



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

ALEXSANDRA DE MORAIS MARTINS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS  
ORGÂNICOS DE *Euphorbia tirucalli* Linn. (AVELOZ)**

Recife

2018

ALEXSANDRA DE MORAIS MARTINS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS  
ORGÂNICOS DE *Euphorbia tirucalli* Linn. (AVELOZ)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

**Área de concentração:** Aspectos biotecnológicos e microbiológicos aplicados a patologia.

**Orientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Gustavo Pina Godoy

**Coorientador:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar

Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Silva do Nascimento

Recife

2018

Catálogo na fonte:  
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

M379a Martins, Alexandra de Moraes.  
Avaliação das atividades citotóxica e antifúngica dos extratos orgânicos de *Euphorbia tirucalli* Linn. (aveloz) / Alexandra de Moraes Martins. – Recife: o autor, 2018.  
57 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Gustavo Pina Godoy.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Patologia.  
Inclui referências e anexos.

1. *Euphorbia tirucalli* L. *Candida* ssp. 2. Citotoxicidade. 3. Cromatografia. I. Godoy, Gustavo Pina (orientador). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2019 - 054)



ALEXSANDRA DE MORAIS MARTINS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS  
ORGÂNICOS DE *Euphorbia tirucalli* Linn. (AVELOZ)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em patologia.

Aprovada em: 30/08/2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Gustavo Pina Godoy (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Mario Ribeiro de Melo Júnior (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Lopes B. Delmiro Santana (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr. Marcela Agne Alves Valones (Examinador Externo)  
Universidade de Pernambuco

A minha família, especialmente meu filho (**Jorge Antônio**) por todo amor e por ser minha pessoa preferida no mundo.

## **AGRADECIMENTOS**

Meu agradecimento especial, A Deus, pela fé que me mantém viva e fiel á vida honesta de trabalho e estudo.

### **AOS FAMILIARES**

Aos meus pais, irmãos, tias, cunhadas, sogra, sogro e em especial ao meu filho e esposo.

### **AOS PROFESSORES**

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ivone Antônia de Souza

Prof<sup>a</sup>. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar

Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Silva do Nascimento

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves Lima Neto

Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

### **INSTITUIÇÕES**

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

Programa de Pós Graduação em Patologia – UFPE.

CAPES - Coordenação de aperfeiçoamento de Nível Superior.

Laboratório de Química de Produtos Naturais- UFPE.

Laboratório de Cultura de Células - UFPE.

Laboratório de Micologia Médica - UFPE.

### **AOS AMIGOS**

Ana Emilia de Medeiros Roberto

Bruno Iraquitan Miranda da Silva

Maria Daniela Silva Buonafina

Pérsio Alexandre da Silva

Talita Leão de Carvalho

Victor Magno Santos do Nascimento

Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem, Ou que seus planos nunca vão dar certo, Ou que você nunca vai ser alguém... Quem acredita sempre alcança!

(14 bis)

## RESUMO

A *Euphorbia tirucalli* L. (Euphorbiaceae) possui princípios ativos com atividades biológicas cientificamente comprovadas como antimicrobiana e anticancerígena. O objetivo do trabalho foi avaliar o perfil fitoquímico, as atividades antifúngica e citotóxica dos extratos hexano, acetato de etila e etanólico dos ramos de *E. tirucalli* Linn. O extrato hexânico foi submetido e analisado por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-MS). A atividade antifúngica foi realizada pelo método de microdiluição seguindo o protocolo M27-A3 frente *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *C. glabrata*; *C. parapsilosis* e *C. krusei*. A atividade citotóxica foi realizada através do ensaio de MTT frente as linhagens humanas HaCaT (queratinócitos), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão), HT-29 (adenocarcinoma de cólon), K562 (leucemia promielocítica aguda), HL-60 (leucemia mielocítica crônica), SCC9 (carcinoma epidermoide de língua), SCC15 (carcinoma epidermoide oral) e murino L929 (fibroblasto de camundongos). A avaliação cromatográfica sugere 14 substâncias: ácido undecanóico, palmítico, linoleico e esteárico, 9-octadecenoato de metila, fitol, octacosano, eicosano, lanosta-8,24-dien-3-ol, lanosterol e lupenona. O extrato etanólico apresentou melhor atividade frente a todos os isolados de *candida* ssp. causando redução significativa nas maiores concentrações testadas (64 µg/mL). O teste de citotoxicidade mostrou inibição acima de 75 % frente a linhagem HL-60, valor esse usado como critério para determinar a  $CI_{50}$ , que apresentou valor de 1,38 µg/mL frente ao extrato hexânico. Concluí-se que o extrato etanólico apresenta capacidade de inibir o crescimento de leveduras do gênero *Candida*, sugerindo a possibilidade de desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos, assim como o extrato hexânico apresentou-se como promissor para o desenvolvimento de novos fármacos anticâncer.

Palavras-chave: *Euphorbia tirucalli* L. *Candida* ssp. Citotoxicidade. Cromatografia.

## ABSTRACT

The *Euphorbia tirucalli* L. (Euphorbiaceae) possesses active principles with biological activities scientifically proven as antimicrobial and anticancer. The objective of this work was to evaluate the phytochemical profile, the antifungal and cytotoxic activities of extracts hexane, ethyl acetate and ethanolic of the branches of *E. tirucalli*. The hexane extract was submitted and analyzed by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometer (CG-MS). The antifungal activity was performed by the microdilution method following the protocol M27-A3 against *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *C. glabrata*; *C. parapsilosis*, *C. krusei*. The cytotoxic activity was performed by the MTT assay against the human lines HaCaT (keratinocytes), NCI-H292 (mucoepidermoid carcinoma of the lung), HT-29 (colon adenocarcinoma), K562 (acute promyelocytic leukemia), HL-60 SCC9 (epidermoid carcinoma of the tongue), SCC15 (oral squamous cell carcinoma) and murine L929 (mouse fibroblast). Chromatographic evaluation suggests 14 substances: undecanoic, palmitic, linoleic and stearic acid, methyl 9-octadecenoate, phytol, octacosan, eicosane, lanosta-8,24-dien-3-ol, lanosterol and lupenone. The ethanolic extract presented better activity against all the isolates of *candida* ssp. causing significant reduction in the highest concentrations tested (64 µg / mL). The cytotoxicity test showed inhibition above 75% against the HL-60 line, which was used as a criterion to determine the IC50, which presented a value of 1.38 µg / mL against the hexane extract. It was concluded that the ethanolic extract has the capacity to inhibit the growth of yeasts of the genus *Candida*, suggesting the possibility of development of new antifungal drugs, as well as the hexane extract is interesting for the development of new anticancer drugs.

Keywords: *Euphorbia tirucalli* L. *Candida* ssp. Cytotoxicity. Chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Imagem da planta <i>Euphorbia tirucalli</i> L. (a). Árvore inteira;(b) Detalhe dos ramos.....	19
Figura 2 –	Estrutura de alguns compostos isolados na <i>Euphorbia tirucalli</i> L.....	20
Figura 3 –	Reação do MTT com a enzima mitocondrial redutase. A viabilidade é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela), pela atividade metabólica celular a formazan (um sal de coloração violeta).....	25
Figura 4 –	Perfil químico do extrato hexânico da <i>Euphorbia tirucalli</i> L. mostrando os diferentes picos de compostos presentes no extrato.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Análise fitoquímica do extrato etanólico dos ramos da espécie <i>Euphorbia tirucalli</i> L conforme Savithramma (2011).....	28
Tabela 2 –	Resultados da análise fitoquímica preliminar do extrato etanólico dos ramos da <i>Euphorbia tirucalli</i> L. conforme Savithramma (2011).....	33
Tabela 3 –	Constituintes químicos identificados no extrato hexânico de <i>Euphorbia tirucalli</i> L. por GC-MS.....	35
Tabela 4 –	Resultados do teste de suscetibilidade antifúngica <i>in vitro</i> das 6 leveduras de <i>Candida</i> ssp. analisadas neste estudo.....	37
Tabela 5 –	T Percentual de inibição (%) dos extratos de <i>E. tirucalli</i> L. em linhagens celulares saudáveis, após 72h de exposição.....	39
Tabela 6 –	Percentual de inibição (%) dos extratos de <i>E. tirucalli</i> L. em linhagens celulares cancerígenas, após 72h de exposição.....	39
Tabela 7 –	T Cl <sub>50</sub> dos extratos hexano, acetato de étila e etanólico de <i>E. tirucalli</i> L. em células tumorais humanas.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas
ATCC	American Type Culture Collection
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50 %
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CO <sub>2</sub> -	Dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EXT	Extrato
HaCaT	Queratinócitos humano
HL-60	Leucemia promielocítica aguda humana
HT-29	Adenocarcinoma de cólon humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPA	Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária
K562	Leucemia mielocítica crônica humana
L929	Fibroblasto de camundongos humana
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humana
MIN	Minuto
MOPS	Ácido Morfolino Propano Sulfônico
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NCI-H292	Carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	OBJETIVOS .....	15
1.1.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	15
1.1.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
2.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	16
2.2	FAMÍLIA <i>EUPHORBICEAE</i> .....	16
2.3	GÊNERO <i>EUPHORBIA</i> .....	17
2.4	ESPÉCIE <i>EUPHORBIA TIRUCALLI</i> L.....	17
2.5	FITOCONSTITUINTES DE <i>EUPHORBIA TIRUCALLI</i> L...	19
2.6	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE <i>EUPHORBIA TIRUCALLI</i> L.....	20
2.7	CONSIDERAÇÕES SOBRE O CÂNCER.....	21
2.8	CONSIDERAÇÕES SOBRE INFECÇÃO FÚNGICA.....	23
2.9	ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE COMPOSTOS.....	24
2.10	INVESTIGAÇÃO DE CITOTOXICIDADE.....	24
2.11	INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	25
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
3.1	COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO.....	27
3.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DOS RAMOS DE <i>EUPHORBIA TIRUCALLI</i> L.....	27
3.3	ANÁLISE FITOQUÍMICA QUALITATIVA DOS EXTRATOS DE <i>EUPHORBIA TIRUCALLI</i> L.....	27
3.4	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (GC-MS).....	29
<b>3.4.1</b>	<b>Parâmetros da CG-MS</b> .....	29
3.5	TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN</i> <i>VITRO</i> .....	29
3.6	PREPARO DO MEIO DE CULTURA RPMI.....	29
<b>3.6.1</b>	<b>Preparo do inóculo</b> .....	30

3.6.2	<b>Determinação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>.....</b>	30
3.7	<b>LINHAGENS CELULARES.....</b>	31
3.7.1	<b>Ensaio citotóxico.....</b>	31
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	33
5	<b>CONCLUSÃO .....</b>	43
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	44
	<b>ANEXO A- FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....</b>	56

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como recurso terapêutico para as mais diversas enfermidades é uma prática tão antiga quanto a história da humanidade. As espécies vegetais utilizadas com essas finalidades são denominadas "plantas medicinais", e muitas das suas aplicações têm sido validadas cientificamente. (ROCHA & DANTAS, 2009; MELO et al., 2011; SILVA et al., 2015).

A espécie *Euphorbia tirucalli* L. pertencente à família Euphorbiaceae é conhecida como aveloz, árvore do lápis, cachorro pelado, cega-olho, dedo do diabo, espinho italiano, entre outros. É uma espécie nativa da África, que chegou ao Brasil em 1892, onde propagou-se por todas as regiões tropicais do planeta, e aclimatizou-se bem em lugares de clima quente, especialmente no Nordeste do Brasil (SAPIÊNCIA, 2010). *Euphorbia tirucalli* L. é considerada uma planta tóxica, por produzir um látex de coloração esbranquiçada, extremamente irritante quando em contato com a pele e mucosas, produzindo inflamação cutânea, queimação na boca e garganta. O contato com os olhos provoca inchaço, conjuntivite e ardência (BALOCH, 2010).

Essa espécie possui princípios ativos com atividades biológicas cientificamente comprovadas como anti-inflamatória (BANI et al., 2007), antimicrobiana (SILVA et al., 2015) e anticancerígena (SILVA et al. (2018) entre outras. Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos e direcionados à descoberta de novos fármacos provenientes de extratos vegetais com potencial anticâncer e agentes antimicrobianos afim de descobrir compostos com atividade comparada à dos tradicionalmente utilizados, porém, com menor toxicidade, maior eficácia e com menor impacto ambiental (PINTO et al., 2014).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil fitoquímico e as atividades antifúngica e citotóxica dos extratos orgânicos dos ramos de *E. tirucalli* Linn.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Preparar os extratos brutos em hexano, acetato de etila e etanol a partir dos ramos de *E. tirucalli* Linn.;
- Avaliar o perfil fitoquímico dos extratos orgânicos dos ramos da *E. tirucalli* Linn.;
- Analisar por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas (CG-MS) do extrato hexânico de *E. tirucalli* Linn.;
- Verificar uma possível ação antifúngica dos extratos etanólico, acetato de étila e hexano dos ramos de *E. tirucalli* Linn., sobre leveduras de (*C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. Krusei*);
- Avaliar a atividade antiproliferativa dos extratos etanólico, acetato de étila e hexano dos ramos de *E. tirucalli* Linn. sobre linhagens normais L929 (fibroblasto de camundongos), HaCaT (queratinócitos humano), e cancerígenas: NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano), SCC9 (carcinoma epidermoide de língua humana), SCC15 (carcinoma epidermoide oral humana) , HL-60 (leucemia promielocítica aguda humana), K562 (leucemia mielocítica crônica humana).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas fazem parte da história da cultura humana desde seus antepassados, e têm fornecido por milênios as matérias-primas que são utilizadas como recurso natural para diversos fins: cosméticos, fonte de habitação, decoração, alimentação, e principalmente, aliviar ou curar enfermidades. As espécies vegetais utilizadas para finalidades terapêuticas são genericamente denominadas “plantas medicinais” (ANDRADE; CARDOSO; BASTOS, 2007). A eficácia terapêutica destas espécies tem sido validadas cientificamente, relacionando suas atividades biológicas a presença de uma variedade de fitoquímicos denominado "fitocomplexo". A composição desse conjunto de substâncias pode ser influenciada por fatores endógenos ou exógenos ao vegetal (ROCHA;DANTAS, 2009).

