

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ROSANA LETÍCIA DA ROSA

**ESTUDO BIOMONITORADO DO EXTRATO DA FOLHA DA *Euphorbia umbellata*
(PAX) BRUYNS PARA A PROPOSTA DE FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
DE PRATA CONTENDO ATIVOS VEGETAIS COM POTENCIAL BIOLÓGICO**

**PONTA GROSSA
2022**

ROSANA LETÍCIA DA ROSA

**ESTUDO BIOMONITORADO DO EXTRATO DA FOLHA DA *Euphorbia umbellata*
(PAX) BRUYNS PARA A PROPOSTA DE FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
DE PRATA CONTENDO ATIVOS VEGETAIS COM POTENCIAL BIOLÓGICO**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade do Centro-Oeste (UNICENTRO) e a Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Orientador: Prof^o. Dr^o. Flávio Luís Beltrame

**PONTA GROSSA
2022**

R788 Rosa, Rosana Letícia da
Estudo biomonitorado do extrato da folha da *Euphorbia umbellata*
(Pax) Bruyns para a proposta de formação de nanopartículas de prata contendo
ativos vegetais com potencial biológico. / Rosana Letícia da Rosa. Ponta Grossa,
2022.
81 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame.

1. Terpenos. 2. Nanopartícula de prata. 3. Síntese verde. 4. Câncer de
pulmão. 5. Ação antimicrobiana. I. Beltrame, Flávio Luís. II. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à
Farmácia. III.T.

CDD: 615.321

**Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa


ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 03/2022 DA DOUTORANDA **ROSANA LETICIA DA ROSA**, REALIZADA NO DIA 14 DE SETEMBRO DE 2022, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos quatorze dias do mês de setembro de dois mil e vinte e dois, às 14h, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em sessão aberta, por videoconferência, sob a presidência do Professor Doutor FLÁVIO LUIS BELTRAME, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda **ROSANA LETICIA DA ROSA**, na linha de pesquisa: Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais, constituída pelo Professor Doutor FLÁVIO LUÍS BELTRAME (UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): CAMILA DELINSKI BET (UNICESUMAR/PR); LUIZA STOLZ CRUZ (UNICENTRO/PR); PATRICIA MATHIAS DOLL BOSCARDIN (UEPG/PR); e PATRÍCIA MAZUREKI CAMPOS (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores, para arguição. O título do trabalho foi: **“ESTUDO BIOMONITORADO DO EXTRATO DA FOLHA DA *Euphorbia umbellata* (PAX) BRUYNS PARA A PROPOSTA DE FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA CONTENDO ATIVOS VEGETAIS COM POTENCIAL BIOLÓGICO”**. Encerrada a defesa, a banca considerou APROVADA a Tese, considerada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 (trinta) dias, a versão definitiva da Tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____


Alteração de título: sim não

Novo título: _____



FLÁVIO LUÍS BELTRAME (UEPG/PR)
Presidente


CAMILA DELINSKI BET
(UNICESUMAR/PR)

Titular


PATRICIA MATHIAS DOLL BOSCARDIN
(UEPG/PR)
Titular


LUIZA STOLZ CRUZ
(UNICENTRO/PR)
Titular


PATRÍCIA MAZUREKI CAMPOS
(UEPG/PR)
Titular

Ponta Grossa, 14 de setembro de 2022.

RESUMO

A utilização de produtos naturais tanto para prevenção como tratamento de doenças é algo muito antigo e realizado muitas vezes empiricamente pela população. Como exemplo, pode-se destacar o uso popular de extratos da *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, conhecida popularmente como janaúba, cega-olho ou cola-nota a qual é utilizada para o tratamento de câncer, úlcera gástrica, processos inflamatórios e outras doenças. No mesmo sentido, são escassos os estudos que avaliam sistemas nanoestruturados contendo substâncias presentes em extratos vegetais com potencial medicinal; como nanopartículas de prata (obtidas pelo processo de síntese verde). Esse trabalho propõe uma avaliação quali-quantitativa dos principais metabólitos vegetais presentes nos extratos obtidos a partir das folhas de *E. umbellata* e estudo biomonitorado frente a linhagens celulares de câncer de pulmão (A549 e H292) e cepas de microrganismos (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*), buscando identificar os extratos mais ativos que possam ser empregados no desenvolvimento de nanopartículas de prata. Após obtenção das nanopartículas preparadas a partir dos extratos mais ativos, se propõe avaliar físico-quimicamente estes sistemas e o potencial terapêutico frente aos modelos de avaliação da citotoxicidade e atividade antimicrobiana. Assim, foram identificados metabólitos secundários como taninos, flavonoides, alcaloides e terpenos nos extratos avaliados. A quantificação de terpenos foi realizada nos 5 extratos, a fração hexano apresentou maior concentração (7,24 mg de eufol/ g de extrato) e o extrato aquoso apresentou a menor concentração de terpenos (0,20 mg de eufol/ g de extrato). Os extratos diclorometano e hexano apresentaram os melhores resultados para a concentração inibitória mínima. A avaliação da citotoxicidade frente à linhagem A549 demonstrou que os extratos hexano e diclorometano foram os mais ativos, com IC₅₀ de 5,28 ± 1,40 e 2,74 ± 0,89 respectivamente. Para as células H292 o extrato de diclorometano foi o mais ativo com IC₅₀ de 27,52 ± 7,43. Os extratos hexano e diclorometano foram empregados no desenvolvimento das nanopartículas de prata. A análise visual das amostras e a avaliação utilizando espectrometria UV-vis demonstraram que houve formação de nanopartículas de prata com 35 minutos de exposição à luz artificial (para os dois extratos). As nanopartículas obtidas apresentaram tamanho médio de 166,9 ± 1,3 nm e 277,8 ± 1,4 nm, índice de polidispersão de 0,405 ± 2,3 e 0,422 ± 1,8, e potencial zeta de -30,5 ± 1,8 mV e -35,7 ± 1,4 mV, para os extratos hexano e diclorometano respectivamente. As nanopartículas de diclorometano foram avaliadas frente aos testes microbiológicos e de citotoxicidade. As nanopartículas de diclorometano na concentração de 0,5 µg/mL inibiram o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* em mais 50%. Essa inibição aconteceu na concentração de 0,25 µg/mL para o *Staphylococcus aureus* e 0,1 µg/mL para a cepa bacteriana *Klebsiella pneumoniae*. Em relação à citotoxicidade as nanopartículas mostraram resultados muito mais satisfatórios quando comparado apenas com a utilização do extrato. Com a concentração de 0,25 µg/mL houve uma redução significativa da viabilidade celular e para a célula H292 essa redução aconteceu na concentração de 0,1 µg/mL. Sendo assim as nanopartículas de prata de diclorometano apresentaram resultados satisfatórios.

Palavras-chave: Terpenos. Nanopartícula de prata. Síntese Verde. Câncer de pulmão. Ação Antimicrobiana.

ABSTRACT

The use of natural products both for the prevention and treatment of diseases is something very old and often carried out empirically by the population. As an example, we can highlight the popular use of extracts of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, popularly known as janaúba, blind-eye or glue-note, which is used for the treatment of cancer, gastric ulcer, inflammatory processes and other diseases. . In the same sense, there are few studies that evaluate nanostructured systems containing substances present in plant extracts with medicinal potential; as silver nanoparticles (obtained by the green synthesis process). This work proposes a qualitative-quantitative evaluation of the main plant metabolites present in extracts obtained from *E. umbellata* leaves and a biomonitored study against lung cancer cell lines (A549 and H292) and strains of microorganisms (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*), seeking to identify the most active extracts that can be used in the development of silver nanoparticles. After obtaining the nanoparticles prepared from the most active extracts, it is proposed to evaluate physicochemically these systems and the therapeutic potential against the evaluation models of cytotoxicity and antimicrobial activity. Thus, secondary metabolites such as tannins, flavonoids, alkaloids and terpenes were identified in the evaluated extracts. The quantification of terpenes was performed in the 5 extracts, the hexane fraction had the highest concentration (7.24 mg of eufol/g of extract) and the aqueous extract had the lowest concentration of terpenes (0.20 mg of eufol/g of extract). The dichloromethane and hexane extracts showed the best results for the minimum inhibitory concentration. The evaluation of cytotoxicity against the A549 strain showed that the hexane and dichloromethane extracts were the most active, with IC_{50} of 5.28 ± 1.40 and 2.74 ± 0.89 respectively. For H292 cells, the dichloromethane extract was the most active with IC_{50} of 27.52 ± 7.43 . The hexane and dichloromethane extracts were used in the development of silver nanoparticles. Visual analysis of the samples and evaluation using UV-vis spectrometry showed that silver nanoparticles were formed after 35 minutes of exposure to artificial light (for both extracts). The nanoparticles obtained had an average size of 166.9 ± 1.3 nm and 277.8 ± 1.4 nm, a polydispersity index of 0.405 ± 2.3 and 0.422 ± 1.8 , and a zeta potential of -30.5 ± 1.8 mV and -35.7 ± 1.4 mV, for hexane and dichloromethane extracts respectively. Dichloromethane nanoparticles were evaluated in microbiological and cytotoxicity tests. Dichloromethane nanoparticles at a concentration of 0.5 μ g/mL inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa* by over 50%. This inhibition occurred at a concentration of 0.25 μ g/mL for *Staphylococcus aureus* and 0.1 μ g/mL for the bacterial strain *Klebsiella pneumoniae*. Regarding cytotoxicity, the nanoparticles showed much more satisfactory results when compared only with the use of the extract. With a concentration of 0.25 μ g/mL there was a significant reduction in cell viability and for the H292 cell this reduction occurred at a concentration of 0.1 μ g/mL. Therefore, the dichloromethane silver nanoparticles showed satisfactory results.

Keywords: Terpenes. Silver Nanoparticles. Green Synthesis. Lung cancer. Antimicrobial Action.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	<i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns	21
FIGURA 2 -	Biossíntese dos terpenos, rota do acetato/mevalonato e rota do metileritritol fosfato (MEP)	24
FIGURA 3 -	Etapas de formação das nanopartículas de prata a partir da síntese verde	30
FIGURA 4 -	Desenvolvimento de resistência de antimicrobianos ao longo dos anos	32
FIGURA 5 -	Fluxograma das etapas da pesquisa	34
FIGURA 6 -	Microdiluição Seriada	38
FIGURA 7 -	Teste microbiológico	39
FIGURA 8 -	Esquema da placa com as microdiluições	39
FIGURA 9 -	Obtenção da solução de extrato de Hexano para o desenvolvimento das nanopartículas de Prata	42
FIGURA 10 -	Obtenção da solução de extrato de Diclorometano para o desenvolvimento das nanopartículas de Prata	43
FIGURA 11 -	Esquema do desenvolvimento das nanopartículas de prata através da síntese verde	44
FIGURA 12 -	Viabilidade celular da linhagem A549 após 72 horas de tratamento com extratos de <i>Euphorbia umbellata</i> pelo ensaio MTT	53
FIGURA 13 -	Viabilidade celular da linhagem H292 após 72 horas de tratamento com extratos de <i>Euphorbia umbellata</i> pelo ensaio MTT	55
FIGURA 14 -	Viabilidade celular da linhagem A549 após 72 horas de tratamento com extratos de <i>Euphorbia umbellata</i> pelo ensaio SRB	57
FIGURA 15 -	Viabilidade celular da linhagem H292 após 72 horas de tratamento com extratos de <i>Euphorbia umbellata</i> pelo ensaio SRB	58

FIGURA 16 - Suspensões de AgNPs de diclorometano expostas à luz arti- tempos de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45	60
FIGURA 17 - Suspensões de AgNPs de hexano expostas à luz artificial, nos tempos de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 minutos	60
FIGURA 18 - Espectro de AgNPs do extrato diclorometano nos tempos de reação de 10 a 45 minutos	61
FIGURA 19 - Espectro de AgNPs do extrato hexano nos tempos de reação de 10 a 45 minutos	62
FIGURA 20 - DM e IPD de uma análise das AgNPs do extrato hexano da <i>Euphorbia umbellata</i>	63
FIGURA 21 - DM e IPD de uma análise das AgNPs do extrato diclorometano da <i>Euphorbia umbellata</i>	64
FIGURA 22 - PZ das AgNPs do extrato hexano da <i>Euphorbia umbellata</i>	65
FIGURA 23 - PZ das AgNPs do extrato diclorometano da <i>Euphorbia umbellata</i>	66
FIGURA 24 - Imagem da AgNPs obtidas através do método de síntese verde utilizando como agente redutor o extrato hexano da <i>Euphorbia</i> <i>umbellata</i>	67
FIGURA 25 - Imagem da AgNPs obtidas através do método de síntese verde utilizando como agente redutor o extrato diclorometano da <i>Euphorbia umbellata</i>	68
FIGURA 26 - Viabilidade celular da linhagem A549 e H292 após 72 h de tratamento com as AgNPsD pelo método MTT	70
FIGURA 27 - Viabilidade celular da linhagem A549 e H292 após 72 h de tratamento com as AgNPsD pelo método SRB	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Resultado da análise fitoquímica das frações das folhas da <i>Euphorbia umbellata</i>	47
TABELA 2 -	Conteúdo total de terpenoides de cinco extratos das folhas de <i>E. umbellata</i>	49
TABELA 3 -	Concentração inibitória mínima para cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC® BAA-3079) após 24 horas de tratamento com as frações de <i>Euphorbia umbellata</i>	49
TABELA 4 -	Concentração inibitória mínima para cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC® 27853) após 24 horas de tratamento com as frações de <i>Euphorbia umbellata</i>	50
TABELA 5 -	Concentração inibitória mínima para cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923) após 24 horas de tratamento com as frações de <i>Euphorbia umbellata</i>	50
TABELA 6 -	Valores de IC ₅₀ (µg/mL) obtidos pelo método MTT e SRB para as linhagens celulares A549 e H292 após 72 horas de tratamento com extratos de <i>Euphorbia umbellata</i>	59
TABELA 7 -	Concentração inibitória mínima para cepas bacterianas <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> após 24 horas de tratamento com as nanopartículas de prata de diclorometano.....	69
TABELA 8 -	Valores de IC ₅₀ (µg/mL) calculados, pelo método de redução de MTT e SRB, para as linhagens A549 e H292, após 72 h de tratamento com as AgNPsD	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	FAMÍLIA <i>Euphorbiaceae</i>	18
3.2	GÊNERO <i>Euphorbia</i>	19
3.3	ESPÉCIE <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns	20
3.4	PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE NOVOS MEDICAMENTOS	24
3.5	NANOPARTÍCULAS DE PRATA	26
3.6	SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA	27
3.7	CÂNCER DE PULMÃO	29
3.8	MEDICAMENTOS ANTIMICROBIANOS E A RESISTÊNCIA	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	DESENHO EXPERIMENTAL	34
4.2	COLETA E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	34
4.3	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	35
4.3.1	Alcaloides	35
4.3.2	Taninos	35
4.3.3	Flavonoides	36
4.3.4	Saponinas	36
4.3.5	Antraquinonas	36
4.3.6	Terpenos	36
4.4	QUANTIFICAÇÃO DOS TERPENOS	37
4.5	TESTES MICROBIOLÓGICOS	37
4.5.1	Obtenção das cepas bacterianas	37
4.5.2	Preparação do inóculo	37

4.5.3	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos da <i>E. umbellata</i>	38
4.5.4	Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos.....	40
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS	40
4.6.1	Linhagem celular	40
4.6.2	Viabilidade celular	41
4.6.3	Ensaio de redução do MTT	41
4.6.4	Ensaio de coloração de proteínas	41
4.7	DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	42
4.7.1	Caracterização físico-químicas das AgNPs	44
4.7.1.1	Determinação do diâmetro médio e potencial zeta	44
4.7.1.2	Análise por espectroscopia UV-Vis	45
4.7.2	Testes microbiológicos das AgNPsD	45
4.7.2.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das AgNPsD.....	45
4.7.2.2	Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) das AgNPsD	45
4.7.3	Avaliação da atividade citotóxica das AgNPsD	46
4.7.3.1	Linhagem celular	46
4.7.3.2	Viabilidade celular	46
4.7.3.3	Ensaio de redução do MTT das AgNPsD	46
4.7.3.4	Ensaio de coloração de proteínas das AgNPsD	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	ENSAIOS FITOQUÍMICOS	47
5.2	QUANTIFICAÇÃO DOS TERPENOS	48
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS....	49
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS.....	52
5.5	DETERMINAÇÃO DE FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS (AgNPs) POR ANÁLISE VISUAL.....	59

5.6	DETERMINAÇÃO DE FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS (AgNPs) POR ESPECTROSCOPIA DE ULTRAVIOLETA.....	61
5.7	MEDIDA DO DIÂMETRO MÉDIO (DM), ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IPD), POTENCIAL ZETA (PZ)	63
5.8	ANÁLISE DO POTENCIAL ZETA	65
5.9	ANÁLISE MORFOLÓGICA DE SUPERFÍCIE	66
5.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS AgNPsD.....	68
5.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS AgNPsD	69
6	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

Há muito tempo a população mundial usa plantas medicinais como tratamento para várias doenças. O uso das plantas nos tempos mais antigos baseava-se em experiências e na observação, visto que não havia informações e estudos suficientes dos produtos naturais e seus efeitos sobre as doenças e para seus tratamentos. Assim, as plantas e seus metabólitos se tornaram alternativas comuns para o tratamento de várias enfermidades (SECA; PINTO, 2018; ALVES-SILVA *et al.*, 2017).

Os produtos naturais/metabólitos vegetais desempenham um papel significativo no desenvolvimento de novos medicamentos (TARIQ *et al.*, 2017). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que entre 65% - 85% da população de países em desenvolvimento usam plantas para o tratamento de doenças. Sendo assim, a avaliação farmacológica, toxicológica e bioquímica dessas plantas e seus produtos/metabólitos torna-se indispensável (PALHARES *et al.*, 2015).

Nesse contexto pode-se citar a *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, conhecida popularmente no Brasil como “janaúba”, “leitosinha”, “cega-olho” ou “cola-nota” (ORTÊNCIO, 1997). O látex dessa espécie tem sido usado empiricamente para o tratamento de vários tipos de câncer (LUZ *et al.*, 2015).

A espécie *E. umbellata* possui poucos estudos científicos que comprovem as atividades biológicas dos seus extratos. Entretanto, estudo realizado por Minozzo (2015) a partir das cascas da *E. umbellata*, mostrou que a fração metabólica quando usada via oral gerou proteção gástrica em ratos e preveniu lesões mais severas que poderiam atingir grandes porções do tecido glandular do estômago.

A forma mais conhecida de uso dessa espécie vegetal é de um diluído desenvolvido através do látex, conhecido popularmente como garrafada (OLIVEIRA *et al.*, 2013), que contém ésteres diterpênicos de forbol, os quais possuem efeitos tóxicos e irritantes (COSTA, 2011).

Com o intuito de minimizar os efeitos tóxicos associados à utilização de plantas para o tratamento de doenças, várias estratégias estão sendo desenvolvidas, sendo a maioria delas, para melhorar a entrega do medicamento no local de ação. Nesse sentido destacam-se as nanopartículas, que podem ser

administradas por várias vias, como oral, nasal, transdérmica, endovenosa, entre outras (VIEIRA; GAMARRA, 2016).

As nanopartículas são sistemas nanoestruturados que podem ser produzidos por diferentes técnicas, como dispersão de um polímero pré-formado (nanoprecipitação), evaporação do solvente, emulsificação espontânea/difusão do solvente, polimerização e síntese verde (MUNDARGI, 2008). Vários materiais podem ser utilizados para o desenvolvimento dessas, como: polímeros, ouro, prata, zinco e cobre.

As nanopartículas metálicas produzidas pela técnica de síntese verde, que se executa pelo emprego de extrato de plantas, os quais possuem uma ampla variedade de metabólitos com potencial redox, e podem desempenhar um papel importante como agente redutor na síntese biogênica da prata (KEAT *et al.*, 2015).

Considerando a importância da constante busca por novas formas farmacêuticas para o tratamento de doenças, destacando-se entre elas o câncer, este trabalho propõe uma avaliação quali-quantitativa das principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos obtidos da *E. umbellata* e um estudo biomonitorado desses sobre linhagens celulares de câncer de pulmão (A549 e H292).

As nanopartículas foram avaliadas em linhagens microbianas (*Klebsiella pneumoniae* (ATCC[®] BAA-3079), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC[®] BAA 3104) e *Staphylococcus aureus* (ATCC[®] 12600)) a fim de determinar o(s) extrato(s) mais ativo(s) para serem utilizados no desenvolvimento de nanopartículas de prata empregando a técnica de síntese verde e assim avaliar as características físico-químicas desse sistema formado e seu potencial medicinal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo biomonitorado dos extratos das folhas da *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns buscando identificar a fração com maior potencial medicinal para ser usada no preparo de nanopartículas de prata a serem testadas quanto ao seu potencial citotóxico e antimicrobiano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos de *E. umbellata*;
- Realizar uma caracterização fitoquímica (qualitativa) dos extratos obtidos;
- Quantificar os terpenos presentes nos extratos;
- Avaliar o efeito microbiológico dos extratos frente às cepas bacterianas: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® BAA-3079), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® BAA 3104) e *Staphylococcus aureus* (ATCC® 12600);
- Avaliar o efeito citotóxico dos extratos frente a linhagens de A549 (adenocarcinoma de pulmão - ATCC® CCL-185®) e NCI-H292 (o adenocarcinoma mucoepidêmico de pulmão - ATCC® CRL-1848®);
- Desenvolver nanopartículas de prata pelo processo de síntese verde, com os extratos que apresentarem melhores resultados em relação à citotoxicidade e efeito antimicrobiano;
- Caracterizar físico-quimicamente as nanopartículas produzidas;
- Avaliar as nanopartículas produzidas frente a linhagens de A549 (adenocarcinoma de pulmão - ATCC® CCL-185®) e NCI-H292 (o adenocarcinoma mucoepidêmico de pulmão - ATCC® CRL-1848®);
- Avaliar as nanopartículas de diclorometano produzidas frente às cepas bacterianas: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® BAA-3079), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® BAA 3104) e *Staphylococcus aureus* (ATCC® 12600).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FAMÍLIA *Euphorbiaceae*

A família *Euphorbiaceae* Juss está inserida na ordem Malpighiales; considerada uma das maiores famílias dos grupos das Angiospermas, a qual apresenta 229 gêneros e 6.511 espécies no mundo (THE PLANT LIST, 2020). No Brasil foram contabilizados 63 gêneros e 943 espécies pela Flora do Brasil (2020). Destacam-se pela sua importância econômica e valores nutricionais e sociais (FELIU, 2011).

É de origem nativa, possui uma ampla distribuição geográfica com ocorrência confirmadas nas regiões norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul e na maioria dos domínios fitogeográficos como: Amazônia, caatinga, cerrado, mata atlântica, pampa e pantanal (FLORA DO BRASIL, 2020).

Apresentam-se sob a forma de árvores, arbustos e trepadeiras e possuem uma grande diversidade morfológicas sendo suas principais características folhas simples, alternas e normalmente pecioladas. O látex geralmente está presente em todas as espécies (NASCIMENTO; SILVA; CONCEIÇÃO, 2017; FLORA DO BRASIL, 2020).

Uma de suas espécies mais importante é a *Ricinus communis* L., conhecida popularmente como mamona. Essa é matéria-prima para produção do óleo de rícino muito utilizada na indústria para produção de medicamentos, cosméticos, plásticos, lubrificantes e como combustível alternativo (SOUZA, 2017).

Estudos fitoquímicos encontraram uma grande variedade de compostos secundários como terpenos, taninos, flavonoides, ácido fenólico e esteroides. Dentre as várias classes desses compostos os terpenos, presentes nas *Euphorbias*, são relatados como os responsáveis pela ação anticâncer (GAO *et al.*, 2015; FEI *et al.*, 2016).

