

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EXTRATO AQUOSO DOS RAMOS DE *E.***  
***tirucalli* L. *IN VITRO***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Emily Pansera Waczuk**

**Uruguaiana - RS, Brasil, 2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EXTRATO AQUOSO DOS RAMOS DE *E.*  
*tirucalli* L. *IN VITRO***

**por**

**Emily Pansera Waczuk**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica**,

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Daiana Silva de Ávila

Co-orientador: Prof<sup>º</sup> Dr<sup>º</sup> João Batista Teixeira da Rocha

**Uruguaiana, RS, Brasil, 2014**

W115a Waczuk, Emily Pansera  
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EXTRATO AQUOSO DOS RAMOS DE E.  
tirucalli L. IN VITRO / Emily Pansera Waczuk.  
78 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2014.

"Orientação: Daiana Silva de Ávila".

1. Euphorbia tirucalli L.. 2. Genotoxicidade. 3.  
Citotoxicidade. 4. Expressão gênica. I. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EXTRATO AQUOSO DOS RAMOS DE *E.*  
*tirucalli* L. *IN VITRO***

Elaborada por

**Emily Pansera waczuk**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

**Mestre em Bioquímica**

**Banca examinadora:**

---

**Profª Drª Daiana Silva de Ávila**  
**(Orientadora)**

---

**Profª Drª Cristiane Casagrande Denardin**

---

**Profº Drº Daniel Henrique Roos**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado força nos momentos que necessitei, pela família que tenho e as pessoas que vieram ao meu auxílio nesta caminhada.

Aos meus pais (Janete e Osvaldo), e meu irmão (Osvaldo Junior), primeiramente quero dizer que os “AMO MUITO”. Obrigada pelo apoio, carinho, amor, força em todos os momentos!

Aos meus familiares, em especial a Arlete, Greice, Katlyn, Eduardo, Flora, Roberto, Vera, Kely, Rui e Mariazinha "in memorian" o meu muito obrigada pelo incentivo, ajuda e carinho!

Ao meu segundo pai, meu avô Vitalino "in memorian" que deixou seu espírito de pesquisador, através da sua admiração que tinha pela natureza e pelo seu modo empírico de cuidar a saúde. Obrigada vô!!!

Gostaria de agradecer especialmente à minha mestre e orientadora, a Prof. Dra. Daiana Silva de Ávila simplesmente por “TUDO”, pela paciência, pelo espírito de liderança, força e determinação que ela sempre me transmite! Sou eternamente grata!

Ao meu grande e eterno “Mestre”, o professor Dr. João Batista Teixeira da Rocha, pelos ensinamentos que nos transmite a cada dia, pelas orientações, cobranças, disposição e incentivo em todos os momentos. Quero agradecer também pela oportunidade de ter realizado minhas pesquisas em seu laboratório e de poder contribuir cientificamente ao seu grupo de pesquisa e ao mundo científico.

Agradeço o professor Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira, por ter sido meu primeiro orientador e incentivador na área da pesquisa. Obrigada!

A todos os meus novos amigos e colegas do laboratório do professor João Batista, pela parceria nos congressos, pelos momentos de descontração no laboratório e pela parceria no desenvolvimento das pesquisas.

Aos meus amigos Jean Paul, Amos, Daiane, Diones, Thallita, Assis e Gerson pela amizade sincera, pelas risadas no momento de folga e pelo apoio no desenvolvimento das pesquisas.

Enfim, a todos que de certa forma, contribuíram para que eu chegasse à etapa final desse trabalho! Muito Obrigada!!

*“Truth in science can be defined as the working hypothesis best suited to open the way to the next better one.”*

**Konrad (Zacharias) Lorenz (1903-89) Austrian ethologist.  
[Nobel prize for medicine, 1973]**

## **DEDICATÓRIA**

*“Dedico este estudo aos meus familiares e amigos que me incentivam em todos os momentos da minha caminhada” Obrigada!!*

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. A planta <i>Euphorbia tirucalli</i> L.....	21
Figura 2. Metabolismo primário e secundário dos vegetais .....	24
Figura 3. Biossíntese do Ácido Mevalônico.....	25

### ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1: Representative HPLC profile of <i>E. tirucalli</i> L. ....	43
Figure 2: Antioxidant activity of the aqueous extract of <i>E. tirucalli</i> L. ....	44
Figure 3: Effect of extract of <i>E. tirucalli</i> on the cell viability in leukocytes.....	45
Figure 4: DNA damage levels in human leukocytes by visual score.....	46
Figure 5: Osmotic fragility of erythrocytes treated with extract of <i>E. tirucalli</i> L.....	47
Figure 6: Gene expression (mRNA) of the antioxidant enzymes .....	48



## **LISTA DE TABELAS**

### **ARTIGO CIENTÍFICO**

Table 1: Composition of flavonoids and phenolic acids.....44

Table 2: Comet assay: Frequency of damage levels and index damage.....46

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

ERO – Espécies reativas de oxigênio

CAT – Catalase

SOD – Superoxido dismutase

GPX – Glutathione peroxidase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

HPLC – Cromatografia líquida e alta eficiência

IPP – Isopentil pirofosfato

DMAPP – Dimetil-alil-pirofosfato

EBV – Epstein – Bare

PKC – Proteína quinase C

OMS – Organização Mundial da Saúde

DPPH – 2,2-difenil-1-picril hidrazil

*E. tirucalli* – *Euphorbia tirucalli*

**RESUMO**

**Dissertação de Mestrado**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioquímica**  
**Fundação Universidade Federal do Pampa**

**AValiação Toxicológica do Extrato Aquoso dos Ramos de *E. tirucalli* L. *in vitro***

AUTORA: Emily Pansera Waczuk

ORIENTADORA: Daiana Silva de Ávila

CO-ORIENTADOR: João Barista Teixeira da Rocha

Local e Data da Defesa: Uruguaiana, 06 de Março de 2014

A *Euphorbia tirucalli*, popularmente conhecida como avelós, é uma planta tóxica, tradicionalmente usada como um chá na medicina popular brasileira para o tratamento de várias doenças, demonstrando atividades antibacteriana, antiviral e anticarcinogênica. No entanto, não há nenhum relatório científico dos efeitos tóxicos podem surgir a partir de consumo desta planta, bem como os mecanismos pelos quais ela induz sua toxicidade. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* a genotoxicidade e citotoxicidade do extrato aquoso de *E. tirucalli* em leucócitos humanos usando os testes do ensaio cometa e azul de tripan, respectivamente. Adicionalmente, o efeito do extrato aquoso de *E. tirucalli* sobre a fragilidade osmótica foi investigada em eritrócitos humanos. Além disso, avaliamos a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes (SOD2, CAT e GPx4) através de qRT-PCR. Os nossos resultados demonstraram que a exposição de *E. tirucalli* em leucócitos humanos provocou aumentos significativos de danos no DNA nas concentrações mais elevadas testadas (100-150 µg/mL), que foi associada a uma diminuição significativa da viabilidade celular em concentrações de 10 a 150 µg/mL. Por outro lado, a *E. tirucalli* não induziu a hemólise de eritrócitos humanos em todas as concentrações testadas. A exposição de leucócitos humanos à *E. tirucalli* (10-50µg/mL) causou regulação positiva significativa sobre no RNAm da SOD2 e expressões dos genes da CAT, e diminuiu significativamente o RNAm da GPx4 nas concentrações mais elevadas (100-150 µg/mL). Adicionalmente, a expressão genica do gene da SOD2 foi regulada negativamente na maior concentração testada (150 µg/mL). Em resumo, com base nos

resultados de genotoxicidade observados em nosso estudo, recomendamos cautela no uso agudo ou crônico deste preparado caseiro. Com todos estes aspectos, nossos resultados sugerem que o extrato da *E. tirucalli* induz genotoxicidade e citotoxicidade em leucócitos humanos, possivelmente através da interação com o sistema enzimático antioxidante, assim, aumentando a formação de ROS e diminuindo o nível de tolerância celular para os constituintes químicos desta planta.