Diante uma variedade de compostos bioquímicos e concentração de componentes bioativos, é esperado que uma mesma planta medicinal apresente uma variedade de atividades biológicas (United States Department of Agriculture, 2009), fornecendo modelos para modificações estruturais, otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas e construção sintética de novas estruturas moleculares naturais (BRAZ-FILHO, 2010).

### 2.2 FAMÍLIA *EUPHORBIACEAE*

A família Euphorbiaceae possui uma ampla distribuição geográfica, com cerca de 317 gêneros e 8.000 espécies, distribuídas em praticamente todas as regiões do mundo, porém, assume posição de destaque com uma maior diversidade de espécies, distribuídas predominantemente em regiões tropicais. No Brasil, levantamentos florísticos revelam ocorrência de 1.100 espécies e 72 gêneros, que podem ser encontradas nos mais diversos tipos de vegetação do país. A região Nordeste comporta cerca de 211 espécies e 45 gêneros, sendo 17 espécies endêmicas da Caatinga (ARAÚJO et al., 2018; LUCENA; ALVES 2010).

A família Euphorbiaceae está entre as seis maiores e mais importantes famílias do grupo das Angiospermas (SECCO et al., 2005). Diversos estudos comprovam cada vez mais o rico potencial da família *Euphorbiaceae*, que são

conhecidas tradicionalmente por sua relevância no âmbito medicinal, madeireiro (Lucena; Alves 2010, nutricional (Ferreira et al., 2009), industrial e ornamental (Trindade; Lameira 2015).

### 2.3 GÊNERO *EUPHORBIA*

O gênero *Euphorbia* foi originado do nome do rei grego Euphorbos, um incentivador do estudo das plantas medicinais usadas como tratamento de males do povo em seu reino, a partir da cicatrização das chagas de seu corpo pelo uso do látex de uma espécie laticífera não especificada (VARRICCHIO et al., 2008).

Esse gênero é considerado o maior da família *Euphorbiaceae* (SHLAMOVITZ et al., 2009), com cerca de 2.000 espécies espalhadas pelo mundo, em ecossistemas muito diversos, apresentando diferentes aspectos morfológicos entre herbáceas, suculentas e arbustivas (RADCLIFFE-SMITH, 2001). Entre outras características, esse gênero possui um látex branco leitoso, que é frequentemente tóxico e irritante para pele e mucosas (KUMAR, 2010).

As plantas do gênero *Euphorbia* são bastante conhecidas pela diversidade química dos seus componentes, tais como alcaloides, flavonoides, taninos, diterpenos, triterpenos entre outros (CHEN et al., 2014; YANG et al., 2014). O gênero vem sendo estudado pelo *Euphorbia Planetary Biodiversity Inventory* (*Euphorbia PBI*), que conta com pesquisadores do mundo inteiro, buscando fazer a monografia completa do gênero e entender as relações evolutivas de *Euphorbia*.

Algumas espécies pertencentes a esse gênero são objetos de estudos multidisciplinares envolvendo diferentes pesquisas sobre suas características químicas, propriedades biológicas, importância taxonômica e etnobotânica, o que tem contribuído para o melhor conhecimento de seu uso medicinal (SECCO, 2005; TRINDADE; LAMEIRA, 2014).

### 2.4 A ESPÉCIE *EUPHORBIA TIRUCALLI* L.

A espécie *Euphorbia tirucalli* L. é uma planta nativa do Sul do continente Africano, localizada na região de Madagascar. Essa espécie foi introduzida no Brasil através das antigas navegações no ano de 1892, sendo plantada inicialmente no Nordeste Brasileiro e, posteriormente, disseminada para todo o país, sendo

bastante cultivadas na região Norte e Nordeste (ABREU et al., 2014; CASEIRO et al., 2006, MELO et al., 2011), onde passou a ser cultivada para diversos fins que envolvem desde a terapêutica, ornamentais, até mesmo para a formação de “cercas-vivas” separando as lavouras agrícolas e propriedades (LORENZI; MATOS, 2002).

Devido ao seu aspecto, *E. tirucalli* L. recebe várias denominações variando de lugar para lugar. Nos Estados Unidos *E. tirucalli.*, é conhecida como *milk bush*; na Índia, de *lunka sij* e na Angola, é chamada de *assoneira*. No Brasil, ela recebe várias denominações, como: *aveloz*, *planta de São Sebastião*, *árvore-do-lápis*, *cega-olho*, *espinho-italiano*, *pau- pelado*, *dedo do diabo*, entre outros (DANTAS, 2007, DUTRA et al., 2011). Existem relatos do uso dessa espécie desde a antiguidade, nos herbários e até mesmo em farmacopeias, tanto da África quanto do continente europeu, contendo a descrição das suas indicações e propriedades terapêuticas (PALMIERI et al., 2005). Sua utilização é mencionada para fins medicinais em algumas obras médicas e científicas dos considerados antigos mestres naturalistas, como Hipócrates no século V a.C., e de Paracelso, no século XVI (VARRICCHIO et al., 2008).

A espécie *E. tirucalli* L. é uma planta suculenta, e pode variar de 1,5 metros a 8,0 m de altura, e 15 centímetros de diâmetro, se plantada em seu habitat natural, porém, em ambientes com condições climáticas contrárias, não passa de 2 m (SAPIÊNCIA, 2010). A planta apresenta tronco verde, e ramos lenhosos, com característica cilíndrica. Os ramos da *Euphorbia tirucalli* L. possuem algumas folhas e flores que são muito pequenas, raramente visíveis, pois caem logo que nascem (Figura 1). Além disso, no interior desta espécie existe uma seiva de aparência esbranquiçada e leitosa denominada de látex, que é expelido quando seus ramos são feridos (BESSA, 2010; VALE; ORLANDA, 2011) Entretanto, o látex é considerado irritante, cáustico e até mesmo tóxico. Ao atingir a região dos olhos, esse látex pode causar lesões na córnea levando à cegueira temporária. O contato com a pele e mucosas, pode causar edema na boca, lábios e língua e, se for ingerido, pode causar vários inconvenientes, como náuseas, vômito e diarreia (WACZUK, 2014).

**Figura 1-** Imagem da planta *Euphorbia tirucalli* Linn. (a). Árvore inteira;(b) Detalhe dos ramos.



**Fonte:** pessoal.

## 2.5 FITOCONSTITUINTES DE *EUPHORBIA TIRUCALLI* L

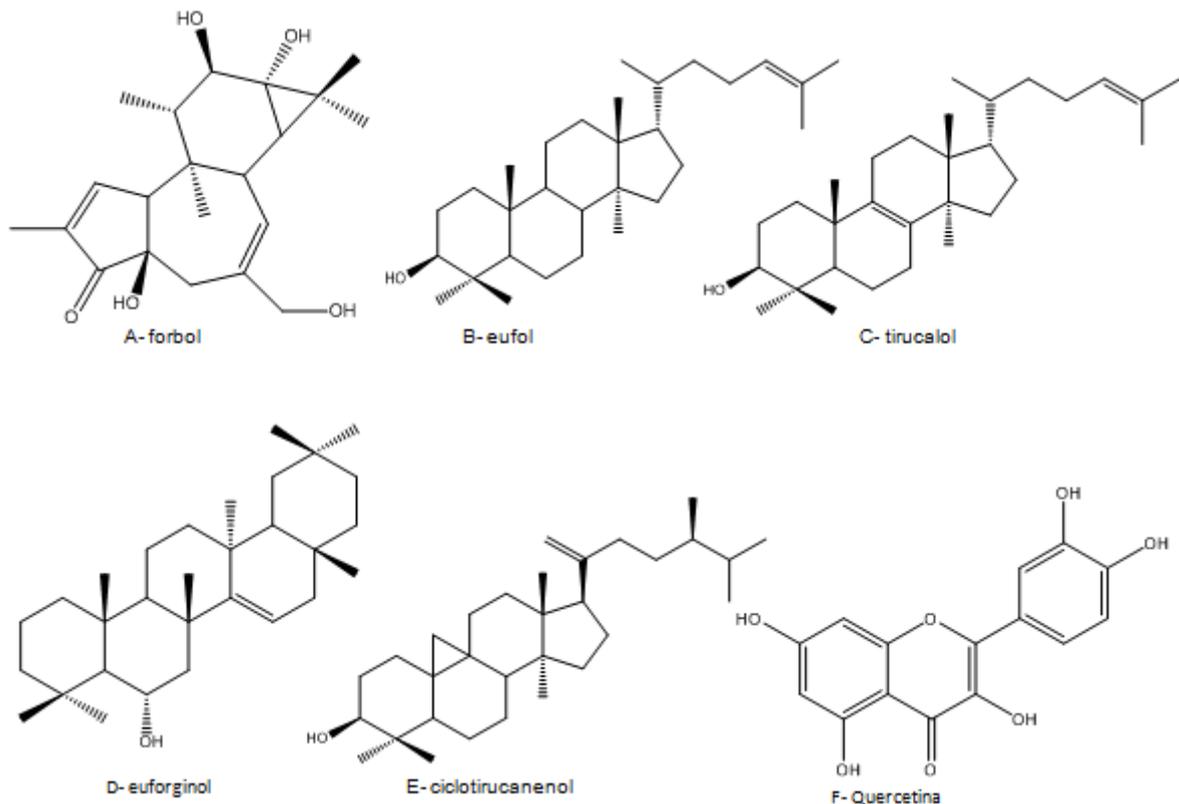
As substâncias presentes nas espécies vegetais despertam interesse de estudo. A composição química das diferentes partes da *Euphorbia tirucalli* L. tem sido extensivamente estudada e uma variedade de compostos químicos, tem sido isolados a partir deles (WACZUK et al., 2012).

Dentre as classes de substâncias químicas que se distribuem nessa espécie, é possível encontrar diversos compostos resultantes de seu metabolismo secundário, utilizados como defesa química, contra fatores que causam algum tipo de estresse ao seu desenvolvimento. Através do mapeamento da ocorrência de compostos majoritários em *Euphorbia tirucalli* L., pôde-se observar a presença de vários tipos de moléculas (figura 3)

*Euphorbia tirucalli* L., dispõe de algumas moléculas reconhecidas como forbol, eufol, quercetina e tirucalol (GRANJA; QUEIROZ, 2003; NES et al., 1984). Em 1986, Furstenberger, identificou a existência de um derivado do forbol, denominado de 4-Desoxiforbol, o qual, foi apontada como sendo carcinogênica por indicar elevada atividade irritante em testes realizados. Em 1988a, KAHN et al., identificaram a presença de outro triterpeno, denominado ciclotirucanenol. No mesmo ano, KAHN et al., (1988b) identificou a presença de um triterpeno pentacíclico, que foi denominado de euforcinol.

O mesmo grupo de Kahn, identificaram um novo composto, euforginol. Já em 1991, YOSHIDA et al., identificaram taninos hidrolizáveis, os quais foram denominados de tirucalin A, tirucalin B e euforin F. No ano de 2001, LIN et al., reportaram o isolamento de 13 compostos polifenólicos, sendo onze já conhecidos derivados do ácido galico além de flavonoides. Segundo YAMAMOTO; MIZUGUCHI; YAMADA, (2004), também foram identificados no látex da *E. tirucalli* L. estruturas esteroideais, como  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol e campferol, bem como ácido palmítico e ácido linoléico. Já em 2006, MALLAVADHANI et al., identificaram e quantificaram em diferentes estações do ano o eufol.

**Figura 2-** Estrutura de algumas moléculas isoladas na *Euphorbia tirucalli* L. \*A- forbol, B- eufol, C- tirucalol, D- 4-euforginol, E- ciclotirucanenol, F- quercetina.



Fonte: pessoal

## 2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *EUPHORBIA TIRUCALLI* L.

A espécie *Euphorbia tirucalli* L. é uma espécie muito explorada cientificamente, buscando ampliar, elucidar e confirmar suas reais atividades

biológicas. Existem relatos de que esta espécie apresenta propriedades curativas para algumas doenças destacando-se dentre elas as atividades antimalárica (MWINE; DAMME; JUMBA, 2010) analgésica e anti-inflamatória (SINOKI et al., 2011).

