composto ativo, já conhecido, Vitaferina A (Samadi *et al.* 2010). Assim sendo, devido aos escassos estudos encontrados na literatura sobre a espécie brasileira da *V. breviflora*, principalmente quanto à sua composição química, associado ao baixo sucesso de tratamento e elevada taxa de mortalidade para o carcinoma hepatocelular, esta pesquisa tem como objetivo principal avaliar a atividade citotóxica da fração hidroalcoólica da *V. breviflora* frente à linhagem celular de carcinoma hepatocelular (HEPG2).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

O material vegetal (folhas) da planta foi coletado em uma propriedade particular no distrito de Boca do Monte, município de Santa Maria, RS. A exsicata do material botânico encontra-se no Herbário da Universidade Federal de Santa Maria - SMDB (Santa Maria Departamento de Biologia), registrado sob o número 14.450.

Obtenção do extrato hidroalcoólico

Para a obtenção do extrato hidroalcoólico, as folhas de *V. breviflora* passaram por um processo de secagem em estufa de circulação/renovação de ar, à temperatura de 40°C durante 48h. Em seguida, esse material foi moído em moinho de facas e macerado em álcool etílico 80% durante três dias à temperatura ambiente. O material resultante foi filtrado e evaporado através do equipamento rotaevaporador com pressão reduzida. As concentrações utilizadas para

os ensaios citados a seguir, foram 10 µg/mL, 30 µg/mL , 100 µg/mL , 1 mg/ml, 3 mg/ml, 10 mg/ml e 30 mg/ml.

Cultura celular

As células da linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2) foi cultivada em garrafas de cultura 25 cm² contendo meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* suplementando com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As garrafas foram mantidas com as tampas semiabertas em estufa de CO₂ contendo atmosfera úmida. A quantidade de células plaqueadas foi 1x10⁴ por poço em placas de 96 poços e 2x10⁵ em placas de 24 poços. O tratamento utilizado foi o extrato hidroalcolico de *V. breviflora* com concentrações logarítmicas.

Ensaio (3-4,5 dimethylthiazol-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide) (MTT)

O ensaio MTT é um teste colorimétrico que mede a redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio pelas enzimas desidrogenases intracelulares (MOSMANN, 1983). O reagente MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi dissolvido em tampão fosfato salina (PBS 0,01 mol/L; pH 7,4), foi adicionado 20 µL desta solução na concentração de 5 mg/mL às células tratadas em microplaca de 96 poços e incubado por 4 horas. Após o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em DMSO e feita a leitura em aparelho (Termoplate®) de ELISA no comprimento de onda de 570 nm.

Ensaio cristal violeta

O cristal violeta (cloreto de pararosanilina) é um corante básico também conhecido como violeta de Genciana, que cora o núcleo das células, de forma que a taxa de crescimento celular/quantidade de células aderidas é refletida pela determinação colorimétrica das células coradas (Gillies *et al.*1986; Vega-Avila & Pugsley, 2011). Após coloração e fixação, as células

foram são lavadas com PBS duas vezes e solubilizados em SDS 1% para leitura em aparelho de ELISA 570 nm (Termoplate®).

Ensaio vermelho neutro

O ensaio do vermelho neutro é baseado na capacidade da célula de absorver o vermelho neutro através de endocitose. O vermelho neutro fica acumulado nos lisossomas de células viáveis, sendo assim encontrado em maior quantidade em células com integridade na membrana plasmática. Sendo então incubadas com a solução de meio de cultura incompleto com o reagente vermelho neutro na concentração de 40 µg/mL. As células permaneceram em cultura por cerca de 3h em uma estufa de CO₂ a 37 °C. O meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS e foi adicionado 1 mL do meio de eluição (EtOH/AcCOOH, 50%/1%). A placa foi levemente agitada por cerca de 10 minutos para se obter uma dissolução completa seguido de leitura a 540 nm (Termoplate®) (Borenfreund & Puerner 1985, Fotakis & Timbrell 2006, Ferron *et al.* 2014).