**Palavras-chave:** *Euphorbia tirucalli*, genotoxicidade, citotoxicidade e expressão gênica.

**ABSTRACT****Dissertation of Master****Program of Post-Graduation in Biochemistry****Federal University of Pampa****TOXICOLOGICAL EVALUATION AND FROM AQUEOUS EXTRACT OF  
THE BRANCHES OF *E. TIRUCALLI* L. *IN VITRO*.**

AUTHOR: Emily Pansera Waczuk

ADVISOR: Daiana Silva de Ávila

CO-ADVISOR: João Barista Teixeira da Rocha

Place and Date of Defense: Uruguaiiana, 06, March, 2014

*Euphorbia tirucalli*, popularly known as avelós, is a toxic plant traditionally used as a tea in the Brazilian folk medicine for the treatment of various diseases, by presenting antibacterial, antiviral and anticarcinogenic properties. However, there is no scientific report regarding the toxic effects of this plant in human cells which may occur from its consumption, as well as the mechanisms by which it induces its toxicity. Therefore, the objective of the present study was to evaluate *in vitro* the genotoxicity and cytotoxicity potential of aqueous extract of *E. tirucalli* in human leukocytes using comet assay and trypan blue exclusion respectively. In addition, the effect of the aqueous extract of *E. tirucalli* on osmotic fragility was investigated in human erythrocytes. Furthermore, we evaluated the qRT-PCR expressions of selected antioxidant mRNA genes (SOD2, CAT and GPx4). Our results demonstrated that exposure of *E. tirucalli* to human leukocytes caused significant increase in DNA damage at the higher concentrations tested (100-150 µg/mL), which was associated with a significant decrease of cellular viability at concentrations 10 to 150 µg/mL. In contrast, *E. tirucalli* did not induce hemolysis of human erythrocytes at all the concentrations tested. Exposure of *E. tirucalli* (10-50 µg/mL) to human leukocytes significantly up-regulated the mRNA of SOD2 and CAT genes expressions, and significantly decreased the mRNA of GPx4 at higher concentrations (100-150 µg/mL). In addition, the mRNA gene expression of SOD2 was down-regulated at the highest concentration tested (150 µg/mL). In summary, based in the results of genotoxicity observed in our study, we recommend caution in the acute or chronic use of this homemade prepared. Taken together, our results suggest that the extract aqueous of *E. tirucalli* induces genotoxicity and cytotoxicity to human

leukocytes, possibly by interacting with the antioxidant enzyme system, thereby, increasing the formation of ROS and decreasing the cellular tolerance level to chemical constituents of this plant. Therefore, we recommend caution in the acute or chronic use of this plant.

**Key-words:** *Euphorbia tirucalli*, genotoxicity, cytotoxicity and gene expression.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	18
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	18
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	19
3.1 Uso das plantas medicinais .....	19
<b>3.2 <i>Euphorbia tiricalli</i> L.</b> .....	19
3.2.1 Histórico .....	19
3.2.2 Classificação botânica e aspectos gerais .....	20
3.2.3 Uso na medicina popular .....	22
3.2.4 Metabolismo secundário .....	23
3.2.5 Constituintes químicos .....	26
3.2.6 Efeitos Farmacológicos e Toxicológicos .....	27
3.2.6.1 Atividade Imunossupressora .....	27
3.2.6.2 Atividade Antiviral e Antifúngica .....	27
3.2.6.3 Atividade Mielomoduradora e Antiinflamatória .....	28
3.2.6.4 Atividade Antiartrítica .....	29
3.2.6.5 Atividade Tumoral e Antitumoral .....	29
3.2.6.6 Atividade Esplenohepatotóxica .....	30
3.2.6.7 Atividade Anticolinesterásica .....	31
3.2.6.8 Atividade Desacopladora da Cadeia Respiratória .....	31
<b>4 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	33
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	64
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	65
<b>REFERENCIAS</b> .....	66
<b>APÊNDICE A</b> .....	78

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o homem encontra-se exposto todos os dias a inúmeros agentes, sejam eles físicos, químicos, ou até mesmo biológicos, que podem ser considerados benéficos a saúde ou causadores de grandes malefícios (MALUF; ERDTMANN, 2000; KLAASSEN; WATKINS, 2001; FRANCO *et al.* 2008). Muitos dos agentes naturais, como as plantas, são considerados pela maioria da população como não causadoras de problemas a saúde, pois segundo elas, são naturais e vêm sendo usadas há muitos anos pelas pessoas. Esse fato faz com que essas plantas sejam utilizadas indiscriminadamente, sem preocupação com dose nem prazo de administração ou toxicidade, o que é uma prática considerada inaceitável atualmente a qual deve ser modificada. As plantas possuem constituintes químicos causadores de efeitos diversos em nosso organismo e, assim sendo, podem combater enfermidades como também causar danos graves em diversos órgãos, tecidos e sistemas (MONTANARI; BOLZANI, 2001; SILVA *et al.* 2006; VARANDA, 2006; NETO; LOPES, 2007).

Dentre as inúmeras plantas utilizadas tradicionalmente na medicina popular, uma vem sendo estudada pelos pesquisadores por ser tóxica (TIWARI *et al.* 2003; KUMAR *et al.* 2010) a chamada *Euphorbia tirucalli* L., conhecida popularmente no Brasil como avelós. É uma espécie nativa do sul do continente africano, a qual é utilizada empiricamente pela população no Brasil e em outros países como Índia, Indonésia e Malásia (CORREIA, 1994; OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2004; CASEIRO *et al.* 2006; JYOTHI *et al.* 2008). O látex desta planta vem sendo utilizado como purgativo, útil no tratamento da asma, gonorréia, artrite reumatóide, hanseníase (JYOTHI *et al.* 2008) e, também é aplicado em coceiras e mordidas de escorpiões (NADKARNI, 1976).

Algumas evidências científicas consideram esta planta como protagonista de vários casos de intoxicações e pode estar associada com algumas doenças que acometem a população (VALADARES *et al.* 2007; FURSTENBERGER; HECKER, 1986; ITO *et al.* 1981; SILVA *et al.* 2007; AYA *et al.* 1991; BOSCH, 2004). Além disso, o seu látex é considerado irritante, cáustico e até mesmo tóxico, quando ingerido ou em contato com a pele, olhos ou mucosas (MATOS, 2000; LORENZI; MATOS, 2002).

No entanto, alguns estudos demonstram que seus ramos apresentam atividades antibacterianas (LIRIO *et al.* 1998), moluscicida (JURBERG *et al.* 1985; TIWARI *et al.*