No Brasil, *Euphorbia tirucalli* L. é utilizada com fins terapêuticos para algumas enfermidades como, anti-inflamatória (BANI et al., 2007), anti-cancerígena para alguns tipos de câncer (pulmão, mama, e cervical de colo) (DUKE, 2011), controle de parasitoses intestinal (KUMAR, 2010), antitumoral (VALADARES et al., 2006), imunestimulante e antioxidante (MACHADO et al., 2007), angiogênica (Bessa, 2010), imunomoduladora (CORONEL et al., 2010; AVELAR et al., 2011), moluscicida (AFONSO NETO; BESSA; SOARES, 2010), foi visto ainda, atividade larvicida em *Aedes aegypti* (VARRICCHIO et al., 2008b) e antibacteriana frente a *Escherichia coli* (GONCALVES; ARAUJO, 2009).

Diante do exposto, é possível encontrar diversos estudos científicos (VARRICCHIO et al., 2000; VALADARES, 2007; VARRICCHIO, 2008a) em relação a seu uso para tratar algumas patologias, entre elas, o câncer e algumas infecções fúngicas (BONA et al., 2014).

Melo e colaboradores (2011) analisaram artigos com possíveis ação anticâncer no Brasil, e verificaram que 84 espécies de plantas medicinais foram mencionadas como sendo úteis no tratamento de tumores benignos e malignos. Dentre as plantas mais frequentemente citadas, está a *Euphorbia tirucalli* L. pertencente a família euphorbiaceae.

## 2.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE O CÂNCER

Em efeitos naturais bioquímicos do nosso organismo, as células são capazes de nascer, se desenvolver, diferenciar e por fim morrer. Quando algo disso dá errado, por exemplo, inativação de genes responsáveis pela apoptose (morte celular programada), bem como mutações ocasionadas por agentes químicos, físicos ou biológicos, com a conseqüente perda de controle da proliferação celular e dos mecanismos de homeostase da célula, dá-se o nome de neoplasia (DRAKE et al., 2012).

O termo neoplasia refere-se a todos os tumores benignos e malignos, no entanto, a terminologia câncer refere-se especificamente ao crescimento anormal,

irrestrito e não regulado de células, que ao formar massas denominadas tumores e podem levar o indivíduo à morte (MBAVENG et al., 2011). Sabe-se que originalmente estas células modificadas são geradas em função de um desequilíbrio no corpo (MADHURY; PANDEY, 2009). A principal característica dessa enfermidade é o descontrole celular, diferenciação e posteriormente invasão dos órgãos e tecidos.

O INCA mostra que a incidência do câncer no mundo cresceu 20% na última década, sendo considerada uma das doenças mais graves e que mais atingem a população. No Brasil, é previsto o aparecimento de 600 mil novos casos de câncer para o ano de 2018. Para o mesmo ano, o INCA (Instituto Nacional de Câncer) informou uma estimativa dos 10 tipos de câncer mais prevalentes em homens e mulheres. De acordo com esses dados, estão entre eles: leucemias (10.800) pulmão (31.270) intestino (36.360) e cavidade oral (14.700). Esse fato contribui progressivamente com a elevação do número de mortes no Brasil (INCA, 2018).

As formas de tratamento do câncer estão em torno de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea (INCA, 2018). Porém, é preciso destacar algumas limitações relacionadas a esses tratamentos, que estão associados à promoção de danos às células normais (PALUMBO et al., 2013). Ainda, o desenvolvimento de resistência à quimioterapia por parte das células cancerígenas e a ocorrência de recidivas são fatores limitantes (REBUCCI; MICHIELS, 2013; Wang et al., 2013) e ainda invariavelmente estão associados a presença de efeitos colaterais como a alopecia, diarreia, vômitos e outros (Alonso-castro et al., 2011).

Nesse sentido, além dos métodos convencionais, existe uma extensa procura por novas drogas, que sejam menos agressivas ao organismo (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001). Com isso, essa doença vem sendo alvo de pesquisas para desenvolvimento ou descobertas de novos fármacos. Muitas substâncias cujas origens se encontram nas plantas têm hoje papel de grande importância na terapia antineoplásica. Neste contexto, *E. tirucalli* L. tem apresentado efeitos antitumorais a despeito de seus diferentes compostos (MELO et al., 2011).

Segundo Avelar (2011) o látex de *Euphorbia tirucalli* L. estimula o organismo a produzir citocinas, que estimulam o sistema imune e ajuda combater tumores. De acordo com OLIVEIRA; EVANGELISTA (2014) no Brasil e em vários outros países, o

látex de *Euphorbia tirucalli* L. é utilizado como agente antitumoral contra câncer de mama, próstata, rim entre outros.

## 2.8 CONSIDERAÇÕES SOBRE INFECÇÃO FÚNGICA

Ao longo dos últimos dez anos, a incidência de infecções fúngicas tem aumentado, apresentando-se principalmente como infecções nosocomiais (Tortora *et al.*, 2005). Em países desenvolvidos, 10% das infecções nosocomiais são causadas por fungos, e o gênero *Candida ssp.* é responsável por cerca de 80% dessas infecções em ambiente hospitalar (MONTAGNER, 2007). Embora a espécie *C. albicans* seja o agente etiológico mais comum e mais patogênico aos seres humanos outras espécies de interesse clínico vem sendo isoladas. Dentre as espécies envolvidas as mais prevalentes são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; SILVA *et al.*, 2015).

O tratamento para as infecções fúngicas pode ser de uso tópico e sistêmico, e são utilizados de acordo com o quadro clínico e estado geral do paciente. Sendo assim, a escolha de um fármaco para o tratamento é instituída pelo clínico, que avaliará a resposta imunológica do paciente frente à infecção (RAMESH *et al.*, 2011; FU *et al.*, 2012; SHIBATA *et al.*, 2012) No entanto, concomitante ao aumento no número de infecções de etiologia fúngica observa-se um aumento no uso de antifúngicos, devido a ocorrência de fatores indesejáveis como o surgimento de resistência de algumas cepas aos antifúngicos convencionais principalmente quando são utilizados de modo indiscriminado, e em indivíduos imunodeprimidos (ALVES, 2006).

Nesse contexto, preparações de tecidos vegetais ou produtos isolados de diversas plantas tem demonstrado ação antimicrobiana sobre microrganismos resistentes, para tanto, testes *in vitro* permitem avaliar seu potencial antimicrobiano (POSTERARO; SANGUINETTI, 2014).

Novas terapêuticas à base de plantas com potencial antimicrobiano têm sido estudadas. PAREKH E CHANDA (2008) mostrou que o extrato metanólico da *E.tirucalli* L. foi capaz de inibir o crescimento de leveduras do gênero *candida ssp.* CHANDA e BARAVALIA (2010) observaram que o extrato metanólico da *E.tirucalli* L.

foi capaz de inibir o crescimento de *C.albicans*, *C.neoformans*, *C.tropicalis* e *C.leuteolus*. PRASAD (2011) demonstrou que extratos de *E. tirucalli* L. revelaram atividade antifúngica contra microorganismos, entre eles *C. albicans*. Várias metodologias são descritas para a preparação de extratos vegetais com o intuito de analisar sua ação antimicrobiana. A ação antifúngica pode ser avaliada utilizando algumas técnicas básicas: entre elas o método de microdiluição em caldo, baseado nos documentos M27-A3 (CLSI, 2008) para fungos.

## 2.9 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE COMPOSTOS

### 2.10 INVESTIGAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

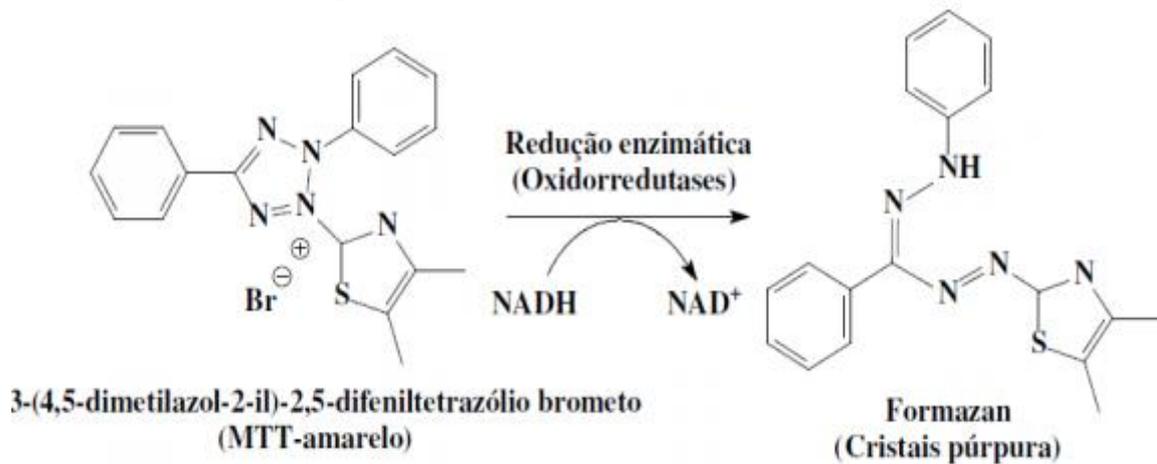
Os ensaios de citotoxicidade envolvendo células normais e cancerígenas são amplamente utilizados no processo de triagem de substâncias bioativas. Deste modo, a verificação de danos a células normais causados por potenciais ferramentas farmacológicas são imprescindíveis. O estudo da citotoxicidade de produtos naturais ou sintéticos sobre células cancerígenas proporciona resultados rápidos e confiáveis, além de fornecer subsídios para o prosseguimento dos estudos, evitando o uso desnecessário de modelos animais (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; SARZAEEM et al., 2011; PAYDAR et al., 2014).

Embora alguns estudos indiquem o possível uso seguro de produtos naturais que não apresentam efeitos citotóxicos ao material genético de células normais, diversos trabalhos relatam produtos naturais que se apresentam citotóxicos tanto para células cancerígenas como para células normais (BOEIRA et al., 2009; BECHELLI et al., 2011; CALHELHA et al., 2014).

Entre os testes mais utilizados na avaliação da citotoxicidade, está o teste do MTT (RIBEIRO et al., 2013). Este teste baseia-se na conversão do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio em azul de formazan a partir da ação das enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas, atuando como um indicador de viabilidade celular. O estudo citotóxico pelo método do MTT trata-se de um método colorimétrico quantitativo, permitindo assim definir a citotoxicidade, porém não o mecanismo de ação (GRAIDIST; MARTLA;

SUKPONDMA, 2015). São considerados citotóxicos extratos com concentração maior que 30µg/mL (ALONSO-CASTRO et al., 2011).

**Figura 3-** Reação do MTT com a enzima mitocondrial redutase. A viabilidade é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela), pela atividade metabólica celular a formazan (um sal de coloração violeta)



Fonte: Ribeiro et al., (2013).

## 2.11 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos está atrelada a vários testes, entre os quais merecem destaque o método de diluição em caldo (macrodiluição e microdiluição) A realização do teste de suscetibilidade antifúngica *in vitro* têm se tornado um teste preditivo de grande valor terapêutico, já que tais testes possibilitam à seleção de agentes eficazes a fim de combater os fungos causadores de infecções fúngicas (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Os testes de susceptibilidade antifúngica são padronizados internacionalmente pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e são baseados na medição do crescimento fúngico em diferentes concentrações do fármaco, de modo a determinar faixas de referências para a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de um determinado isolado clínico. Dessa maneira, o valor *in vitro* é determinado a fim de prever a eficácia terapêutica.

Os valores *in vitro* são definidos a partir de correlações *in vivo*, os quais determinam os pontos de corte (*breakpoints*) para a interpretação dos resultados

dos isolados clínicos, fornecendo um indicador útil a fim de orientar uma escolha terapêutica adequada (CLSI, 2008; PFALLER E DIEKEMA, 2012). De acordo com o documento M27-A3, a CIM é definida como a menor concentração do antifúngico capaz de promover aproximadamente 50% de inibição do crescimento para as equinocandinas.

O mesmo documento recomenda que a leitura do teste para espécies de *Candida* seja realizada após 24 horas frente as equinocandinas, e após 48 horas frente aos azólicos, devido ao crescimento indefinido (denominado *trailing*) no qual é uma inibição parcial promovida pelo fármaco ao decorrer das primeiras horas do teste em todas as concentrações estabelecidas. Esse tipo de ocorrência pode ser observado em alguns isolados clínicos, que com 24 horas parecem sensíveis e com 48 horas apresentam-se como resistentes. Diante disso, pesquisas apontaram que isolados com esse tipo de comportamento devem ser classificados como sensíveis ao invés de resistentes devido ao crescimento indefinido dos mesmos (ROBERTO, 2016).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

Os ramos da *Euphorbia tirucalli* L. foram coletados no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A confirmação da Taxonomia foi realizada pela botânica Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Pereira. O depósito da exsicata foi incorporada ao Herbário da Universidade Federal do Pernambuco (UFPE), sob o protocolo de nº 91421. Os ramos de *E.tirucalli* L. utilizados nesse estudo foram coletados em novembro de 2017, às 14h 38 min, sob as seguintes coordenadas (8.0476797 de latitude e 34.9497628 de longitude).

#### 3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DOS RAMOS DE *EUPHORBIA TIRUCALLI* L.

Os ramos foram lavados e secos em papel toalha e seccionados em pedaços pequenos com o auxílio de uma tesoura comum. O material foi posto para secar à temperatura ambiente em local ventilado por um período de uma semana. Depois de seco, o material foi moído em liquidificador, reduzido a um pó fino e armazenados em frascos de vidro com tampa em local fresco e seco à temperatura ambiente.