Ensaio PicoGreen

Foi realizado um ensaio adicional a partir da quantificação da concentração de DNA de cadeia dupla (dsDNA) presente ou não no sobrenadante. Para essa medição utilizou-se o corante fluorescente dsDNAPicoGreen®. O experimento foi seguido de acordo com a bula do fornecedor (Invitrogen®). A leitura foi realizada em fluorímetro (SpectraMax® i3x – Molecular Devices) nos comprimentos de onda de 520 nm de emissão e 480 nm de excitação. Os resultados foram expressos como valores de intensidade de fluorescência.

Ensaio de diclorofluoresceína

Os níveis de espécies reativas do oxigênio foram determinados no sobrenadante celular pelo ensaio fluorimétrico de 2,7 - diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). A DCFH-DA é um composto não fluorescente que é desacetilado pela ação das enzimas esterases mitocondriais em DCFH que reage com EROs e se torna DCF, um composto fluorescente (ROTA *et al.* 1999). A leitura foi realizada em fluorímetro (SpectralMax® i3x – Molecular Devics) e a fluorescência foi medida em um comprimento de onda de excitação de 488 nm e um comprimento de emissão de 525 nm.

Ensaio óxido nítrico

A concentração de óxido nítrico (NO) foi determinada por ensaio colorimétrico usando o Greiss método (Green *et al.*1982). Em uma placa de 96 poços de fundo plano, 50 µL de reagente Greiss (0,1% sulfanilamida, N-naftil-etilenodiamina 0,1% e 2,5% de ácido fosfórico) e 50 µL do sobrenadante celular. Após aproximadamente 10 minutos em temperatura ambiente, a absorbância foi medida no leitor de microplaca (Termoplate®) no comprimento de onda de 570 nm e os dados foram expressos em intensidade de absorbância, como controle positivo foi utilizado 10 µM de nitrito de sódio.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente no programa GraphPad Prism, sendo comparados por análise de variância (ANOVA), seguido de teste post hoc de Tukey. Sendo considerada diferença estatística quando o $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio colorimétrico (MTT)

No ensaio para verificar a viabilidade celular, a partir da concentração de 100 µg/mL já apresentou significativa diminuição da viabilidade celular. A redução ficou em torno 28% a 80% na maior concentração (Figura 1).

Samadi utilizou o ensaio MTS para averiguar a viabilidade celular, e com isso conferiu que em suas concentrações de vitaferina A, principal composto do vegetal estudado, também reduziu a viabilidade em seus testes. A viabilidade celular que foi reduzida pelo composto na linhagem humana HNSCC, inibiu o crescimento de uma forma depende da concentração. Sendo assim, como o estudo apresentado, o efeito antiproliferativo do composto também esta presente nas quatro principais linhagens de câncer de cabeça e pescoço (SAMADI *et al.* 2010).

Demonstrando assim, que tanto em sua forma por inteira como apenas o composto principal purificado, apresenta a redução da viabilidade celular em linhagens de carcinoma.

Segundo a pesquisa de Grogan, os seus resultados também apresentaram a apoptose celular nas linhagens de gliomas malignos, tanto linhagem humana como de camundongos murinho, sendo assim comprovando a atividade do extrato do vegetal (GROGAN *et al.* 2011)

Ensaio colorimétrico cristal violeta

No ensaio cristal violeta a viabilidade baixou para 72,3% na concentração de 1 mg/mL e foi decaindo de forma concentração dependente. Em um segundo momento foi feita uma comparação qualitativa entre controle negativo, extrato na concentração de 2,07 mg/mL e peróxido de hidrogênio 100 mM em placas de 24 poços como está representado na Figura 2.

Ensaio colorimétrico Vermelho Neutro

No ensaio para avaliar a citotoxicidade foi possível verificar uma redução de 12,4% na quantidade de células em relação ao controle negativo. As maiores concentrações de 10 e 30 mg/mL reduziram em 44% e 47% respectivamente (Figura 3),

Ensaio fluorescente dsDNA PicoGreen.

A avaliação através do ensaio dsDNA PicoGreen demonstrou uma elevação na quantidade de DNA dupla fita extracelular, porém sem significância estatística, somente biológica (Figura 4).

Para Grogan o seu estudo apresentou pontos positivos em relação a expressão de proteínas de reparo do DNA, além disso a inibição da recombinação homologa do reparo da quebra de fita dupla por meio de um ensaio fluorescente, confirmando a potência do extrato vegetal em gliomas malignos (GROGAN *et al.* 2011) .