2003), anti-herpéticas (BETANCUR-GALVIS *et al.* 2002) e antimutagenicas (REZENDE *et al.* 2004). Além disso, a planta *E. tirucalli* possui atividades cocarcinogênicas (GSCWHENOT; HECKER, 1969) e anticarcinogênicas (HECKER, 1968). Apesar da sua ampla utilização em diversas terapias, os estudos avaliando os efeitos terapêuticos e tóxicos do extrato aquoso dos ramos são escassos e não há informações na literatura quanto à sua genotoxicidade, citotoxicidade e alterações na expressão gênica de enzimas antioxidantes. Até o presente momento não se sabe quais são as vias metabólicas que poderiam estar envolvidas nas diversas ações dessa planta demonstradas nos estudos científicos. Entretanto, estudos prévios têm mostrado que as plantas do gênero *Euphorbia* apresentam a capacidade de alterar alguns parâmetros celulares e moleculares do sistema imunológico (AMIRGHOFRAN *et al.* 2008; SINGH *et al.* 2006). Com isso, este estudo foi realizado para avaliar *in vitro*, um possível efeito modulatório do extrato aquoso dos ramos da *E. tirucalli* em leucócitos e eritrócitos humanos, para assegurar o seu uso popular, e quem sabe, uma futura utilização clínica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* os efeitos toxicológicos do extrato aquoso dos ramos da *E. tirucalli* L. e a expressão gênica de alguns marcadores de estresse oxidativo com o intuito de assegurar previamente a sua utilização pela medicina popular.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar do perfil fitoquímico do extrato aquoso dos ramos da *E. tirucalli* por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- b) Avaliar da atividade antioxidante do extrato aquoso dos ramos da *E. tirucalli* pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil);
- c) Avaliar *in vitro* a atividade genotóxica do extrato aquoso de *E. tirucalli* através do Ensaio cometa em leucócitos humanos;
- d) Avaliar *in vitro* da citotoxicidade do extrato aquoso de *E. tirucalli* através do teste da viabilidade celular em leucócitos humanos;
- e) Avaliar *in vitro* o efeito hemolítico dos eritrócitos expostos ao extrato aquoso dos ramos da *E. tirucalli* através do teste da fragilidade osmótica;
- f) Avaliar *in vitro* a expressão gênica de alguns marcadores de estresse oxidativo do extrato aquoso dos ramos da *E. tirucalli* em leucócitos humanos.

### **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1 Uso das plantas medicinais**

As plantas fazem parte da história da cultura humana desde seus antepassados, como fonte de habitação, vestuário, alimentação, manifestações religiosas, artística e, principalmente, para recuperação da saúde (LORENZI; MATOS, 2002).

O uso das espécies vegetais, com fins terapêuticos e para a cura de doenças e sintomas, remonta ao início da civilização, desde o momento que o homem despertou interesse através da alimentação por um e outro vegetal. Ou ainda, pela observação do comportamento dos animais ao se alimentarem de plantas, refletindo em um modo empírico para sistematizar sua utilização (YUNES; CALIXTO *et al.* 2001). Dessa maneira, o homem foi descobrindo as propriedades terapêuticas das plantas medicinais e, de certa forma, também daquelas que eram maléficas para o seu organismo, as chamadas de plantas tóxicas (DAVID; DAVID, 2002).

#### **3.2 *Euphorbia tirucalli* L.**

##### **3.2.1 Histórico**

Desde os tempos remotos, várias espécies vegetais foram utilizadas pela humanidade tanto para fins terapêuticos quanto tóxicos, baseadas inicialmente pelo conhecimento empírico. Uma dessas espécies refere-se a uma planta que, apesar de ser reconhecidamente tóxica, apresenta muitos relatos da sua utilização, desde as antigas civilizações com fins terapêuticos, tanto do oriente quanto do ocidente, a denominada *Euphorbia tirucalli* L. (VARRICCHIO *et al.* 2008).

Esta espécie é nativa do Sul do continente Africano, da região de Madagascar e veio ao Brasil através das antigas navegações no ano de 1892, sendo plantada inicialmente no Nordeste Brasileiro e, posteriormente, disseminada para todo o país (OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2004; CASEIRO *et al.* 2006). Desde a antiguidade, existem registros do uso não somente da *Euphorbia tirucalli* L., mas de outras espécies de sua família botânica denominada *Euphorbiacea* nos herbários e até mesmo em farmacopéias, tanto da África quanto do continente europeu, contendo a descrição das suas indicações e propriedades terapêuticas (PALMIERI *et al.* 2005). É mencionado

ainda a sua utilização para fins medicinais desta e de outras espécies da mesma família, 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).

Atualmente, a *Euphorbia tirucalli* L. está sendo uma das espécies explorada pelo meio científico, com o intuito de ampliar, elucidar e confirmar suas reais atividades biológicas. No entanto, mesmo sendo uma planta tóxica, é ainda utilizada tradicionalmente, sem comprovação científica quanto às suas indicações e concentração, gerando, assim, um risco para as pessoas que a utilizam.

### 3.2.2 Classificação botânica e aspectos gerais

A *Euphorbia tirucalli* L. é uma espécie do gênero Euphorbia, pertencente à família botânica Euphorbiaceae, a qual encontra-se distribuída principalmente em regiões tropicais e temperadas do planeta, como na África e América. É considerada uma das maiores famílias das dicotiledôneas, contando com cerca de 300 gêneros e 7500 espécies. No Brasil, está representada por 70 gêneros e 1000 espécies, sendo considerada uma das famílias mais importantes da flora brasileira, com uma enorme complexidade do ponto de vista taxonômico e de grande importância científica (SOUZA; LORENZI, 2005; BRANCO; PIZZOLATTI, 2002, JOLY, 1998).

Essa família possui várias espécies de interesse econômico, como por exemplo, a *Chamaesyce hirta* que, do ponto de vista ecológico, apresenta um enorme potencial na biorremediação de solos alcalinos. É considerada da mesma família a Mandioca da espécie *Manihot esculenta* Crantz, na qual é utilizada como alimento em vários países; a espécie *Havea Brasiliensis*, conhecida popularmente como Seringueira, da qual é extraída a borracha utilizada para a fabricação de vários produtos como bola, redes, entre outros (LORENZI; MATOS, 2002; LUDWIG *et al.* 2006; JOLY, 1998).

Além dessas espécies, existem outras que, a partir da sua utilização empírica pelas antigas civilizações, foram realizados estudos científicos para desvendar suas possíveis atividades terapêuticas como, por exemplo, a *E. esula* L. e a *Cróton tiglium*, que, a partir dos seus extratos, se isolou alguns diterpenos que demonstraram atividade antileucêmica em camundongos (GRANJA; QUEIROZ, 2003).

A espécie *Euphorbia tirucalli* L. (FIGURA 1) é conhecida popularmente nos Estados Unidos como milk bush; na Angola, é chamada de assoneira, na Índia, de lunka sij. Já no Brasil, ela recebe várias denominações, como: aveloz, pau-pelado, gaiolinha, árvore-de-são-sebastião, árvore-de-lápis, cassoneira, coroa-de-cristo, almeidinha, coral-verde, dedo-do-diabo, dente-de-cão, espinho-de-cristo, espinho-de-judeu, espinho-italiano, mata-verrugas (SILVA; SANTOS, 2002; LORENZI; MATOS, 2002; CASEIRO *et al.* 2006; BOCHNER; SOUZA, 2008).



Fonte: Top Tropicals, 2009.

**Figura 1** - A planta *Euphorbia tirucalli* L.

A *E. tirucalli* L. é considerada uma planta suculenta, arbustiva, latescente, que pode atingir 2 a 6 metros de altura. Possui trancos e ramos lenhosos, intrincados, com característica cilíndrica, de aspecto verde, sendo que as plantas jovens apresentam caules mais ramificados. Os seus ramos possuem algumas folhas que são muito pequenas, raramente visíveis, pois caem logo que nascem. As flores também são muito pequenas, de cor verde amarelada, mas raramente se desenvolvem no Brasil. Além disso, a maioria das espécies da família Euphorbiaceae possui um látex de aparência incolor ou leitosa (JOLY, 1998; CASEIRO *et al.* 2006; LORENZI; MATOS, 2002).

Em nosso país, a *Euphorbia tirucalli* L. passou a ser cultivada para diversos fins que envolvem desde medicinais, ornamentais, ou até mesmo para a formação de “cercas- vivas” de maneira a separar as lavouras agrícolas ou propriedades, principalmente na região Nordeste do Brasil (LORENZI; MATOS, 2002).