No Hospital de Medicina Alternativa (HMS/SES-GO), o qual atende pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS) com terapias complementares, são utilizadas algumas espécies/plantas da família *Euphorbiaceae* com finalidade terapêutica (PINTO *et al.*, 2014).

Entre os anos de 1980 e 2008, foram citadas 8 espécies na prevenção ou tratamento do câncer, sendo que a maioria estão relacionados aos gêneros *Croton* (2 espécies), *Cnidocolus* (3 espécies) e *Euphorbia* (3 espécies) (DE MELO *et al.*, 2018).

3.2 GÊNERO *Euphorbia*

O gênero *Euphorbia* apresenta uma grande variedade de espécies em todas as regiões do mundo e são utilizadas para o tratamento de diversas doenças. É considerada tóxica devido ao látex rico em diterpenóides e ésteres diterpênicos de forbol (COSTA, 2011). Outros metabólitos encontrados nesse gênero foram: esteroides, flavonoides, ácidos fenólicos e taninos (PASCAL *et al.*, 2017).

O principal metabólito presente nesse gênero é o terpeno, sendo algumas das subclasses classificadas em diterpenos policíclicos e diterpenos macrocíclicos, os quais apresentam grande atividade antitumoral (VASAS; HOHMANN, 2014). No Brasil esse gênero é muito utilizado para tratar problemas alérgicos, doenças inflamatórias, dor, úlcera gástrica e principalmente câncer (MINOZZO, 2015).

Amirghofran *et al.*(2006) realizou um estudo do potencial citotóxico do extrato metanólico das partes aéreas da espécie *Euphorbia cheiradenia* frente a 5 linhagens celulares (HeLa, A549, Fen, K-562 e Jurkat), demonstrando uma maior sensibilidade das linhagens K-562 e Jurkat às substâncias químicas presentes nesse extrato.

O potencial citotóxico do extrato de metanol e subfrações de partes aéreas de cinco espécies do gênero *Euphorbia* também foram analisados em um estudo com linhagens celulares HeLa, MCF-7, Fen, K-562 e Jurkat. O extrato de metanol além de apresentar potencial citotóxico frente às linhagens celulares, também mostrou potencial de indução da proliferação linfocitária (AMIRGHOFRAN *et al.*, 2011).

Santos e colaboradores (2016) demonstraram um decréscimo no tumor de Ehlich em camundongos utilizando extrato da *Euphorbia tirucalli*. Segundo os autores, os mecanismos responsáveis por esse efeito ainda são desconhecidos, mas acredita-se que os terpenos, os quais possuem ação antioxidante, possam estar envolvidos nessa atividade antitumoral.

Em 2012 foi aprovado um medicamento, comercialmente nominado PICATO[®], para o tratamento de queratose actínica, o qual possui como principal ativo um diterpeno isolado da espécie vegetal *Euphorbia peplus* (APARICIO, 2019).

3.3 ESPÉCIE *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns

A espécie *Euphorbia umbellata* apresenta como sinônimos: *Euphorbia pseudograntii* Bruyns, *Synadenium grantii* Hook. f., *Synadenium umbellatum* Pax e *Synadenium umbellatum* var. *puberulum* (WCSP, 2018), e é conhecida popularmente como janaúba, leitossinha, cega olho ou cola nota (Figura 1).

É um arbusto suculento de 5 a 10 metros de altura, possui caule cilíndrico, cicatrizes foliares proeminentes e hastes verdes com grande quantidade de látex. As folhas estão dispostas em espiral, são simples e completas; pecíolo com até 8 mm de comprimento. Inflorescências frouxas axilares, compostas por cachos de flores, onde essas são unissexuais, sésseis (NICHOLSON, 2008).

Vários metabolitos estão presentes na espécie *E. umbellata*, sendo esses com grande ação farmacológica. Eles são encontrados principalmente nas folhas, látex e caule. Os principais compostos são: antocianinas, glicosídeos cianogênicos ou cianogênicos, compostos fenólicos, saponinas, glicoproteínas, enzimas proteolíticas, trans e cis poli-isoprenos, ésteres de diterpenos e derivados do forbol, ácidos isobutírico, tíglico e fenilacético, carboxilesterases e colinesterases, triterpenoides (germanicol, friedelina, 3 β -friedelinol, eufol, tirucalol, euforbol, , isômeros do lanosterol), ionol, ácido benzoico, ácido fenilacético e lequitinas (HASSAN, MOHAMMED e MOHAMED, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013; MUNHOZ *et al.*, 2014).

FIGURA 1- *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns.



Fonte: LUZ *et al.*, 2015.

Algumas partes e compostos dessa planta (látex, caule, raiz, partes aéreas ou na sua totalidade) são usados popularmente no tratamento de diferentes tipos de cânceres, mesmo possuindo alguns constituintes tóxicos (BHANOT, SHARMA e NOOLVI *et al.*, 2011). No sul do Brasil o látex é muito utilizado no tratamento de câncer intestinal, câncer de pele, leucemias, etc (LIU *et al.*, 2014).

O látex presente nessa espécie é uma mistura de vários compostos altamente tóxicos, sendo assim, é comum ocorrer acidentes, principalmente com animais e crianças por se tratar de uma planta ornamental (FRANCISCO; PINOTTI, 2000).

Cruz e colaboradores, (2020) realizaram um estudo com as frações do látex da *E. umbellata* que demonstrou um grande efeito citotóxico em células das linhagens HRT-18, HeLa e Jurkat (leucemia); o extrato hexano foi o que apresentou maior citotoxicidade frente aos outros extratos (clorofórmio, acetato de etila e metanol), sendo importante destacar que esse efeito foi dependente da dose testada.

Estudos realizados com o látex dessa planta também demonstraram atividade citotóxica frente a células de melanoma (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Os extratos obtidos das partes aéreas demonstraram um alto potencial antitumoral e antiangiogênico (MOTA *et al.*, 2009).

O látex exibiu diminuição da viabilidade celular em linhagem de melanoma, dependente da concentração e tempo de ação, assim como parada do ciclo celular. Gerou uma redução de 40% no volume dos tumores dos camundongos com melanoma, fato esse que pode estar relacionado ao metabólito esteroide citrostadienol presente na *E. umbellata* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Compostos isolados dessa espécie mostraram diferentes atividades em sistemas biológicos, como por exemplo, ação anti-inflamatório, anti-úlceras, homeostática e antitumoral (GOEL *et al.*, 2007; *apud* LUZ *et al.*, 2016). O látex dessa espécie é utilizado na forma de “garrafada”, na qual 18 gotas dele são diluídas em 1 litro de água e consumidas três vezes por dia (ORTENCIO, 1997). Essa é utilizada no tratamento de vários tipos de doenças, incluindo o câncer (DUTRA *et al.*, 2012).

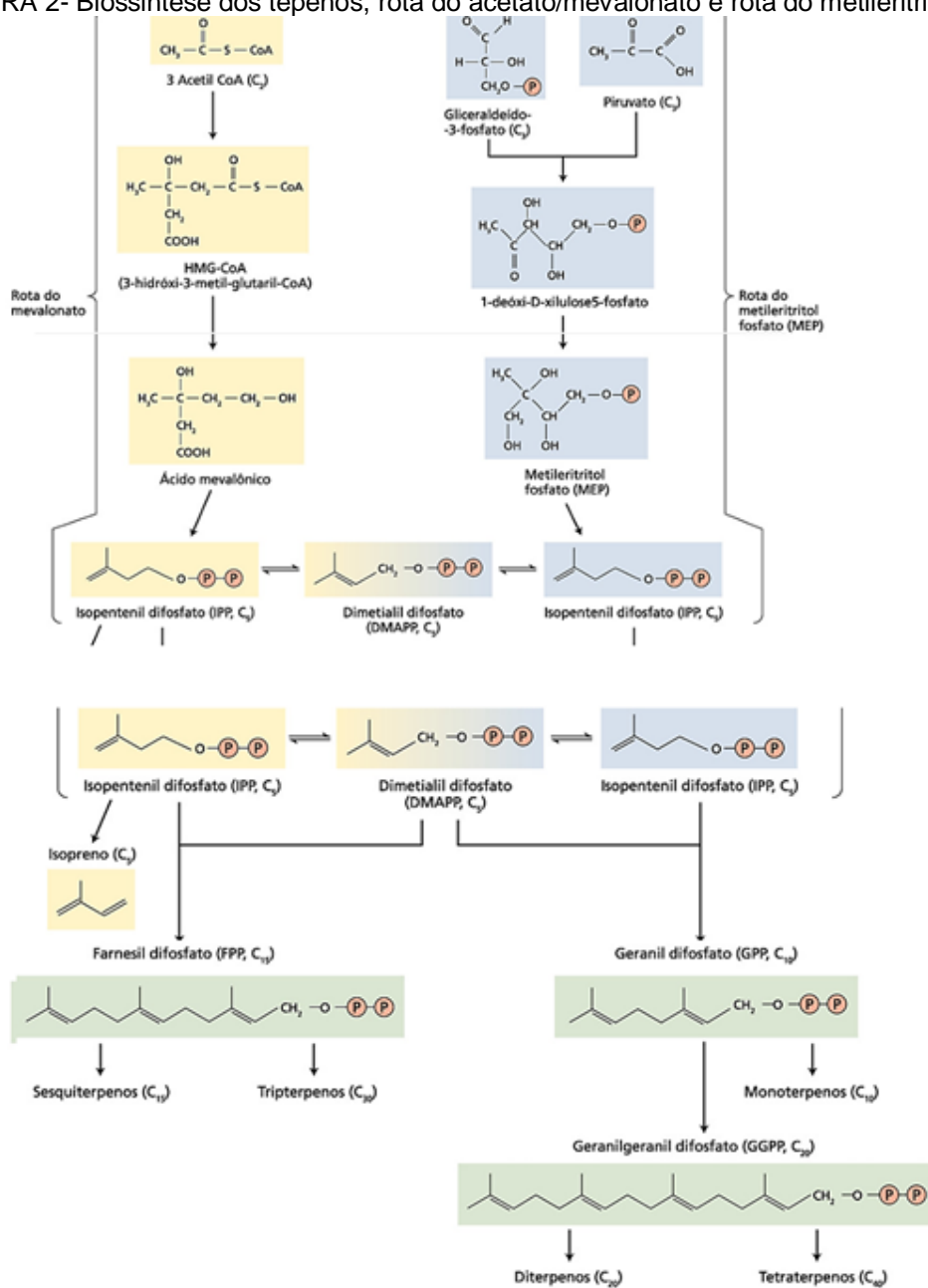
Um dos principais componentes dessa espécie responsável por essas ações citotóxicas são os terpenos (di e triterpenos). Os terpenoides constituem a maior classe de metabolitos secundários, com mais de 24 mil compostos. São caracterizados pela fusão de unidades de isoprenos (composto por cinco carbonos-C5) e apresentam uma grande diversidade estrutural. Sua classificação quanto aos subtipos se dão a partir do número de unidades de isoprenos (BUCHANA; GRUISSEM e JONES, 2015). São duas as rotas metabólicas dessa classe de metabolitos, rota do ácido mevalônico e a rota do metileritritol fosfato (MEP) (TAIZ *et al.*, 2017).

Na rota do ácido mevalônico, três moléculas de acetil-CoA são catalisadas pelas enzimas tiolase e hidroximetilglutaril-CoA sintase, sendo assim o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) é formado. Posteriormente essa molécula formada é reduzida pela HMG-CoA redutase em duas reações, formando o ácido mevalônico. Subsequente há duas fosforilações, dependentes de adenosina trifosfato (ATP), do ácido mevalônico e uma descarboxilação subsequente de fosforilação do isopentil difosfato (IPP) (KANG *et al.*, 2016). Na rota do metileritritol fosfato (MEP) primeiramente com o auxílio da enzima 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (DXS) ocorre à condensação do piruvato e de gliceraldeído 3-fosfato para formar o intermediário 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato. Esse é rearranjado pela 1-desoxi-D-xilulose 5 fosfato reductoisomerase (DRX) e assim reduzido para formar 2-C-metil-D-eritriol 4 –fosfato (MEP). Em seguida o trifosfato de citidina é transferido juntamente com um fosfato adicional de ATP para formar 4-(Citidina-5'-difosfato)-2C-metil-D-

eritritol. Com o auxílio da enzima MEP-2,4-ciclodifosfato sintase, ocorre à ligação do grupo fosfato adicional à porção do fosfato do nucleotídeo. Assim há formação de um difosfato cíclico e ocorre à perda de citidina monofosfato, formando o 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (MEcPP). As duas últimas reações ocorrem à redução e eliminação catalisadas pelas redutases de ferro-enxofre, formando assim o isopentenil difosfato e o seu isômero alicíclico, difosfato de dimetilalilo (BUCHANAN *et al.*, 2015; TAIZ *et al.*, 2017).

Após a formação do IPP ocorre a adição de IPP, as quais formam uma serie de penil-difosfato. Ocorre à elaboração desses por sintases de terpenoides Especificas para formar as estruturas dos terpenos, também há modificações enzimáticas Secundarias as estruturas básicas (oxidação, redução, isomerização e conjugação). Deste modo ocorre a formação dos compostos terpênicos, essas rotas metabólicas estão representadas na Figura 3 (BUCHANAN *et al.*, 2015; KABERA *et al.*, 2014).

FIGURA 2- Biossíntese dos tepenos, rota do acetato/mevalonato e rota do metileritritol fosfato (MEP).



Fonte: Fisiologia Vegetal UFC.

3.4 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE NOVOS MEDICAMENTOS

O uso de plantas medicinais para o tratamento, cura e prevenção de doenças é uma prática muito antiga. No Brasil essa prática é muito comum devido principalmente a grande diversidade da flora. As plantas medicinais são comercializadas em feiras livres (DA PAIXÃO *et al.*, 2016).

Um dos grandes problemas relacionados ao uso de plantas medicinais é o seu consumo sem nenhuma comprovação das propriedades farmacológicas (TRESVENZOL *et al.*, 2006). Duas áreas de conhecimento das plantas medicinais são utilizadas para busca de novas soluções terapêuticas sendo a etnobotânica, a qual estuda a inter-relação entre as plantas e as pessoas, como as plantas são usadas e nomeadas, e a etnofarmacologia, relacionada à pesquisa de compostos químicos presentes nessas plantas capazes de gerar uma ação terapêutica (ROCHA-COELHO e SANTOS, 2008).

O uso de plantas medicinais (extratos e princípios ativos) no tratamento de várias doenças, incluindo o tratamento do câncer e doenças causadas por microrganismos, é uma das alternativas frente aos efeitos adversos existentes nos tratamentos convencionais. Os estudos da utilização de plantas têm aumentado significativamente nos últimos anos, principalmente devido ao uso de técnicas inovadoras de identificação, extração e purificação de seus compostos (MOLIN *et al.*, 2015).

No mercado farmacêutico, muitos antineoplásicos são derivados de plantas medicinais (NEWMAN e CRAGG, 2020). A citar, por exemplo a Podofilotoxina que foi uma das primeiras drogas antineoplásicas desenvolvidas usando produtos naturais, a qual foi isolada da espécie vegetal *Podophyllum peltatum*. Essa substância se destaca por ser uma lignana ariltetralínicas com atividade citotóxica e efeito anticâncer (MEDRADO *et al.*, 2015). A partir dela foi dada origem a estudos de semi-síntese e até sínteses completas de outras moléculas que hoje estão disponíveis comercialmente, como o Taxol® (Paclitaxel), Etopophos® (Etoposídeo), Vumon® (Teniposídeo), Velban® (Vimblastina) e Oncovin® (Vincristina) (EID *et al.*, 2015)

Estudos apontam que aproximadamente 60% dos pacientes com câncer usam plantas medicinais como um método alternativo para prevenção e controle dessa doença em todo o mundo, por isso é de extrema importância desenvolver pesquisas em relação a plantas medicinais e utilizando-as para desenvolver novas formas farmacêuticas (DELL'ANTONIO *et al.*, 2015).

Estudos também relatam o potencial das plantas medicinais e seus metabólitos em microrganismos. Devido ao aumento da resistência microbiana aos medicamentos convencionais, as plantas têm sido estudadas como alternativas para o tratamento dessas infecções (REIS GOMES *et al.*, 2020).

Nos últimos anos muitos estudos foram realizados envolvendo plantas medicinais para obtenção de fitoterápicos com grande potencial farmacológico. Os extratos de plantas tornaram-se alternativas para o tratamento de doenças causadas por microrganismos e com algumas vantagens frente aos medicamentos sintéticos como: menos efeitos adversos, menor custo, disponibilidade da planta na natureza e menor desenvolvimento de resistência dos microrganismos multirresistentes (SOUSA, OLIVEIRA e MOURA, 2019).

3.5 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A nanotecnologia é uma área que apresenta grande crescimento na indústria farmacêutica, otimizando as propriedades físicas, químicas e biológicas com uma liberação controlada de fármacos, aumentando assim a sua biodisponibilidade (RAMOS, 2018).

No início do século XX, Paul Ehrlich propôs o conceito de Bala Mágica, onde uma nanopartícula contendo um fármaco, o qual atravessava várias barreiras fisiológicas e celulares. No século XXI foram desenvolvidas nanopartículas vetorizadas, direcionando o fármaco ao seu alvo de ação, diminuindo os efeitos adversos causados por formas farmacêuticas convencionais (APOLINÁRIO *et al.*, 2017).

As nanopartículas de prata (AgNPs) possuem uma variedade de ações farmacológicas como agentes antimicrobianos, antitrombótico, anti-inflamatório e na cicatrização de feridas. Estudos recentes mostram grande potencial no tratamento de câncer, pois estão envolvidas no rompimento da cadeia respiratória mitocondrial, levando a produção de espécies reativas de oxigênio e interrupção da síntese de ATP (GUO *et al.*, 2015).

Características das células cancerígenas podem auxiliar na eficácia das AgNPs no tratamento do câncer. Os tumores geralmente apresentam um sistema de drenagem linfático reduzido e uma vascularização abundante com fenestras que variam de 300 a 700 nm. Dessa forma as AgNPs podem permear de forma passiva ocasionando uma retenção e acumulação dessas no tumor (LEMBO; CAVALLI, 2010).

A prata demonstra-se segura para o organismo humano em baixas concentrações (0,05 mg/L). O uso de nanopartículas de prata leva a uma redução

em centenas de vezes da sua concentração utilizada, em relação a forma iônica, mantendo todas suas propriedades (MUKHA *et al.*, 2013).

Estudos relatam que as AgNPs, exibem atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans*, *Candida non albicans* e *Candida tropicalis* (CHAUHAN, REDDY e ABRAHAM, 2015).

As nanopartículas metálicas possuem absorção de ressonância de plasmon de superfície na região UV-Vis, isso surge devido ao tamanho reduzido da partícula. O deslocamento da banda de absorção depende do tamanho da partícula, do ambiente químico que ela se encontra, das espécies adsorvidas na superfície e também da constante dielétrica. A absorbância ou o comprimento de onda define principalmente o tamanho e algumas propriedades das partículas metálicas (BHUI *et al.*, 2009; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

Existe uma diversidade de espectros de ressonância plasmônica superficial de nanopartículas de prata na região visível, com suas respectivas colorações, sendo que essas variam de amarelo a azul (MARTINEZ; ZUÑIGA; SANCHEZ, 2013). As colorações das soluções de nanopartículas metálicas indicam o seu tamanho (TANG *et al.*, 2015).

3.6 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As nanopartículas metálicas estão sendo muito estudadas devido às suas propriedades físicas e químicas baseadas no tamanho reduzido, levando assim a uma série de aplicações de interesse médico. O ouro e a prata são os íons mais importantes e proeminentes para a utilização da síntese verde no desenvolvimento de nanopartículas a partir de plantas com propriedades medicinais (RAO *et al.*, 2016).

Todos os métodos usados para obtenção das nanopartículas metálicas devem seguir algumas características como: reprodutibilidade, controle do tamanho da partícula, dispersão do tamanho, distribuição dos compostos químicos adsorvidos, controle de agregação (referente ao potencial zeta das soluções) (LOPES, 2017).

O método da síntese verde na obtenção de nanopartículas metálicas oferece inúmeros benefícios frente aos métodos químicos e físicos. Possui ótimo custo-

benefício, é inofensivo ao meio ambiente e de fácil transposição para a síntese em escala industrial (SULAIMAN *et al.*, 2013).

Para impedir a agregação das nanopartículas metálicas e assim garantir sua estabilidade podem ser usadas duas técnicas de estabilização, sendo a eletrostática e a estérica. A eletrostática baseia-se na repulsão elétrica gerada por cargas de mesmo sinal, que estão presentes ao redor das partículas. A estérica está relacionada ao uso de moléculas aderidas à superfície as quais impedem a agregação com outras nanopartículas. Os extratos de origem vegetal são opções utilizadas para a síntese das nanopartículas, uma vez que desempenham ação de redução e estabilizadores (RAOTA, 2019).

As plantas possuem uma variedade de metabólitos com potencial redox, desempenhando um papel muito importante como agente redutor na síntese biogênica de nanopartículas. Esse método produz nanopartículas mais estáveis e com uma alta taxa de produção frente à síntese microbiana de nanopartículas (KEAT *et al.*, 2015).

A utilização da química verde está se tornando comum, principalmente devido às iniciativas de sustentabilidade. Ao invés de serem utilizados produtos químicos tóxicos para a redução e estabilização de nanopartículas metálicas, estão sendo usados compostos biológicos, como os extratos de plantas e micro-organismos (bactérias, bolores, leveduras, algas e biomoléculas) (PARK *et al.*, 2011).

Os extratos das plantas para o desenvolvimento das nanopartículas metálicas pode advir de diferentes partes dessas, como folhas, caules, raízes, sementes, frutos, cascas, calos, flores e látex (HAMELIAN *et al.*, 2018).

São vários metabólitos secundários presentes nos extratos das plantas, como alcaloides, taninos, polifenóis, flavonoides, esteróis polissacarídeos, saponinas e terpenoides. Esses apresentam muitas propriedades medicinais, as estruturas complexas são capazes de atuar como redutores do metal, levando a formação das nanopartículas metálicas (ALJABALI *et al.*, 2018).

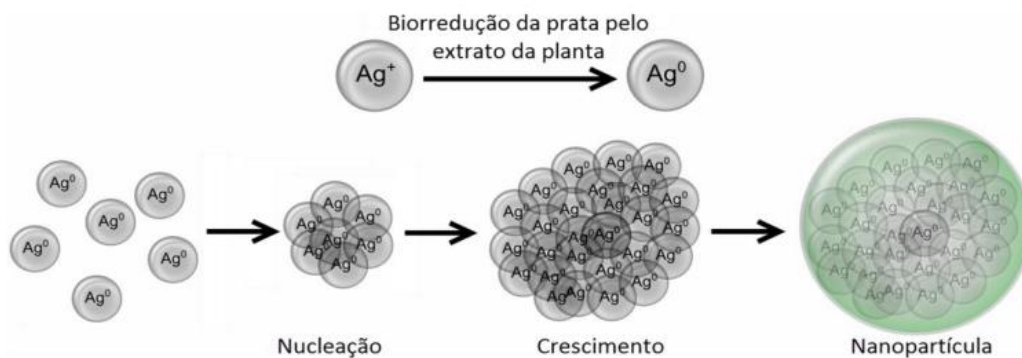
As nanopartículas de prata sintetizadas pelo método de síntese verde são esféricas (LOPES, 2017). Essa síntese possui três etapas principais:

- a) **Etapa 1:** O extrato da planta atua reduzindo os sais de prata, a partir da síntese verde, formando assim átomos neutros;

- b) Etapa 2:** Os átomos colidem e formam um núcleo estável e esse processo é chamado de nucleação (mais átomos colidem e formam partículas maiores);
- c) Etapa 3:** Ocorre a estabilização a partir do esgotamento dos íons metálicos, ou pelo recobrimento das nanopartículas pelos compostos presentes no extrato, esse processo impedindo a aglomeração (ALBERNAZ, 2014).