Ensaio fluorescente 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA)

Na avaliação das espécies reativas do oxigênio não foi possível constatar aumento intracelular desses radicais livres (Figura 5). Por mais que os estudos de Grogan apresentando resultados sobre as espécies reativas de oxigênio, ainda permanece desconhecido se a vitaferina A, principal bioativo do vegetal estudado, libera ou induz diretamente as ROS e suas propriedades reativas (GROGAN *et al.* 2013)

Ensaio colorimétrico Óxido Nítrico.

No ensaio para avaliar a produção de espécies reativas do nitrogênio, não foi possível verificar a presença dos mesmos através dos tratamentos utilizados (Figura 6).

CONCLUSÃO

Concluimos que no presente estudo, os três primeiros ensaios utilizando o extrato hidroalcolico de *Vassobia breviflora* apresentaram respostas positivas em relação à diminuição da viabilidade celular, principalmente nas concentrações a partir de 1 mg/mL frente

à linhagem de carcinoma hepatocelular. Dessa forma, esses resultados são promissores para uma possível utilização desses ativos como terapia adjuvante no tratamento desta importante neoplasia. Porém é preciso mais estudos na área para confirmar sua eficácia, segurança e compreender, em detalhes, o mecanismo de ação dos bioativos da espécie vegetal estudada, inclusive em modelos *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento a Universidade franciscana e a todo o grupo de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ARMENGOL, C., SARRIAS, M.R & SALA, M. 2018. Hepatocellular carcinoma: present and future. *Medicina Clínica (English Edition)*, 150 (10): 390-397.
- BORENFREUND, E., & PUERER, J. A. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters*, 24(2-3): 119-124.
- BRANDÃO, H.N., DAVID, J.P., COUTO, R.D., NASCIMENTO, J.A. & DAVID, J.M. 2010. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química nova*, 33(6): 1359-1369.
- CHEN, F., ZHONG, Z., TAN, H.Y., GUO, W., ZHANG, C., TAN, C.W., LI, S., WANG, N. & FENG, Y.2020. Uncovering the Anticancer Mechanisms of Chinese Herbal Medicine Formulas: Therapeutic Alternatives for Liver Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 11:293.
- FERRON, P.J., HOGEVEEN, K., FESSARD, V. & HÉGARAT, L.L. 2014. Comparative analysis of the cytotoxic effects of okadaic acid-group toxins on human intestinal cell lines. *Marine drugs*, 12(8): 4616-4634.

FOTAKIS, G., & TIMBRELL, J.A. 2006. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*, 160(2): 171-177.

GILLIES, R.J., DIDIER, N. & DENTON, M. 1986. Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical biochemistry*, 159(1): 109-113.

GOMES, M.A., PRIOLLI, D.G., TRALHAO, J.G. & BROTELHO, M.F. 2013. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 59(5):514-524.

GREEN, L.C., WAGNER, D.A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P.L., WISHNOK, J.S. & TANNENBAUM, S.R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*, 126(1):131-138.

GROGAN, P. T., SLEDER & K. D., SAMADI, A. K., ZHANG, H., TIMMERMANN, B. N., & COHEN M. S.,2013. Cytotoxicity of withaferin A in glioblastomas involves induction of an oxidative stress-mediated heat shock response while altering Akt/mTOR and MAPK signaling pathways. *Investigational new drugs*, 31(3): 545-557.

GROGAN, P. T., SLEDER, K. D., STECKLEIN, S. R., & COHEN, M. S.,2011. Vassobia breviflora root-extract withaferin a as a novel cytotoxic and synergistic agent against malignant gliomas. *Journal of Surgical Research*, 165(2): 311.

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2): 55-63.

NEWMAN, D.J. & CRAGG, G.M.2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, 79(3): .629-661.

ROTA, C., CHIGNELL, C.F. & MASON, R.P. 1999. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase:: Possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(7-8): 873-881.