Os ramos da *Euphorbia tirucalli* L. possuem um látex de cor branca, que quando feridos o liberam. Entretanto, o látex é considerado irritante, cáustico e até mesmo tóxico, tanto que, se chegar a atingir a região dos olhos pode causar lesões na córnea

levando à cegueira temporária. No entanto, a pessoa que entrou em contato pode apresentar sinais de irritação, edema nas pálpebras, lacrimejamento, causando o comprometimento da visão. Com isso essa planta passou a ser chamada popularmente também de “cega-olho”. Neste mesmo contexto, é importante ressaltar que todas as partes desta planta são tóxicas. O seu látex pode causar lesões se entrar em contato com a pele e mucosas, causando edema na boca, lábios e língua e, se for ingerido, pode causar vários inconvenientes, como náuseas, vômito e diarreia (LORENZI; MATOS, 2002).

Esta espécie é considerada xerófila, ou seja, adapta-se facilmente em solos secos e pobres, em ambientes abertos ou expostos à luz, mas, quando plantada em solos úmidos, o seu crescimento é lento, sendo que é sensível a climas de frios intensos, sendo recomendado plantar no período que compreende entre o final da primavera ao início do verão. Para que a planta tenha um bom desenvolvimento, esta deverá ser plantada em solos de pH que vão de neutros a ácidos. Além disso, é considerada uma planta de fácil cultivo, bastando espetar no chão um pedaço do seu ramo (CASEIRO *et al.* 2006).

### **3.2.3 Uso na medicina popular**

A planta *E. tirucalli* é utilizada na medicina popular africana como repelente de insetos; o seu látex é usado contra a impotência sexual, epilepsia, dor de dente, hemorróidas, picadas de cobra e tosse; a raiz é utilizada para picadas de cobras e o chá das folhas é utilizado para infecções bacterianas. Na Malásia os ramos e a infusão da raiz são aplicados em sangramentos.

Na Índia, esta planta é utilizada na maioria dos lares tradicionais como um remédio para diversos casos, como: aumento do baço, asma, lepra, leucorréia, dispepsia, icterícia, cólicas, tumores e pedras na bexiga. Além disso, o seu látex é considerado emético em doses grandes, mas um purgante em pequenas doses e aplicada contra dores de dente, dores de ouvido, reumatismo, verrugas, tosse, neuralgia e picadas de escorpião (KUMAR, 1999). Além do látex, são utilizadas suas raízes em caso de picadas de cobras, e seus ramos para pesca (FURSTENBERGER; HECKER, 1986). Já no Peru a

planta *E. tirucalli* vem sendo utilizada para o tratamento de abscessos, câncer e cólicas (WEBSTER, 1967).

Na península da Malásia, Índia e Indonésia a decocção das raízes, folhas ou ramos são aplicadas em ulcerações, hemorroidas, hanseníase, paralisia de mãos e pés após o parto, inchaços, espinhas e usadas em casos de cólicas e gastrite.

No Brasil, a planta *E. tirucalli* é usada principalmente contra o câncer, epitelomas, sarcomas, tumores e verrugas (VAN DAMME (1989).

Na região nordeste do Brasil, o látex de *E. tirucalli* é usado como agente antimicrobiano, laxativo, parasitoses intestinais, asma, tosse, dor de ouvido, reumatismo, verrugas, câncer, cancro, epitelioma, sarcoma, tumores de pele e como um remédio popular contra a sífilis (CORREIA, 1994; BETANCUR-GALVIS et al, 2002).

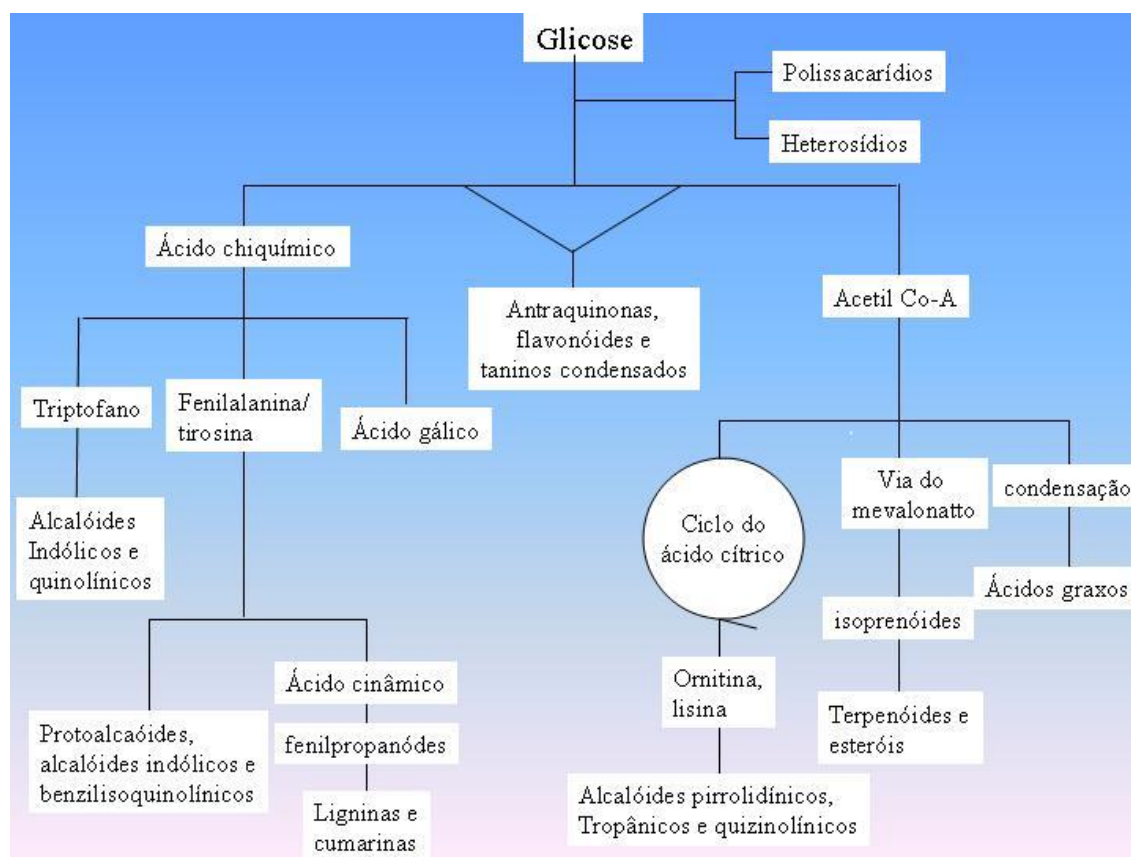
No entanto, a posologia utilizada para esses diversos tipos de patologias é muito variada, baseada somente no conhecimento empírico. Para ser utilizada externamente, como, por exemplo em verrugas, indica-se colocar uma pouca do látex sobre o local. No caso de feridas com pus, primeiro deve-se lavar as feridas e, depois, pingar algumas gotas do látex sobre a ferida (SILVA; SANTOS, 2002; CASEIRO *et al.* 2006).

Para uso interno, recomenda-se pingar três gotas do látex, sendo cada uma em um respectivo copo com 150mL de água para serem tomados durante o dia. Outra forma de utilização seria de preparar um copo com água e nele pingar uma gota do látex para posteriormente ingerir uma colher de sopa a cada 60 minutos. Outra maneira para uso interno seria adicionar 6 gotas do látex em 2 litros de água e, depois, tomar um copo três vezes ao dia. Outra forma de administração oral da *E. tirucalli* L. é a partir de seus ramos, sendo utilizado uma porção equivalente a cobertura da área de uma das palmas das mãos do indivíduo. A quantidade de material vegetal obtida é colocada em um recipiente contendo 150 mL de água, para que seja, na sequência, submetido à fervura por 10 minutos. Após, deixa-se esfriar para que a preparação seja ingerida ao longo do dia.