Essas etapas estão demonstradas na Figura 3.

FIGURA 3- Etapas de formação das nanopartículas de prata a partir da síntese verde.



Fonte: ALBERNAZ (2014).

3.7 CÂNCER DE PULMÃO

Câncer é o nome dado ao conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células as quais tendem a ser muito agressivas invadindo órgãos e tecidos, causando muitas vezes, metástase (INCA, 2020).

No mundo é o segundo tipo de câncer mais comum em homens e mulheres, ficando atrás apenas para o de próstata em homens e de mama em mulheres (BRAY *et.al.*, 2018). Estudo realizado em 2012 apontava uma incidência de 1,8 milhões de casos, com uma maior ocorrência em homens, sendo que 85% estão associados ao consumo do tabaco e seus derivados (INCA, 2020). A taxa de sobrevivência desse tipo de neoplasia é muito baixa, sendo ela de 18%, fato muitas vezes relacionado à metástase que ocorre em ossos (ALLEMANI *et al.*, 2015).

O câncer de pulmão é classificado em duas categorias: carcinoma de pulmão de pequenas células (CPPC), representando 10 a 15% dos casos e carcinoma de

pulmão não-pequenas células (CPNPC), onde representa 80 a 85% dos casos. O último é dividido em outras subcategorias: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas (epidermoide) e carcinoma de células grandes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

O adenocarcinoma é o subtipo mais dominante em comparação com os outros. Na maioria dos casos ele localiza próximo aos alvéolos, onde ocorre uma diferenciação glandular ou produção de mucina. O carcinoma escamoso aparece próximo às vias aéreas e traqueia, causado principalmente pelo tabagismo. O carcinoma de células grandes é diagnosticado através da exclusão, quando não apresenta morfologia de adenocarcinoma e nem de carcinoma (DAVIDSON GAZDAR e CLARKE, 2013).

O câncer de pulmão pode evoluir para uma metástase óssea maligna. Os ossos são os locais mais frequentes de metástase onde o foco primário é o pulmão, isso resulta em grande morbidade e reduz a qualidade de vida dos pacientes (AVELINO *et al.*, 2015). Estudo realizado por Oliveira *et al.*, (2019) mostrou que a metástase é mais prevalente nos pacientes com adenocarcinomas, onde os sítios mais comuns são coluna vertebral, cingulo pélvico, fêmur e úmero proximal e parede torácica, fato esse que está relacionado a uma menor sobrevida dos pacientes.

O Brasil está consideravelmente atrasado em relação aos outros países em relação as terapias sistêmicas (quimioterapia e terapia hormonal) para o tratamento de câncer de pulmão e acesso aos medicamentos (ARAUJO *et al.*, 2018).

No Brasil são escassos os estudos que descrevem padrões de tratamentos para o câncer de pulmão (ARAUJO *et al.*, 2014). Materiais publicados anteriormente sugerem que o tratamento desse tipo de câncer gera um alto impacto econômico, como no ambiente hospitalar e ambulatorial principalmente devido o valor da quimioterapia. O custo do tratamento do câncer de pulmão pode chegar a R\$410.848,34 por paciente ao ano, isso demonstra a necessidade da busca por novos tratamentos, mais eficazes e com custo reduzido (TANAKA, CHADID e BERNARDINO, 2016).

O diagnóstico é muito importante para fazer um planejamento adequado no tratamento. Para pacientes onde o tumor é localizado, o ideal é a cirurgia seguida de uma quimioterapia e/ou radioterapia. Quando o paciente já apresenta metástase o tratamento mais eficaz é a quimioterapia combinada com medicamentos específicos (INCA, 2020).

Acredita-se que a falta de disponibilidade de terapias no Sistema Único de Saúde para o câncer de pulmão tenha causado mais de 700 mortes prematuras de pacientes em 2015. Os medicamentos como anticorpos monoclonais (bevacizumabe) e inibidor da tirosina quinase (ITQ), já estão disponíveis no SUS, no entanto poucos pacientes têm acesso a eles. O primeiro medicamento a ser aprovado seu uso no Brasil foi o crizotinibe, onde sua aprovação foi lenta, causando muitas mortes prematuras (ARAUJO *et al.*, 2018).

Taxanos e gencitabina são medicamentos oferecidos para poucos pacientes, a maioria deles recebem um regime de primeira linha baseado em platina, sendo os mais comuns: paclitaxel e pemetrexede (BALDI e CHATKIN, 2019).

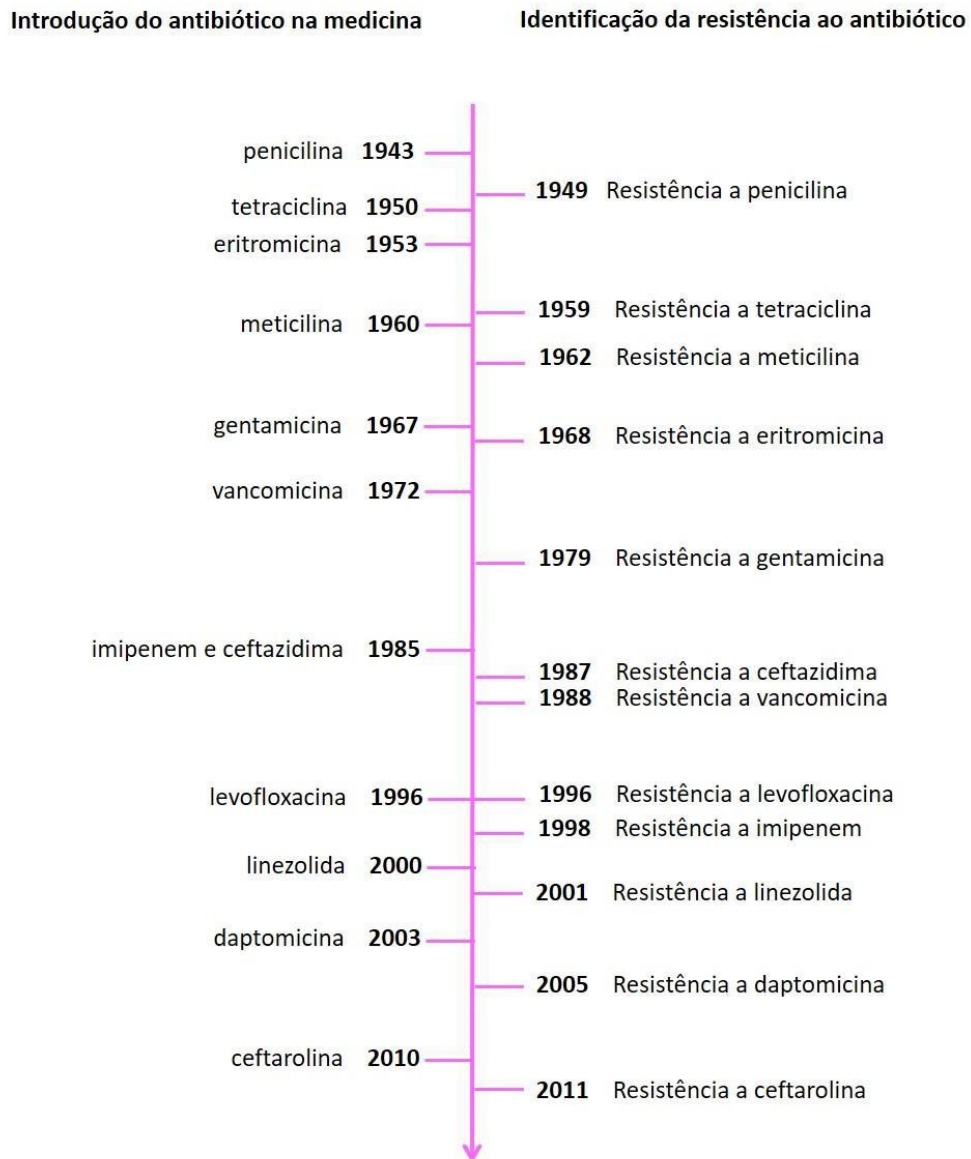
Esses dados demonstram a importância da pesquisa de novas terapias como tratamento de câncer de pulmão.

3.8 MEDICAMENTOS ANTIMICROBIANOS E A RESISTÊNCIA

O uso indiscriminado de antimicrobianos e a resistência bacteriana são conhecidos desde o começo da utilização da penicilina. Eles são a classe de medicamentos mais prescritos, tanto para uso terapêutico como profilático. O uso desse tipo de medicamento deve ser cada vez mais controlado, o que não se vê em muitos países, onde não há necessidade de prescrição médica. Os microorganismos possuem uma imensa capacidade de adaptação aos fármacos (FERNANDES *et al.*, 2016). Acredita-se que 700 mil mortes por ano sejam causadas pela resistência antimicrobiana, tornando-se um problema de saúde pública em nível mundial (ESTRELA, 2018).

A resistência bacteriana frente aos antimicrobianos é manifestada pouco tempo após o início do uso do agente, como mostrado na Figura 4 que denota o ano de inserção do antimicrobiano no mercado em relação ao tempo que as bactérias atingidas levaram para desenvolver algum mecanismo de defesa.

FIGURA 4- Desenvolvimento de resistência de antimicrobianos ao longo dos anos.



Fonte: FRIEDEN, 2013 *et al.*, *apud* OLIVEIRA, 2018.

A *Klebsiella pneumoniae* também é uma bactéria Gram-negativa, é comumente encontrada nas fezes e na nasofaringe. As principais infecções causadas por essa bactéria são infecções do trato urinário, de tecidos moles, pneumonia, septicemias e muito comum em infecções hospitalares. Os antimicrobianos mais utilizados para o tratamento dessa bactéria são penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e quinolonas. Muitos estudos mostram que a *K. pneumoniae* tem criado grande resistência a vários antimicrobianos (MUNIZ *et al.*, 2019).

A *Klebsiella pneumoniae* carbapemase (KPC), é uma bactéria que apresenta grande resistência aos antimicrobianos. Um estudo demonstrou que em 2001 ela foi responsável por 1% das infecções hospitalares e em 2008 esse número já chegou a 30%, um aumento significativo. O tratamento dessa infecção tem um alto custo e uma grande incidência de mortalidade, tornando-se um problema de saúde pública (SANTOS e SECOLI, 2019).

O *Staphylococcus aureus* é um agente Gram-positivo presente na microbiota normal, é um problema de saúde devido à grande adaptação ao homem, sendo assim um potencializador de patogenicidade (SOUZA, TEIXEIRA e CUNHA, 2017). Os últimos estudos demonstram que essas cepas estão desenvolvendo grande resistência aos antimicrobianos (CUNHA, 2017). Há poucas expectativas no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças causadas por essa bactéria, o que torna de grande importância a pesquisa de novas alternativas de tratamento para essas cepas.

Estudo realizado por Furtado *et al.*, (2019) em um hospital público do Pará mostrou a resistência de *S. aureus* frente à clindamicina e oxacilina.

O *S. aureus*, resistente a meticilina, é um grande causador de infecções hospitalares. Em um estudo foram isoladas 272 amostras de pacientes que estavam sendo atendidos em um hospital, dessas 142 (52,2%) mostraram-se resistentes a meticilina. Em relação aos isolados cirúrgicos esses apresentaram resistência frente à azitromicina, eritromicina e ciprofloxacina (MARTÍNEZ *et al.*, 2011).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, patógeno oportunista, está associada principalmente a pneumonias causadas por ventilação mecânica, realizada em hospitais. Responsável por muitas mortes de pacientes imunocomprometidos. Por esses motivos o tratamento de doenças causadas por esse patógeno é pouco eficaz (BASSETTI *et al.*, 2012).

Estudos mostram a resistência da *P. aeruginosa* em β -lactamases, aminoglicosídeos, fluorquinolona e polimixina. Esse fato limita significativamente as opções terapêuticas disponíveis (LÓPEZ-CAUSAPÉ *et al.*, 2018).

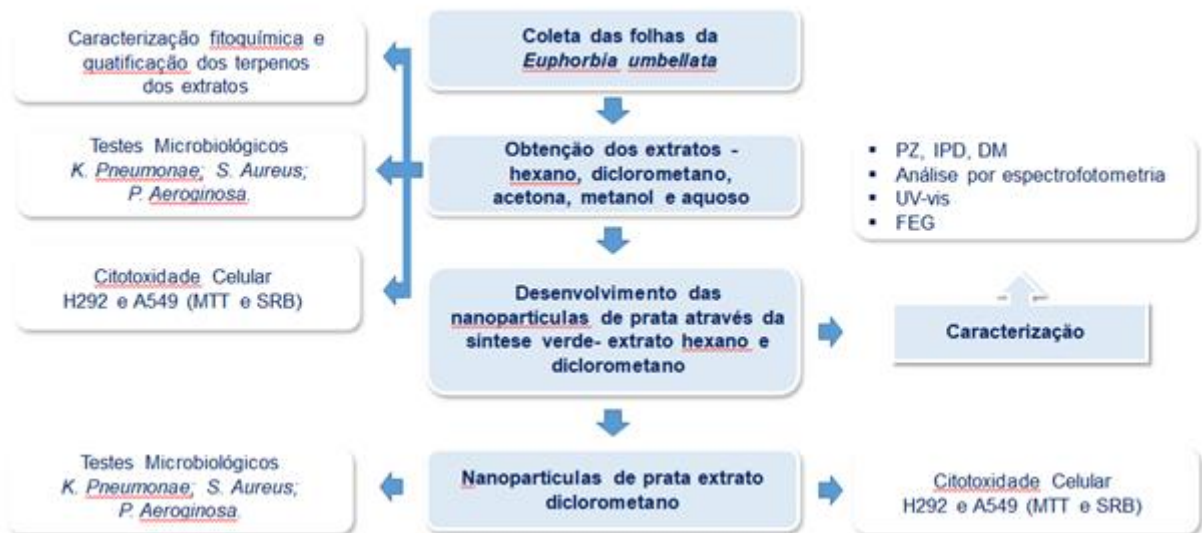
No Brasil existe um índice muito alto de infecções do trato respiratório, sendo 66,7 % dessas causadas por *P. aeruginosas* (SOUSA; OLIVEIRA e MOURA, 2016). A grande resistência desse patógeno a diversos antimicrobianos mostra a grande necessidade do desenvolvimento de novas formas terapêuticas para o tratamento dessas infecções.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O presente trabalho teve início a partir da coleta das folhas da *Euphorbia umbellata*. Consequente, houve a obtenção dos extratos e após isso foi realizada a caracterização fitoquímica desses, assim como a quantificação dos terpenos. Posteriormente realizaram-se os testes microbiológicos e de citotoxicidade celular. Os extratos que apresentaram os melhores em relação aos testes anteriores foram selecionados para desenvolver as nanopartículas de prata. Essas foram caracterizadas. Por fim, realizaram-se os testes microbiológicos e de citotoxicidade celular em nanopartículas de diclorometano. As etapas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 5.

FIGURA 5- Fluxograma das etapas da pesquisa.



Fonte: A autora.

4.2 COLETA E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

A coleta do material vegetal foi realizada em 2019, durante o verão, na região de Ponta Grossa, (Coordenadas: 22 J 0584216 UTM 7222790 ELEVÇÃO 902), Paraná, Brasil.

Uma excisata com um ramo florido da espécie (*Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns) foi preparada e posteriormente enviada ao Herbário do Museu Botânico

Municipal de Curitiba para classificação sistemática. A identificação botânica foi realizada pelo curador Dr. Osmar dos Santos Ribas e catalogada sob o número 363509.

As folhas da espécie *Euphorbia umbellata* foram coletadas e secas em estufa a 37 °C. Para a extração dos metabólitos secundários foi utilizada a técnica de extração por solvente a quente, para a qual foi produzido um cartucho com 35 g das folhas secas e trituradas e a cada etapa da extração utilizou-se 750 mL de cada solvente, com seis horas de extração. Foram obtidos assim quatro extratos (hexano, diclorometano, acetona e metanol). Através da técnica de turbólise foi obtido o extrato aquoso, utilizando 35 g da planta seca e 750 mL de água. Após a rotaevaporação dos solventes (40 °C) o material foi levado para liofilização (-47 °C e pressão inferior a 500 mmHg). Os extratos foram armazenados sob-refrigeração. O rendimento foi calculado através de uma regra de três simples, levando em conta o peso obtido de extratos a partir de 35 g de plantas secas utilizadas para a extração.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

Foram utilizadas as técnicas propostas pela Sociedade Brasileira de Farmacognosia (SBF, 2020). Foram avaliadas as seguintes classes de metabólitos secundários: alcaloides, taninos, flavonoides, terpenos, saponinas e antraquinonas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.1 Alcaloides

As frações (hexano, diclorometano, acetona, metanol e aquoso) foram diluídas em água destilada (1:1 v/v), e colocadas em tubos de ensaios, onde foram adicionadas 2 gotas do reagente de Dragendorff. Esses foram comparados com o branco (extrato sem reagente). O resultado foi considerado positivo para aqueles que apresentaram um precipitado.

4.3.2 Taninos

As frações foram diluídas em água (1:1 v/v), e colocadas em tubos de ensaios. A esses foram adicionadas 2 gotas de HCl diluído (10%), juntamente com

uma solução de gelatina a 2,5%. O resultado foi considerado positivo para aqueles onde houve precipitação.

4.3.3 Flavonoides

Para a identificação dos flavonoides foi realizada a reação de Shinoda. Os extratos foram diluídos em água e em seguida foram adicionados seis fragmentos de Mg metálico. A essa solução foi adicionado 1 mL de HCl. Os tubos que desenvolveram uma coloração rósea a vermelha foram considerados positivos para essa classe de metabólito.

4.3.4 Saponinas

Todas as frações foram diluídas (1:10 v/v) em 10 mL de água destilada em tubos de ensaios. Agitaram-se os tubos no sentido vertical por 15 segundos. As soluções foram deixadas em repouso por 15 minutos, a altura da espuma inicial foi marcada com caneta. Espuma persistente (15 minutos) foi considerada singular para saponinas.

4.3.5 Antraquinona

A identificação da antraquinona foi realizada com a reação de Borntränger. As frações foram diluídas em água (1:1 v/v) e nelas foram adicionados 5 mL de solução de NH_4OH diluído. Surgimento da coloração rósea a vermelha foi considerada positiva para esse metabólito.

4.3.6 Terpenos

A identificação dos terpenos foi realizada através da reação de Liebermann-Burchard. Foram adicionados 2 mL dos extratos em uma cápsula de porcelana, a qual foi colocada em uma capela até a evaporação do solvente. Ao resíduo adicionou-se 1 mL de anidro acético, o qual foi transferido para um tubo de ensaio.

Foi adicionado lentamente 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, em banho de gelo. O aparecimento da coloração vermelho/castanho indica presença de terpenos.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DOS TERPENOS

Foi realizada por técnica colorimétrica (HE *et al.*, 2019). Para tanto 1 mg de cada fração foi solubilizado em 100 µL de metanol. Em seguida foram adicionados 150 µL de solução de vanilina sulfúrica (5% p/v em ácido acético glacial) e 500 µL de ácido perclórico. As amostras foram aquecidas a 60 °C, por 45 minutos. Após esse período foram resfriadas em banho de gelo e 2,25 mL de ácido acético foram adicionados. A absorvância das amostras foi medida em 548 nm, em espectrofotômetro UV/Vis. Foi determinada uma curva de calibração com eufol (0,05 a 1 mg/mL em metanol). Os resultados foram expressos como equivalentes de miligrama de eufol (mg de eufol) por grama de extrato (g de extrato).

4.5 TESTES MICROBIOLÓGICOS

4.5.1 Obtenção das cepas bacterianas

As cepas padrões foram cedidas pelo professor Dr. Luís Antônio Esmerino, do laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Foram testados micro-organismos Gram-Negativos: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® BAA-3079) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853) e Gram-Positivo: *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923). As culturas foram cultivadas durante 24 horas em ágar Mueller Hinton.

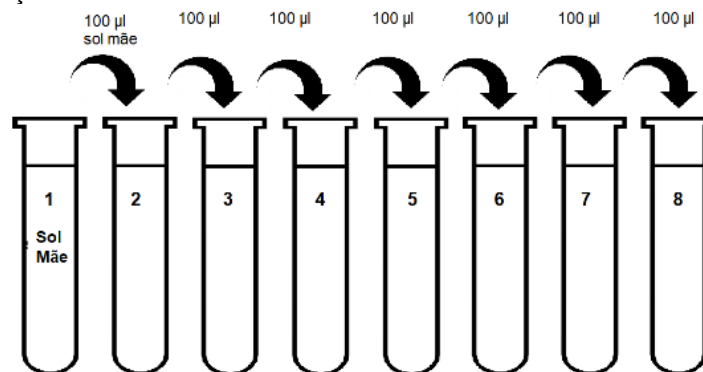
4.5.2 Preparação do inóculo

Foram selecionadas de 5 a 6 colônias de bactérias isoladas e com o apoio de uma alça esterilizada os micro-organismos foram transferidos para um tubo contendo 5 mL de solução salina e agitadas no vórtex, para obter uma concentração aproximada de 10⁵ UFC/mL, obtidas pelo controle de turbidez de BaSO₄, equivalente à escala 0,5 de McFarland.

4.5.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos da *E. umbellata*

A determinação da CIM dos extratos foi realizada por meio da técnica de microdiluição seriada, proposta por Karaman *et al.* (2003) com modificações. Uma solução mãe contendo 40 mg dos extratos (hexano, diclorometano, acetona, metanol e aquoso) foi preparada em 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO). Seguida pela adição de 100 μ L de DMSO em sete tubos de ensaios sequenciados de 2 a 8, sendo a solução mãe o tubo 1. Para obter a diluição foram transferidos 100 μ L da solução mãe para o tubo 2 e assim sucessivamente até o tubo 8. A partir dessas diluições foram obtidas as seguintes concentrações: 1,562; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50, 100 e 200 mg/mL, como mostrado na Figura 6.

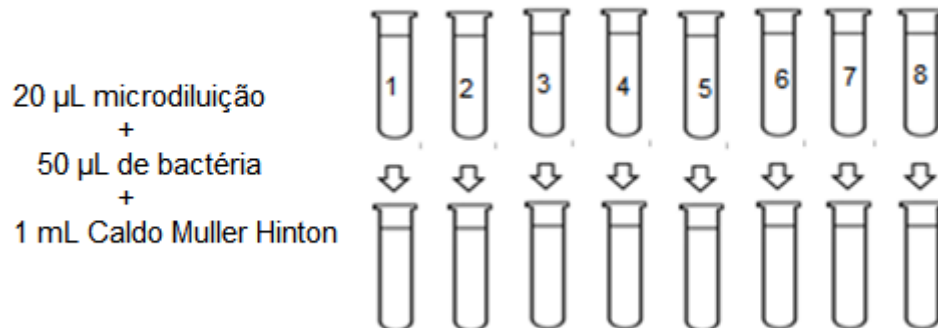
FIGURA 6- Microdiluição Seriada.



Fonte: A autora.

Após a diluição foram transferidos 20 μ L de cada solução para tubos numerados de 1 a 8, nestes foram adicionados 50 μ L de bactérias diluídas (10^5 UFC/mL). Também foram preparados controles dos extratos, assim como um controle positivo contendo as cepas bacterianas e um controle negativo na ausência dos micro-organismos (Figura 7). Os tubos foram incubados por 24 horas a 35 $^{\circ}$ C.