O pó de *E. tirucalli* L. foi pesado e extraído em Soxhlet na proporção de 6 g de planta seca para 400 mL de cada solvente (hexano, acetato de etila e etanol) por um período de 5 horas. Posteriormente os extratos foram concentrados por rotaevaporação em temperatura de 40 °C para eliminação dos solventes. Os extratos secos foram armazenados em recipientes de vidro, e mantidos ao abrigo da luz. Posteriormente os extratos foram pesados e tiveram seus rendimentos calculados.

#### 3.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA QUALITATIVA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *EUPHORBIA TIRUCALLI* L.

Na triagem fitoquímica, o material pulverizado foi submetido a testes qualitativos de precipitação e coloração específicos para as principais classes de metabólicos secundários, conforme SAVITHRAMMA (2011). As classes de

metabólitos secundários pesquisadas foram: flavonoides, alcaloides, terpenos, esteroides, taninos, saponinas, cumarinas, quinonas e glicosídeos.

**Tabela 1-** Análise fitoquímica do extrato etanólico dos ramos da espécie *Euphorbia tirucalli* L. conforme Savithramma (2011).

<b>Metabólitos secundários</b>	<b>Métodos de avaliação</b>	<b>Observação</b>
Flavonóides	2 mL de extrato, adicionou-se 1 mL de hidróxido de sódio + agitação.	Surgimento de coloração amarela.
Alcalóides	2 mL do extrato + 2 mL de ácido clorídrico concentrado, e posteriormente acrescentou-se três gotas do reagente de Mayer.	Formação de cor verde ou precipitação branca.
Terpenos	0,5 g do extrato, acrescentou-se 2 mL de clorofórmio e agitou-se. Posteriormente adicionou-se três gotas de ácido sulfúrico concentrado + agitação.	Coloração marrom, avermelhada na interface.
Triterpenos/Esteroides	0,5 mL de extrato + 2 mL clorofórmio e 1 mL de ácido sulfúrico	Formação de anel marrom avermelhado na interface.
Taninos	0,5 mL do extrato + 1 mL de cloreto férrico 5% + agitação.	Formação de cor azul escuro ou preta esverdeada.
Saponinas	2 mL de extrato + 5 mL de água destilada + agitação por 3 min.	formação de uma camada de espuma persistente por mais de 30 mim.
Cumarinas	1 mL do extrato + 1 mL de hidróxido de sódio 10%.	Formação de cor amarela.
Quinonas	1 mL do extrato + 1 mL de ácido sulfúrico concentrado.	Formação de cor vermelha.
Glicosídeos	2 mL de extrato + 3 mL de clorofórmio e solução de amônia a 10%.	Formação de cor rosa.

### 3.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (GC-MS)

Uma fração hexânica foi submetida a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas (CG-MS).

#### 3.4.1 Parâmetros da CG-MS

A temperatura do forno foi programada a 70°C com taxa de crescimento de 4°C/ min até 280° e mantido por 15 min. O gás de arraste foi hélio com fluxo constante de 1.4 ml/min. A temperatura da fonte de íons foi mantida a 280°C, a energia de ionização a 70eV. Os espectros de massa foram gravados em um intervalo de 30 até 450 m/z e identificados com a biblioteca de compostos NIST 11 comparando seus índices de retenção e padrões de fragmentação.

### 3.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

A técnica foi realizada através do método de microdiluição em caldo, baseado nos documentos M27-A3 (CLSI, 2008) para fungos leveduriformes. Essa metodologia avalia a Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a concentração mais baixa da substância que inibe completamente o crescimento do micro-organismo. A interpretação dos resultados baseia-se na turvação ou não das cavidades da microplaca de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). A turvação evidencia a ineficácia da amostra na concentração testada perante o micro-organismo, enquanto que a limpidez indica a concentração inibitória mínima (CIM) da fração testada em relação ao micro-organismo em questão.

### 3.6 PREPARO DO MEIO DE CULTURA RPMI-1640

O meio de cultura utilizado para realização do teste e diluição da droga foi o meio líquido RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH 7,0 ± 0,1, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; 0,165 mol.L<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de 0,22 µm (Millipore, Darmstadt, Alemanha). O agente antifúngico comercial utilizado foi

anfotericina. Concentrações de anfotericina B foram preparadas e usadas nos intervalos de 0,125 a 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

### 3.6.1 Preparo do inóculo

O teste antifúngico utilizado incluiu 6 leveduras: *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. cedidas pelo laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos do centro de Biociências da UFPE. Para o preparo das suspensões dos inóculos, com 24 horas de antecedência, realizou-se o repique das culturas puras pela técnica de esgotamento, em tubos estéreis com ágar sabouraud dextrose, que permaneceram incubados a temperatura constante de 35 °C. O inóculo foi preparado escolhendo-se cinco colônias de cada uma das culturas, as quais foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril a 0,85%. A suspensão resultante foi agitada com auxílio de vórtex e sua densidade celular ajustada em espectrofotômetro a 530 nm para obter a absorbância equivalente de uma solução-padrão do tubo 0,5 da escala de McFarland em 90% de transmitância. O inóculo de trabalho foi produzido por duas diluições sucessivas de 1:100 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI-1640, resultando em inóculo com concentração de  $1-5 \times 10^6$  céls.mL<sup>-1</sup>

### 3.6.2 Determinação da atividade antifúngica *in vitro*

Na placa contendo 100  $\mu\text{L}$  do meio RPMI 1640 em cada poço, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do extrato de *Euphorbia tirucalli* L. para os ensaios com cepas de *Candida*. As concentrações utilizadas dos extratos foram: 64  $\mu\text{g.mL}$ , 32  $\mu\text{g.mL}$ , 16  $\mu\text{g.mL}$ , 8  $\mu\text{g.mL}$ , 4  $\mu\text{g.mL}$ , 2  $\mu\text{g.mL}$ , 1  $\mu\text{g.mL}$ , 0,5  $\mu\text{g.mL}$ , 0,25  $\mu\text{g.mL}$ , 0,125  $\mu\text{g.mL}$ , até o poço 10 da microplaca. Em seguida foram adicionados 100 $\mu\text{L}$  do inóculo ajustado aos poços da microplaca. Todos os controles foram devidamente realizados, entre os quais, controle negativo, poço 11 (meio de cultura e inóculo), os 4 primeiros poços da coluna 12, controle positivo (contendo apenas o meio de cultura), controle do extrato da *Euphorbia tirucalli* L., 4 últimos poços da coluna 12 (extrato e meio). As microplacas foram levadas a estufa e incubadas a 35 °C por um período de 24 horas para determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas

(CIM). As CIM para Anfotericina B foi determinada para 50% de inibição em relação aos poços controles. O teste foi realizado em duplicata.

### 3.7 LINHAGENS CELULARES

Neste estudo foram utilizadas as linhagens celulares L929 (fibroblasto de camundongos), HaCaT (queratinócitos humano), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano) que foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), as linhagens SCC9 (carcinoma epidermoide de língua humana), SCC15 (carcinoma epidermoide oral humana) foram mantidas em DMEM/F12 e HL-60 (leucemia promielocítica aguda humana), K562 (leucemia mielocítica crônica humana) mantidas em meio de cultura RPMI 1640. As linhagens foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro e mantidas no laboratório de cultura de células do departamento de Antibióticos da UFPE. Todos os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e incubadas a 37 °C com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a 5 % e atmosfera umidificada.

#### 3.7.1 Ensaio citotóxico

O ensaio citotóxico foi avaliado através do método MTT, que baseia-se na conversão do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio em azul de formazan a partir da ação das enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas, atuando como um indicador de viabilidade celular (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983)

Inicialmente foi feita uma contagem do número de células em câmara de Neubauer. As linhagens foram ajustadas na concentração de 10<sup>5</sup> céls/mL para as seguintes linhagens (L929, HaCaT, NCI-H292, SCC9, SCC15, HT-29 e MCF-7 e 3 x 10<sup>5</sup> células/mL para as linhagens HL-60 e K562). Em seguida as amostras dissolvidas em DMSO (0,5 %) foram adicionadas aos poços nas concentrações de 0,39 a 50 µg/mL e as placas foram incubadas por 24 h, 37°C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO<sub>2</sub>. A doxorrubicina (0,078 a 10 µg.mL<sup>-1</sup>) foi utilizada como fármaco padrão. Os poços contendo apenas as células, meio de cultura e o veículo

foram utilizados como controle negativo. Após a incubação por 72 h foi adicionado 25  $\mu\text{L}$  de MTT ( $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em cada poço e as placas reincubadas por 3 h. Em seguida o sobrenadante foi aspirado e os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO ( $100 \mu\text{L}$ ). A absorbância foi medida em espectrofotômetro de placas no comprimento de onda de 560 nm (Figura 2).

O experimento foi realizado em triplicata. A  $\text{CI}_{50}$  (Concentração que inibe 50 % do crescimento em relação ao controle negativo) e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foi calculada a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism 7.0. demo*.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras com atividade (95 a 100 % de inibição), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 70 a 90%) e sem atividade (inibição de crescimento menor que 50 %) (RODRIGUES et al., 2014).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### a) Análise fitoquímica

A análise fitoquímica revelou a presença de flavonóides, alcalóides, triterpenos e esteroides, fenóis, cumarinas e quinonas (Tabela 2).

**Tabela 2-** Resultados da análise fitoquímica preliminar do extrato etanólico dos ramos da *Euphorbia tirucalli* L. conforme Savithramma (2011).

Classe de metabólitos secundários	Critérios de avaliação	Resultados
Flavonoides	Surgimento de coloração amarela.	+
Alcalóides	Formação de cor verde ou precipitados brancos.	+
Terpenos	Coloração marrom, avermelhada.	-
Triterpenos/Esteróides	Formação de anel marrom avermelhado.	+
Taninos	Formação de cor azul escuro ou cor preta esverdeada.	-
Saponinas	Camada de espuma.	-
Fenóis	Formação de cor azul / verde.	+
Cumarinas	Formação de cor amarela.	+
Quinonas	Formação de cor vermelha.	+
Glicosídeos	Formação de cor rosa.	-

Comparando os resultados desta pesquisa com as análises fitoquímicas feitas em plantas da mesma espécie, pode-se verificar semelhanças entre os resultados para alcaloides e triterpenos (MACHADO, 2007), flavonoides (ORLANDA, 2015), compostos fenólicos bem como esteróides (SINGH, 2015). Embora os resultados não apresentem saponinas e taninos, existem registros da presença destes compostos na literatura (ORLANDA, 2015; VALE E ORLANDA, 2011). A quantidade e o tipo dos extrativos pode variar de espécie para espécie, assim como são evidentes variações nos teores dessas substâncias entre indivíduos dentro de uma mesma espécie. Isso deve-se a aspectos relacionados ao solo, clima, coleta de material, temperatura, reagentes químicos, dentre outros (GOBBO-NETO, 2007).

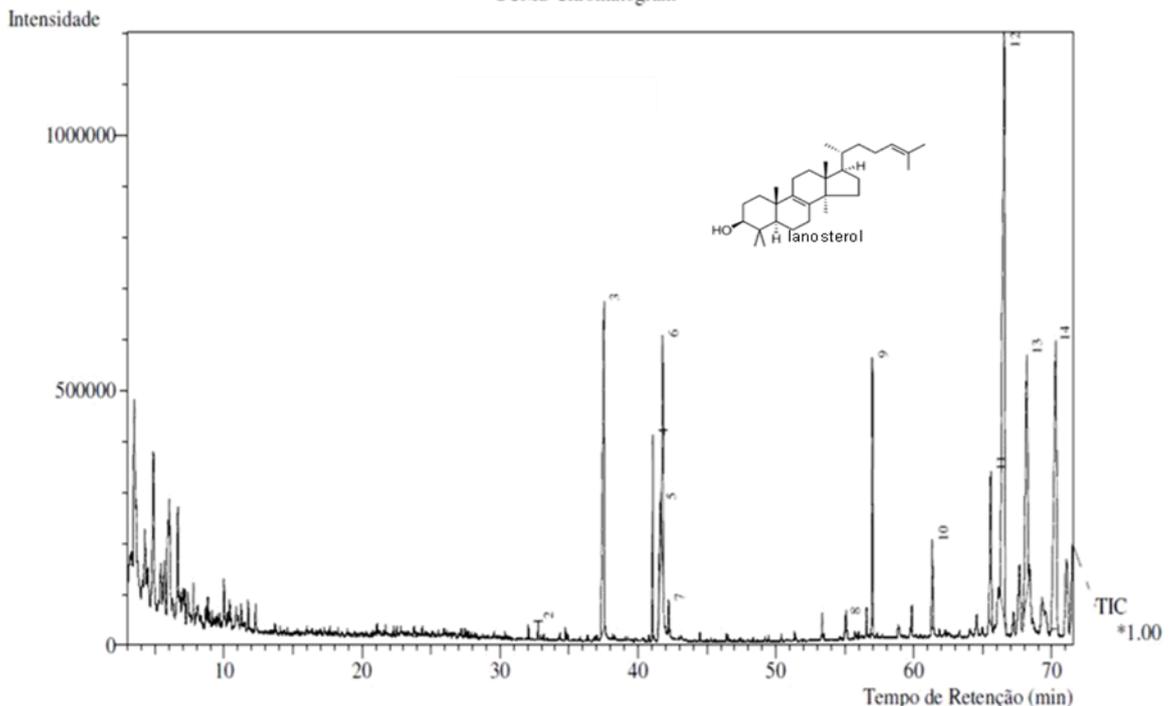
Algumas das classes de compostos identificados no presente trabalho são vistas como importantes no combate a microrganismos (UPADHYAY et al., 2010). Nesse contexto os compostos fenólicos são considerados tóxicos aos microrganismos (ARAUJO, 2013). Dentre os compostos fenólicos, destacam-se os flavonoides com comprovada atividade fungicida contra *C. albicans* e *C. krusei* (ORHAN et al., 2010; SELEEM et al., 2017). Além destes, essa atividade também pode ser atribuída as cumarinas que igualmente apresentam atividade antifúngica (STEIN et al., 2006; SINGH et al., 2010; THATI et al., 2007).