### **3.2.4 Metabolismo secundário**

O metabolismo das espécies vegetais é dividido em primário e secundário. No metabolismo primário, existem várias substâncias que são produzidas pelos vegetais, como as proteínas, lipídios, carboidratos e os ácidos nucleicos, os quais são essenciais

para a sobrevivência das espécies, formados a partir da fotossíntese em plantas verdes (KOEFFENDER; BURIOL, 2007). Já no metabolismo secundário, as substâncias são produzidas através de várias rotas denominadas biossintéticas, que variam de acordo com a família botânica das espécies. Tanto os metabólitos primários como os secundários são formados a partir do metabolismo da glicose demonstrado na Figura 2 (FUNASAKI; KATO, 2006). Para comparação da variação taxonômica entre as espécies relacionada ao seu metabolismo secundário, podemos citar a família Lamiaceae que é rica em compostos triterpênicos, óleos essenciais e iridóides, enquanto a família das Euphorbiaceae apresenta, dentre seus constituintes químicos, os compostos diterpenos (SILVA; SANTOS, 2002; VARRICCHIO *et al.* 2008). A formação desses diterpenos na *Euphorbia tirucalli L.*, que são da classe dos terpenos, são considerados de interesse para o estudo da planta, tendo o início de sua biossíntese através da via do mevalonato, a qual será relatada a seguir.



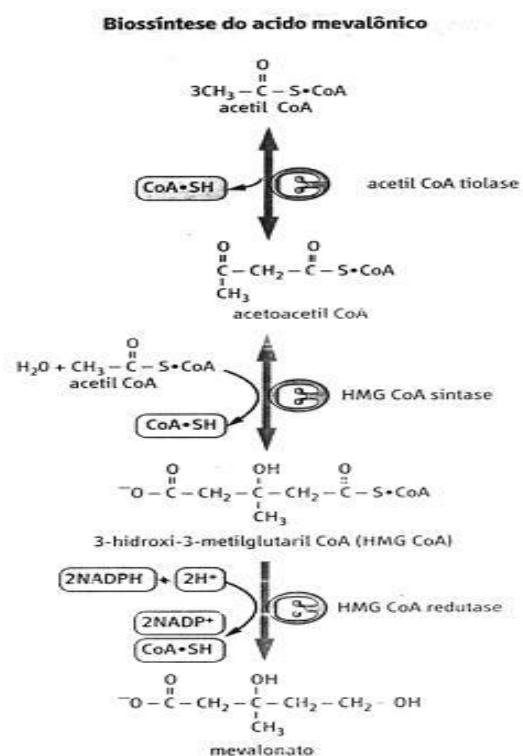
Fonte – Oliveira, 2009.

**Figura 2** – Metabolismo primário e secundário dos vegetais



A formação do mevalonato é proveniente do metabolismo da glicose, mais especificamente pela condensação aldólica da acetil-CoA juntamente com acetoacetil-CoA (Figura 4), que, posteriormente, sofre uma hidrólise dando origem ao 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA, o qual passa a ser reduzido a mevalonato em uma reação irreversível. Após essa reação, o mevalonato será convertido em isopentil-pirofosfato (IPP), constituindo, assim, uma unidade básica para a formação dos terpenos e esteróides (DEY; HARBONE, 1997).

Na rota biossintética, o IPP é convertido em seu isômero o dimetil-alil-pirofosfato (DMAPP) formando o trans-geranyl-pirofosfato, que gera os demais terpenos que são classificados pelo número de unidades isoprênicas presentes em sua estrutura (DEY; HARBONE, 1997; SILVA; SILVEIRA, 2007). Os principais terpenos encontrados na espécie *Euphorbia tirucalli* L. são os diterpenos (20C) e os triterpenos (30C) (VARRICCHIO *et al.* 2008).



Fonte – Chemello; Guerra, 2004.

**Figura 3** – Biossíntese do Ácido Mevalônico

As substâncias presentes nas espécies vegetais que geralmente despertam interesse de estudo, no que diz respeito às suas atividades biológicas ou tóxicas são provindas do seu metabolismo secundário. De modo geral, as plantas possuem inúmeros

metabólitos secundários, que, dentre estes, através de vários métodos e experimentos são elucidados as suas estruturas químicas e, posteriormente, suas atividades farmacológicas, tanto das substâncias que estiverem em maior concentração, quanto das de menor proporção (NETO; LOPES, 2007; FILHO; YUNES, 1998).

Neste sentido, diversos estudos vêm tentando elucidar os constituintes químicos presentes no metabolismo secundário de *Euphorbia tirucalli* L., buscando uma associação às suas respectivas atividades biológicas, baseadas, inicialmente, no conhecimento empírico da população.

### 3.2.5 Constituintes químicos

A família botânica das *Euphorbiaceae* ao longo dos anos vem sendo bastante estudada, devido à presença de vários constituintes químicos, em especial de algumas moléculas bioativas que foram isoladas e identificadas como ésteres de forbol e outros compostos diterpenos semelhantes. Uma das espécies pertencentes a esta família é a *Euphorbia tirucalli* L., a qual apresenta algumas desses constituintes que foram e estão sendo identificadas ao longo das pesquisas (GRANJA; QUEIROZ, 2003).

Alguns pesquisadores descobriram que o seu látex é composto por água (53,8% a 79,9%), diterpenos do tipo tigliane (ésteres de forbol), ingenane (ésteres de ingenol), dafnanos e dafnanos aromáticos. Enquanto outras pesquisas avaliaram o seu látex fresco e identificaram álcool terpênico, taraxasterol (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>OCH<sub>30</sub>H) e o tirucalol (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O). Um outra análise revelou que seu látex seco apresentou 75,8 a 82,1% de resina, a qual supõe-se que seja o seu principal componente (SILVA et al. 2007; VARRICCHIO et al. 2008; GRANJA; QUEIROZ, 2003).

No entanto, os pesquisadores da planta, embasados nas análises fitoquímicas realizadas, apontam relevância aos hidrocarbonetos terpênicos, açúcares e ácidos orgânicos. Todavia, o composto de maior interesse, parece ser o éster de forbol, de nome químico: 3,3'-di-o-methylellagic-acid, 12-o-(2z)(4e)-octadienoyl-4-deoxyphorbol-13-acetato considerado um agente pró-cancerígeno, e também o 4-desoxi-forbol; o 12-o-tetradecanoil forbol-13-acetato, 12-0-(22)(4E)-octadienol-4-deoxiforbol-13-acetado, ácido 3, 3'-di-0-metil-elágico (LORENZI; MATOS, 2002; SILVA JÚNIOR, [s.d]; VARRICCHIO et al. 2008). Além deste, podem ser encontrados outros compostos, como o acetato de sapogenina, flavonóides, óleos essenciais

(eugenol), ácido succínico, ácido elágico, ácido cítrico, ácido málico, hentriacontano, hentriacontanol, kampeferol, isoeuphoral, taraxerin, glicose e beta-sitosterol (LORENZI; MATOS, 2002).

### **3.2.6 Efeitos Farmacológicos e Toxicológicos**

Vários estudos têm demonstrando que a concentração dos metabólitos secundários vegetais sofre alteração quantitativa em função da influência de fatores climáticos, fornecimento hídrico, época de plantio e colheita, horário de coleta, nutrição e manejo do solo, (NETO; LOPES, 2007). Devido a isso, é possível observar uma variabilidade na concentração de compostos presentes na espécie *E. tirucalli* L., como em ésteres diterpênicos de forbol, como o ingenano e o tigliano, quando obtidos de diferentes locais de plantio, trazendo variabilidade dos efeitos descritos em literatura (FURSTENBERGER; HECKER, 1986).

#### **3.2.6.1 Atividade Imunossupressora**

Em estudos *in vitro* realizados por AYA e colaboradores (1991) foi demonstrado que um constituinte presente no látex da *E. tirucalli* L. africana, denominado 4-desoxiforbol, parece ter a capacidade de promover uma redução na imunidade celular específica associada à ativação da replicação do vírus Epstein-Barr (EBV) em sua fase latente, ilustrada por um aumento da infecção dos linfócitos B pelo vírus, provavelmente por danos ao DNA leucocitário, associado, ainda, a uma provável supressão imunológica.