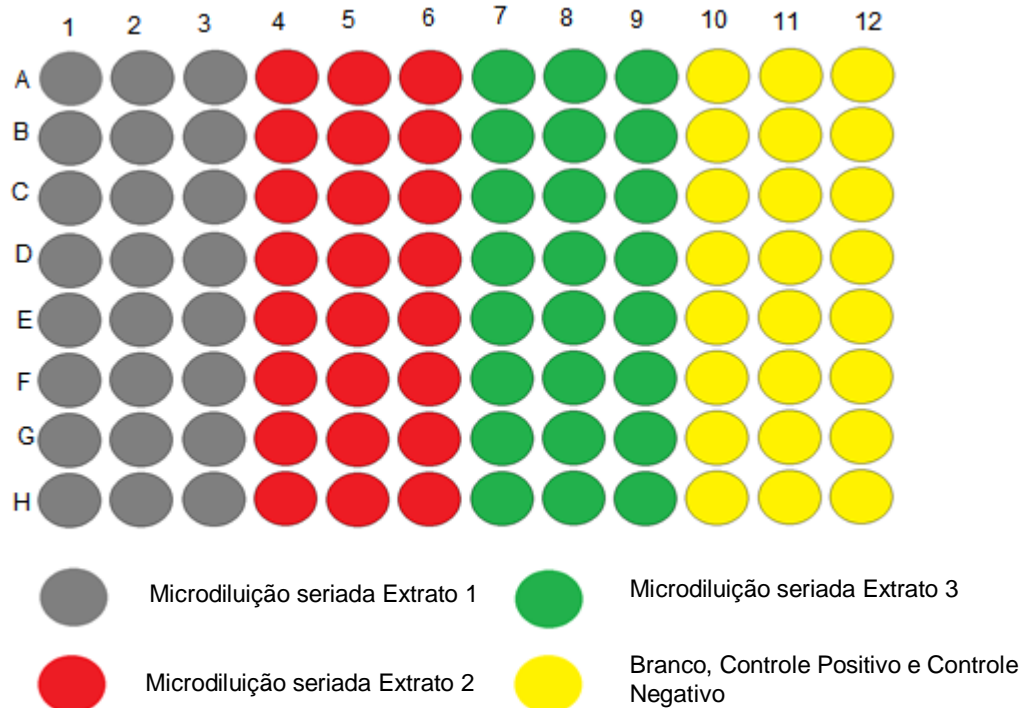
FIGURA 7- Teste microbiológico.



Fonte: A autora.

Após a incubação foram transferidos 100 μ L das soluções para uma microplaca de 96 poços com fundo em U, conforme apresentado na Figura 8. A leitura da placa foi realizada em leitor de placas de ELISA em 630 nm.

FIGURA 8- Esquema da placa com as microdiluições.



Fonte: A autora.

Os resultados das triplicatas foram calculados conforme a fórmula 1. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos três vezes.

$$C = \left(\frac{y}{\bar{x}_{C-} - \bar{x}_{C+}} \right) \times (\bar{x}_{Mic} - \bar{x}_{branc}) \quad (1)$$

onde:

C = concentração final;

y = concentração solução bacteriana comparada com padrão McFarland;

\bar{x}_{C-} = média controle negativo;

\bar{x}_{C+} = média controle positivo;

\bar{x}_{mic} = média microdiluições

\bar{x}_{branc} = média branco dos reagentes

4.5.4 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos

A determinação da concentração bactericida mínima foi determinada através da inoculação das culturas anteriormente preparadas dos poços em ágar Mueller-Hinton e incubada por 24 horas a 35 °C. A menor concentração do extrato capaz de inibir completamente o crescimento dos micro-organismos foi considerada a CBM. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS

4.6.1 Linhagem celular

A avaliação da citotoxicidade foi determinada para as cinco frações (hexano, diclorometano, acetona, metanol e aquoso) utilizando as linhagens de carcinoma de pulmão, A549 e H292. As células foram descongeladas e transferidas para garrafas apropriadas e cultivadas com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e Instituto Roswell Park Memorial (RPMI), respectivamente, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 34 mmol/L de bicarbonato de sódio e antibiótico (penicilina 10000 UI) e mantidas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a uma temperatura de 37 °C. As células foram cultivadas em meio de cultura e o crescimento foi acompanhado a cada 24 horas com auxílio de microscópio invertido. As culturas foram descartadas após 30 passagens.

4.6.2 Viabilidade celular

O efeito dos extratos sobre as células foi avaliado por meio da viabilidade celular. As células foram plaqueadas em placas de cultivo de 96 poços e incubadas por 24 horas. Após esse período foram adicionadas cinco concentrações dos extratos, variando de 0,1 a 500 µg/mL. A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas do tratamento, através de duas técnicas colorimétricas, redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina (MTT) e coloração de proteína. O controle negativo foi realizado com as células incubadas com uma solução veículo (DMEM e DMSO a 2%). Para ambas as técnicas os valores de absorbância foram transformados em porcentagem de viabilidade e os valores de IC₅₀ calculados.

4.6.3 Ensaio de redução do MTT

Para a leitura o meio foi descartado e 200 µL de MTT (500 µg/mL) foram adicionados em cada poço. A placa foi incubada a 37 °C, por um período de 2 horas. A solução de MTT foi descartada e os cristais de formazan formados, de coloração violeta, foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). A determinação quantitativa da citotoxicidade foi realizada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm em espectrofotômetro UV/Vis (MOSMANN, 1983). O controle negativo foi realizado com as células incubadas com uma solução veículo (DMEM e DMSO a 2%). Os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos três vezes.

4.6.4 Ensaio de coloração de proteínas

Para tal ensaio utiliza-se o reagente sulforodamina B (SRB). Decorrido o período de incubação o meio de cultura foi removido. Os poços foram lavados com tampão fosfato (pH 7,4), 100 µL de ácido tricloroacético 10% foram adicionados e as placas mantidas sob refrigeração por 30 minutos. Em seguida os poços foram lavados e as placas foram deixadas em temperatura ambiente para secagem. Uma vez secas foram adicionados 100 µL de solução de SRB 0,4%. A coloração se deu em 30 minutos a temperatura ambiente. Para remover o excesso de corante as

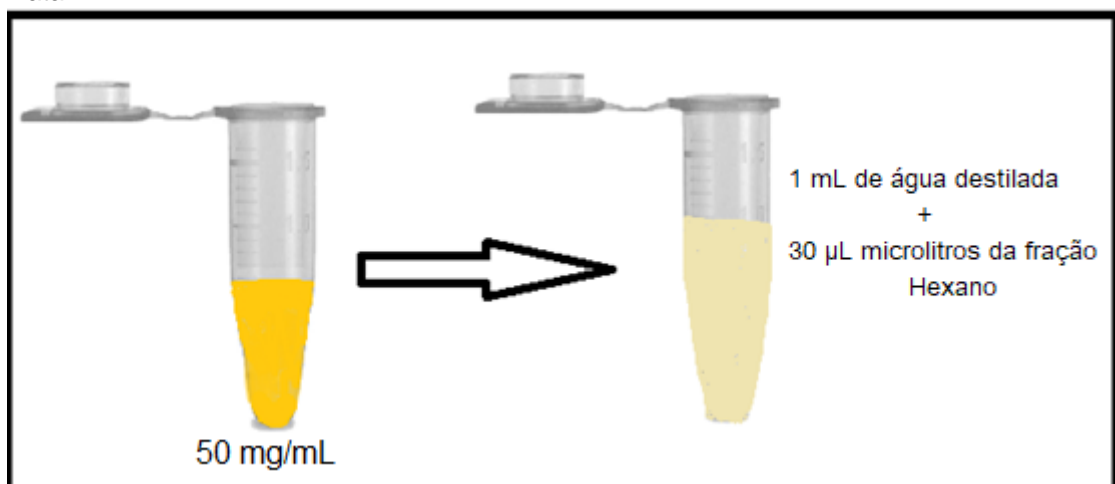
placas foram lavadas com solução de ácido acético 1% e secas em temperatura ambiente. Por fim, para solubilização, 150 μ L de TrisBase 10 mM foram adicionados (PAPAZISIS *et al.*, 1997). A leitura da absorbância foi realizada nos comprimentos de 520 nm e 620 nm. Veículo (solução de DMSO) foi utilizado como controle negativo. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos três vezes.

Como o extrato diclorometano apresentou melhores resultados que o extrato hexânico em experimentos microbiológicos e citotóxicos, e os AgNPsD demonstraram melhores resultados quanto às suas características físico-químicas, este material (AgNPsD) foi selecionado para avaliar o potencial biológico.

4.7 DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

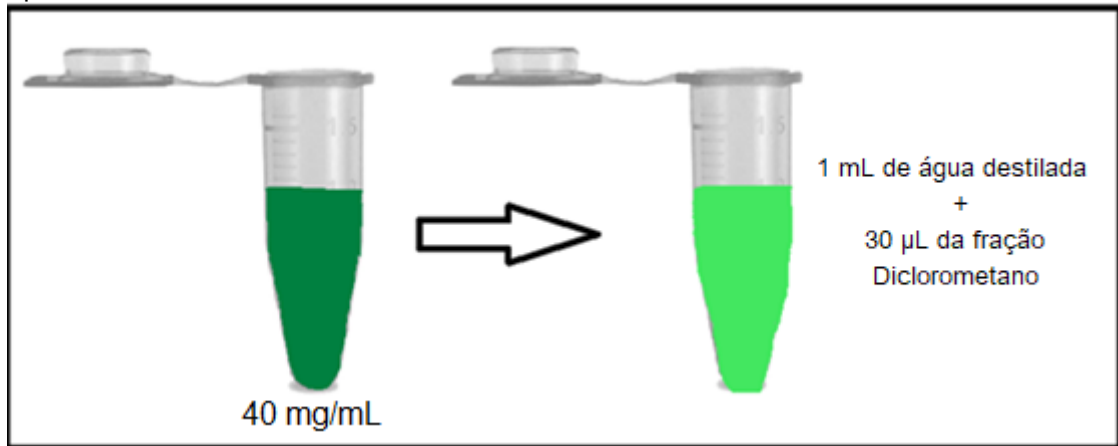
Para o desenvolvimento das nanopartículas de prata (AgNPs) foi preparada uma solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3) 1 mmol. Em seguida foi preparada uma solução padrão em água dos extratos da fração diclorometano (40 mg/mL) e hexano (50 mg/mL). Foram solubilizadas 30 μ L de cada fração em 1 mL de água destilada, a temperatura de 40°C e sob agitação, obtendo assim as soluções que foram utilizadas para o preparo das nanopartículas de prata, como mostrado nas Figuras 9 e 10.

FIGURA 9- Obtenção da solução de extrato de Hexano para o desenvolvimento das nanopartículas de Prata.



Fonte: A autora.

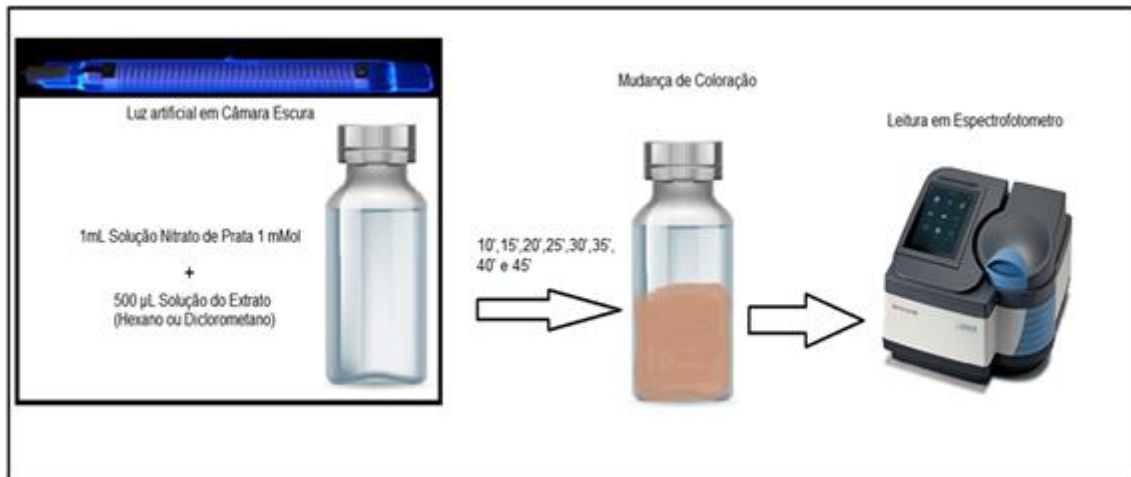
FIGURA 10- Obtenção da solução de extrato de Diclorometano para o desenvolvimento das nanopartículas de Prata.



Fonte: A autora.

A produção das nanopartículas de prata se deu através da síntese verde, para a qual foram adicionados 500 µL da solução dos extratos hexano e diclorometano (solubilizados em água com aquecimento) em 1 mL da solução de nitrato de prata. Em seguida essa solução foi deixada em exposição na luz artificial, produzida por uma lâmpada JBL modelo TROPIC ULTRA T5 24W 55CM 4000K. O tempo de exposição da solução contendo AgNO_3 /extrato de hexano/diclorometano à luz de espectro integral foi avaliado em duas etapas. Na primeira etapa foram avaliadas as soluções nos intervalos de tempo de: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 minutos onde a mudança de coloração de incolor/amarelo claro para castanho é indicativo de formação de nanopartículas. Após a visualização da mudança de coloração foi realizada a leitura da absorbância em UV-vis em todos os tempos, com o intuito de determinar o melhor tempo de exposição para redução da prata a nanopartículas de prata (Figura 11).

FIGURA 11- Esquema do desenvolvimento das nanopartículas de prata através da síntese verde.



Fonte: A autora.

Foram desenvolvidas as nanopartículas de prata de hexano (AgNPsH) e nanopartículas de prata de diclorometano (AgNPsD), essas foram armazenadas em geladeira a uma temperatura de 4 a 8°C para prosseguir com as análises.

4.7.1 Caracterização físico-químicas das AgNPs

4.7.1.1 Determinação do diâmetro médio e potencial zeta

O tamanho e polidispersão foram determinados pela técnica do espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic light scattering* - DLS), a qual analisa a distribuição de velocidades de movimento das partículas através da medição de flutuações dinâmicas de intensidade de dispersão da luz causada pelo movimento Browniano das partículas. Esta técnica promove um raio ou diâmetro hidrodinâmico, que é calculado utilizando a equação de Stokes-Einstein a partir das medidas acima mencionadas. Esses foram analisados no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (*Malvern Instruments*) com ângulo de detecção de 90° a 25°C. As amostras foram diluídas em água ultrapura do tipo I (1:100 v/v). Foram analisadas três amostras, com essas também foi realizada a determinação do potencial zeta.

4.7.1.2 Análise por espectroscopia UV-Vis

Os espectros de solução de AgNPs foram monitorados por um espectrofotômetro UV-VIS NIR VARIAN CARY 50 sem diluições na faixa de 190-500 nm. O branco foi calibrado com água destilada destinada para preparar as suspensões de nanopartículas e as amostras foram analisadas diretamente.

4.6.1.3 Microscopia eletrônica de varredura com feixe por emissão de campo (SEM-FEG).

A avaliação morfológica e da superfície das AgNPs foi realizada em microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo MYRA 3 LMH (Tescan). Essas foram depositadas no suporte de amostras e secas em estufa a 36°C por 24 horas. As amostras foram metalizadas com ouro no equipamento SC7620 *mini sputter Coater* e as micrografias foram obtidas após a visualização das amostras, empregando voltagens de aceleração entre 10 e 25 kV. O registro das imagens foi feito através do software do equipamento.

4.7.2 Testes microbiológicos das AgNPsD

Os testes microbiológicos para as AgNPsD foram realizados conforme o item 4.5.

4.7.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das AgNPsD

A CIM das AgNPsD foi realizada conforme descrito no item 4.5.1. As concentrações testadas foram: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 µg/mL.

4.7.2.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) das AgNPsD.

A CBM das AgNPsD foi realizada conforme já descrito no item 4.5.4.

4.7.3 Avaliação da atividade citotóxica das AgNPsD

4.7.3.1 Linhagem celular

Foi realizada conforme descrito no item 4.6.1.

4.7.3.2 Viabilidade celular

O efeito das AgNPsD foi realizado conforme o item 4.6.2, com as concentrações entre 0,1 a 1 µg/mL.

4.7.3.3 Ensaio de redução do MTT das AgNPsD

Esse teste foi realizado conforme já descrito no item 4.6.3.

4.7.3.4 Ensaio de coloração de proteínas das AgNPsD

O teste foi realizado conforme descrito no item 4.6.4.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS FITOQUÍMICOS

A análise fitoquímica é composta pelas etapas de coleta, preparação do material vegetal, extração e pesquisa dos metabólitos secundários. O principal objetivo dessa etapa é conhecer e confirmar a presença desses constituintes químicos (REGINATTO, 2017). Extração é um termo empregado para descrever o processo de separação dos metabólitos secundários e é realizada com solventes de polaridade crescente (FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 2010). Os solventes utilizados são capazes de separar os compostos de interesse considerando a solubilidade dos mesmos, assim como seus coeficientes de partição (SIMÕES *et al.*, 2017; ANDRADE, 2020).

O processo de extração das folhas permitiu a obtenção de cinco extratos. As frações das folhas da *E. umbellata* que apresentaram maiores rendimentos de extração foram as obtidas a partir dos solventes hexano (21,33%) e metanol (20,91%), seguidas dos solventes diclorometano (19,95%), acetona (19,83%) e aquosa (18,21%).

A análise fitoquímica dos extratos revelou a presença de taninos, flavonoides, alcaloides e terpenos nos diferentes extratos, como mostrado na Tabela 1.

TABELA 1- Resultado da análise fitoquímica das frações das folhas da *Euphorbia umbellata*

Classe de metabólitos	Secundários				
	Acetona	Metanol	Hexano	Diclorometano	Aquoso
Taninos	+	+	-	-	+
Flavonoides	+	-	-	-	-
Alcaloides	-	+	+	-	+
Terpenos	+	+	+	+	+
Saponinas	-	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-

Fonte: A autora.

Trabalho realizado anteriormente com ramos da espécie *E. tirucalli* já havia identificado a presença de flavonoides, alcaloides e terpenos em extratos desta espécie vegetal pertencente ao gênero *Euphorbia* (MARTINS, 2018). Embora não tenha sido identificado saponinas neste trabalho, existem registros na literatura afirmando a presença desses compostos em extratos de plantas do gênero *Euphorbia* (ORLANDA e VALE, 2015). Isso pode estar relacionado ao fato de que a quantidade e os tipos de metabólitos podem variar de espécies para espécies, assim como aspectos relacionados ao solo, clima, o método de coleta do material e a temperatura que essas plantas foram submetidas e também a solubilidade dos glicosídeos (MARTINS, 2018).

Ensaio fitoquímico preliminar no látex da *E. umbellata* mostraram a presença de terpenos, sendo esses os principais metabólitos secundários presentes nos extratos dessa espécie vegetal (LUZ *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2014).

A análise fitoquímica permite obter uma visão geral dos metabólitos secundários presentes na espécie estudada, a fim de determinar possíveis utilizações no desenvolvimento de novos fármacos (BESSA *et al.*, 2013).

5.2 QUANTIFICAÇÃO DOS TERPENOS

Os dados obtidos demonstraram que a fração hexano foi a que apresentou maior conteúdo total de terpenos, seguido da fração diclorometano. A variação do conteúdo nos cinco extratos estudados foi de 0,2 a 7,24 mg de eufol/ g de extrato, como mostrado na Tabela 2. Resultado já esperado, visto que foram identificados terpenos em outras partes da planta da mesma espécie estudada (ANDRADE, 2020; CRUZ *et al.*, 2020). A diferença nas concentrações em cada fração se dá pelo uso de solventes com diferentes polaridades, os quais conseguem extrair maior ou menor quantidade de terpenos que possuem características apolares, sendo mais facilmente extraídos por hexano (AZEVEDO *et al.*, 2014).

TABELA 2- Conteúdo total de terpenoides de cinco extratos das folhas de *E. umbellata*.

Amostra	mg eufol/g de extrato
Hexano	7,24 ± 0,81
Diclorometano	6,12 ± 2,44
Acetona	3,86 ± 1,06
Metanol	1,03 ± 0,30
Aquoso	0,20 ± 0,02

Fonte: A autora.

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS

Os extratos foram avaliados em três cepas bacterianas através do método de microdiluição com modificações (KARAMAN *et al.*, 2003) e os resultados estão expressos nas tabelas 3, 4 e 5.

TABELA 3- Concentração inibitória mínima para cepas de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® BAA-3079) após 24 horas de tratamento com as frações de *Euphorbia umbellata*.

Extrato	% de Inibição <i>Klebsiella pneumoniae</i>							
	1,562 mg/mL	3,125 mg/mL	6,25 mg/mL	12,5 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	200 mg/mL
Hexano	77,5 ± 1,43	59,5 ± 2,43	95,6 ± 0,6	99,0 ± 0,58	99,1 ± 0,57	103,3 ± 0,47	102,7 ± 0,65	105,5 ± 0,86
Diclorometano	78,3 ± 2,73	80,0 ± 2,93	85,2 ± 2,39	85,2 ± 3,35	84,8 ± 3,30	84,8 ± 3,97	85,3 ± 1,63	85,3 ± 3,17
Acetona	77,4 ± 2,10	77,5 ± 2,05	77,1 ± 2,52	79,2 ± 2,05	81,4 ± 1,88	84,7 ± 1,60	81,2 ± 1,76	83,2 ± 1,17
Metanol	1,5 ± 0,24	9,2 ± 0,42	25,6 ± 0,62	7,1 ± 0,64	27,5 ± 0,94	33,5 ± 0,84	36,1 ± 0,63	37,6 ± 0,75
Aquoso	1,3 ± 0,17	8,8 ± 0,43	15,1 ± 1,37	17,2 ± 1,59	23,1 ± 1,93	23,8 ± 1,47	33,6 ± 1,53	36,1 ± 1,65

Fonte: A autora.

Notas: Dados expressos como média de triplicatas de três experimentos independentes ± desvio padrão da média. Sendo o veículo, solução de DMSO.

TABELA 4- Concentração inibitória mínima para cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853) após 24 horas de tratamento com as frações de *Euphorbia umbellata*.

Extrato	% de Inibição <i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
	1,562 mg/mL	3,125 mg/mL	6,25 mg/mL	12,5 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	200 mg/mL
Hexano	30,3 ± 2,32	47,3 ± 2,56	64,3 ± 1,81	71,2 ± 2,01	76,5 ± 2,03	87,9 ± 1,18	97,4 ± 1,78	98,6 ± 0,76
Diclorometano	44,8 ± 2,21	54 ± 1,81	57,5 ± 1,39	64,5 ± 2,35	75,0 ± 2,05	81,6 ± 3,31	88,9 ± 2,25	95,1 ± 1,53
Acetona	31,0 ± 1,90	42,5 ± 2,91	55,9 ± 1,91	65,0 ± 2,23	65,3 ± 1,54	72,5 ± 1,42	77,4 ± 1,39	81,8 ± 1,01
Metanol	10,0 ± 1,23	13,5 ± 1,40	23,5 ± 1,59	26,2 ± 1,57	28,8 ± 0,77	41,8 ± 4,98	48,0 ± 1,01	53,2 ± 1,36
Aquoso	5,71 ± 0,25	7,45 ± 0,23	10,34 ± 1,09	11,91 ± 1,19	14,33 ± 1,45	19,0 ± 0,72	28,6 ± 0,77	31,8 ± 1,02

Fonte: A autora.

Notas: Dados expressos como média de triplicatas de três experimentos independentes ± desvio padrão da média. Sendo o veículo, solução de DMSO.

TABELA 5- Concentração inibitória mínima para cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923) após 24 horas de tratamento com as frações de *Euphorbia umbellata*.