A análise fitoquímica preliminar permite uma visão geral das classes de metabólitos secundários presentes nas plantas mas, estudos mais aprofundados são necessários para determinar o princípio ativo do extrato analisado.

## b) Identificação dos compostos por CG-MS

A análise por GC-MS (figura 1) revelaram catorze picos presentes no extrato hexânico de *E.tirucalli* L. O cromatograma apresenta, tempo de retenção (RT), composto identificado, a formula molecular e o porcentual das substancia no extrato, listados na Tabela 3.

**Figura 4-** Perfil químico do extrato hexânico da *Euphorbia tirucalli* L. mostrando os diferentes picos de compostos presentes no extrato.



\*Destaque para o espectro de fragmentação da substância com (%) total de 31.59 (lanosterol)

**Tabela 3-** Constituintes químicos identificados no extrato hexânico de *Euphorbia tirucalli* L. por GC-MS.

Pico	RT (Min)	Constituintes	Formula molecular	Massa molecular (g/mol)	% Total
<b>Ácidos graxos</b>					
1	32.050	Ác. undecanoico	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	1860	0.22
2	32.767	Ácido graxo não identificado	Não identificado	124	0.31
3	37.533	Ac. hexadecanoico (Ac. Palmítico)	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256	12.52
5	41.625	Ác linoleico	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280	1.63
7	42.225	Ac. esteárico	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284	0.48
<b>Hidrocarboneto</b>					
4	41.067	Fitol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296	3.44
<b>Ester de ácido graxo</b>					
6	41.783	9-octadecenoato de metila	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	296	5.45
<b>Hidrocarbonetos</b>					
8	55.017	Hidrocarboneto não identificado	Não identificado	290	0.23
9	56.992	Octacosano	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>	394	5.10
10	61.333	Eicosano	C <sub>28</sub> H <sub>40</sub>	282	2.42
<b>Triterpenoides</b>					
11	65.567	Triterpeno não identificado	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	426	5.53
12	66.533	Lanosterol	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	426	31.59
13	68.183	Triterpeno não identificado	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	426	12.83
14	70.275	Lupenona	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O	424	18.26

Na análise por GC-MS, alguns dos compostos foram identificados utilizando-se o banco de dados da biblioteca Wiley, com base na similaridade de mais de 90% (substâncias: 1, 3, 4, 5, 9). Para os compostos não identificados pela biblioteca de espectros de massa, foram comparados com substâncias idênticas citadas na literatura (substâncias: 2,6,7,8,10,11,12,13 e 14). O lanosterol foi o principal constituinte desse extrato. Alguns dos constituintes químicos identificados no extrato hexânico dos ramos de *E. tirucalli* L. já foram isolados nessa espécie. Já foram identificados lanosterol e eufol (MACHADO, 2007; SHAIKHLI; JANABI, 2017) ácido hexadecanóico, ácido 9,12-octadecadienóico, lupenona e octacosano (HANI et al., 2010; WANG et al., 2011).

Estudos mostram que alguns dos compostos identificados na espécie *E. tirucalli* L.. exibem bioatividades. O lanosterol identificado no cromatograma como principal constituinte dessa fração apresenta atividade anticancerígena reportada por CHUNG (2010). O ácido hexadecanóico apresenta atividade citotóxica frente a células tumorais de carcinoma colo-retal humano (HCT-116) (RAVI & KRISHNAN, 2017) assim como a lupenona apresenta efeito anti-câncer contra células de câncer de mama MCF-7 (AHMAD et al., 2015). Além desses, alguns hidrocarbonetos como o fitol, mostram atividade anti-inflamatória (SHIMIZU; TOMOO, 1994) e anti-câncer (TOMITA, 1983).

### **c) Teste de suscetibilidade antifúngica *in vitro***

Para cada experimento de suscetibilidade antifúngica, os controles do inóculo mostraram um crescimento claramente detectável ao tempo de incubação, indicando que todos os isolados foram viáveis e que as condições utilizadas foram adequadas para o crescimento fúngico. O *breakpoint* com a respectiva CIM de cada fração testada, bem como os valores da anfotericina B encontram-se sumarizados na Tabela 4. Os isolados clínicos de *Candida* spp. não demonstraram resistência frente a anfotericina B. Assim, podemos observar que todas as leveduras tiveram uma boa resposta frente aos antifúngicos testados.

**Tabela 4-** Resultados do teste de suscetibilidade antifúngica *in vitro* das 6 leveduras de *Candida* ssp. analisadas neste estudo.

N° Isolado	Espécies isoladas	Anfotericina B(µg/mL)	Extratos (µg/mL)		
			Hexânico	Acetato de étila	Etanol
595	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	1	NT	2
473	<i>C. albicans</i>	0,5	2	64	1
7583	<i>C. glabrata</i>	1	2	64	1
9415	<i>C. glabrata</i>	1	1	32	0,5
2209	<i>C. parapsilosis</i>	1	1	64	1
6528	* NT, não testado	devido o CIM não ter sido estabelecido.	NT	NT	1

A atividade antifúngica dos extratos aqui analisados foram considerados ativos quando exibiram valores de CIM igual ou inferior a mais alta concentração 64µg/mL testada. Os extratos hexânico e etanólico demonstraram atividade (CIM ≤ 2 µg/mL) contra os isolados testados, enquanto que todos os extratos foram considerados ativos contra pelo menos um ou mais isolados.

Dos extratos avaliados, verificou-se que o extrato etanólico apresentou espectro de ação mais amplo, devido ter inibido o crescimento de todos os isolados e permitiu determinar a CIM. Em relação a ação do extrato etanólico, o isolado de *C. parapsilosis*, requereu a concentração 2 µg/mL para ser inibido, enquanto que, os isolados *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* foram inibidos na concentração 1 µg/mL. A concentração mais baixa capaz de inibir o crescimento fúngico, foi vista na concentração 0,5 µg/mL, frente a *C. glabrata*. O CIM das espécies avaliadas frente ao antifúngico anfotericina B, foram similarmente comparadas aos obtidos frente ao extrato etanólico, no qual foi observado zona de inibição semelhantes e valores idênticos 1 µg/mL para as espécies *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*.

Diferente dos nossos resultados, Santos-Filha (2018), buscando atividade antifúngica do extrato etanólico das partes aéreas de *E. tirucalli* L., não obteve resultados satisfatórios frente a *C. albicans*. Oliveira *et al* (2014) também reportaram ausência dessa atividade no extrato aquoso das partes aéreas de *E. tirucalli* L., frente à *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, e *C. glabrata*. Vale salientar que os diferentes resultados, podem estar relacionados com o método de extração, bem como a dose utilizada, uma vez que, estudos demonstram que a concentração dos

metabólitos secundários presentes nas plantas, bem como o solvente de extração, podem sofrer alterações quantitativas em função da influência de fatores climáticos, como a época de plantio e colheita, fornecimento hídrico, horário de coleta, e outros fatores às quais as espécies vegetais estão submetidas (NETO; LOPES, 2007).

O extrato hexânico mostrou-se como o segundo mais efetivo frente aos microrganismos teste. *Candida parapsilosis* e *C. glabrata* foram encontrados mais sensíveis quando comparados aos demais microrganismos. Quando comparado aos valores obtidos do antifúngico anfotericina B, ao extrato hexânico, pôde-se obter valores idênticos 1µg/mL para *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Prasad *et al.*, (2011) reportaram ausência da atividade do extrato hexânico das partes aéreas da *E.tirucalli* L. contra *C. albicans*.

Considerando as CIMs, de modo geral, o extrato de acetato de etila demonstrou os menores valores frente a todos os isolados, além de demonstrar-se ineficazes na inibição de *C. parapsilosis* e *C. krusei*, só sendo possível determinar a CIM desse extrato, frente a *C. glabrata* (32 µg/mL). Estes resultados podem ser comparados com os reportados por Santos-Filha (2018), no qual foi utilizado o extrato de acetato de etila contra *C. albicans*, não obtendo inibição. Oliveira *et al.*, (2014) reportaram ausência dessa atividade para alguns fungos, entre eles, *C. albicans*. Filho (1998) relata que resultados negativos não significam ausência de componentes bioativos nem que o extrato da planta esteja inativo. O(s) composto(s) ativo(s) pode estar presente em quantidades insuficientes nos extratos para mostrar a atividade com os níveis de dose utilizados e as estirpes utilizadas.

Os resultados gerais sugerem que dentre os microrganismos avaliados, *C. glabrata* mostrou-se mais sensível frente aos extratos, seguida de *C. parapsilosis*, enquanto que *C. krusei*, mostrou-se mais resistente.

A atividade antifúngica relatada nesse estudo pode estar atribuída à presença de alguns constituintes ativos na *E.tirucalli* L., uma vez que algumas das classes de compostos identificados na análise fitoquímica têm sido relatado na literatura sobre a atividade antifúngica. Compostos fenólicos isolados de espécies de *Euphorbia* mostram potencial antifúngico (FERREIRA *et al.*, 2006). Orhan *et al.*, (2010) relataram a atividade dos flavonóides frente a vários microrganismos, entre eles *C. albicans* e *C. krusei*. Seleem *et al.*, (2017) também relata essa atividade frente *C. albicans*. Essa atividade também pode ser atribuída às cumarinas, uma vez que foram identificadas como responsáveis pela atividade antifúngica frente a

patógenos humanos como a *C. albicans* e *C. neoformans* (MONTAGNER et al., 2008). Estudos mostram o potencial antifúngico dos alcalóides frente a espécies de *Candida* (ARIF et al. 2009; DABUR et al., 2005; EMILE et al., 2007).

#### d) Ensaio citotóxico

Vários estudos de citotoxicidade têm avaliado a atividade antitumoral de compostos presentes em *E.tirucalli* L., frente a diversas linhagens celulares tumorais *in vitro* como, por exemplo, contra células de câncer pancreático (MUNRO et al., 2015), câncer de mama (CHOENE; MOTADI, 2016) e carcinoma epidermóide de laringe (FRANCO, 2014).

A atividade citotóxica dos extratos testados na concentração de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  está apresentada na tabela 5 e 6, com seus respectivos percentuais de inibição sobre as linhagens. Todos os extratos apresentaram atividade citotóxica moderada (> 70% de inibição) frente a HL-60 e foram submetidos a diferentes concentrações (0,39 a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para a determinação da concentração que inibe 50 % do crescimento celular em relação ao controle negativo ( $\text{CI}_{50}$ ) (Tabela 7).

**Tabela 5-** Percentual de inibição (%) dos extratos de *E. tirucalli* L. em linhagens celulares saudáveis, após 72h de exposição.

Produtos testes	Linhagens Celulares	
	L929	HaCat
Ext. hexânico	11,24±0,77	40,40±1,03
Ext. acetato de etila	NT	NT
Ext. etanólico	11,79±0,77	24,68±2,65
Doxorrubicina	<b>67,57±2,93</b>	<b>83,97±3,74</b>

\* NT não testado. Os dados estão apresentados em percentagem  $\pm$  desvio padrão. L929 (fibroblasto de camundongos), HaCaT (queratinócitos humano).

**Tabela 6-** Percentual de inibição (%) dos extratos de *E. tirucalli* L. em linhagens celulares cancerígenas, após 72h de exposição.

Produtos testes	Linhagens Celulares					
	SCC9	SCC15	NCI-H292	HL-60	K-562	HT-29
Ext. hexânico	55,31±6,55	24,04±2,54	47,65±1,48	<b>94,54±1,82</b>	35,60±7,29	46,77±0,08
Ext. acetato de etila	55,15±8,10	59,15±2,55	63,99±2,98	<b>75,71±0,31</b>	NT	50,67±0,29
Ext. etanólico	11,08±1,17	20,62±3,07	24,69±1,25	<b>84,74±1,45</b>	3,45±2,68	23,27±1,08
Doxorrubicina	<b>87,44±1,89</b>	<b>81,03±0,57</b>	<b>71,83±0,71</b>	<b>95,32±1,69</b>	NT	NT

\* **NT não testado. Os dados estão apresentados em percentagem  $\pm$  desvio padrão.** SCC9 (carcinoma epidermoide de língua humana), SCC15 (carcinoma epidermoide oral humana), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HL-60 (leucemia promielocítica aguda humana), K562 (leucemia mielocítica crônica humana) e HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano).