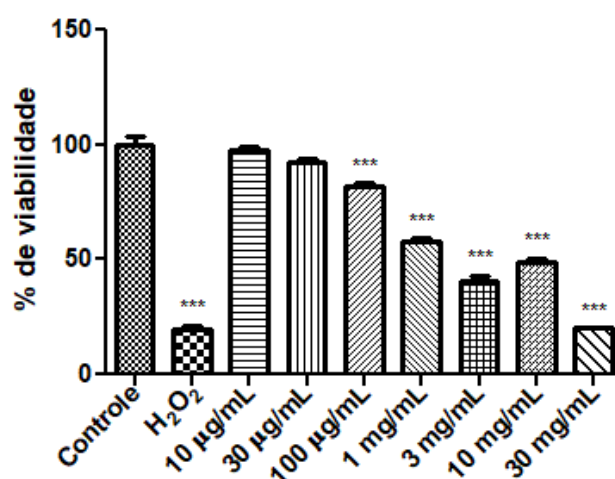
SAMADI, A.K., TONG, X., MUKERJI, R., ZHANG, H., TIMMERMANN, B.N. & COHEN, M.S.2010. Withaferin A, a cytotoxic steroid from *Vassobia breviflora*, induces apoptosis in human head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of natural products*, 73(9):1476-1481.

VEGA-AVILA, E. & PUGSLEY, M.K. 2011. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc*, 54 (54): 10-4.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

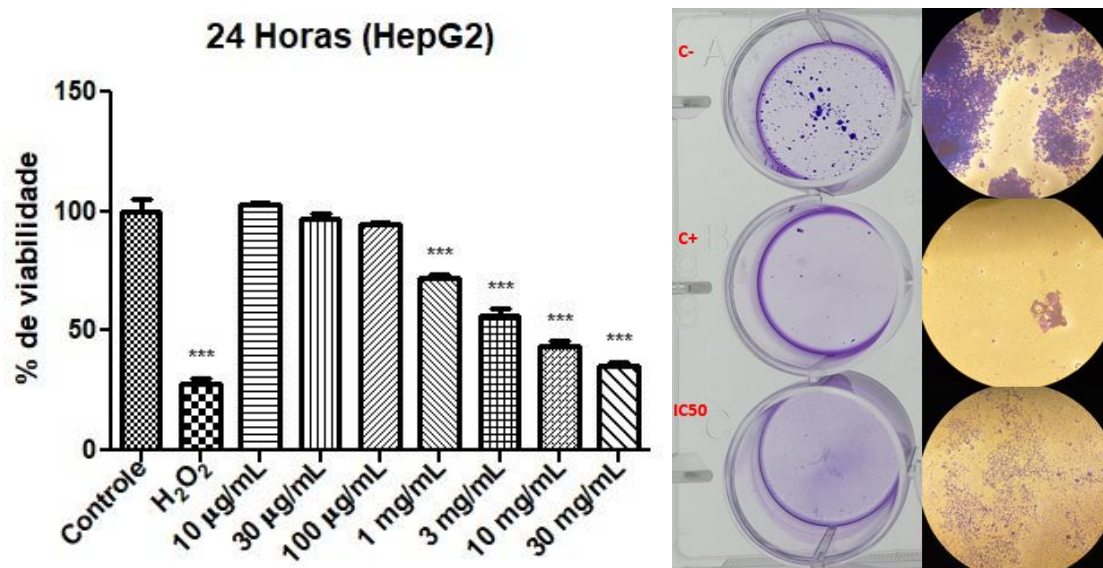
Figura 1. Ensaio de citotoxicidade no período de 24 horas.