#### **3.2.6.2 Atividade Antiviral e Antifúngica**

Na Colômbia, estudos *in vitro* realizados por BETANCUR e colaboradores (2002) a partir de dados etnofarmacológicos de espécies da família *Euphorbiaceae*, demonstraram que três das dez espécies testadas apresentaram elevada atividade contra os vírus Herpes Simples tipo 2 e EBV, sem, contudo, promover atividade citotóxica nos parâmetros e modelos de avaliação utilizados. Dentre estas, encontrava-se a *E. tirucalli*

L. No Brasil, SOUZA e colaboradores (2011), testaram o efeito de proteínas presentes em algumas plantas secretoras de látex contra algumas cepas fúngicas. Os resultados obtidos apontaram para a presença de atividade antifúngica para duas das espécies testadas, contudo, não foi encontrada atividade inibitória para o látex da *E. tirucalli* L. sobre as cepas testadas.

### 3.2.6.3 Atividade Mielomoduladora e Antiinflamatória

A utilização do látex da *E. tirucalli* L. pela medicina não formal para o tratamento de diversos tipos de cânceres motivou Valadares e colaboradores (2006) a avaliarem *in vivo* a possível propriedade mielomoduladora em tumores de ascite de Ehrlich (EAT). Em seus estudos foi possível observar que os extratos etanólicos (125, 250 e 500 mg/Kg), após indução tumoral, estimularam a mielopoiese e a redução do volume do baço, o que não aconteceu com o grupo que sofrera somente a indução tumoral. Nestes, pelo contrário, foi deflagrada mielossupressão e esplenomegalia. No que diz respeito aos níveis plasmáticos de prostaglandinas, que geralmente encontram-se drasticamente elevados devido ao processo inflamatório causado pelo tumor, foi observado recuperação a níveis admitidos como normais para os animais que receberam os extratos da planta. Entretanto, não foram elucidados os mecanismos pelos quais foram obtidos aqueles resultados, o que não permitiu estabelecer se há somatória de atividades ou se os efeitos observados são consequência um dos outros.

Além disso, RAVIKANTH e colaboradores (2002), demonstraram que outra espécie do gênero *Euphorbia*, a *Euphorbia nivulia*, também possui atividade antiinflamatória *in vitro* por inibição da atividade da prostaglandina E<sub>2</sub>. Contudo, seus constituintes químicos são diferentes aos encontrados na *E. tirucalli* L., muito embora pertençam à mesma classe química, ou seja, diterpenos (3,12-diacetil-8-benzoilingol e 3,12-diacetil-7-benzoil-8-nicotinolingol) e triterpenos (cicloart-25-en-3 $\beta$ -ol e o ciclonivulinol). Estes achados sugerem que a atividade antiinflamatória possa estar presente em várias espécies de *Euphorbiaceae* e, talvez, esteja relacionada à presença de di e triterpenos na constituição comum do gênero.

#### 3.2.6.4 Atividade Antiartrítica

BANI e colaboradores (2006) avaliaram a atividade antiartrítica da *E. tirucalli* L. em camundongos, a partir de uma fração biopolimérica de arabinose, glicose, xilose e galactose, obtida a partir do extrato etanólico de folhas e caule. No final deste estudo, foi observada uma redução do volume de exudato nas patas dos animais e do número total de leucócitos pela fração biopolimérica, de forma dose dependente. Além disso, foi observada uma redução da permeabilidade vascular mais efetiva (40,32%) que o controle utilizando ibuprofeno (38,7%), quando comparados ao grupo que recebeu somente indução artrítica.

Estudo realizado por UZABAKILHO e colaboradores (1987), analisou quatro espécies, da família *Euphorbiaceae*, originárias do continente africano, avaliando a composição química destas plantas a partir de extratos produzidos com solventes de diferentes polaridades, como acetona e diclorometano. Assim, foi possível observar, principalmente na espécie *E. tirucalli* L., que na fração diclorometano estavam presentes cetonas de cadeia longa e o composto cis-1,4-poliisopreno. Enquanto que na fração acetona foram identificadas cetonas triterpênicas e triterpenóis tetracíclicos, entre eles o eufol, tirucallol e o euforbol.

#### 3.2.6.5 Atividade Tumoral e Antitumoral

A promoção de tumores por *E. tirucalli* L. também foi observada por MATOS & ARMELIN (2007), relacionando o aparecimento das lesões nos animais analisados à estimulação celular, através de uma rápida ativação da proteína quinase C – PKC, mesmo em altas diluições.

Neste sentido, a indução de câncer pela planta parece estar relacionada aos ésteres de forbol presentes na espécie, uma vez que estes parecem competir com o diacilglicerol pelo mesmo sítio de ligação, a PKC (ITO et al., 1981; BOSCH, 2004; VARRICCHIO et al., 2008; SCHAAN, 2003).

Cabe ressaltar que a PKC é regulada por sinais bioquímicos extrínsecos, como por exemplo, hormônios e fatores de crescimento, além de eventos de transdução de sinais, respondendo a estímulos específicos neuronais, hormonais e dos fatores de

crescimento. A ativação e a translocação da PKC do citosol até a membrana plasmática ocorre devido a um aumento transitório de diacilglicerol ou pela exposição a outros agentes como os ésteres de forbol, que podem desencadear processos apoptóticos, proliferação celular através de uma elevada estimulação ou desregulação, que estão diretamente relacionadas a várias doenças como diabetes mellitus, problemas cardiovasculares, câncer, entre outros (SILVA et al. 2009; SCHAAN, 2003; LENZ; SALBEGO, 1996).

Neste contexto, WADA e colaboradores (2002) observaram que a partir de várias sínteses do constituinte 4-deoxiphorbol foram originadas quatro novas moléculas com variações na sua hidrofiliidade desativando a PKC, diferindo das reações apresentadas pelos ésteres de forbol, podendo assim, caracterizarem-se como potenciais antitumorais e antivirais a serem explorados. Considerando essa capacidade de modificação estrutural, que leva a características diferentes de seus compostos, é possível gerar diversas atividades biológicas de interesse clínico-farmacológico.

### **3.2.6.6 Atividade Esplenohepatotóxica**

Estudos realizados por Varricchio e colaboradores (2008) avaliaram os possíveis efeitos toxicológicos crônicos em diferentes concentrações do látex da *E. tirucalli* L. sobre o peso do fígado e do baço em camundongos, baseados em informações etnofarmacológicas. Os resultados obtidos pela pesquisa demonstraram não haver sinais de toxicidade nas concentrações administradas durante o período do experimento. O peso do fígado não apresentou variações significativas, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, houve variação no peso do baço quando os animais foram submetidos à concentração maior utilizada no experimento. Por outro lado, as análises histopatológicas e bioquímicas dos órgãos não apresentaram alterações quando comparadas às amostras do grupo controle.

Alguns autores têm descrito efeitos nefro e hepatotóxicos da planta *E. tirucalli* L., bem como ação imunossupressora e promotora de tumores (ITO et al., 1981; BOSCH, 2004). Estes resultados, aparentemente paradoxos entre os pesquisadores, podem estar relacionados às concentrações utilizadas, pois como observado ao longo deste trabalho, os relatos de toxicidade parecem estar relacionados às concentrações mais elevadas utilizadas da droga vegetal.

### 3.2.6.7 Atividade Anticolinesterásica

Estudos demonstraram que a droga vegetal, provavelmente em função dos ésteres de forbol presentes no látex, é capaz de induzir inibição da acetilcolinesterase (VARRICCHIO et al., 2008). O estudo desta atividade deveria ser mais explorado e aprofundado, dada sua potencialidade no emprego como droga colinérgica, o que traduz uma grande variabilidade de aplicação clínico-farmacológica.