Extrato	% de Inibição <i>Staphylococcus aureus</i>							
	1,562 mg/mL	3,125 mg/mL	6,25 mg/mL	12,5 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	200 mg/mL
Hexano	59,1 ± 3,31	57,6 ± 1,05	95,2 ± 0,55	98,5 ± 0,75	98,9 ± 0,89	102,8 ± 1,08	102,6 ± 1,40	104,1 ± 1,87
Diclorometano	44,3 ± 2,68	56,4 ± 1,94	94,0 ± 2,08	93,5 ± 1,83	94,4 ± 1,57	89,8 ± 1,79	94,1 ± 2,03	94,7 ± 1,81
Acetona	1,5 ± 0,18	2,2 ± 0,56	7,8 ± 2,46	21,6 ± 3,28	26,6 ± 1,26	27,1 ± 1,38	37,9 ± 1,26	44,5 ± 1,46
Metanol	1,6 ± 0,17	6,3 ± 0,7	16,3 ± 5,91	19,1 ± 4,73	21,2 ± 2,69	23,5 ± 2,36	23,5 ± 1,54	27,8 ± 1,90
Aquoso	1,4 ± 0,20	7,6 ± 0,54	12,1 ± 2,30	13,1 ± 3,13	12,1 ± 1,61	16,7 ± 1,90	23,1 ± 1,31	23,1 ± 1,10

Fonte: A autora.

Notas: Dados expressos como média de triplicatas de três experimentos independentes ± desvio padrão da média. Sendo o veículo, solução de DMSO.

É possível notar inibição de crescimento de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, principalmente nos extratos hexano e diclorometano. O extrato de acetona mostrou uma boa inibição para *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* onde mais de 50% da população bacteriana foi inibida, o que não ocorreu para o *S. aureus*, visto que apresentou uma menor concentração inibitória mínima quando comparado às outras cepas bacterianas.

Para a cepa de *K. pneumoniae* os extratos de hexano, diclorometano, acetona apresentaram uma inibição de mais de 50% das bactérias na menor concentração testada (1,562 mg/mL). Esse fato não ocorreu para os extratos de metanol e aquoso nem na maior concentração testada (200 mg/mL).

Nas cepas de *P. aeruginosa* os extratos hexano e acetona mostraram uma inibição de mais de 50% das bactérias na concentração de 6,25 mg/mL. No extrato diclorometano esse fato ocorreu em uma menor concentração (3,125 mg/mL). Na concentração de 200 mg/mL do extrato de metanol houve a inibição de mais de 50% da população bacteriana. O extrato aquoso não mostrou resultados satisfatórios para inibição dessa bactéria, pois a maior concentração testada (200 mg/mL) não foi capaz de inibir 50%.

É possível notar inibição de mais de 50% das cepas de *S. aureus* na concentração de 1,562 mg/mL do extrato hexano. Essa inibição ocorreu na concentração de 3,125 mg/mL do extrato diclorometano. Nos extratos de acetona, metanol e aquoso não houve essa inibição em nenhuma das concentrações testadas.

Da Rocha e Santo (2009) mostraram em seu trabalho que o látex de uma Euphorbiacea não apresentou halo de inibição para *S. aureus*. Observa-se que em maiores concentrações ocorre uma maior inibição do crescimento bacteriano, fato esse que pode estar ligado a maior concentração de metabólitos secundários com efeitos antimicrobianos.

Os extratos de metanol e aquoso não apresentaram resultados satisfatórios em relação à CIM nas menores concentrações. Extrato de hexano e diclorometano mostraram maior efeito antimicrobiano sobre as cepas bacterianas. Esses dois foram o que apresentaram maior concentração de terpenos. Espadero *et al.*, (2019) associam o fato da ação antimicrobiana à presença de terpenos em extratos, sendo assim, possuem um grande potencial como agente antimicrobiano.

Lin e colaboradores (2012) mostraram em seu trabalho que o óleo essencial e extrato bruto de uma Euphorbiacea (*Euphorbia macrorrhiza*), apresentam ação antimicrobiana sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Nenhum extrato apresentou concentração bactericida mínima, ou seja, apenas inibiram o crescimento, sem morte da bactéria. Da Costa *et al.*, (2008) avaliaram a atividade bactericida em extratos de *Croton zehntneri*, mostrando que não houve essa ação frente a *S. aureus*. Estudo realizado por Silva (2018) com a *Euphorbia tirucalli* Lineau em bactérias isoladas de dermatofitopatias, mostrou que o extrato etanólico e do látex (100%) não apresentaram ação bactericida.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS

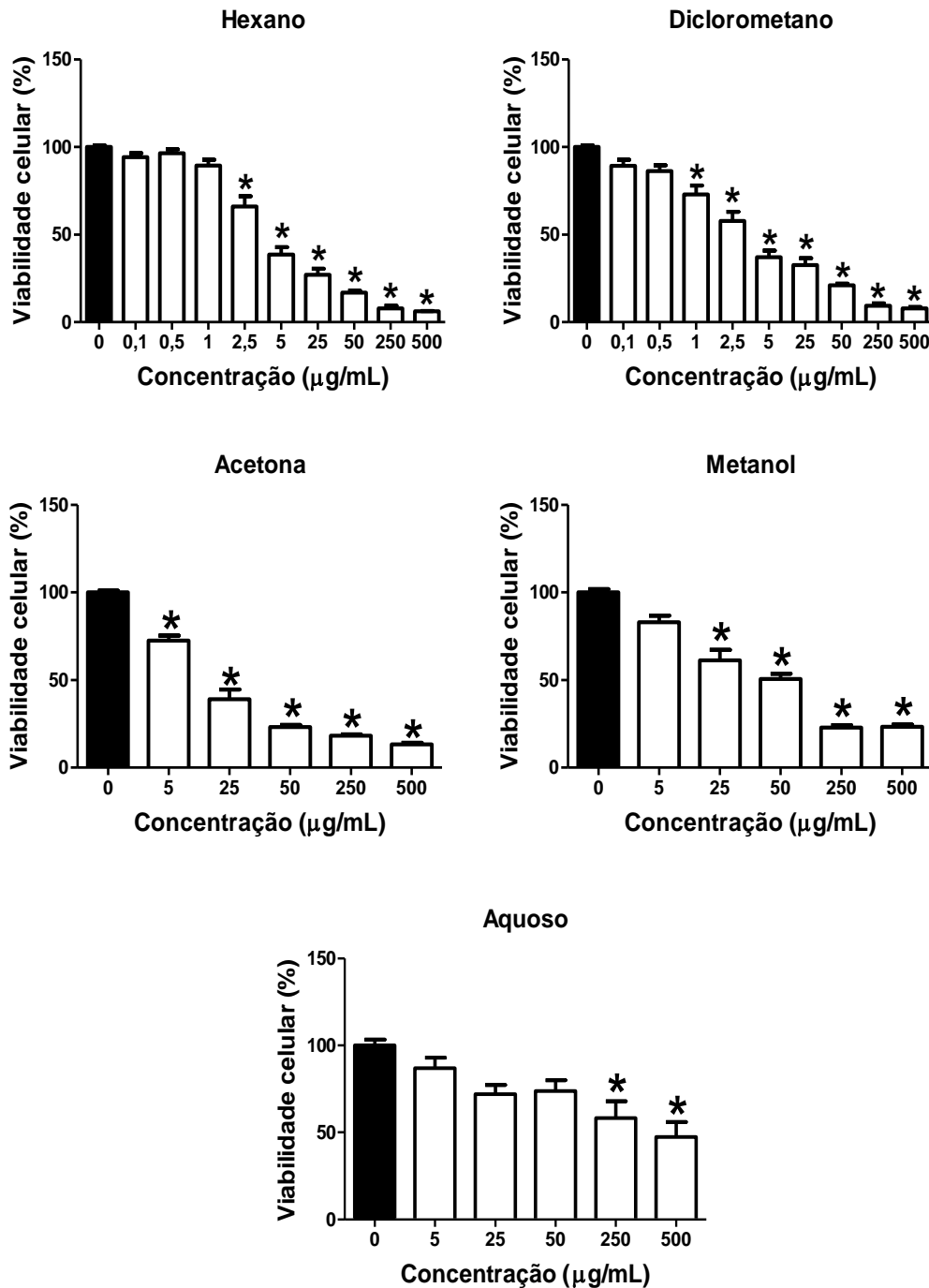
O ensaio do MTT permite a quantificação da viabilidade e proliferação celular por meio de uma análise colorimétrica, esse método que se tornou padrão. Ele baseia-se na redução do azul de tetrazólico (MTT), onde células viáveis com metabolismo ativo, principalmente o mitocondrial, reduzem o MTT a cristais roxos insolúveis conhecidos como formazan, os quais possuem absorvância próxima a 570 nm (MOSMANN, 1983; VAN TONDER, JOUBERT e CROMARTY, 2015). Para células que se encontram em fase log de crescimento a concentração desses cristais é proporcional a sua viabilidade (RISS *et al.*, 2016).

Em contrapartida, o ensaio de sulforrodamina B quantifica a viabilidade celular com base na habilidade do corante se ligar a componentes proteicos das células (HOUGHTON *et al.*, 2007).

O emprego dessas duas técnicas permite avaliar a viabilidade celular levando em conta diferentes mecanismos de ação, deixando claro assim a influência das amostras testadas no metabolismo celular.

Os resultados de viabilidade celular determinados pelos ensaios de MTT na linhagem A549 após o tratamento de 72 horas com as frações de hexano, diclorometano, acetona, metanol e aquosa das folhas da *E. umbellata*, mostraram um decréscimo da viabilidade celular com o aumento da concentração do tratamento aplicado, como mostrado na Figura 12.

FIGURA 12- Viabilidade celular da linhagem A549 após 72 horas de tratamento com extratos de *Euphorbia umbellata* pelo ensaio MTT.



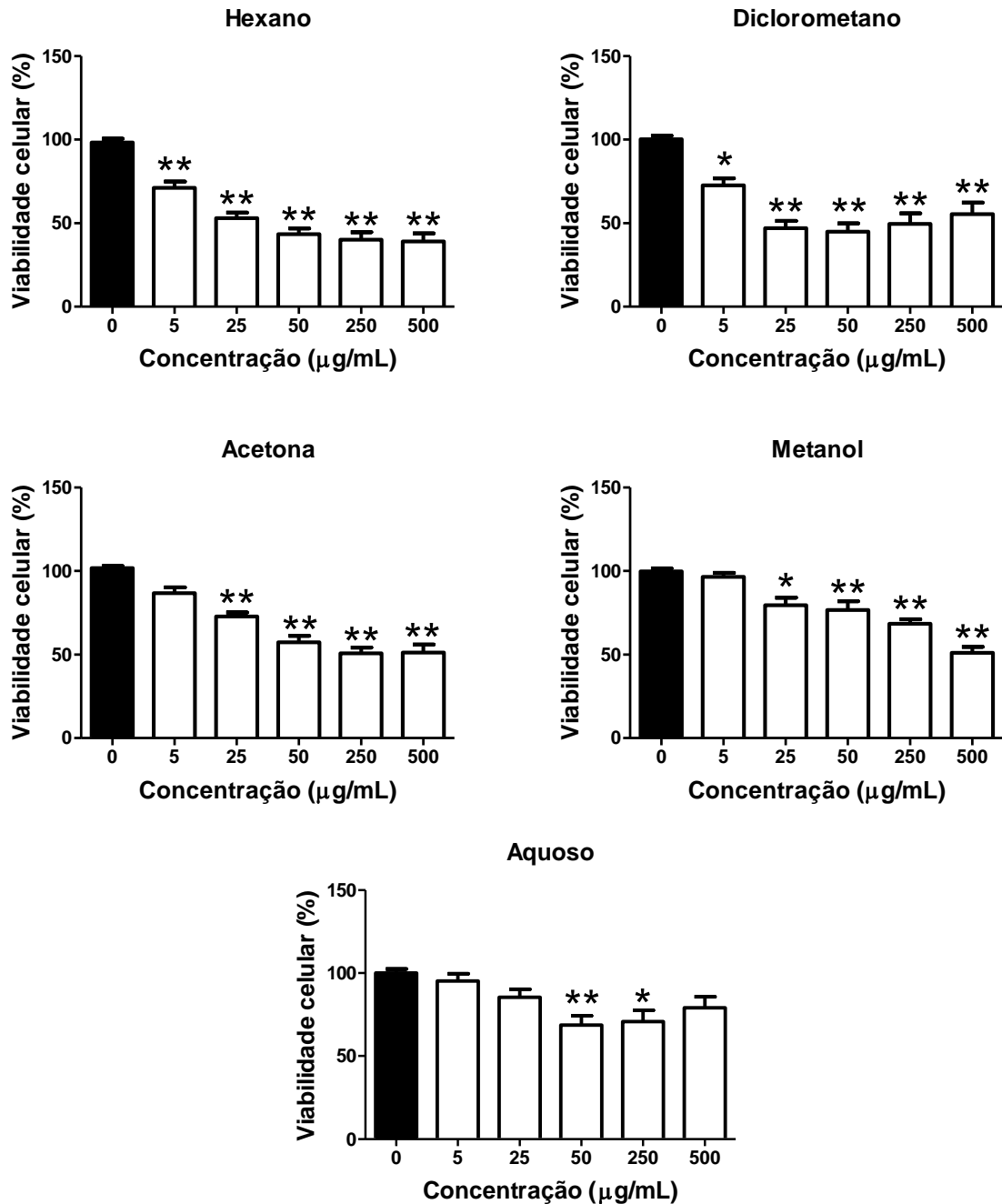
Fonte: A autora.

Notas: Os resultados são apresentados como a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão (n=4). Os dados foram analisados usando uma análise de variância unidirecional (ANOVA) complementada com um teste post hoc de Tukey * $p < 0,001$ versus controle negativo (células tratadas com DMSO 2%).

Nas frações hexano e diclorometano foram avaliadas 10 concentrações, as quais variaram de 0,1 a 500 µg/mL. Essas frações reduziram significativamente ($p < 0,001$) a viabilidade celular, quando comparadas ao controle. A fração hexano

mostrou-sesignificativa na redução da viabilidade a partir da concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ em contrapartida a diclorometano a partir de 1 $\mu\text{g/mL}$. Na linhagem H292 (Figura 13) foram avaliadas cinco concentrações (5 a 500 $\mu\text{g/mL}$), onde essas mostraram redução significativa a partir de 5 $\mu\text{g/mL}$ para hexano ($p < 0,01$) sendo a mesma concentração para o diclorometano, no entanto com $p < 0,001$. Esse fato pode estar relacionado à quantidade de compostos terpenoides presentes nessas frações, como mostrado anteriormente com a quantificação desses metabólitos secundários.

FIGURA 13- Viabilidade celular da linhagem H292 após 72 horas de tratamento com extratos de *Euphorbia umbellata* pelo ensaio MTT.



Fonte: A autora.

Notas: Os resultados são apresentados como a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão (n=4). Os dados foram analisados usando uma análise de variância unidirecional (ANOVA) complementada com um teste post hoc de Tukey * p < 0,001 versus controle negativo (células tratadas com DMSO 2%).

Estudos realizados anteriormente utilizando outras partes da *E. umbellata*, em linhagens celulares como HeLa (câncer de colo de útero) e HRT-18 (câncer de colo

retal), mostram o efeito citotóxico no tempo de 48 horas, nas concentrações de 100 a 1000 µg/mL do látex, por meio do ensaio de MTT (LUZ *et al.*, 2015).

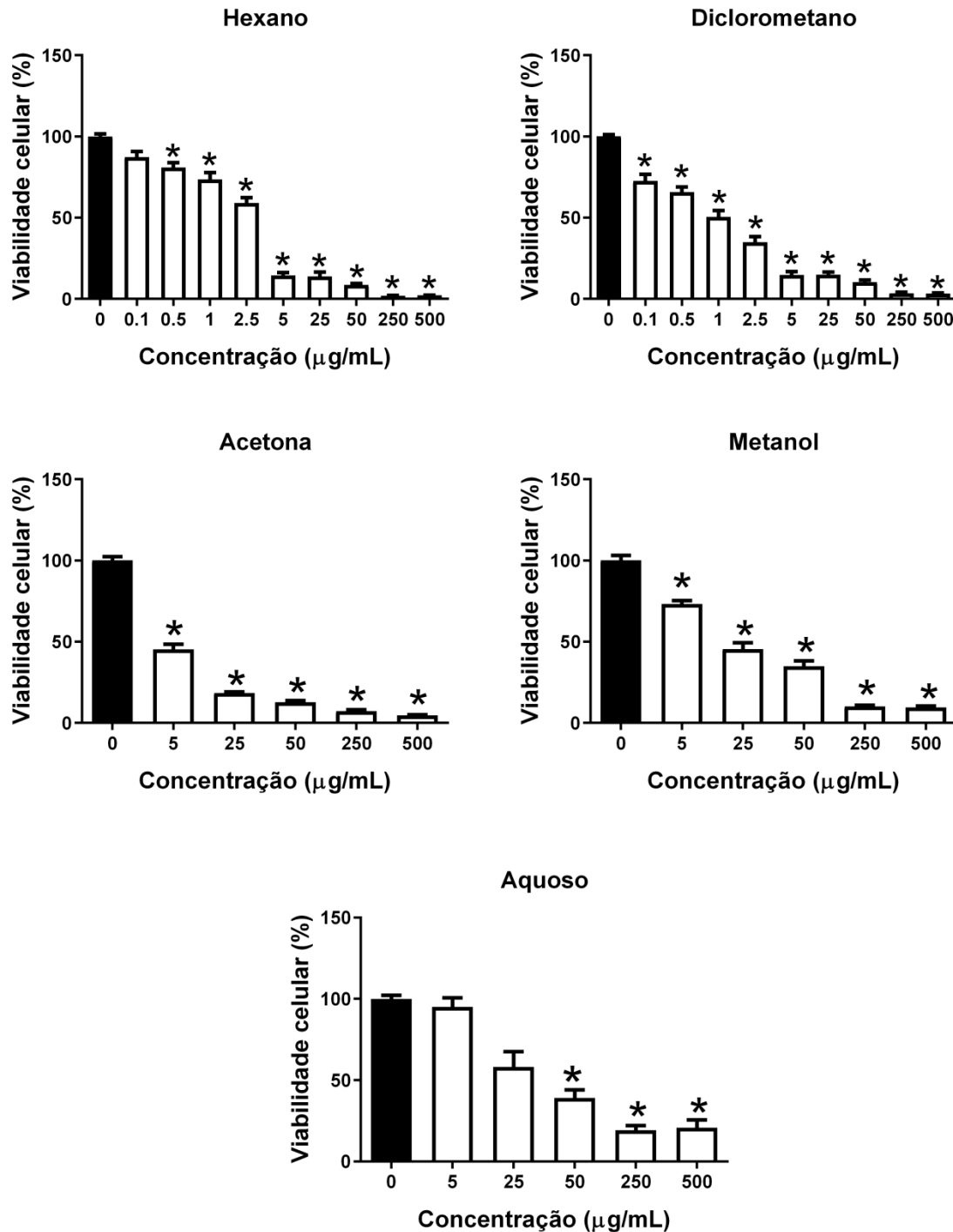
No estudo realizado por Andrade (2020) mostrou a citotoxicidade do látex nas concentrações entre os intervalos de 0,1 a 0,9 µg/mL em células de fibroblastos de camundongo 3T3 e B16F10 (melanoma murinho).

As frações de acetona e metanol também se mostraram citotóxicas frente a essas linhagens celulares, no entanto em concentrações maiores, quando comparadas às frações de hexano e diclorometano. A viabilidade celular mostrou redução significativa a partir da concentração de 5 µg/mL da fração de metanol, já a fração da acetona a partir de 25 µg/mL para as células A549. Para a linhagem H292 houve uma redução significativa a partir de 25 µg/mL para a fração de acetona ($p < 0,01$) e metanol. O fato dessas frações apresentarem menor citotoxicidade pode estar relacionada a menor quantidade de terpenoides, sendo de $3,86 \pm 1,06$ e $1,03 \pm 0,30$ respectivamente.

A fração aquosa apresentou uma menor citotoxicidade para as duas linhagens, esse fato pode estar relacionado à dificuldade de solubilização do extrato em DMSO e também a baixa concentração de terpenos ($0,20 \pm 0,02$).

O ensaio da sulforrodamina B mostrou maior citotoxicidade em menores concentrações quando comparado a técnica do MTT, para as duas linhagens, como mostrado nas Figuras 14 e 15. As diferenças observadas se dão em decorrência da técnica de SRB corar apenas os constituintes proteicos presentes nas células aderidas ao poço da placa de cultivo.

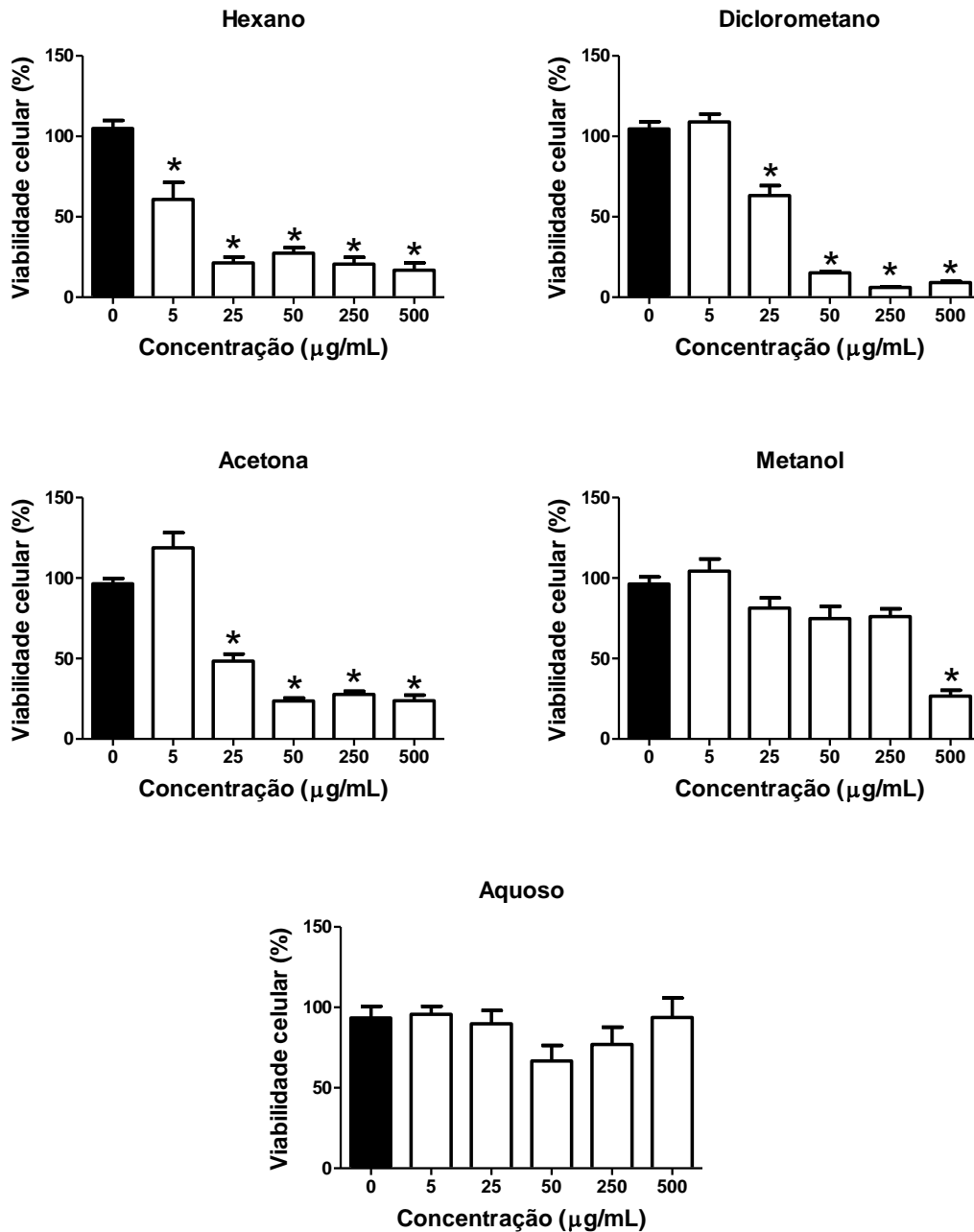
FIGURA 14- Viabilidade celular da linhagem A549 após 72 horas de tratamento com extratos de *Euphorbia umbellata* pelo ensaio SRB.