24 Horas (HepG2)



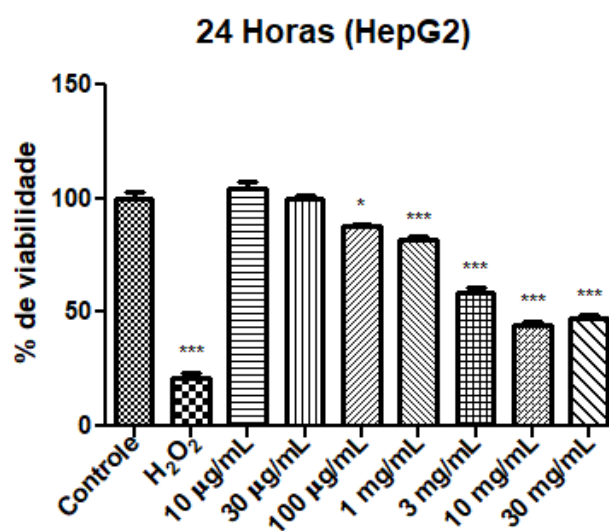
A) Ensaio de MTT, incubação de 24 h das células HepG2 tratadas com o extrato hidroalcoólico de *V.breviflora*. Dados expressos em média \pm desvio padrão (DP). Análise seguida por ANOVA de uma via, seguida de teste post hoc de Tukey, comparando os tratamentos com o controle negativo (CN). Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 2. Ensaio de citotoxicidade no período de 24 horas, mais imagem macroscópica e microscópica da placa de 24 poços.



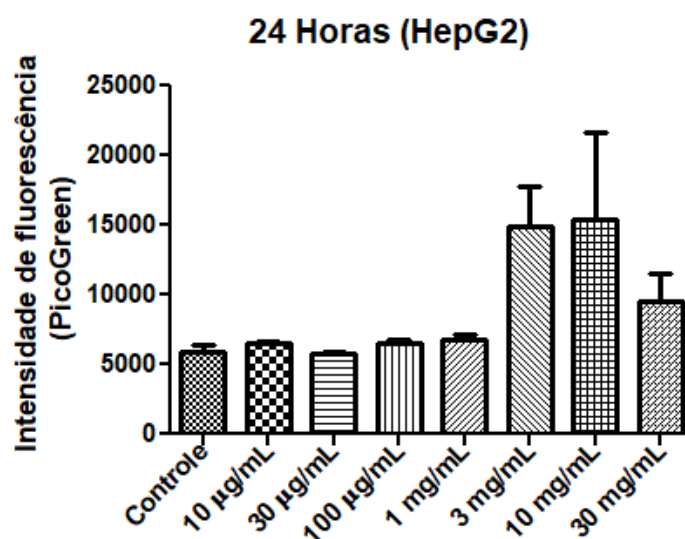
B) Ensaio do cristal violeta, incubação de 24 h das células HepG2 tratadas com o extrato hidroalcoólico de *V.breviflora*. Dados expressos em média \pm desvio padrão (DP). Análise seguida por ANOVA de uma via, seguida de teste post hoc de Tukey, comparando os tratamentos com o controle negativo (CN). Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 3. Ensaio de citotoxicidade no período de 24 horas.



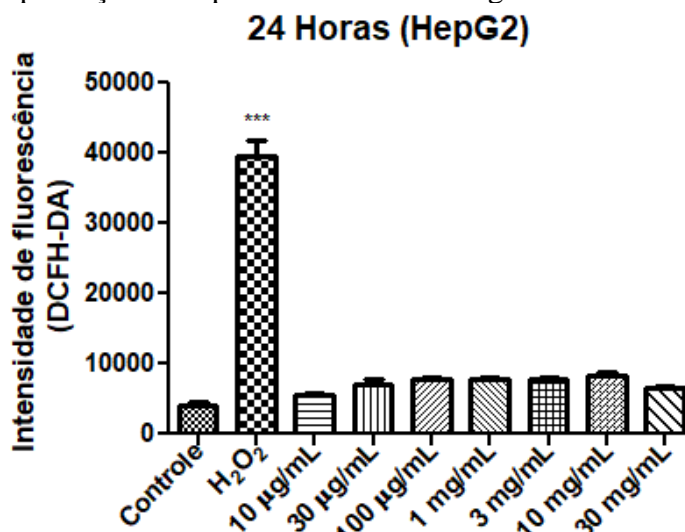
C) Ensaio de vermelho neutro, incubação de 24 h das células HepG2 tratadas com o extrato hidroalcoólico de *V.breviflora*. Dados expressos em média \pm desvio padrão (DP). Análise seguida por ANOVA de uma via, seguida de teste post hoc de Tukey, comparando os tratamentos com o controle negativo (CN). Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 4. Ensaio de citotoxicidade no período de 24 horas.