Analisando os valores de inibição para ambos os extratos, tem-se a fração hexânica como a mais potente, mostrando inibição de crescimento celular, com percentuais de 94,54% para HL-60. Todos os extratos obtiveram inibição acima de 75% na linhagem testada HL-60, valor esse usado como critério para determinar a IC<sub>50</sub>. A tabela 6 mostra os valores de CI<sub>50</sub> obtidos, verificando assim que a linhagem HL-60 foi a mais sensível à ação inibitória das amostras testadas.

**Tabela 7-** CI<sub>50</sub> dos extratos hexano, acetato de etila e etanólico de *E. tirucalli* L. em células tumorais humanas.

Linhagem	CI <sub>50</sub> (µg/mL) Intervalo de confiança
	HL-60
<b>Ext. hexânico</b>	1,38 (0,96 $\pm$ 2,00)
<b>Ext. acetato de etila</b>	1,39 (1,14 $\pm$ 1,70)
<b>Ext. etanólico</b>	1,69 (1,26 $\pm$ 2,27)
<b>Doxorrubicina</b>	0,04 (0,03 $\pm$ 0,05)

A citotoxicidade pode ser avaliada através dos valores de IC<sub>50</sub>, que corresponde a concentração de morte celular para 50% de uma cultura (Assaf *et al.*, 2013). Neste contexto a partir dos ensaios de MTT, foi calculado o valor de IC<sub>50</sub> dos extratos frente a linhagem HL-60. Os extratos apresentaram valores de IC<sub>50</sub> de 1,38 a 1,26 µg/mL frente a HL-60.

Neste trabalho o potencial de inibição do crescimento celular foi diferente e específico para cada tipo de célula e extrato. De acordo com a escala de intensidade de atividade segundo (Rodrigues *et al.*, 2014), utilizada nesse estudo, pôde-se determinar que todos os extratos apresentaram atividade moderada frente à linhagem (HL-60).

Choene (2016) testou a propriedade anticâncer do extrato hexânico da *E.tirucalli* sobre linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). Seus

resultados mostraram que esse extrato inibiu efetivamente o crescimento das células, com IC<sub>50</sub> de 50 µg/mL em MDA-MB-231 e 30 µg/mL frente a MCF-7. Este resultado também foi reportado por Munro, (2015) que avaliou o extrato metanólico em diferentes concentrações sobre células de câncer pancreático humano (Mia-PaCa2), seus resultados mostraram viabilidade celular de 50% bem como evidências para sugerir que os compostos da espécie *E.tirucalli* podem possuir propriedades anticâncer (Lin *et al.*, 2012). Outros estudos mostram que *E.tirucalli* apresenta ação citotóxica frente a outros tipos de linhagens tumorais. No estudo de Barbosa (2009) as linhagens de câncer de mama humano (MDA-MB-435), cólon humano (HCT-8) e glioblastoma (SF295) apresentaram percentual de inibição do crescimento celular de 40-89, 20-19, 23-50 respectivamente.

Baseado nos dados da literatura, as plantas medicinais são consideradas como promissoras agentes antitumorais quando apresentam citotoxicidade de seus extratos brutos valores de IC<sub>50</sub> ≤ 30µg/mL (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2011). Diante dessa informação, é possível concluir que todos os extratos aqui avaliados, foram considerados citotóxicos ao apresentar IC<sub>50</sub> variando de 1,38 a 1,69 frente a linhagem HL-60. Divergindo dos nossos resultados, alguns trabalhos realizados com essa espécie não se enquadram como promissores na terapia oncológica. Isso é mostrado por CAXITO, (2017), que avaliou o extrato etanólico das partes aéreas de *E.tirucalli* L., de diferentes regiões frente a linhagem celular de HL-60. Seus resultados mostraram atividade inibitória (60 a 70%). A IC<sub>50</sub> variou 113.06 a 300.70 µg/mL.

Com base na análise de identificação (CG-MS) e o conhecimento citotóxico das substâncias presentes no extrato hexânico dos ramos de *E. tirucalli* L., já descritas na literatura, é possível pressupor que os resultados promissores da fração hexânica, esteja associado à composição química desse extrato. O lanosterol identificado no cromatograma como principal constituinte dessa fração apresenta atividade anticancerígena reportada na literatura. Chung *et al.*, (2010) avaliaram a inibição do crescimento do lanosterol em linhagens celulares de carcinoma humano (células A-549 de carcinoma de pulmão, células AGS de adenocarcinoma de estômago, células MCF-7 de adenocarcinoma de mama, e células HeLa de adenocarcinoma cervical) *in vitro*. Seus resultados mostraram atividade citotóxica significativa contra a proliferação das linhagens celulares de câncer. Kahlos *et al.*

(1987) relataram que lanosterol também inibe a proliferação de MCF-7 células de adenocarcinoma.

O ácido hexadecanóico identificado no presente estudo, apresentou atividade citotóxica frente a células tumorais de carcinoma colorretal humano (HCT-116) reportado por RAVI E KRISHNAN (2017). Essa mesma substância apresentou citotoxicidade para células leucêmicas humana (Molt-4) (HARADA et al., 2002). A lupenona identificado nesse estudo, foi reportada por Ahmad *et al.*, (2015) por apresentar efeitos biológicos, tais como atividade anticâncer contra células de câncer de mama (MCF-7). e ainda se mostrou eficaz na redução da proliferação de células cancerígenas leucêmica (WEHI-3) (SUTTIARPORN et al., 2015).

Além desses, alguns hidrocarbonetos como o fitol, mostrou-se como potente anti-inflamatório (Shimizu & Tomoo, 1994) e citotóxico frente a linhagens de câncer de mama (MCF-7) e HeLa cervical (Pejin *et al.* 2014).

## 5 CONCLUSÃO

O extrato etanólico dos ramos da *E. tirucalli* L. inibe o crescimento de leveduras do gênero *Candida*, sugerindo a possibilidade de utilização deste extrato como meio alternativo no tratamento antifúngico. Além disso, a fração hexânica apresentou melhor efeito citotóxico na linhagem HL-60. Recomenda-se um estudo futuro para purificar e examinar os principais compostos bioativos destes extratos, e avaliar sua atividade anti-leucêmica, bem como antifúngica.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco. Ao Programa de Pós Graduação em Patologia – UFPE. A UNICAMP, ao Laboratório de Química de produtos Naturais- UFPE. Ao Laboratório de Cultura de Células - UFPE e ao Laboratório de Micologia Médica - UFPE. A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

## REFERÊNCIAS

- 14 BIS. Mais uma vez. 1987. Disponível em:  
[https://www.youtube.com/watch?v=w23zWp\\_fYuQ](https://www.youtube.com/watch?v=w23zWp_fYuQ). Acesso em: 10 mar. 2019
- ABREU, C.M.; PRICE, S.L.; SHIRK, E.N.; CUNHA, R.D, PIANOWSKI, L.F.; CLEMENTS, J.E.; TANURI, A.; GAMA, L. Dual role of novel ingenol derivatives from *Euphorbia tirucalli* in HIV replication: inhibition of de novo infection and activation of viral LTR. 2014; PLoS One, v.9, n.5, p.1-14.
- AFONSO NETO, I. S.; BESSA, E. A.; SOARES, G. L. G. Avaliação da atividade moluscicida do latex de tres especies de Euphorbia (Euphorbiaceae) sobre *Leptinaria unilamellata* D'Orbigny, 1835 (Gastropoda – Subulinidae). 2010; Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. Botucatu, v. 12, n. 1, p. 90-95.
- AHMAD ,S; SUKARI, M.A.; ISMAIL, I,S; N, DUL, A,B; BAKAR,M,F,A; KIFI, N, et al., Phytochemicals from Mangifera pajang Kosterm and their biological activities, BMC Complem. 2015; *Altern. Med.*; V. 15, P. 1.
- ALLEY, M. C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. 1988; *Cancer Research*, v. 48, p. 589-601,
- ALONSO, C, A. J; VILLARREAL, M,L; OLIVO, L,A,S; SANCHEZ, M,G; DOMINGUEZ, F; CARRANCA, A, G. Mexican medicinal plants for cancer treatment: phamacological, phytochemical and ethnobotanical studies. 2011; *Journal of Ethnopharmacology*. v. 113, p. 945-972.
- ALONSO-CASTRO, A. J. et al. Mexican medicinal plants for cancer treatment: phamacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 945-972.2011.
- ALVES EM, NEPOMUCENO JC. Avaliação do efeito carcinogênico do látex do ávelos (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. 2012; *Perquirere*. 9(2):125-40.
- ALVES, P, M; LEITE P, H,A,S; PEREIRA, J,V; PEREIRA L,F; PEREIRA, M S,V; HIGINO J,S; LIMA E, O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral. 2006; *Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.* V. 16(2) P.192-196.
- ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. 2007; *Journal of Ethnopharmacology*, v.109, n. 3,p. 464-471, Araújo, G.J; SOUZA,M,S; SIMÕES, V,J,L,P; GOMES,F,T. *et al.* Espécies da família Euphorbiaceae na alimentação animal. 2018; *Pubvet*. v.12, n.8, a147, p.1-8,
- ARAÚJO. KELINE MEDEIRO. Identificação de compostos fenólicos presentes em extratos de *euphorbia tirucalli* l., e avaliação de sua atividade antioxidante e antibacteriana (Dissertação de mestrado). Parnaíba. Universidade Federal do Piauí. programa de pós-graduação em Biotecnologia. 2013.

ARIF, T , J.D. KUMARA,B,N; T.K. MANDALA, R.S. BENDREB, G.S. LAVEKARA AND RAJESH DABUR. Natural products - Antifungal agents derived from plants. 2009; *Journal of Asian Natural Products Research*. V. 11, p. 621–638

ASSAF, A, M; HADDADIN, R, N; N,A; ALABBASSI, R; MASHALLAH, S; MOHAMMAD,M; BUSTANJ, Y. “Anti-Cancer, Anti-Inflammatory and Anti-Microbial Activities of Plant Extracts Used against Hematological Tumors in Traditional Medicine of Jordan.” 2013; *Journal of Ethnopharmacology*. V. 145(3) p. 728–36.

AVELAR, B.A.; LÉLIS, F.J.N.; AVELAR, R.S.; Weber, M.; Souza-Fagundes, E.M.; Lopes, m.t.p.; Maritns-filho, o.a.; Brito-melo, G.E.A. The crude latex of *Euphorbia tirucalli* L. (Euphorbiaceae) modulates the cytokine response of leukocytes, especially CD4+ T lymphocytes. 2011; *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.21, n.4, p.662-667,

BALOGH, I. B.;BALOGH, M. K. Irritant and co-carcinogenic diterpene esters from the latex of *Euphorbia cauducifolia* L. 2010; *J Asian Nat Prod Res*. 12(7), 600-13.  
BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. 2016; *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 6, n. 2, p. 71- 79,

BANI, S.; KAUL, A ; KHAN, B.; GUPTA, V. K.; SATTI, N. K.; SURI, K. A.; QAZI, G. N. Anti-arthritic activity of a biopolymeric fraction from *Euphorbia tirucalli*. 2007; *Journal of Ethnopharmacology*, v.110, n. 1, p. 92-98,  
BARBOSA, P. R.; GONZALEZ, F.H.D.; CORREA, A. M. R.; DRIEMEIER, D.; ALL'ALBA, M. P.; PEDROSO, A. P.; et al., Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). 2009; *Journal of Ethnopharmacology*, v. 128, p. 526-532.

BESSA, O. G. Avaliação da atividade angiogênica e do potencial de cicatrização do látex da *Euphorbia Tirucalli* (Avelóz). 2010. 50p. Dissertação de mestrado - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2010.

BOEIRA, J. M.; FENNER, R.; BETTI, A. H.; PROVENSÍ, G.; LACERDA, L. A.;BARBOSA, et al. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). 2009; *Journal of Ethnopharmacology*, v. 128, n. 2, p. 526-532,

BONA,E.A.M; PINTO; F,G,H; FRUET, T, H; JORGE,T,C,M; MOURA, A, C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. 2014.Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225,

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. 2010. *Química Nova*, v.33, p. 229-239,

CALHELHA, R. C.; FALCÃO, S.; QUEIROZ, M. J. R. P.; VILAS-BOAS, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Cytotoxicity of Portuguese Propolis: The Proximity of the In Vitro Doses for Tumor and Normal Cell Lines. 2014; *BioMed Research International*, v. 2014, Artigo ID 897361, doi:10.1155/2014/897361,

CASEIRO, B. M.; FERREIRA, E. P.; GRILLO, J. G. B.; ARAUJO, J. H. B. DE. Estudo do potencial de cura das formas de câncer utilizando Aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.). - 2006; Mostra de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar (MICTI), Colégio Agrícola de Comburu – UFSC.

CATALUÑA, P. AND RATES, S.M.K. The traditional use of the latex from *euphorbia tirucalli* linnaeus (euphorbiaceae) in the treatment of cancer in south brazil. 1999; *Acta Hort.* v.501 p. 289-296 (accessed on 9 June 2015).

CAXITO, M,L DO C; VICTÓRIO C, P, COSTA, H B; ROMÃO W; RICARDO M KUSTER et al., Antiproliferative activity of extracts of *Euphorbia tirucalli* L. (*Euphorbiaceae*) from three regions of Brazil. 2017; *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. v.16 (5): p. 1013-1020.

CHANDA AND BARAVALIA. Screening of some plant extracts against some skin diseases caused by oxidative stress and microorganisms. 2010; *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(21), pp. 3210-3217, 24 May.