### 3.2.6.8 Atividade Desacopladora da Cadeia Respiratória

Tendo em vista que os ramos da *E. tirucalli* L. são utilizados na pesca para facilitar a captura de peixes, Tiwari & Singh (2006), realizaram um estudo para tentar elucidar o porquê da morte ou diminuição da mobilidade píceca ao entrar em contato com extrato da planta, admitido como concentrado, se comparado a outros estudos. Os resultados apontaram para geração de estresse oxidativo a partir de alterações na cadeia respiratória dos peixes. Estes achados reforçam a ação tóxica de extratos obtidos da planta ou de suspensões a partir de seu látex, pelo menos em parte, quando estes são preparados em doses mais elevadas.

Esses achados são corroborados aos encontrados por Kumar e colaboradores (2010), que evidenciaram o látex da *E. tirucalli* L. como sendo mais deletério que os pesticidas organofosforados e piretroides testados.

### 3.2.6.9 Potencial Biocombustível

A busca para dominar tecnologia relacionada à obtenção de energia renovável é crescente e necessária, uma vez que as jazidas petrolíferas não estão uniformemente distribuídas em todos os continentes e países, o que traz percalços econômicos aos países que não dispõem de uma fonte própria e abundante deste recurso.

Neste sentido, Rajasekaran e colaboradores (1989) buscaram avaliar o potencial da *E. tirucalli* L. como fonte renovável de combustível, mais precisamente para a produção de biogás, a partir da biodigestão anaeróbica da planta com um composto

orgânico. Para este estudo, foi utilizado esterco bovino e ramos cominuídos da planta em proporções equivalentes. Nesta mistura, foi demonstrada uma maior produção de gás, quando comparada ao processo que utilizou somente esterco como substrato gerador de gás. Este resultado foi atribuído ao látex da planta, devido a sua composição por açúcares, enzimas, óleos, sais e outras substâncias, que são consideradas como substratos favoráveis ao crescimento microbiano, o que por consequência, seria responsável pelo aumento da produção de gás.

Se a busca de novas possibilidades de geração de energia são uma constante, não menos frequente se faz presente na cadeia produtiva o interesse em aumentar a produtividade agrícola. Esta, por sua vez, passa pelo controle de pragas, que, maciçamente, é realizado através de agroquímicos. Neste sentido, Kumar e colaboradores (2010), apontam o látex da *E. tirucalli* L. como uma nova possibilidade para controle de pragas.



#### 4. ARTIGO CIENTÍFICO

***Euphorbia tirucalli* extract induces cytotoxicity, genotoxicity and changes in antioxidant gene expressions levels in human leucocytes**

Emily Pansera Waczuk<sup>2</sup>; Jean Paul Kamdem<sup>1</sup>; Amos Olalekan Abolaji<sup>1</sup>; Daiane Francine Meinerz<sup>1</sup>; Diones Caeran Bueno<sup>1</sup>; Thallita do Nascimento<sup>1</sup>; Thais Scotti do Canto Dorow<sup>4</sup>; Aline Augusti Boligon<sup>3</sup>; Margareth Linde Athayde<sup>3</sup>; João Batista Teixeira da Rocha<sup>1</sup> Daiana Silva de Ávila<sup>2</sup> \*

<sup>1</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 18, sala 2425, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Pampa, BR 472 Km 585 Sala 403, CEP 97500-970 Uruguaiana, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Program of Post-Graduation in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Campus Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

\* Corresponding author:

Daiana Silva de Ávila

Universidade Federal do Pampa, BR 472 Km 585 Sala 403, CEP 97500-970 Uruguaiana, RS, Brazil.

## ABSTRACT

*Euphorbia tirucalli*, popularly known as avelós, is a toxic plant traditionally used as a tea in the Brazilian folk medicine for the treatment of various diseases including antibacterial, antiviral and anticarcinogenic. However, there is no scientific report of the toxic effects of this plant in human cells which may arise from its consumption, as well as the mechanisms by which it induces its toxicity. Therefore, the objective of the present study was to evaluate *in vitro* the genotoxicity and cytotoxicity potential of aqueous extract of *E. tirucalli* in human leukocytes using comet assay and trypan blue exclusion respectively. In addition, the effect of the aqueous extract of *E. tirucalli* on osmotic fragility was investigated in human erythrocytes. Furthermore, we evaluated the qRT-PCR expressions of selected antioxidant mRNA genes (SOD2, CAT and GPx4). Our results demonstrated that exposure of *E. tirucalli* to human leukocytes caused significant increase in DNA damage at the higher concentrations tested (100-150 µg/mL), which was associated with a significant decrease of cellular viability at concentrations 10 to 150 µg/mL. In contrast, *E. tirucalli* did not induce hemolysis of human erythrocytes at all the concentrations tested. Exposure of *E. tirucalli* (10-50 µg/mL) to human leukocytes significantly up-regulated the mRNA of SOD2 and CAT genes expressions, and significantly decreased the mRNA of GPx4 at higher concentrations (100-150 µg/mL). In addition, the mRNA gene expression of SOD2 was down-regulated at the highest concentration tested (150 µg/mL). In summary, based in the results of genotoxicity observed in our study, we recommend caution in the acute or chronic use of this homemade prepared. Taken together, our results suggest that the extract aqueous of *E. tirucalli* induces genotoxicity and cytotoxicity to human leukocytes, possibly by interacting with the antioxidant enzyme system, thereby, increasing the formation of ROS and decreasing the cellular tolerance level to chemical constituents of this plant. Therefore, we recommend caution in the acute or chronic use of this plant.

**Key-words:** *Euphorbia tirucalli*, genotoxicity, cytotoxicity and gene expression.

## INTRODUCTION

Exposure to several environmental xenobiotics generate reactive oxygen species (ROS) as by products, that can cause living organisms to be susceptible to diseases and toxicity, which could eventually lead to death. ROS are potentially toxic reactive molecules-produced during cellular metabolism. At low levels, they are known to act as modulators or as signaling molecules in redox systems (Gilston et al., 2001; Upham and Trosko, 2009). On the other hand, elevated levels of ROS can induce-oxidation of proteins, lipids and DNA, leading to cellular damage, apoptosis and cell death (Perry et al., 2000; Rahman and Adcock, 2006). Furthermore, oxidative stress has been associated with the progression and severity of several chronic diseases, such as atherosclerosis, aging, diabetes and other degenerative diseases in humans (Cai et al., 2004; Cairns et al., 2011; Poulson et al., 1998; and Halliwell and Gutteridge, 1998). The cell redox signaling system is controlled by balancing between activity and gene expression of antioxidant enzymes and ROS generation, emphasizing which free radical generation occur primarily in the mitochondrial organelles (Finkel, 1998; Dalton et al., 1999; Rahman et al., 2005, 2006; Prigione et al., 2010). The endogenous (enzymatic) and exogenous (non-enzymatic) antioxidant defence system maintain the reducing environment necessary to protect the organism against oxidative damage (Rezaie, Parker, & Abdollahi, 2007). These systems include catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) as well as flavonoids, polyphenols and vitamin C (Dalton et al., 1999; Rezaie, Parker, & Abdollahi, 2007). In oxidative stress conditions, these classical antioxidant enzymes modulate their activities and expression to secure redox balance in the cell (Fukai and Ushio, 2011).

For several millennia, plants have been used for pharmaceutical and dietary therapy (Williamson, 2003). According the World Health Organization (WHO), about 80% of the world population use natural sources for their primary health care (Atsamo et al., 2011; Jordan et al., 2010). The consumption of natural antioxidants has been associated with reduced risk of pathological conditions such as cancer that is considered the second leading cause of death in the world (Niki, 1997; Mclarity, 1997; Cai et al., 2004). Thus, there is a growing interest in natural compounds isolated from plants as rich sources of novel anticancer drugs (Cai et al., 2004). Clinical evidences indicate that these phytochemicals exert their actions through antioxidant mechanism. Recently, several *in vitro* and *in vivo* studies have that cellular metabolism and antioxidant enzymes

expression can be modulated by dietary phytochemicals (Rodrigo, et al., 2002; Fernández et al., 2009; Puiggròs, et al., 2009; Robb et al., 2011; Estruch, et al., 2011; Skibola and Smith, 2000).