Fonte: A autora.

Notas: Os resultados são apresentados como a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão (n=4). Os dados foram analisados usando uma análise de variância unidirecional (ANOVA) complementada com um teste post hoc de Tukey * p < 0,001 versus controle negativo (células tratadas com DMSO 2%).

FIGURA 15- Viabilidade celular da linhagem H292 após 72 horas de tratamento com extratos de *Euphorbia umbellata* pelo ensaio SRB.



Fonte: A autora.

Notas: Os resultados são apresentados como a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão (n=4). Os dados foram analisados usando uma análise de variância unidirecional (ANOVA) complementada com um teste post hoc de Tukey * $p < 0,001$ versus controle negativo (células tratadas com DMSO 2%).

As frações hexano, diclorometano, acetona e metanol foram capazes de reduzir a viabilidade celular, no entanto quando se compara com os resultados da

linhagem A549 nota-se que a H292 necessita de uma maior concentração para promover morte celular.

Os valores de IC₅₀ obtidos pelo ensaio de redução de MTT e ensaio de SRB, para todos os extratos de *E. umbellata* são mostrados na Tabela 6.

Com base nos valores de IC₅₀ para os extratos de diclorometano, hexano e acetona, em ordem crescente, esses foram capazes de diminuir a viabilidade celular em ambas as linhagens. Por outro lado, os extratos metanol e aquoso apresentaram valores de IC₅₀ mais elevados. Moléculas apolares como os terpenos encontrados no gênero *Euphorbia* já haviam demonstrado efeitos citotóxicos (JADRANIN *et al.*, 2013). Sendo que o extrato apolar da espécie *E. umbellata* foi relacionado aos efeitos de citotoxicidade contra HRT-18 (células de adenocarcinoma do intestino grosso), HeLa (células de câncer cervical) e células Jurkat (células de linfócitos T) após tratamento de 48 horas (Luz *et al.*, 2016).

TABELA 6- Valores de IC₅₀ (µg/mL) obtidos pelo método MTT e SRB para as linhagens celulares A549 e H292 após 72 horas de tratamento com extratos de *Euphorbia umbellata*.

Extrato	MTT ensaio		SRB ensaio	
	A549	H292	A549	H292
Hexano	5,28 ± 1,40	53,75 ± 19,69	2,30 ± 0,68	5,28 ± 5,98
Diclorometano	2,74 ± 0,89	27,52 ± 7,43	0,84 ± 0,32	33,83 ± 14,05
Acetona	13,16 ± 45,93	190,15 ± 75,38	2,54 ± 1,11	44,50 ± 29,70
Metanol	61,80 ± 8,82	>500	19,54 ± 3,25	301,72 ± 196,09
Aquoso	157,94 ± 27,60	>500	49,80 ± 21,44	>500

Fonte: A autora.

Notas: Os dados foram expressos como IC₅₀ ± erro padrão médio e foram calculados pela análise de Probit e pelo método de Finney.

5.5 DETERMINAÇÃO DE FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS (AgNPs) POR ANÁLISE VISUAL

A formação de nanopartículas de prata pode ser visual, onde ocorre a passagem de cor da formulação de transparente/amarelo para marrom (Figura 16 e 17). Esse fato demonstra a grande capacidade dos extratos hexano e diclorometano reduzir o nitrato de prata a nanopartículas de prata, ao colocar as amostras em exposição à luz artificial com um espectro na faixa de 800 a 300 nm.

FIGURA 16- Suspensões de AgNPs de diclorometano expostas à luz artificial, nos tempos de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 minutos.



Fonte: A autora.

FIGURA 17- Suspensões de AgNPs de hexano expostas à luz artificial, nos tempos de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 minutos.



Fonte: A autora.

No método da síntese verde para o desenvolvimento das AgNPs, os constituintes químicos presentes nos extratos desempenham um papel fundamental, eles atuam como agentes redutores do nitrato de prata a prata assim como também podem ser considerados estabilizadores nas formulações. Os grupos alcaloides, fenóis, taninos, terpenos, aminoácidos e proteínas são os responsáveis por reduzir o nox do nitrato de prata para zero, ou seja, estes elementos funcionam como agentes redutores (RESENDE, 2017; INGALE e CHAUDHAR, 2013).

O tamanho das nanopartículas é afetado principalmente pelo tempo de exposição à luz artificial (MORAHUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Na solução de nanopartículas de diclorometano pode se observar que houve uma modificação na coloração, de marrom para uma coloração mais escura no tempo de 40 minutos.

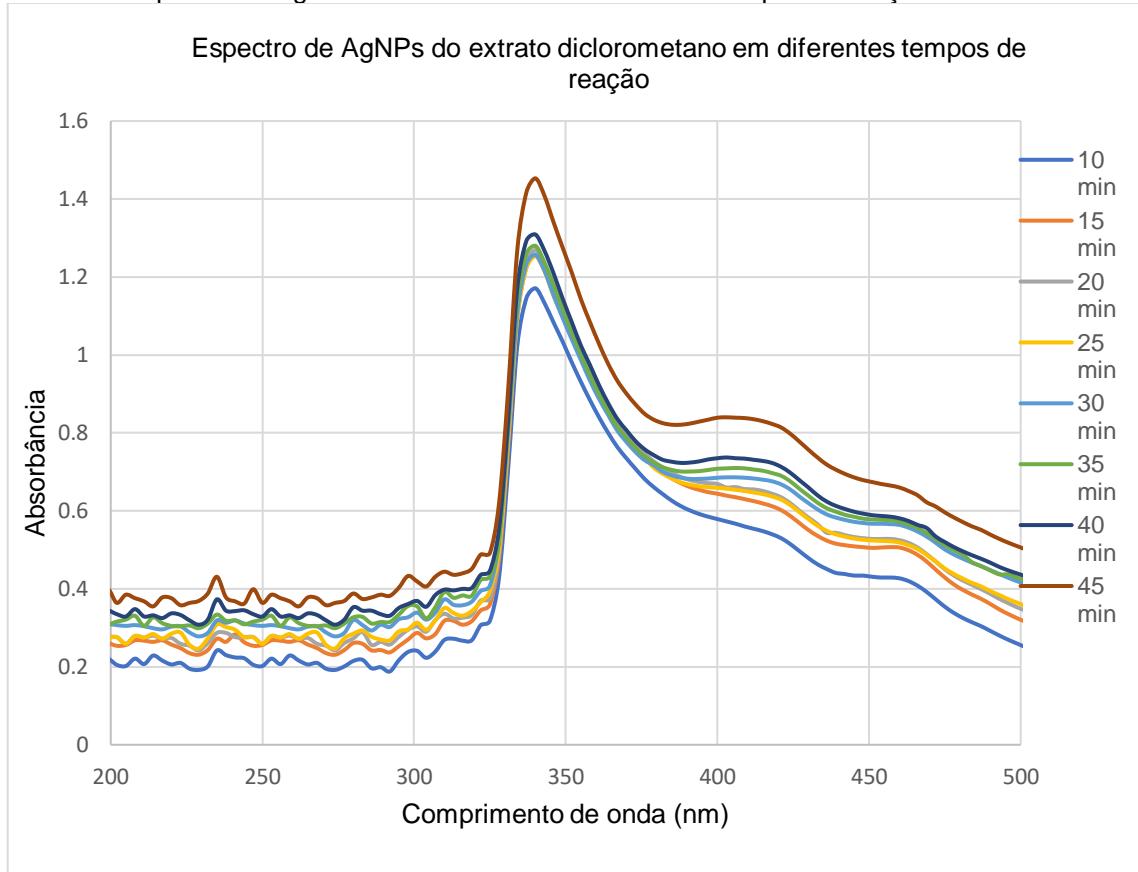
Na solução de hexano esse fato ocorre a partir do tempo de 45 minutos. Segundo De Freitas (2019) a coloração acinzentada evidencia a formação de nanopartículas de prata com tamanhos elevados.

A partir de 40 minutos de exposição à luz artificial, as nanopartículas tenderam a aumentar de tamanho, o que pode ser constatado, também, pelo deslocamento do pico, no ultravioleta, para absorbâncias maiores.

5.6 DETERMINAÇÃO DE FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS (AgNPs) POR ESPECTROSCOPIA DE ULTRAVIOLETA

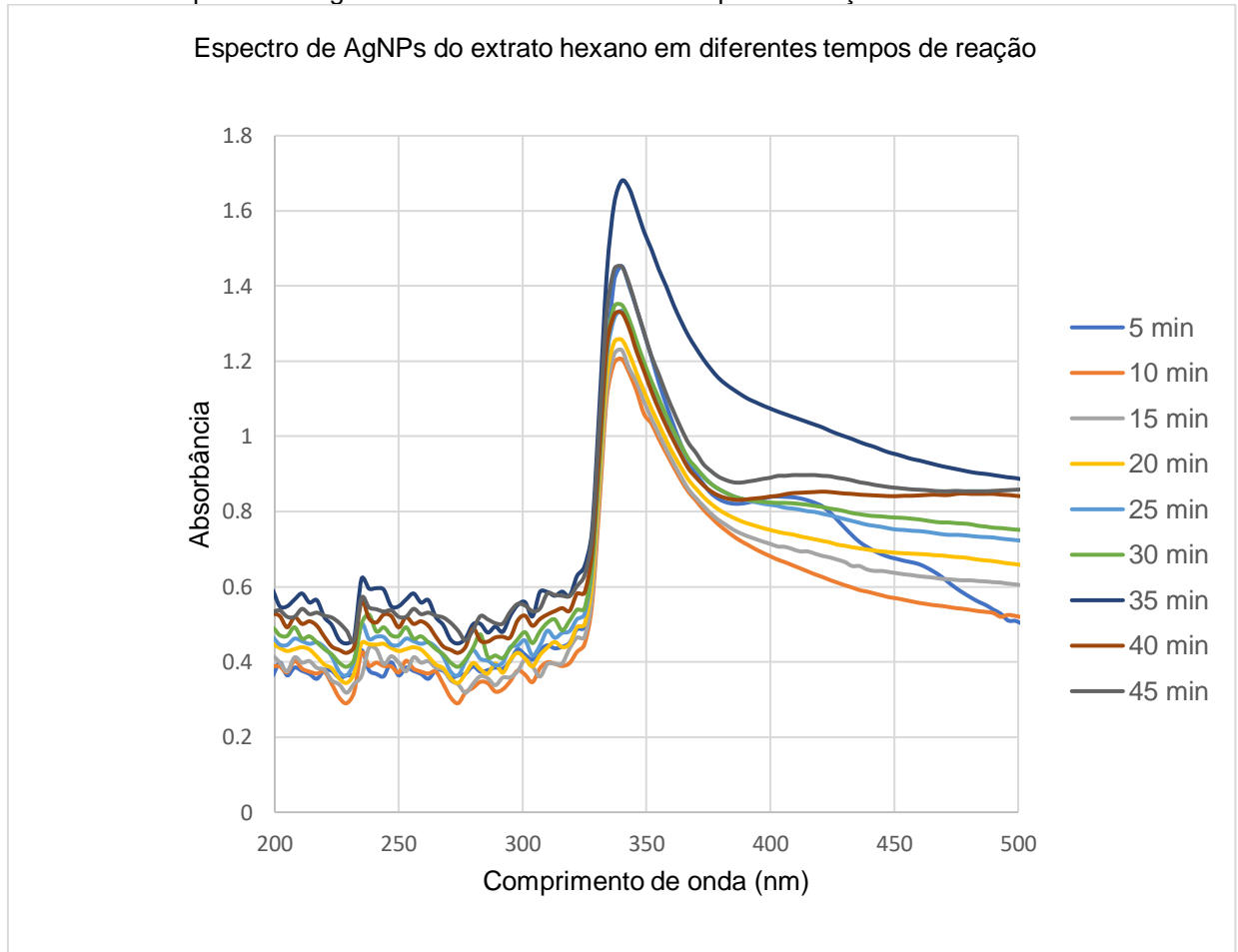
As figuras 18 e 19 mostram os espectros obtidos por UV-vis das nanopartículas de prata em diferentes tempos de exposição à luz (10 a 45 minutos) de diclorometano e hexano, respectivamente. O maior comprimento de onda em que ocorreu a absorção foi de 340 nm para os dois extratos. Ao observar as figuras nota-se que nos tempos de 10 a 30 minutos houve formação de pouca quantidade de nanopartículas, sendo considerado o tempo de 40 minutos ideal para a formação das nanopartículas a partir do extrato diclorometano e 45 minutos para o extrato hexano.

FIGURA 18- Espectro de AgNPs do extrato diclorometano nos tempos de reação de 10 a 45 minutos.



Fonte: A autora.

FIGURA 19- Espectro de AgNPs do extrato hexano nos tempos de reação de 10 a 45 minutos.



Fonte: A autora.

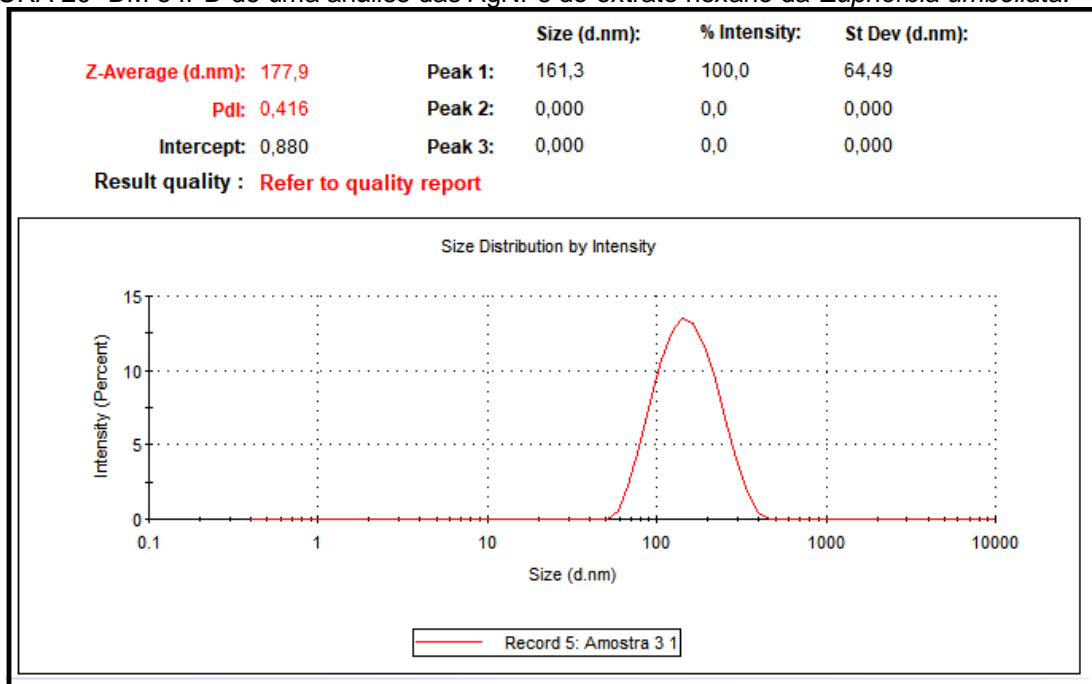
Trabalho realizado por Atarod, Nasrollahzadeh e Sajadi (2016), utilizando extrato da folha da *Euphorbia heterophylla* para desenvolvimento de nanopartículas, mostrou o máximo de comprimento de onda entre 250 e 350 nm no UV-vis, indicando formação de nanopartículas, o que corrobora com os resultados encontrados nesse trabalho.

Nasrollahzadeh e Sajadi (2016) desenvolveram nanopartículas metálicas utilizando o extrato aquoso das folhas da *Euphorbia granulate*, onde apresentou a formação de nanopartículas de prata no tempo de 5 minutos nos comprimentos de onda de 260 a 320 nm.

5.7 MEDIDA DO DIÂMETRO MÉDIO (DM), ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IPD), POTENCIAL ZETA (PZ)

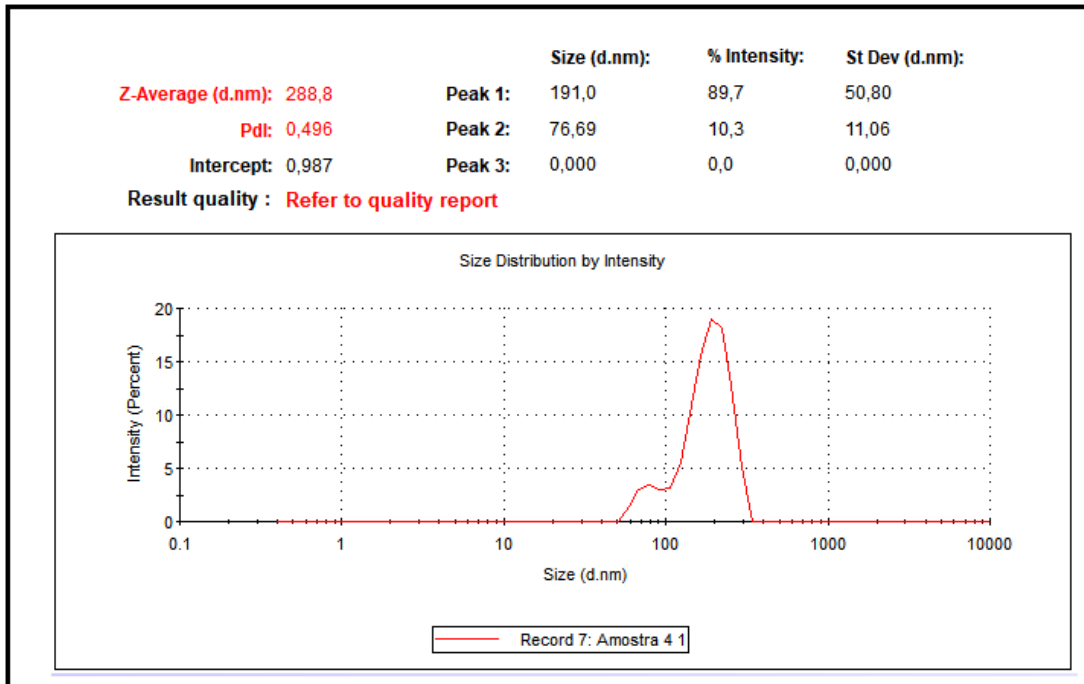
As AgNPs de hexano apresentaram tamanho médio de $166,9 \pm 1,3$ nm, já as nanopartículas formadas a partir do extrato de diclorometano apresentaram tamanho médio de $277,8 \pm 1,4$ nm. As Figuras 20 e 21 representam uma medida do DM e IPD das AgNPs de hexano e AgNPs de diclorometano respectivamente.

FIGURA 20- DM e IPD de uma análise das AgNPs do extrato hexano da *Euphorbia umbellata*.



Fonte: A autora.

FIGURA 21- DM e IPD de uma análise das AgNPs do extrato diclorometano da *Euphorbia umbellata*.



Fonte: A autora.

Durgawale Phatak e Hendre (2015) obtiveram nanopartículas de prata usando o látex da *Synadenium grantii* Hook com tamanhos variando de 106 a 147 nm. O tamanho elevado das nanopartículas neste trabalho pode estar relacionado ao fato da leitura de aglomerados de nanopartículas, fato que pode ser verificado a partir das imagens do FEG obtidas.

Toribio Espinoza (2017) encontraram valores entre 129,12 e 278,46 nm para o tamanho médio, ao desenvolverem nanopartículas de prata utilizando extrato de *Aloe vera*, valores próximos aos encontrados nesse trabalho.

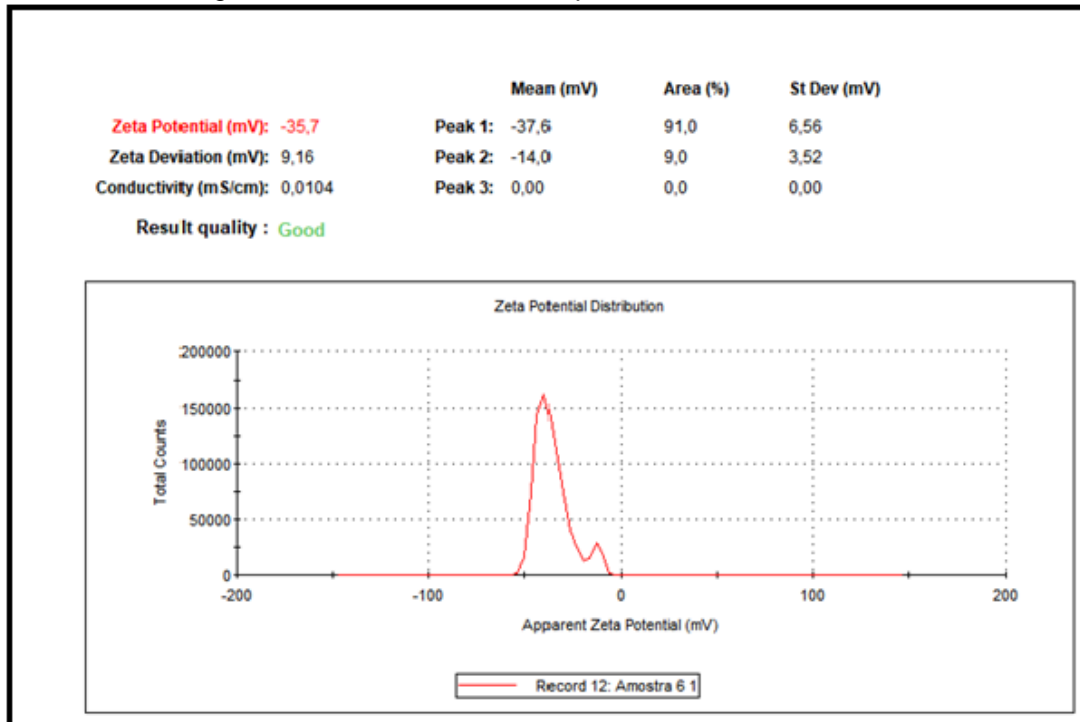
O índice de polidispersão (IPD) foi de $0,420 \pm 3,2$ para as nanopartículas de hexano e $0,398 \pm 2,7$ para as nanopartículas de diclorometano. Esses valores mostram a homogeneidade da solução em relação aos tamanhos das AgNPs (TRAN; TRAN e LEE, 2013). É comum suspensões apresentarem populações com tamanhos variados e essa distribuição é avaliada através do IPD, onde pode variar de 0 a 1, sendo aqueles com valores próximos a 0 consideradas homogêneas e próximas a 1 heterogêneas (BONFERONI *et al.*, 2014). Nesse caso podem-se considerar as duas soluções de nanopartículas como homogêneas.

5.8 ANÁLISE DO POTENCIAL ZETA

O potencial zeta de superfície das nanopartículas é um indicador de estabilidade das suspensões.