CHEN, R. et. al. Chemical constituents from the roots of *Euphorbia nematocypa* Hand.-Mazz. 2014; *Biochemical Systematics and Ecology* 57, p. 1-5,  
CHOENE, M; MOTADI, L. Validation of the Antiproliferative Effects of *Euphorbia tirucalli* extracts in Breast Cancer Cell Lines. 2016; *Molecular Biology*, V. 50, p. 98–110.

CHUNG MJ, CHUNG CK, JEONG Y, HAM SS. Anticancer activity of subfractions containing pure compounds of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract in human cancer cells and in Balbc/c mice bearing Sarcoma-180 cells. 2010; *Nutr Res Pract*. 4(3):177-182.

CLSI: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts In CLSI document M27-A3. 3rd Informational Supplement. Edited by Wayne. PA: Clinical and laboratoty Standards Institute:2008.

CORONEL, L. D. S.; GAMEZ, D. L. Y.; SUAREZ, Q. L. P.; PAEZ, L. J.; TORRES, F.; ECHEVERRI, F.; et al.. M. New promising *Euphorbiaceae* extracts with activity in human lymphocytes from primary cell cultures. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2010; Medellin, Colômbia, v. 33, n.2, p. 279-90,

CRUZ, LUIZA STOLZ. Avaliação da atividade citotóxica de subfrações do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns e eufol. 67 p. (Dissertação) Ponta Grossa, - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Pós graduação em Ciências Farmacêuticas) 2017.

DABUR, A.K. CHHILLAR, V. YADAV, P.K. KAMAL, J. GUPTA, AND G.L. SHARMA, 2005; *J. Med. Microbiol*. v.54, p. 549  
DANTAS, I. C. Avelós. In: O Raizeiro. Campina Grande: EDUEP,1. ed. p. 107-109, 2007.

DAVID SPARKMAN, ZELDA PENTON, FULTON G. A PRACTICAL GUIDE. Gas Chromatography and Mass Spectrometry. segunda edição. San Diego, FG Kitson, BS Larsen e CN McEwen. California. 2011.

DRAKE, J. M.; GRAHAM, N. A.; STOYANOVA, T.; SEDGHI, A.; GOLDSTEIN, A. S.; CAI, H.; et al., Oncogene-specific activation of tyrosine kinase networks during prostate cancer progression. 2012; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* , v. 109, p. 1643-1648.

DUKE, JAMES A. DR.DUKE'S Phytochemical and Ethnobotanical Databases. Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/farmacy2.p1>>. Acesso em : 04 jun 2011.

DUTRA, R.C.; CLAUDINO, R.F.; BENTO, A.F.; MARCON, R.; SCHMIDT, E.C.; BOUZON, Z.L.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Preventive and therapeutic euphol treatment attenuates experimental colitis in mice. 2011; *PLoS One*, v.6 , n.11, p.1-15. EHELLI, J.; COPPAGE, M.; ROSELL, K.; liesveld, j. Cytotoxicity of algae extracts on normal and malignant cells. *Leukemia Research and Treatment*, v. 2011, n. 19, p. 37-35, 2011.

EMILE, J. WAIKEDRE, C. HERRENKNECHT, C. FOURNEAU, J.C. GANTIER, E. HNAWIA, P. et al.,. Fournet, 2007; *Phytother Res.* v. 21 p. 398.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. 2001; *Environmental Health Perspectives*, v. 109, p. 69-75.

FERREIRA A.L., SILVA A.F., PEREIRA L.G.R., BRAGA L.G.T., MORAES S.A.D. & ARAÚJO G.G.L. Produção e valor nutritivo da parte aérea da mandioca, maniçoba e pornunça. 2009; *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal.* 10, 129-36.

FERREIRA, M.J.U., N. DUARTE, M. KOŁACZKOWSKI, AND K. MICHALAK, 2006; *Planta Med.* v.23p. 72.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. 2006; *Química Nova*, v. 29 p. 326-337

FRANCO, G. B. LISONI R. C, OLIANI M S. Análise da expressão gênica em resposta ao tratamento com *Euphorbia tirucalli* (aveloz) em carcinoma epidermoide de laringe. (Dissertação de Mestrado) São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista., 2014.

FU, MAN-SHUN; SORDI, LUISA; MÜHLSCHLEGEL, FRITZ A. Functional characterization of the small heat shock protein Hsp12p from *Candida albicans*. *PLOS ONE*, v.7, n.8, p.1-10, 2012

FURSTENBERGER G. On the active principles of the Euphorbiaceae, XII. Highly unsaturated irritant diterpene esters from *Euphorbia tirucalli* originating from Madagascar. *Journal of Natural Products*, v 49, n.3, p.386-397, 1986.

GIOLO, MURIEL PADOVANI; SVIDZINSKI, TEREZINHA INEZ ESTIVALET. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. 2014. *Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial*, Rio de Janeiro, v.46, n.3, p.225-234.

GOBBO-NETO, LEONARDO; LOPES, NORBERTO P.. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. 2007; *Quím. Nova*, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, Apr. .

GONCALVES, DIOGO MOREIRA; ARAUJO, JOSE HILTON BERNARDINO DE. Aplicação do latex bruto de *Euphorbia tirucalli* L. no combate ao microrganismo *Escherichia coli*. XIV SICITE. [S.l.], v. 2, 2009.

Graidist, P.; Martla, M.; Sukpondma, Y. Cytotoxic activity of Piper cubeba extract in breast cancer cell lines. 2015; *Nutrients*, v. 7, n. 4, p. 2707-2718,

GRANJA, S.; QUEIROZ, M. L. S. Efeitos do extrato liofilizado da *Euphorbia tirucalli* L. sobre a resposta hematopoiética em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich.. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas), Universidade Estadual de Campinas. 2003. São Paulo.

HANI M. MOBARAK, IBRAHIM M. EL-SHERBINY AND MAMDOUH ABDEL-MOGIBA. Triterpenoids and volatile components of *Euphorbia tirucalli* . 2010; *Mansoura Journal of Chemistry*. Vol. 37 (2).

HARADA H ;YAMASHITA U ; KURIHARA H , FUKUSHI E , KAWABATA J , KAMEI Y . Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. *Research Support, Non-U.S. Gov't, Journal Article*. 2002, v. 22(5), P. 2587-2590.

INCA. Instituto Nacional de câncer. José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018– Incidência de Câncer no Brasil.

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2018/inca-estima-cerca-600-mil-casos-novos-cancer-para-2018>. Acesso em 11 de Junho de 2018. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2018/inca-estima-cerca-600-mil-casos-novos-cancer-para-2018>.

INCA. Instituto Nacional de câncer. José Alencar Gomes da Silva. câncer.

[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322). Acesso em 17 de Agosto de 2018.

KAHLOS T, ZHUANGAS L, HITUNEN R. Antitumor activity of some compounds and fractions from an n-hexene extract of *Inonotus obliquus*. *Acta Pharmaceutica Fennica* 1987;96:33-40.

KAHN, A.Q. ; KAZMI, S.N.H. ; AHMED, Z. ; MALIK, A. Euphorcinol: A New Pentacyclic Triterpene from *Euphorbia tirucalli*. 1988c; *Planta Medica*, v.55, p.290-291.

KAHN, A.Q. ; RASHEED, T. ; KAZMI, S.N.H. ; AHMED, Z. ; MALIK, A.

Cycloeuphordenol, a new triterpene from *Euphorbia tirucalli*. 1988b; *Phytochemistry*, v.27, n.7, p.2279-2281.

KANNAN, RAJESH. Virulence Factors and Anti Fungal Sensitivity Pattern of *Candida* sp. Isolated from HIV and TB Patients. Indian J Microbiol. Tiruchirappalli, v.51, n.3, p.273–278, april, 2011.

KUMAR A. (1999). Some potential plants for medicine from India, Ayurvedic medicines, University of Rajasthan, Rajasthan. pp. 1-12.

KUMAR, S.; MALHOTRA, R.; KUMAR, D. Euphorbia hirta: Its chemistry , traditional and medicinal uses, and pharmacological activities. 2010; *Pharmacognosy review*, v. 4(7), p. 58–61,

LAGE H, DUARTE N, COBURGER C, HILGEROTH A, FERREIRA MJ Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells. 2009; *Phytomedicine*. v.17(6) p.441-8.

LEE, C.; RAFFAGHELLO, L.; BRANDHORST, S.; SAFDIE, F. M.; BIANCHI, G.; MARTIN-MONTALVO, A.; PISTOIA, V.; WEI, M.; HWANG. S.; MERLINO, A.; EMIONITE, L; CABO, R.; LONGO, V. D. Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. 2012; *Science Translational Medicine*, v. 7, p. 124-127.

LIN, M.-W.; LIN, A.-S.; WU, D.-C.; WANG, S.S.W.; CHANG, F.-R.; WU, Y.-C.; HUANG, Y.-B. Euphol from Euphorbia tirucalli selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis. 2012; *Food Chem Toxicol*. v.50, v. 4333–433.9

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo, Plantarum, 2002. 560p.

LUCENA M.F.A. & ALVES M. Notas taxonômicas para Euphorbiaceae sl do Nordeste do Brasil. *Hoehnea* . 2010: 37, 71-85.

MACHADO, M.M. Perfil fitoquímico e avaliação dos principais efeitos biológicos e Imunológicos In Vitro da *Euphorbia tirucalli* L. (Dissertação de mestrado), Santa Maria, Programa de pós-graduação em ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil, 2007.

MADHURY, S.; PANDEY, G. Some anticancer medicinal plants of foreign origin. *Current science*, v. 96, n. 6, p. 779-783, 2009.

MALLAVADHANI, U.V.; SATYANARAYANA, K.V.S.; MAHAPATRA, A.; SUDHAKAR, A.V.S.; NAASIMHAN, K.; PANDEY, D.K.; THIRUNAVOKKARASU, M. Development of Diagnostic Microscopic and Chemical Markers of Some Euphorbia Latexes. 2006; *Journal of Integrative Plant Biology*, v.48, n.9, p.1115–1121.

MBAVENG, A. T.; KUETE, V.; MAPUNYAD, B. M.; BENG, V. P.; NKENGFACK, A. E.; MEYERD, J. J. M.; LALL, N. Evaluation of four Cameroonian medicinal plants for anticancer, antigonorrheal and antireverse transcriptase activities. 2011; *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.32, p. 162–167.

- MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; DE AMORIM, E. L. C.; DO NASCIMENTO, S. C.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, New York, p. 1-14, Jan. 2011.
- MONTAGNER, C. Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas. (Dissertação ) Florianópolis. universidade federal de santa catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. 2007.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. 1983; *J Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63.
- MUNRO, B; QUAN V. Vuong 1,2, Anita C. Chalmers 2, Chloe D. Goldsmith 1,2, Michael C. Bowyer 1,2 and Christopher J. Scarlett. Phytochemical, Antioxidant and Anti-Cancer Properties of *Euphorbia tirucalli* Methanolic and Aqueous Extracts. 2015; *Antioxidants*. v.4, p. 647-661.
- MWINE, JULIUS; DAMME, PATRICK VAN; JUMBA et al., Evaluation of larvicidal properties of the latex of *Euphorbia tirucalli* L. (Euphorbiaceae) against larvae of *Anopheles* mosquitoes. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010; v. 4, n. 19, p. 1954-1959.
- NES, W.D.; WONG, R.Y.; BENSON, M.; LANDREY, J.R.; NES, W.R. Rotational isomerism about the 17(20)-bond of steroids and euphoids as show by the crystal structures of euphol and tirucallol. *Procedures of NationalAcademy of Science*, v.81, n.18, p.5896-5900, 1984
- NETO, G,L; LOPES, N P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. 2007; *Quím. Nova*, V. 30, p. 374-381.
- OCHWANG'I DO; KIMWELE CN; ODUMA JA; GATHUMBI PK; MBARIA JM;KIAMA SG. Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County, Kenya. 2014; *J Ethnopharmacol*. 12;151(3):1040-1055.
- OLIVEIRA & EVANGELISTA-COIMBRA. *Euphorbia tirucalli*: complementary treatment of cancer.v.20,n.3,pp.60-64 (Out-Dez,2014) *Revista UNINGÁ Review*.
- OLIVEIRA L, F, S; FUENTEFRIA A,M; KLEIN, S,F; MACHADO M, M .Antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* strains and genotoxicity assessment in human leukocyte cells of *Euphorbia tirucalli* L. 2014; *Braz. J. Microbiol*. v.45 no.4 .p 1349-55.
- ORHAN DD, OZÇELIK B, OZGEN S, ERGUN F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. 2010; *Microbiol Res*. v. 20;165(6), p. 496-504.
- 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.

PALMIERI, R.R.; VARRICCHIO, M.C.B.N.; CAXITO, M.L. Ação Citotóxica e moduladora do extrato e do látex de *Euphorbia Tirucalli* L. (Avelóz) em células de melanoma. In. XXVII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural. UFRJ, Rio de Janeiro, 2005.

PALUMBO R, SOTTOTETTI F, RICCARDI A, TERAGNI C, POZZI E, QUAQUARINI E, TAGLIAFERRI B, BERNARDO A. Which patients with metastatic breast cancer benefit from subsequent lines of treatment? An update for clinicians. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 2013; 5(6): 334-350.

PAREKH; CHANDA. *In vitro* antifungal activity of methanol extracts of some Indian medicinal plants against pathogenic yeast and moulds. 2008; *African Journal of Biotechnology*. V. 7 (23), p. 4349-4353.