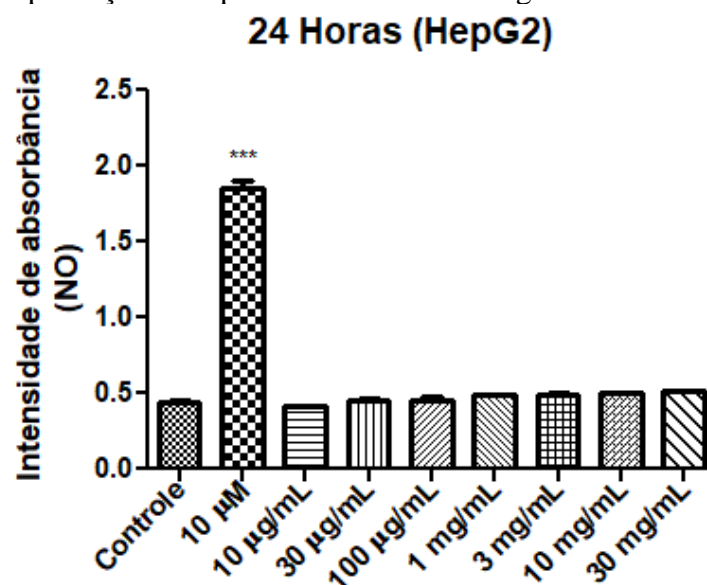


D) Ensaio de dsDNA PicoGreen, incubação de 24 h das células HepG2 tratadas com o extrato hidroalcoólico de *V.breviflora*. Dados expressos em média \pm desvio padrão (DP). Análise seguida por ANOVA de uma via, seguida de teste post hoc de Tukey, comparando os tratamentos com o controle negativo (CN). Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 5. Ensaio de produção de espécies reativas do oxigênio.



E) Ensaio de diclorofluoresceína, incubação de 24 h das células HepG2 tratadas com o extrato hidroalcoólico de *V.breviflora*. Dados expressos em média \pm desvio padrão (DP). Análise seguida por ANOVA de uma via, seguida de teste post hoc de Tukey, comparando os tratamentos com o controle negativo (CN). Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 6. Ensaio de produção de espécies reativas do nitrogênio.

F) Ensaio de óxido nítrico, incubação de 24 h das células HepG2 tratadas com o extrato hidroalcolóico de *V.breviflora*. Dados expressos em média \pm desvio padrão (DP). Análise seguida por ANOVA de uma via, seguida de teste post hoc de Tukey, comparando os tratamentos com o controle negativo (CN). Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 1. Rendimento do extrato e IC50 a partir do ensaio MTT.

Dados	Resultados
Rendimento de 80 g da <i>V.breviflora</i>	7,37 g
IC50	2,07 mg/mL

Fonte: Elaborada pelo autor.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO PELA REVISTA BRASILEIRA DE BIOCÊNCIAS
Título do manuscrito (negrito)

Nome Completo do Autor^{1*}, Nome Completo do Autor² e Nome Completo do Autor³

(todos os nomes por extenso; não use abreviaturas)

Título resumido: (negrito) Título resumido do manuscrito

¹. Afiliação do primeiro autor (Laboratório, Instituição (com abreviatura). Endereço completo, com CEP, cidade, estado e país.

². Afiliação do segundo autor.

³. Afiliação do terceiro autor.

* Autor para contato. E-mail: email@email.com.br

RESUMO E ABSTRACT em nova página (use quebra de página aqui)

RESUMO (negrito e maiúsculas): (Título do manuscrito em português). Texto do resumo.

Palavras-chave: (negrito) palavra-chave1, palavra-chave2, palavra-chave3, palavra-chave4, palavra-chave5.

ABSTRACT: (negrito e maiúsculas) (Title of the manuscript in English). Text of the abstract.

Key words: (negrito) key word1, key word2, key word3, key word4, key word5.

Não esquecer de incluir título na língua principal artigo, no RESUMO, e título em inglês, no ABSTRACT (ambos entre parênteses).

INTRODUÇÃO E DEMAIS SEÇÕES em nova página (use quebra de página aqui)

INTRODUÇÃO (negrito e maiúsculas)

Texto da introdução.

MATERIAL E MÉTODOS (negrito e maiúsculas)

Texto do material e métodos. Texto do material e métodos. Texto do material e métodos.