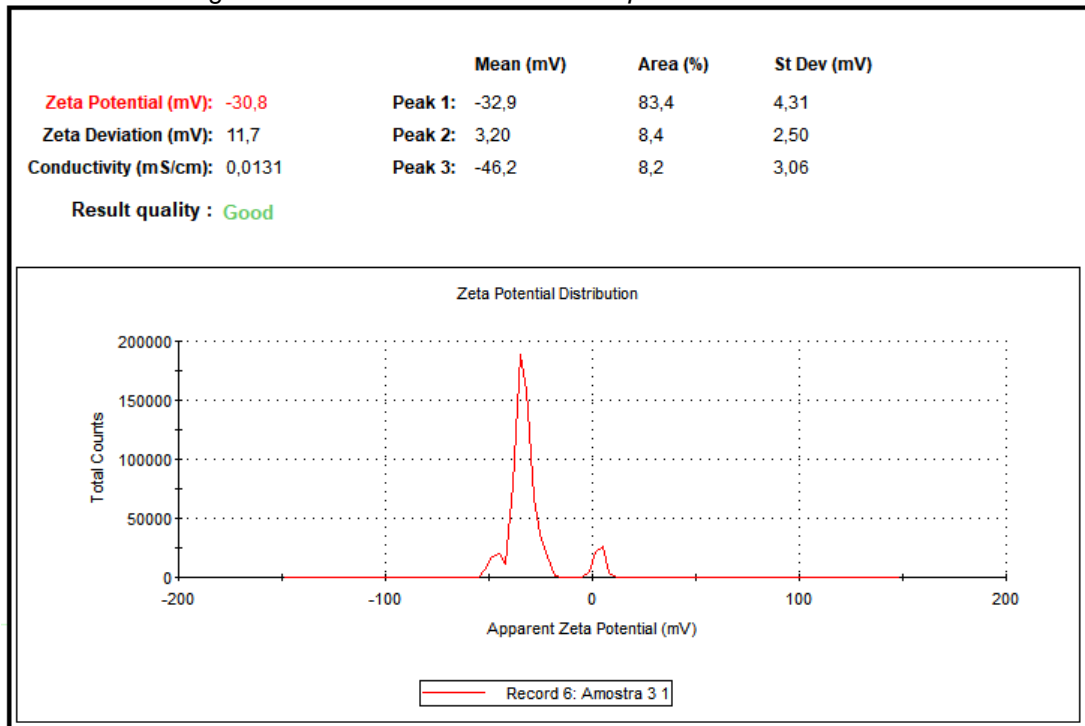
Noronha e colaboradores (2013) propoem que valores entre ± 25 e ± 30 mV garantem uma boa estabilidade elétrica. Nesse caso as AgNPs hexano apresentaram PZ médio de $-32,7 \pm 1,4$ mV e as AgNPs diclorometano $-31,2 \pm 1,8$ mV, com isso as nanopartículas podem ser consideradas estáveis. As figuras 22 e 23 representam uma medida do PZ das AgNPs de hexano e diclorometano respectivamente.

FIGURA 22- PZ das AgNPs do extrato hexano da *Euphorbia umbellata*.



Fonte: A autora.

FIGURA 23- PZ das AgNPs do extrato diclometano da *Euphorbia umbellata*.

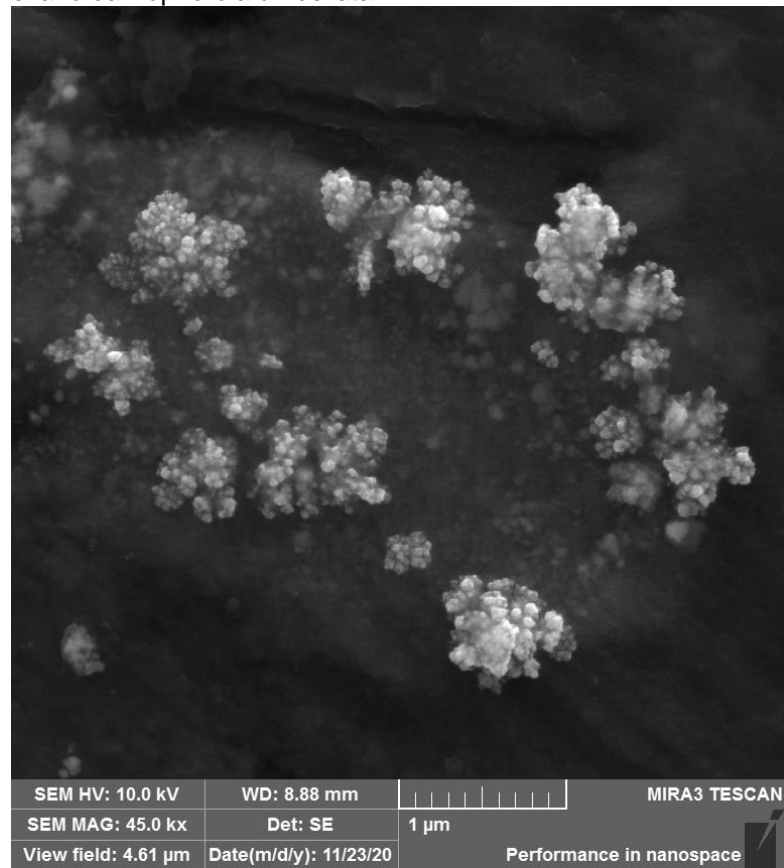


Fonte: A autora.

5.9 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE SUPERFÍCIE

Conforme a Figura 24 e 25 as AgNPs obtidas através do extrato de hexano e diclorometano apresentaram formato esférico, no entanto apresentaram agregados, isso pode estar relacionado ao recobrimento das nanopartículas com excesso de extrato. Apresentaram tamanhos médios variando entre $86,87 \pm 9,11\text{nm}$ e $42,78 \pm 17,22\text{ nm}$, respectivamente. Esses valores encontram-se menores quando comparados aos medidos no PZ devido o equipamento *zeta-sizer* fazer a leitura dos agregados. Momeni e colaboradores (2016) realizaram o desenvolvimento de nanopartículas de cobre utilizando o extrato aquoso das folhas da *Euphorbia prolifera*, esses também encontraram imagens das nanopartículas com o formato esféricas e agrupadas.

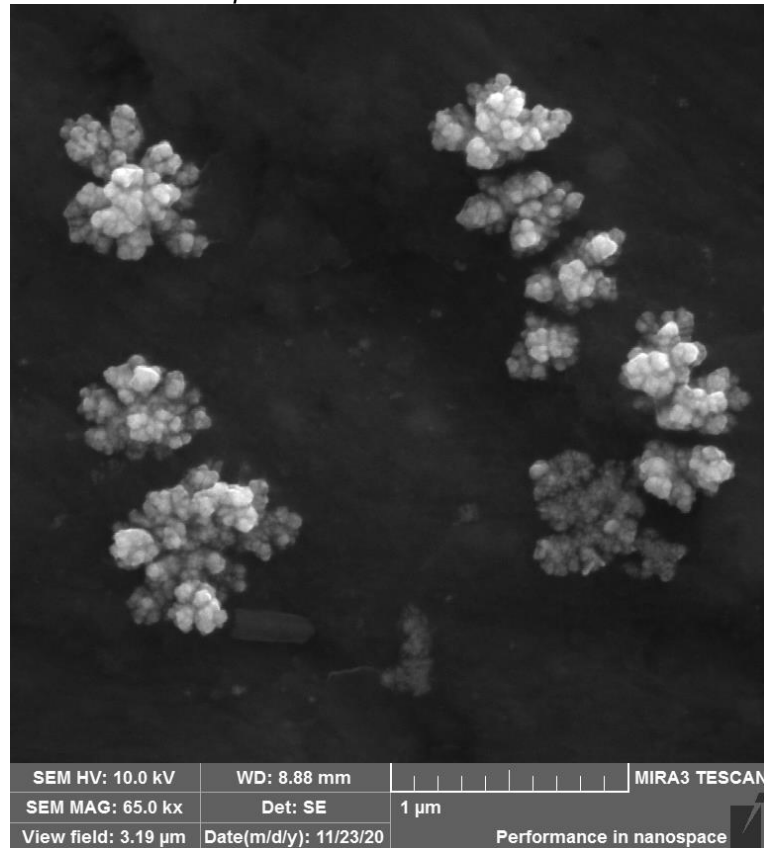
FIGURA 24- Imagem da AgNPs obtidas através do método de síntese verde utilizando como agente redutor o extrato hexano da *Euphorbia umbellata*.



Fonte: A autora.

Notas: Aumento da Imagem: 45 Kx.

FIGURA 25- Imagem da AgNPs obtidas através do método de síntese verde utilizando como agente redutor o extrato diclorometano da *Euphorbia umbellata*.



Fonte: A autora.

Notas: Aumento da Imagem: 65 Kx

5.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS AgNPsD

A *Pseudomonas aeruginosa* foi a que apresentou maior resistência nas menores concentrações, fato esse que já havia sido notado no extrato do diclorometano. No entanto quando comparado apenas ao uso do extrato as AgNPsD mostraram uma maior inibição frente as bactérias com concentrações muito menores.

Para a *Staphylococcus aureus* a partir de 0,25 µg/mL das AgNPsD já houve inibição de mais de 50% dessas, um valor muito inferior quando se compara com a utilização do extrato de diclorometano, que apresentou essa mesma inibição a partir de 3,125 µg/mL.

As AgNPsD apresentaram os melhores resultados frente a *Klebsiella pneumoniae*, sendo que na menor concentração testada já houve inibição de mais

de 50% dessas bactérias. Nos resultados obtidos a partir dos extratos essa inibição também foi notada em uma concentração menor, de 1,562 µg/mL (Tabela 7).

As AgNPs podem aderir e atravessar a parede celular das bactérias devido ao seu tamanho reduzido. Elas podem ser oxidadas e assim formar íons metálicos que possuem a capacidade de reagir com aminoácidos presentes nas bactérias. Acarretando assim em dano e morte celular (Banala, Nagati e Karnati (2015); Lopes (2017) e Oliveira (2018)).

Outro fator que pode ser levado em conta é a presença de fósforo e enxofre no DNA das bactérias, desse modo os íons Ag⁺ podem interagir com essas bases causando morte celular. Podendo também levar a problemas na replicação do DNA.

Tabela 7-Concentração inibitória mínima para cepas bacterianas *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* após 24 horas de tratamento com as nanopartículas de prata de diclorometano.

Bactéria	% de Inibição- AgNPsD			
	0,125 µg/mL	0,25 µg/mL	0,5 µg/mL	1,0 µg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	76,1 ± 0,68	86,2 ± 1,17	91,3 ± 1,70	99,5 ± 0,13
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	12,2 ± 1,75	33,4 ± 0,74	54,6 ± 0,91	97,0 ± 1,1
<i>Staphylococcis aureus</i>	22,4 ± 1,50	52,8 ± 1,92	79,3 ± 1,10	99,3 ± 0,37

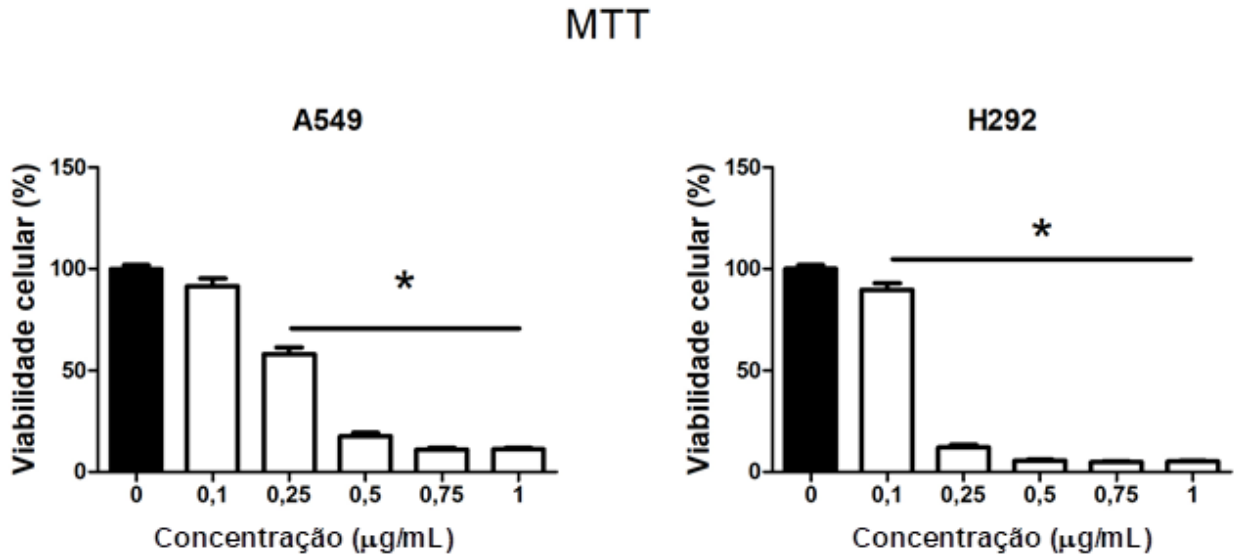
Fonte: A autora.

Notas: Dados expressos como média de triplicatas de três experimentos independentes ± desvio padrão da média. Sendo o veículo, solução de DMSO.

5.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS AgNPsD

Os resultados de viabilidade celular determinados pelos ensaios de MTT nas linhagens A549 e H292 após o tratamento de 72 horas com as AgNPsD, mostraram um decréscimo da viabilidade celular com o aumento da concentração do tratamento aplicado, como mostrado na Figura 26.

FIGURA 26- Viabilidade celular da linhagem A549 e H292 após 72 h de tratamento com as AgNPsD pelo método MTT.



Fonte: A autora.

Notas: Dados expressos como média de quadruplicata de três experimentos independentes \pm erro padrão da média. Sendo o veículo, solução de DMSO (2%), utilizado como controle negativo. * $p < 0,001$.

Foram avaliadas concentrações que variaram de 0,1 a 1 $\mu\text{g/mL}$. Durante o tratamento com AgNPsD nas células A549 houve redução da viabilidade celular estatisticamente significativa ($p < 0,001$) a partir da concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$. Essa concentração é inferior ao valor de 1 $\mu\text{g/mL}$ encontrado quando foi usado apenas extrato de diclorometano.

Esse resultado pode estar relacionado ao fato das AgNPs serem capazes de romper a cadeia respiratória mitocondrial de células cancerosas, gerando assim espécies reativas de oxigênio e consequentemente a interrupção da síntese de ATP (GUO *et al.*, 2015), culminando na morte celular.

As células H292 mostram-se mais sensíveis ao tratamento com AgNPsD, sendo possível notar uma redução significativa a partir da concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, um valor 10 vezes menor quando comparado a concentração necessária durante a utilização do extrato de diclorometano para essa mesma linhagem celular.

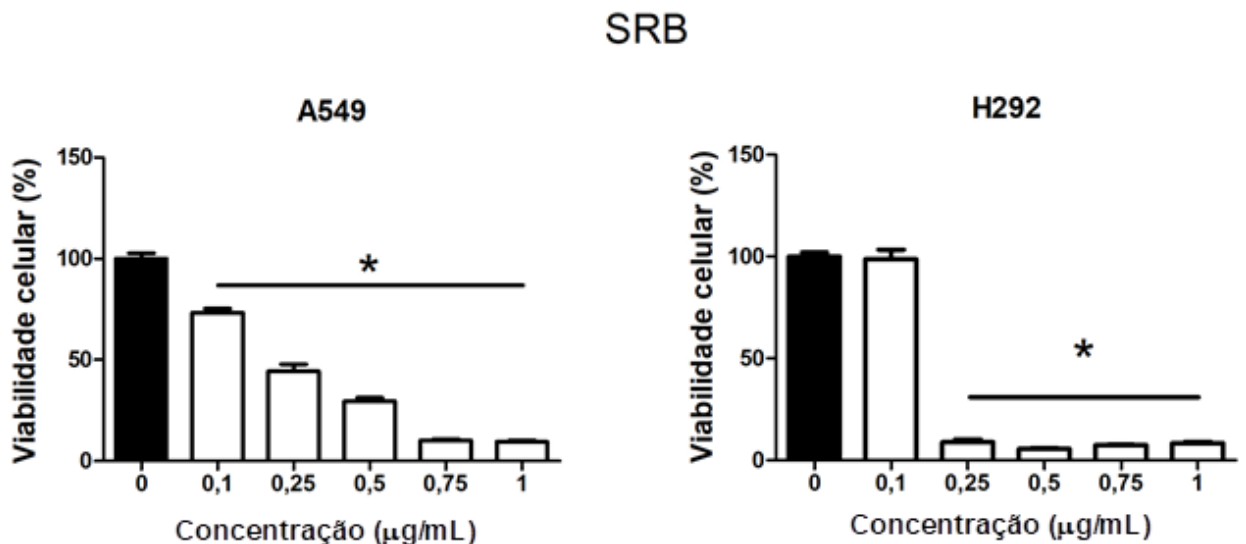
A citotoxicidade das AgNPs dependem de vários parâmetros. As AgNPsD apresentaram tamanhos reduzidos, média de $277,8 \pm 1,4$ nm, facilitando a penetração dessas partículas. Outros fatores que podem ser levados em conta são a

área de superfície e os agentes redutores utilizados na síntese das AgNPs (BARABADI *et al.*, 2017, ZHANG *et al.*, 2016)

No teste de citotoxicidade realizado pelo método SRB as AgNPsD mostraram uma redução significativa ($p < 0,001$) a partir da concentração 0,1 $\mu\text{g/mL}$ para o tratamento nas células A549. Esse valor é menor quando comparado ao teste de MTT.

Já no tratamento com as AgNPsD nas células H292 a concentração que apresentou redução significativa foi a partir de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 27), um valor superior ao comparado ao MTT. Essa diferença pode estar relacionada ao fato de que a técnica de SRB cora apenas os constituintes proteicos das células aderidas.

FIGURA 27- Viabilidade celular da linhagem A549 e H292 após 72 h de tratamento com as AgNPsD pelo método SRB.



Fonte: A autora

Notas: Dados expressos como média \pm erro padrão da média de quatro experimentos independentes.

* significa diferença estatística com $p < 0,001$.

O IC_{50} das AgNPsD demonstraram-se satisfatórios, para as duas linhagens celulares. Os valores referentes a esse teste estão demonstrados na Tabela 8. Quando comparado ao extrato de diclorometano, pode-se notar que as AgNPsD apresentaram melhores valores de IC_{50} para as duas linhagens em ambos os métodos.

TABELA 8- Valores de IC₅₀ (µg/mL) calculados, pelo método de redução de MTT e SRB, para as linhagens A549 e H292, após 72 h de tratamento com as AgNPsD.

	A549	H292
MTT	0,28 ± 0,01	0,18 ± 0,05
SRB	0,22 ± 0,02	0,19 ± 0,07

Fonte: A autora.

Notas: Dados calculados por análise de Probit, método de Finney e expressos como valor de IC₅₀ ± erro padrão da média.

6 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular e microbiológico tem-se que as frações hexano e diclorometano da *E. umbellata* (Pax) Bruyns apresentaram melhores resultados. Destaca-se que essas frações foram mais ativas frente às bactérias testadas (*S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*). Em relação aos testes de viabilidade celular esses mesmos extratos apresentaram maior atividade citotóxica, nas menores concentrações, nas duas linhagens de células testadas (A549 e H292). No teste de quantificação de terpenos as frações de hexano e diclorometano foram as que apresentaram maior concentração desse metabólito. Visto esses resultados sugere-se que os terpenos sejam importantes para ação citotóxica nessas linhagens. Por fim, através desses resultados optou-se por esses dois extratos para o desenvolvimento das nanopartículas de prata. Para que ocorra a formação de nanopartículas metálicas através da síntese verde há necessidade da presença de compostos redutores, como nesse caso os terpenos. As nanopartículas de prata foram obtidas com sucesso, comprovando assim que os extratos hexano e diclorometano dessa planta são adequados para a síntese verde. A partir de resultados preliminares de citotoxicidade optou-se por utilizar as AgNPsD para os testes microbiológicos e de citotoxicidade. Essas apresentaram valores satisfatórios para a inibição do crescimento das bactérias. Para o teste de citotoxicidade as AgNPsD mostraram redução significativa em concentrações muito menores quando comparado aos testes realizados com o extrato diclorometano. Sendo assim as nanopartículas de AgNPsD mostraram ação bactericida e citotóxica. As AgNPsD apresentaram resultados satisfatórios para esse estudo.

REFERÊNCIAS

- AHMED, W.; RANA, N. F. PEG capped methotrexate silver nanoparticles for eficiente anticancer activity and biocompatibility. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 251–255, 2016.
- ALARCON, E. I. et al. The biocompatibility and antibacterial properties of collagen-stabilized, photochemically prepared silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 33, n. 19, p. 4947–4956, 2012.
- ALBERNAZ, Vanessa Lima. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização fisicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. 2014.
- ALJABALI, Alaa AA et al. Synthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Ziziphus zizyphus* and their antimicrobial activity. **Nanomaterials**, v. 8, n. 3, p. 174, 2018.
- ALLEMANI, Claudia et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). **The Lancet**, v. 385, n. 9972, p. 977-1010, 2015.
- ALVES-SILVA, J.M.; Romane, A.; Efferth, T.; Salgueiro, L. North African medicinal plants traditionally used in cancer therapy. **Front. Pharmacol.**, v. 8, n. 1, p. 24, 2017.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **About Small Cell Lung Cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8708.00.pdf>>. Acesso em: 30. Out. 2020.
- AMIRGHOFAN, Z.; BAHMANI, M.; AZADMEHR, A.; JAVIDNIA, K. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by *Linum persicum* and *Euphorbia cheiradenia*. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 132, p. 427–432, 2006.
- AMIRGHOFAN, Z.; MALEK-HOSSEINI, S.; GHOLMOGHADDAM, H.; KALALINIA, F. Inhibition of tumor cells growth and stimulation of lymphocytes by *Euphorbia* species. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 33, p. 34–42, 2011.
- ANDERSEN, O. M. *et al.* Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). **Phytochemistry**, v. 71, n. 13, p. 1558-1563, 2010.
- ANDRADE, Evelyn Assis de et al. **Efeito citotóxico do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae) para modelo de melanoma murino**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2020.
- APARÍCIO, Rosa Maria de Miranda. **Propriedades biológicas do género *Euphorbia***. 2019. Monografia (Mestrado em ciências farmacêuticas)- Universidade de Lisboa, Lisboa, 2019.
- APOLINÁRIO, Alexsandra Conceição et al. Polimerossomos versus lipossomos: a evolução da “bala mágica”. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 810-817, 2017.
- ARAUJO, Luiz Henrique de Lima et al. Survival and prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer treated in private health care. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, p. 1001-1014, 2014.
- ARAUJO, Luiz Henrique et al. Câncer de pulmão no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 1, p. 55-64, 2018.
- ATAROD, Monireh; NASROLLAHZADEH, Mahmoud; SAJADI, S. Mohammad. *Euphorbia heterophylla* leaf extract mediated green synthesis of Ag/TiO₂ nanocomposite and investigation of its excellent catalytic activity for reduction of variety of dyes in water. **Journal of colloid and interface science**, v. 462, p. 272-279, 2016.