PAYDAR, M.; KAMALIDEHGHAN, B.; WONG, Y. L.; WONG, W. F.; LOOI, C. Y.; MUSTAFA, M. R. Evaluation of cytotoxic and chemotherapeutic properties of boldine in breast cancer using in vitro and in vivo models. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 8, p. 719-733, 2014.

PEJINA B; KOJICB V; Bogdanovicb, G. An insight into the cytotoxic activity of phytol at in vitro conditions. 2014; *Natural Product Research*, V.28, p.2053–2056.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Progress in Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* spp. by Use of Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods, 2010 to 2012. *Journal of Clinical Microbiology*, Iowa, v.50, n.9, p.2846-2856, sep, 2012.

PINTO, F,G,S ;BONA, E,A,M; FRUET, T,K; JORGE, T, C,M; MOURA,A, C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Pharmacology / Scientific Article*. DOI: 10.1590/1808-1657001192012. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.

POSTERARO B, TORELLI R, DE CAROLIS E, POSTERARO P, SANGUINETTI M. Antifungal Susceptibility Testing: Current Role from the Clinical Laboratory Perspective. 2014; *Mediterr J Hematol Infect Dis*. v.6, p.1-7.

PRASAD, S; SWAPNA,N,L; PRASAD,M. Efficacy of *euphorbia tirucalli* (L.) Towards microbicidal activity against human pathogens. *International journal of pharma and bio sciences*. 2011; V.2. p. 12.

RADCLIFFE-SMITH, A. 2001. *Genera Euphorbiacearum*. Kew Publishing, Kew. Horn, J.W., Van Ee, B.W., Morawetz, J.J., Riina, R., Steinmann, V.W., Berry, P.E.

RAMESH, NACHIMUTHU; PRIYADHARSINI, MARUTHUPANDIAN; SUMATHI, CHETTIPALAYAM SAMIAPPAN; BALASUBRAMANIAN, VELRAMAR; HEMAPRIYA, JANARTHANAM; KANNAN, Rajesh. Virulence Factors and Anti Fungal Sensitivity Pattern of *Candida* sp. Isolated from HIV and TB Patients. *Indian J Microbiol*. Tiruchirappalli, v.51, n.3, p.273–278, april, 2011.

RAVI LOKESH; KANNABIRAN KRISHNAN. Cytotoxic Potential of N-hexadecanoic Acid Extracted from *Kigelia pinnata* Leaves. *Asian J. Cell Biol.* 2017;v.12 (1)p. 20-27.

REBUCCI M, MICHIELS C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochemical Pharmacology* 2013; 85(9): 1219-1226

ROBERTO, A,E,M. Detecção de resistência as equinocandinas de isolados clínicos de *candida parapsilosis stricto sensu*, *candida orthopsilosis* e *candida metapsilosis* através de espectrometria de massas. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, Dissertação de mestrado. Recife, 2016.

ROCHA E DANTAS. 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*, 2009; Ano 25, Vol. 4.

SANTOS, O,J. TCBC-MA; FILHO, E,N,S; NASCIMENTO,F,R,S;JÚNIOR,F,C,S; FIALHO, E,M; SANTOS,R,H,P; SANTOS, R,A,P; SERRA,I,C,P,B. Use of raw *Euphorbia tirucalli* extract for inhibition of ascitic Ehrlich tumor. *Rev. Col. Bras.* 2016; v.43(1)p. 018-021.

SANTOS-FILHA, M.A.F.dos. (sd). Atividade microbiológica dos extratos de *Euphorbia tirucalli* e suas inibições para bactérias e fungos. Centro Universitário Luterano de Manaus - ULBRA/Manaus, 61ª Reunião anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da ciência (SBPC). <http://www.sbpnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/5266.htm> Acesso em 14 de agosto de 2018.

SAPIÊNCIA JORNAL - Informativo científico da FAPEPI (2010). [Online]. N. 23, Ano VI, p. 04-09, Teresina-PI - <http://www.fapepi.pi.gov.br/nova/sapiencia/pdf/sapiencia23.pdf>. Acesso em 26 de agosto de 2010.

SARZAEEM TOFANELLI E, J; SILVA F, A. Propriedades fitoterápicas de *euphorbia tirucalli* L.: 2011; da etnobotânica a farmacognosia. issn 1983-4209 - Volume 06– Número 01.

SAVITHRAMMA, N., M. L RAO, K. RUKMINI; P. S. DEVI, “Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by using medicinal plants”. *International Journal of Chem Tech Research.* 2011.Vol 3(3), p. 1394-1402.

SECCO RS. Flora da Reserva Ducke, AM, Brasil: Euphorbiaceae-Parte-I Rodriguésia, 2005; Revista do Jardim Botânico do RJ. 56(86):143-168  
SELEEM D, PARDI V, MURATA RM.Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity *in vitro*. 2017; *Arch Oral Biol.* Apr;76:76-83.

SHAIKHLI. REYAM JAMEEL AL; AL-JANABI,A,A. The cytogenetic effect of Euphorbia tirucalli stems methanolic extract on sperm head morphology in male albino mice. 2017; *HOAJ Biology* . V.6, ISSN 2050-0874.

SHIBATA, NOBUYUKI; KOBAYASHI, HIDEMITSU; SUZUKI, SHIGEO. Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. 2012; Proceedings of The Japan Academy. Series B Physical and Biology Sciences, Miyagi, v. 88, p. 250-265

SHIMIZU, M; TOMOO, T. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. V. Constituents and anti-inflammatory effect of Aoki, *Aucuba japonica* Thunb. 1994; *Biol. Pharm. Bull*, v.17, p 665–667.

SILVA CM, CARVALHO-PARAHYM AM, MACÊDO DP, LIMA-NETO RG, FRANCISCO EC, MELO AS et al., Neonatal Candidemia Caused by *Candida haemulonii*: Case Report and Review of Literature. 2015; *Mycopathologia*, v.180(1-2)p.69-73.

SILVA J. R R.M, TEIXEIRA. D. F, SAMPAIO. A. L. F, LEITÃO. T. C. A. Analysis of in vitro activity of high dilutions of Euphorbia tirucalli L. in human melanoma cells. *Int J High Dilution Res* 2011; 10(36):183193 Proceedings of the XXV GIRI Symposium and VIII CBFH; 2011 Sep 0407; Foz do Iguaçu (Brazil).

SILVA, CAROLINA M.; CARVALHO-PARAHYM, ANA MARIA R.; MACÊDO, DANIELLE P. C; LIMA-NETO, REGINALDO G.; FRANCISCO, ELAINE C.; MELO, ANALY S. A.; SILVA, MARIA CONCEIÇÃO M.; JUCÁ, MOACIR B.; MELLO, LUCIANA R. B; AMORIM, ROSEMARY M. J.; NEVES, REJANE P. Neonatal Candidemia Caused by *Candida haemulonii*: Case Report and Review of Literature. 2015; *Mycopathologia*, Recife, feb.

SILVA; ROSA,M,N; TANSINI,A; OLIVEIRA,J.S.R; OLGA MARTINHO; LIMA, J,P; PIANOWSKI,J,F; REIS, R,M; cytotoxic activity of euphol from *e. tirucalli* on human cancer cells 560. 2018: *Experimental and therapeutic medicine*. 16: 557-566.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK. P.R.(Orgs). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 1104p. 2010.  
SINGH, I;KAUR,H; KUMAR, A; LATA, S; KUMAR, A. Synthesis of new coumarin derivatives as antibacterial. *International Journal of Chem Tech Research*. 2010; v.2, p. 1725- 1752.

SINOKI, L. A.; LIMA, T. B. C.; COSTA, I. B.; FRANCISCO, O. Levantamento sobre as propriedades terapêuticas de Avelóz (*Euphorbia Tirucalli* Linnaeus 1753). Ourinhos: FIO/FEMM, 2011.

STEIN, A,C; ALVAREZ, S; AVANCINI,C; ZACCHINO,S; VON POSER, G. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 2006; v.107, p. 95-98.

SUTTIARPORN,P; CHUMPOLSRI, W; MAHATHEERANONT, S; LUANGKAMIN,S; TEEPSAWANG, S; LEARDKAMOLKARN, V. Structures of Phytosterols and Triterpenoids with Potential Anti-Cancer Activity in Bran of Black Non-Glutinous Rice. *Nutrients*. 2015; v.7, 1672-1687.

THATI, B; NOBLE, A; ROWAN, R CREAVEN, B,S; WALSH,M; MCCANN, M; EGAN, D; KAVANAGH, K. Mechanism of action of coumarin and silver(I)- coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicology in vitro*, 2007; v.21, p. 801-808.

TOMITA, Y. Immunological role of vitamin A and its related substances in prevention of cancer. *Nutr. Cancer*. 1983; v.5, p.187–194  
TORTORA, G. J.; et al. Microbiologia, 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Bibliografia: 334-375.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

TRINDADE M.T. & LAMEIRA O.A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. 2015; *Revista Cubana de Plantas Medicinales* .19.

TRINDADE S. J. M, LAMEIRA O,A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Amazônia Oriental. Belém-PA, Brasil. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2014;19(1):292-309.

UPADHYAY, B.; SINGH, K.P.; KUMAR, A. Ethno-medicinal, phytochemical and antimicrobial studies of *Euphorbia Tirucalli* L. *Journal of phytology*, 2010;v.2, n.4, p. 65-77.

VALADARES, MARIZE CAMPOS; CASTRO, NÚBIA CRISTIANA DE; CUNHA LUIZ CARLOS DA. SYNADENIUM UMBELLATUM: Citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camudongos. 2007; *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.43, n 4,p. 631-638.

VALE, V. V.; ORLANDA, J. F. F. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). *Scientia Plena*, 2011; v. 7, p. 1-6.

VARRICCHIO, M. C. B. N. Estudos integrados: Biotecnologia, toxicologia, Matabólitos Especiais e Atividade antitumoral de *Euphorbia tirucalli* L" *Disertação - Programa de pós Graduação em Biotecnologia vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro*. 2008.

VARRICCHIO, M. C. B. N.; ORMELEZ, E. G.; MOREIRA, C. B.; SILVA, S. DA; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L. S. Cultivo in vitro de *Euphorbia tirucalli* L. (Aveloz), avaliação da constituição química do látex, em diferentes condições de cultivo, e teste de atividade larvicida e juvenilizante em *Aedes Aegypti*. 2000; *Biofar.*, v. 02, n. 01.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WACZUK E,P; PEREIRA, K, B; MACHADO, M,M; Oliveira, L, F, S. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos da *Euphorbia Tirucalli* L.: DOS RISCOS ÀS POSSIBILIDADES *Euphorbia tirucalli* L.: Dos riscos às possibilidades. 2012.; Acta ambiental catarinense v.9. (n. 1/2).

WANG B, ZHANG S, YUE K, WANG XD. The recurrence and survival of oral squamous cell carcinoma: a report of 275 cases. *Chinese Journal of Cancer* 2013; 32(11): 614-618.

WANG, L., WANG, G., YANG, D., GUO, X., XU, Y., FENG, B., et al., Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression". *Molecular Medicine Reports* 8.4 2013: 1279-1285.

YAMAMOTO, Y.; MIZUGUCHI, R.; YAMADA, Y. Chemical constituents of cultured cells of *Euphorbia tirucalli* and *E. millii*. 2004; *Plant Cell Reports*, v.1, n.1, p.1154-1159.

YANG, D. et. al. Chemical constituents from *Euphorbia stracheyi* and their biological activities. 2014; *Fitoterapia*, p. 211–218.

YUSOFFA E ; AHMADA,B A; MOHAMADA,S ; MUHAMMADA, N, F .GC-MS analysis of some volatile constituents extracted from stem of *Euphorbia tirucalli* Linn. *Arch Orofac Sci* . 2017; v.12(1)p. 36-44.

## ANEXO A - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA


 HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA  
 FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB Nº 70/2015

	Nº de Tombo	Nome popular	Família	Nome Científico	Identificada por
1	91421	Aveloz*	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia tirucalli</i> L.	F. Gallindo

\* outros nomes populares observados em Pernambuco: dedo-do-diabo, mata-verrugas, sendo o mais comum o Aveloz.

**Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Pereira**  
 Curadora do Herbário IPA

**Consulta:** Alexandra de Moraes Martins tel (81) 998449983

**Procedência:** PE - Recife - Cidade Universitária - coletada no campus da UFPE, no jardim próximo ao Laboratório de Farmacologia e Cancerologia, crescendo sob árvore e enramando em sua copa.

**Coletor:** a mesma. Coletada em 08/08/16.

**Determinada em:** 12/08/2016.

Resultado encaminhado por e-mail: alexandramartinspb@gmail.com em 15/08/2016

Obs.: material botânico em estudo para fim de dissertação de Mestrado em Patologia na UFPE - Deptº de Ciências da Saúde, sob orientação do Profº Dr. Gustavo Godoy.

**Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA**  
 Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária  
 Av. Gal. San Martin, 1371 – Bongi – 50761-000 – Recife – PE – C.P. 1022  
 CNPJ 10.912.293/0001-37 – PABX: (81) 3184-7200 – Fax: (81) 3184-7211  
 Home Page: www.ipa.br / E-mail: ipa@ipa.br

**IPA – 77 anos semeando conhecimento**