Subtítulo 1 do material e métodos se necessário (itálico)

Texto do material e métodos. Texto do material e métodos. Texto do material e métodos.

Subtítulo 2 do material e métodos (itálico)

Texto do material e métodos. Texto do material e métodos. Texto do material e métodos.

RESULTADOS (ou RESULTADOS E DISCUSSÃO) (negrito e maiúsculas)

Texto dos resultados.

Subtítulo 1 dos resultados, se necessário (itálico)

Texto dos resultados. Texto dos resultados.

.

AGRADECIMENTOS (negrito e maiúsculas)

Texto dos agradecimentos. Incluir aqui agências financiadoras, se necessário.

REFERÊNCIAS (negrito e maiúsculas)

Observar formatações importantes nas referências:

1. Autores em maiúsculas separados por vírgula (não use ponto e vírgula). Antes do último autor, use “&”.
2. Nome e volume do periódico em itálico (não use itálico no número do volume); por exemplo:
Revista Brasileira de Biociências, 14(3): 1-12.
3. Atenção aos espaçamentos e uso de maiúsculas e minúsculas. Use os modelos abaixo.

BONGERS, F., POPMA, J., MEAVE, J. & CARABIAS, J. 1988. Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio*, 74: 55-80.

CARNEIRO, F. G. 1997. Numerais em esfero-cristais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 49., 1997, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Ed. da UFMG. 1 CD-ROM.

CEULEMANS, R. & SAUGIER, B. 1993. Photosynthesis. In: RAGHAVENDRA, A. S. (Ed.) *Physiology of Trees*. New York: John Wiley & Sons. p. 21-50.

CLEMENT, S. & SHELFORD, V. E. 1960. *Bio-ecology: an introduction*. 2nd ed. New York: J. Willey. 425 p.

DILLENBURG, L. R. 1986. *Estudo fitossociológico do estrato arbóreo da mata arenosa de restinga em Emboaba, RS*. 106 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.

LOWE-MCCONNELL, R.H. 1987. *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge: Cambridge University Press. 382 p.

NAKATANI, K., BAUMGARTNER, G. & CAVICCHIOLI, M. 1997. Ecologia de ovos e larvas de peixes. In: VAZZOLER, A. E. A. M., AGOSTINHO A. A. & HAHN, N. S. (Eds.) *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá: EDUEM. p. 281-306.

POLÍTICA. 1998. In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática. Disponível em: <<http://www.priberam.pt/Dicionarios/dlp.htm>>. Acesso em: 8 mar. 1999.

QUADRA, A. A. & AMÂNCIO, A. A. 1978. A formação de recursos humanos para a saúde. *Ciência e Cultura*, 30(12): 1422-1426.

SANTOS, R. P. & MARIATH, J. E. A. 2000. Embriologia de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.: estudo da antera e grão de pólen e sua aplicação no melhoramento. In: WINGE, H. (Org.)

CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2., 2000, Encantado, RS e REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, 3., 2000, Encantado, RS. *Anais...* Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO. p. 140-142.

SANTOS, R.P., MARIATH, J.E.A. & HESSE, M. 2003. Pollenkit formation in *Ilex paraguariensis* A.St.Hil. (Aquifoliaceae). *Plant Syst. Evol.*, 237: 185-198.<<http://dx.doi.org/10.1007/s00606-002-0257-2>>

THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX. 2012. Disponível em:<<http://www.ipni.org>>. Acesso em: 26 ago. 2012.

ZANIN, A., MUJICA-SALLES, J. & LONGHI-WAGNER, H. M. 1992. Gramineae: Tribo Stipeae. *Bol. Inst. Biocienc. 51*: 1-174. (Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul, 22).

LISTA DE FIGURAS E TABELAS (negrito e maiúsculas)

Figura 1. (negrito) Legenda completa da figura 1.

Figura 2. (negrito) Legenda completa da figura 2.

Figura 3. (negrito) Legenda completa da figura 2.

Tabela 1. (negrito) Cabeçalho completo da tabela 1.

IMPORTANTE!!!!

Tamanho do papel A4; Margens (todas) 2,5 cm

TODO O TEXTO: Times New Roman, fonte 12; Espaçamento duplo