- AVELINO, Camila Uanne Resende et al. Assessment of quality of life in patients with advanced non-small cell lung carcinoma treated with a combination of carboplatin and paclitaxel. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 2, p. 133-142, 2015.
- AZEVEDO, L. F. P. et al. Triagem fitoquímica e atividade antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 209-215, 2014.
- BAGAVATHI, R.; SORG, B.; HECKER, E. Tiglane-Type Diterpene Esters from *Synadenium grantii* 1,5. **Planta medica**, v. 54, n. 06, p. 506-510, 1988.
- BALDI, Bruno Guedes; CHATKIN, José Miguel. Jornal Brasileiro de Pneumologia and Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia: perspectives for the next four years. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 45, n. 1, 2019.
- BANALA, R. R.; NAGATI, V. B.; KARNATI, P. R. Green synthesis and characterization of *Carica papaya* leaf extract coated silver nanoparticles through X-ray diffraction, electron microscopy and evaluation of bactericidal properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 2, p. 637–644, 2015.
- BARABADI, Hamed et al. Green chemical synthesis of gold nanoparticles by using *Penicillium aculeatum* and their scolicidal activity against hydatid cyst protoscolices of Echinococcus granulosus. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 6, p. 5800-5810, 2017.
- BASSETTI, M., TARAMASSO, L., GIACOBBE, D. R., and PELOSI, P. (2012). Management of ventilator-associated pneumonia: epidemiology, diagnosis and antimicrobial therapy. **Expert Rev. Anti. Infect. Ther.** 10, 585–596. doi: 10.1586/eri.12.36
- BESSA, N. G. F. D.; BORGES, J. C. M.; BESERRA, F. P.; CARVALHO, R. H. A.; PEREIRA, M. A. B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S. L.; RIBEIRO, L. U.; QUIRINO, M. S.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15 n. 4, p. 692-707, 2013.
- BHANOT, Abhishek; SHARMA, Rohini; NOOLVI, Malleshappa N. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. **International journal of phytomedicine**, v. 3, n. 1, p. 09-26, 2011.
- BHUI, Dipak Kumar et al. Synthesis and UV–vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution. **Journal of Molecular Liquids**, v. 145, n. 1, p. 33-37, 2009.
- BITTNER, M. et al. Estudio químico de especies de la familia euphorbiaceae en Chile. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 46, n. 4, p. 419-431, 2001.
- BONFERONI, M. C. *et al.* Ionic polymeric micelles based on chitosan and fatty acids and intended for wound healing. Comparison of linoleic and oleic acid. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, p. 101-106, 2014.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) [homepage on the Internet]. Rio de Janeiro: INCA; [cited 2016 Jan 2]. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Acesso em: outubro 2020.
- BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- BRUYNS, P. V.; MAPAYA, R. J.; HEDDERSON, T. A new subgeneric classification for *Euphorbia* (Euphorbiaceae) in southern Africa based on ITS and *psbA-trnH* sequence data. **Taxon**. v. 55, n. 2, p. 397-420, 2006.
- BUCHANAN, Bob B.; GRUISSEM, Wilhelm; JONES, Russell L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. John wiley & sons, 2015.

CECÍLIO, C. C. S. **Caracterização físico-química e biológica de nanopartículas para o tratamento de leucemias**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica)- Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.

CHAUHAN, Ritika; REDDY, Arpita; ABRAHAM, Jayanthi. Biosynthesis of silver and zinc oxide nanoparticles using *Pichia fermentans* JA2 and their antimicrobial property. **Applied nanoscience**, v. 5, n. 1, p. 63-71, 2015.

COLEGATE, Steven M.; MOLYNEUX, Russell J. (Ed.). **Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination**. CRC press, 2007.

COSTA, L. S. **Estudo do uso do aveloz (*Euphorbia tirucalli*) no tratamento de doenças humanas: uma revisão**. Universidade estadual da Paraíba-centro de ciências biológicas e da saúde, v. 21, 2011.

CRUZ, Luiza Stolz et al. Enriched Terpenes Fractions of the Latex of *Euphorbia umbellata* Promote Apoptosis in Leukemic Cells. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, n. 9, p. e2000369, 2020.

CUNHA, M.L.R.S. *Staphylococcus aureus*: infections, treatment and risk assessment. **New York: Nova Biomedical**. 2017. 148p

DA COSTA, José GM et al. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 583-586, 2008.

DA PAIXÃO, Juliana Azevedo et al. Levantamento bibliográfico de plantas medicinais comercializadas em feiras da Bahia e suas interações medicamentosas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 13, n. 2, p. 71-81, 2016.

DA ROCHA, Francisco Angelo Gurgel; DANTAS, Leandro Ícaro Santos. atividade antimicrobiana in vitro do látex do aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.), pinhão bravo (*Jatropha mollissima* L.) e pinhão roxo (*Jatropha gossypifolia* L.) sobre microrganismos PATOGÊNICOS. **Holos**, v. 4, p. 3-11, 2009.

DAVIDSON, M. R.; GAZDAR, A. F.; CLARKE, B. E. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. **Journal of thoracic disease**, v. 5 Suppl 5, p. S463–S478, 2013.

DE FREITAS, Isabel. **Síntese verde para obtenção de nanopartículas de prata a partir de extratos naturais**. 2019. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

DE MELO, J. G. *et al.* Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: na agents: successes in clinical trials and therapeutic application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 263, p. 1-22, 2018.

DE OLIVEIRA, Thais Latansio et al. Antitumoural effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae) latex. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 263-269, 2013.

DE SOUSA, Rayane Siqueira et al. Tratamento do câncer de próstata: radioterapia, quimioterapia e plantas medicinais como alternativa terapêutica. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 11, n. 9, p. e537-e537, 2019.

DELL'ANTONIO, Larissa Rodrigues et al. O uso de plantas medicinais por mulheres com diagnóstico de câncer de mama em um programa de reabilitação. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research**, v. 17, n. 4, p. 85-97, 2015.

DOS SANTOS, Wendel Mombaqué; MATUOKA, Jessica Yumi; SECOLI, Silvia Regina. Cost-effectiveness of the antimicrobial treatment for inpatients infected with *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*: a systematic review protocol. **JBIC Evidence Synthesis**, v. 16, n. 2, p. 336-344, 2018.

DURGAWALE, P. P.; PHATAK, R. S.; HENDRE, A. S. Biosynthesis of silver nanoparticles using latex of *Syandenum grantii* Hook f and its assessment of antibacterial activities. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 10, n. 3, p. 847, 2015.

DUTRA, R. C. *et al.* Euphol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: evidence for the underlying mechanisms. **Biochemistry Pharmacology**. v. 83, p. 531-542, 2012.

EID, Safaa Yehia *et al.* Natural products modulate the multifactorial multidrug resistance of cancer. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 6, n. 03, p. 146, 2015.

ESPADERO, Mónica *et al.* Evaluación Microbiológica Y Composición Química De Extractos Orgánicos De *Euphorbia aff. viridis* (klotzsch & garcke) boiss sobre *staphylococcus aureus*, *klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. **LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida**, v. 29, n. 1, p. 119-129, 2019.

ESTRELA, Tatiana Silva. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. **Brasil, Ministério da Saúde, assessoria de assuntos internacionais de saúde. Saúde e política externa: os**, v. 20, p. 1998-2018, 2018.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC. 2010.

FEI, Dong-Qing *et al.* *Euphorikanin A*, a diterpenoid lactone with a fused 5/6/7/3 ring system from *Euphorbia kansui*. **Organic letters**, v. 18, n. 12, p. 2844-2847, 2016.

FELIU, D. A. **Análise de terpenoides de espécies de Croton sect. Lamprocroton (Mull. Arg.) Pax (Euphorbiaceae)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Botânica)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FERNANDES, Paulo André *et al.* Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos em Números, 2015. **Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos em Números, 2015**, p. 6-42, 2016.

FLORA DO BRASIL, 2020b. *Euphorbia*. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17561>>. Acesso em: setembro. 2020.

FRANCISCO, I. A.; PINOTTI, M. H. P. Cyanogenic glycosides in plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 43, n. 5, p. 24-27, 2000.

FURTADO, Diego Moreno Fernandes *et al.* Consumo de antimicrobianos e o impacto na resistência bacteriana em um hospital público do estado do Pará, Brasil, de 2012 a 2016. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 10, 2019.

GAO, Jing *et al.* 3-O-(2' E, 4' Z-decadienoyl)-20-O-acetylingenol induces apoptosis in intestinal epithelial cells of rats via mitochondrial pathway. **Journal of ethnopharmacology**, v. 174, p. 331-338, 2015.

GELATTI, Ana Caroline Zimmer; LORANDI, Vinicius. Cenários desafiadores no tratamento do câncer de pulmão. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 46, n. 4, 2020.

GOEL, G. *et al.* Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**. v. 26, p. 279-288, 2007.

GOTTESMAN, B. S. *et al.* Impact of quinolone restriction on resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from urine by culture in a community setting. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 49, p. 869-875, 2009.

GOTTESMAN, Michael M.; AMBUDKAR, Suresh V.; XIA, Di. Structure of a multidrug transporter. **Nature biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 546-547, 2009.

GUO, D. et al. Colloidal silver nanoparticles improve anti-leukemic drug efficacy via amplification of oxidative stress. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 198–203, 2015.

HAMELIAN, Mona et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Thymus kotschyanus* extract and evaluation of their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 32, n. 9, p. e4458, 2018.

HASSAN, Emad M.; MOHAMMED, Magdy; MOHAMED, Samy M. Two New Phorbol-Type Diterpene Esters from *Synadenium grantii* Hook F. Leaves. **Records of Natural Products**, v. 6, n. 3, 2012.

HE, Fan et al. Designable polymeric microparticles from droplet microfluidics for controlled drug release. **Advanced Materials Technologies**, v. 4, n. 6, p. 1800687, 2019.

HOUGHTON P., et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, 42 (4), p. 377-87, 2007.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância (CONPREV). Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede (DIDEPRE). Nota Técnica Detecção precoce de câncer durante a pandemia de Covid-19 [Internet]. Rio de Janeiro: **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)**; Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//nota-tecnica-deteccao-precoce.pdf>.

INGALE, Arun G.; CHAUDHARI, A. N. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an eco-friendly approach. **J Nanomed Nanotechnol**, v. 4, n. 165, p. 1-7, 2013.

JABIR, N. R.; TABREZ, S.; ASHRAF, G. M. et al. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p. 4391-4408, 2012.

JADRANIN, M. et al. Jatrophone diterpenoids from the latex of *Euphorbia dendroides* and their anti-P-glycoprotein activity in human multi-drug resistant cancer cell lines. **Phytochemistry**, v. 86, p. 208-217, 2013.

KABERA, Justin N. et al. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **J Pharm Pharmacol**, v. 2, n. 7, p. 377-392, 2014.

KALIKS, R. A.; MATOS, T. F.; SILVA, V. A.; BARROS, L. H. C. Diferenças no tratamento sistêmico do câncer no Brasil: meu SUS é diferente do teu SUS. **Brazilian Journal Of Oncology**, São Paulo, v.13, n.44, p.1-12, 2017.

KANG, Aram et al. Isopentenyl diphosphate (IPP)-bypass mevalonate pathways for isopentenol production. **Metabolic engineering**, v. 34, p. 25-35, 2016.

KARAMAN, I. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 85, n. 2-3, p. 231-235, 2003.

KEAT, C. L. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles and silver nanoparticles. **Bioresources and Bioprocessing**, 2015.

LEMBO, David; CAVALLI, Roberta. Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 21, n. 2, p. 53-70, 2010.

LIN, Jianbo et al. Chemical composition, antimicrobial and antitumor activities of the essential oils and crude extracts of *Euphorbia macrorrhiza*. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 5030-5039, 2012.

LIU, Chao et al. Two new diterpene derivatives from *Euphorbia lunulata* Bge and their anti-proliferative activities. **Fitoterapia**, v. 96, p. 33-38, 2014.

LIU, J. et al. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 33, p. 95–106, 2012.

LOPES, J. R. **Síntese de nanopartículas de prata (npsag) em soluções aquosas de fibroína de seda e gelatina**. Campinas, 115 p. 2017. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) -Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

LÓPEZ-CAUSAPÉ, Carla et al. The versatile mutational resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 685, 2018.

LUZ, L. E. C.; KANUNFRE, C. C.; PALUDO, K. S.; DA SILVA JUSTO, A.; PETRY, V. K.; LEMES, B. M.; BARISON, A.; NEPEL, A.; WANG, M.; AVULA, B.; KHAN, I. A.; BELTRAME, F. L. Cytotoxic biomonitored study of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 29–37, 2016.

LUZ, Livia Eidam Camargo et al. **Caracterização morfoanatômica, estudo fitoquímico e avaliação da citotoxicidade der *Euphorbia umbellata* (Pax) bruyns (euphorbiaceae)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

MARTÍNEZ OQUENDO, Ariadna et al. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el Hospital Dr. Gustavo Aldereguía Lima. **MediSur**, v. 15, n. 2, p. 210-216, 2017. **Medicine**, p. 1-14, 2011.

MARTINEZ, Fernando M.; ZUÑIGA, Edgar; SANCHEZ LAFARGA, Ana Karen. Método de síntesis de nanopartículas de prata adaptable a laboratorios de docencia relacionado con la nanotecnología. **Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología**, v. 6, n. 10, p. 101-108, 2013.

MARTINS, Alexandra de Moraes. **Avaliação das atividades citotóxica e antifúngica dos extratos orgânicos de *Euphorbia tirucalli* Linn (aveloz)**. 2018. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas)- Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2018.

MEDRADO, Héctor Hugo S. et al. Distribuição, atividade biológica, síntese e métodos de purificação de podofilotoxina e seus derivados. **Química nova**, v. 38, n. 2, p. 243-258, 2015.

MINOZZO, Bruno Rodrigo et al. **Ação gastroprotetora da fração metanólica das cascas de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns: envolvimento de ciclooxigenases, óxido nítrico e seu papel antioxidante**. 2015. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas)- Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

MOGHIMI, S. Moein; HUNTER, A. Christy; MURRAY, J. Clifford. Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB journal**, v. 19, n. 3, p. 311-330, 2005.

MOLIN, G.T.D. et al. Utilização de plantas medicinais e fitoterápicos por pacientes submetidos à quimioterapia de um centro de oncologia de Ijuí/RS. **O Mundo da Saúde**, v.3, n.3, p.287- 298, 2015.

MOMENI, Seyedeh Samaneh; NASROLLAHZADEH, Mahmoud; RUSTAIYAN, Abdolhossein. Green synthesis of the Cu/ZnO nanoparticles mediated by *Euphorbia prolifera* leaf extract and investigation of their catalytic activity. **Journal of colloid and interface science**, v. 472, p. 173-179, 2016.

MORA-HUERTAS, Claudia E.; FESSI, Hatem; ELAISSARI, Abdelhamid. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

- MOTA, K. S. L. *et al.* Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, p. 979-1012, 2009.
- MUHAMMAD, Zarmina *et al.* PEG capped methotrexate silver nanoparticles for efficient anticancer activity and biocompatibility. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 251-255, 2016.
- MUKHA, I. P. *et al.* Antimicrobial activity of stable silver nanoparticles of a certain size. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 199–206, 2013.
- MUNDARGI, Raghavendra C. *et al.* Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (D, L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. **Journal of Controlled Release**, v. 125, n. 3, p. 193-209, 2008.
- MUNHOZ, Antonio CM *et al.* Chemical and pharmacological investigation of the stem bark of *Synadenium grantii*. **Planta Medica**, v. 80, n. 06, p. 458-464, 2014.
- MUNIZ, Jaqueline Joice *et al.* Resistência aos antibióticos utilizados para tratamento de infecções por *Klebsiella pneumoniae* em um hospital. **Revista de Ciências da Saúde Básica e Aplicada**, v. 2, n. 1, p. 3-10, 2019.
- MWINE, J. T.; VAN DAMME, P. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of medicinal plant research**, v. 5, n. 5, p. 652-662, 2011.
- NAIME FF, YOUNES RN, KERSTEN BG, ANELLI A, BEATO CA, ANDRADE RM, *et al.* Metastatic non-small cell lung cancer in Brazil: treatment heterogeneity in routine clinical practice. **Clinics (Sao Paulo)**. 2007;62(4):397-404.
- NASCIMENTO, M. R.; SILVA, G. S.; CONCEIÇÃO, G. M. Euphorbiaceae: checklist de uma coleção botânica, Maranhão, Brasil. **Enciclopédia Biosfera, centro científico conhecer, Goiânia**, v. 14, n. 25, p. 2017, 2017.
- NASROLLAHZADEH, Mahmoud; SAJADI, S. Mohammad. Pd nanoparticles synthesized in situ with the use of *Euphorbia granulate* leaf extract: Catalytic properties of the resulting particles. **Journal of colloid and interface science**, v. 462, p. 243-251, 2016.
- NETALA, Vasudeva Reddy *et al.* Biogenic silver nanoparticles: efficient and effective antifungal agents. **Applied Nanoscience**, v. 6, n. 4, p. 475-484, 2016.
- NEVES, A. L. P. *et al.* Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 45, p. 34-39, 2014.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020
- NICHOLSON, M. J. *Euphorbia pseudograntii* Bruyns. In: Schmelzer, G.H. & Gurib-Fakim, A. (Editors). *Prota 11(1): Medicinal plants/Plantes médicinales 1*. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen, Netherlands. 2008.
- NORONHA, Carolina Montanheiro *et al.* Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 896-903, 2013.
- OCHWANG'I, Dominic O. *et al.* Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County, Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 3, p. 1040-1055, 2014.
- OLIVEIRA, G. Z. S. **Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato aquoso e metabólito secundário (quercetina) das folhas de *Pterodon marginatus* (sucupira branca) direcionadas para aplicações biomédicas e agrícolas**. 2018. 220 f. Tese (Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia) -Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

OLIVEIRA, Marcelo Bragança dos Reis et al. O impacto da histologia do carcinoma pulmonar na frequência das metástases ósseas. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 54, n. 5, p. 524-530, 2019.

OLIVEIRA, R. B. et al. Toxicidade aguda de látex e extrato etanólico de folhas de *Synadenium umbellatum* em camundongos. **Revista Eletretrônica de Farmácia**. v. 2, n. 2, 2005.

OLIVEIRA, T. L. de. et al. Antitumoral effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae) latex. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 150, p. 263-269, 2013.

OMS – Organização mundial de saúde. Perspectiva global para o câncer. **ONU news**, fev. 2018. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/casos-de-cancer-devem-aumentar-70-ate-2038-calcula-oms>.

ORLANDA, J.F.F AND VALE, V.V.. Análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de extrato etanólico de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). 2015; **Rev. bras. plantas med.** v.17, p.730-736.

ORTÊNCIO, W.B. **Medicina popular do Centro-Oeste**. Brasília: Thesaurus, 1997.

PALHARES, Rafael Melo et al. Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0127866, 2015.

PAPAZISIS, K. T. et al. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **Journal of immunological methods**, v. 208, n. 2, p. 151-158, 1997.

PARK, Y. et al. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. **IET nanobiotechnology**, v. 5, n. 3, p. 69-78, 2011.

PASCAL, O. A.; BERTRAND, A. E. V.; ESAÏE, T.; SYLVIE, H. M.; ELOI, A. Y. A review of the ethnomedical uses, phytochemistry and pharmacology of the Euphorbia genus. **The Plant Innovation Journal**, v. 6, p. 34–39, 2017.

PINTO, M. V. et al. Estudo botânico, fitoquímico e físico-químico de *Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 649-656, 2014.

RAGASEEMA, V. M. et al. The antithrombotic and antimicrobial properties of PEG- protected silver nanoparticle coated surfaces. **Biomaterials**, v. 33, n. 11, p. 3083–3092, 2012.

RAMOS, Izabella Maria Ferreira Campos. Nanopartículas poliméricas funcionalizadas para liberação de fármaco no sistema nervoso central. 2018.

RAO, P. V. et al. Phytochemicals and Biogenic Metallic Nanoparticles as Anticancer Agents. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016.

RAOTA, Camila Suliani. **Síntese verde de nanopartículas de prata a partir do extrato do bagaço de Vitis labrusca (cultivar Ives), caracterização e aplicação na desinfecção de efluentes industriais**. 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais)- Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2018.

REGINATTO, F. H. Introdução à análise fitoquímica. In: ARTMED (Ed.). Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre. 2017.

REIS-GOMES, Angelita et al. Dermatopatias fúngicas: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. **Acta veterinaria brasílica**, v. 6, n. 4, p. 272-284, 2012.

RESENDE, R. R., “**Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria – Vol.4**”, 1 ed, 2017.

RIBEIRO SG. **Arte como instrumento auxiliar no tratamento do câncer infantil**. 2005. Dissertação (Curso técnico de laboratório em biodiagnóstico em saúde)- Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Rio de Janeiro, 2005.

RISS, Terry L. et al. Cell viability assays. **Assay Guidance Manual [Internet]**, 2016.

ROCHA-COELHO, Fabiane Borges; SANTOS, M. G. Plantas medicinais utilizadas pela Comunidade Mumbuca Jalapão-TO: Um estudo etnofarmacológico. **Pesquisa e Conservação do Cerrado**. v. 5, 2008.

SANTOS, Orlando José dos et al. Avaliação do uso do extrato bruto de *Euphorbia tirucalli* na inibição do tumor ascítico de ehrlich. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, n. 1, p. 18-21, 2016.

SANTOS, Wendel Mombaque dos; SECOLI, Silvia Regina. Impacto econômico do tratamento de pacientes infectados com *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*. **Einstein (São Paulo)**, v. 17, n. 4, p. -, 2019.

SECA, Ana ML; PINTO, Diana CGA. Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 263, 2018.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1–2, p. 83–96, 2009

SILVA, Jonas dos Santos. **Estudo in vitro da ação antibacteriana da euphorbia tirucalli linneau em microorganismos isolados de dermatopatias de cães e gatos**. 2018. Dissertação (Mestrado Ciências farmacêuticas)- Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2018.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 7 ed., Porto Alegre: Artmed, 2017, 848 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSI 2019. Disponível em: <<http://www.sbfagnosia.org.br/>>. Acesso em: 30, agosto 2020.

SOUSA, A. F. L. DE; OLIVEIRA, L. B.; MOURA, M. E. B. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares causadas por procedimentos invasivos em unidade de terapia intensiva. **Rev Preven de Infec e Saúde (REPIS)**, v. 2, p. 11–17, 2016.

SOUSA, Natália Lima de. **Biodetoxificação de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) mediante silenciamento gênico da ricina**. 2017.

SOUZA, C.S.M.; TEIXEIRA, N.B.; CUNHA, M.L.R.S. Community-associated *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) in special groups. In: Cunha, M.L.R.S *Staphylococcus aureus*. **New York: Nova biomedical**, 2017. p.25-34.

SUGIURA H, YAMADA K, SUGIURA T, HIDA T, MITSUDOMI T. Predictors of survival in patients with bone metastasis of lung cancer. **Clin Orthop Relat Res** 2008;466(03):729–736

SULAIMAN, G. M. et al. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 1, p. 58–63, 2013.

TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TANAKA, Straus; CHADID, Thiago; BERNARDINO, Graziela. Custos e padrões de tratamento de pacientes com câncer de pulmão não-pequenas células (CPNPC) avançado no sistema suplementar de saúde. **JBES: Brazilian Journal of Health Economics/Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 8, n. 2, 2016.

TANG, Bin et al. Sunlight-driven synthesis of anisotropic silver nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 260, p. 99-106, 2015.

TARIQ, Akash et al. A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 2, p. 202-264, 2017.

THE PLANT LIST, 2020. **Euphorbiaceae**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Euphorbiaceae/>>. Acesso em: fev. 2020.

TORIBIO ESPINOZA, Joel et al. **Desenvolvimento tecnológico e caracterização de lipossomas carregados com nanopartículas de prata obtidas por síntese verde**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas)- Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2017.

TRAN, P. H-L.; TRAN, T. T-D.; LEE, B-J. Enhanced solubility and modified release of poorly water-soluble drugs via self-assembled gelatin–oleic acid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, p. 235-240, 2013.

TRESVENZOL, Leonice Manrique Faustino et al. **Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas**. 2006.

VAN TONDER, Alet; JOUBERT, Annie M.; CROMARTY, A. Duncan. Limitations of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC research notes**, v. 8, n. 1, p. 47, 2015.

VARGAS, D. P. **Mamona (*Ricinus communis* L.): cultura de antera, viabilidade e conservação de pólen**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas)- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

VASAS, Andrea; HOHMANN, Judit. Euphorbia diterpenes: isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008–2012). **Chemical reviews**, v. 114, n. 17, p. 8579-8612, 2014.

VIEIRA, Débora Braga; GAMARRA, Lionel Fernel. Avanços na utilização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de câncer. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 1, p. 99-103, 2016.

WCSP - **World Checklist of Selected Plant Families. Euphorbiaceae. Facilitated by Royal Botanic Gardens**. Acesso em: 20 jun. 2018.

ZHANG, Xi-Feng et al. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 9, p. 1534, 2016.