However, despite the apparent beneficial health effects of plants, their safety assessment studies are required due to the reports of intoxications, diseases and fatalities (Stewart et al., 1999; Ernst, 2002; Veiga-Junior et al., 2005). This may be due to their pro-oxidant activity, wide variability of secondary metabolites, which can be potentially toxic (Dickançaité et al., 1998; Sahu and Gray 1997). Considering the biological variation and complexity of plants in general, the toxicological assays are necessary to evaluate their safety, quality and efficacy (WHO, 2002).

*Euphorbia tirucalli* L. belongs to Euphorbiaceae family, and it originated from tropical East Africa, specifically in the region of Madagascar. It is endemic in countries such as Kenya, Ethiopia, Angola, Sudan and Tanzania (Van Damme, 1989, 2001; Schmelzer and Gurib-Fakim 2008). This plant is one of the 8,000 species best known and most widespread within Euphorbiaceae family, being widely distributed in tropical and subtropical regions of the planet (Webster, 1994; Gildenhuis, 2006). It is well-adapted in Brazil and has been progressively introduced in Brazilian culture due to its use in the treatment of several diseases in the traditional medicine Hindu, Chinese and African (Gildenhuis, 2006; Varricchio, 2005). It is found throughout Brazil, more specifically in the state of Amazonas in the Northeastern region, and also on the coast of São Paulo state (Correia, 1994).

Despite being a toxic plant (NEIVA, 1968), it is used in several countries for therapeutic purpose. This plant is used in African folk medicine against warts, snake bites, cough, sexual impotence, hemorrhoids, epilepsy and cancer (Schmelzer and Gurib-Fakim, 2008; Van, 1989). In India, it is the plant most used by population as ornamental and medicinal for to treat asthma, leprosy, leucorrhoea, bladder stones and tumors (Van Damme, 1989). In Brazil, it is popularly known as “avelós” and is used in folk medicine to treat illness, laxative agent, rheumatism, cancer, tumors and warts (Valadares et al., 2006). Despite the wide usage of this plant, it has been reported to be co-carcinogenic and anticarcinogenic (Gschwenot and Hecker, 1969; Hecker, 1968; Alves, and Nepomuceno, 2012). Branches decoctions are used against leprosy, stomachache and paralysis of limbs postpartum (Van Damme, 2011). Phytochemical characterization of the branches and latex of *E. tirucalli* reveals the presence of a large range of bioactive constituents such as alkaloids, flavonoids, polyphenols (Yoshida and

Yokoyama, 1991), triterpenoids (Uchida et al. 2010), including the phorbol diterpene esters (Khan and Malik, 1990), as the major components (Biesboer et al., 1982; Furstenberger and Hecker, 1986). The branches and latex of *E. tirucalli* are known to exhibit various pharmacological activities such as antiviral (Betancur et al., 2002) molluscicide (Juberg et al., 1985), antibacterial (Lirio, et al., 1998) and myelomodulating activity (Valadares et al., 2006).

Indeed, the safety of the use of this plant has recently been an issue of concern due to the reports of illness (Van den Bosch et al., 1993; Imai et al., 1994; MacNeil et al., 2003) and intoxications (Stewart et al., 1999; HSUEH, et al., 2004; Varricchio et al., 2008). The toxic principles of the plant is not yet fully known (Albuquerque et al., 2004). Moreover, all parts of the plant are toxic and studies report that the plant components may induce inflammation (Kinghorn et al., 1979), apoptosis in tumor cells (Duarte et al., 2009), cytotoxic activity (Betancur et al., 2002) nephron and hepatotoxicity (Ito et al., 1981; Bosch, 2004; TIWARI; SINGH, 2006). The plant *E. tirucalli* may modulate leukocyte functions and alter expression of the cells involved in the immune response (Avelar et al., 2011), but little is known about the mechanisms involved in these effects and there are no reports that assess its genetic toxicity and cytotoxicity in leukocytes *in vitro*. To support the popular use and ethnopharmacological indication of *E. tirucalli*, this study proposes to investigate the phytochemical profile, genotoxicity, cytotoxicity and antioxidant gene expressions of the aqueous extract from branches in human leucocytes and hemolytic potential in erythrocytes.

## *Materials and methods*

### *Chemicals*

All chemical used were of analytical grade. DMSO (Dimethyl sulfoxide), trypan blue, dextran, tungstosilicic acid and Triton X-100 were obtained from Sigma, (St. Louis, MO., USA). NaCl, EDTA, Tris, were obtained from commercial sources. Other chemicals were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

### *Plant material*

The plant *E. tirucalli* was collected in Company of Agricultural Research and Rural Extension (EPAGRI) of Chapecó/SC, Brazil, (latitude (26° 57'31.96" N, longitude 51°0'23.76" W) in January 2010. A voucher specimen was identified by Prof. Dr. Thais Scotti do Canto-Dorow and deposited in the Herbarium of Department of Biology of Universidade Federal de Santa Maria under number SMDB 14.451.

### *Preparation of extract*

The aqueous extract of *E. tirucalli* was obtained through decoction method, according to traditional folk use. This was prepared by soaking 8g dried pharmacogen (branches) in 150mL of solvent (distilled water) for 5 minutes. Afterwards, the extract obtained was filtrated, lyophilized and stored at -80°C for evaluations.

### *Quantification of phenolics and flavonoids compounds by HPLC-DAD*

The High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) profile of aqueous extract from the branches of *E. tirucalli* was realized according Laghari et al., (2011) with slight modifications. Identification of phenolics and flavonoids compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C<sub>18</sub> column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles. The mobile phase was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 5% of B until 2 min and changed to obtain 25%,

40%, 50%, 60%, 70% and 100% B at 10, 20, 30, 40, 50 and 80 min, respectively. All the samples and mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.031 – 0.250 mg/ml for kaempferol, quercetin and rutin; and 0.006 – 0.250 mg/ml for gallic, caffeic and chlorogenic acids. The flow rate was 0.6 ml/min, injection volume 40 µl and the wavelength were 254 nm for gallic acid, 327 nm for caffeic and chlorogenic acids, and 365 nm for quercetin, rutin and kaempferol. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 500 nm). Calibration curve for gallic acid:  $Y = 11611x + 1468.8$  ( $r = 0.9999$ ); chlorogenic acid:  $Y = 14762x + 1257.5$  ( $r = 0.9997$ ); caffeic acid:  $Y = 11526x + 1293.1$  ( $r = 0.9995$ ); rutin:  $Y = 13035x - 1045.9$  ( $r = 0.9998$ ); quercetin:  $Y = 15105x - 1192.3$  ( $r = 0.9998$ ) and kaempferol:  $Y = 15223x - 1303.9$  ( $r = 0.9999$ ). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

#### *DPPH radical scavenging activity.*

The free radical scavenging capacity of *E. tirucalli* extract was analyzed by DPPH test assessed according to the method of Koleva et al, (2002), with some modifications. Briefly, 50 µl of extract aqueous at different concentrations (1 to 150 µg/ml) was mixed with 100 µl of DPPH (3mM) in microplate wells. After, the microplate was kept in the dark at room temperature for 30 min. Absorbance was read at 517 nm using a microplate reader. Vitamin C was used as a positive control (McCune and Johns, 2002). The radical scavenging activity was measured as a decreased in the absorbance of DPPH and was calculated as follows: (% inhibition):  $(100 - [A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}] / A_{\text{control}}) \times 100$ , where,  $A_{\text{control}}$  is referent the absorbance of the control group,  $A_{\text{sample}}$ , is the absorbance of the sample and  $A_{\text{blank}}$  is referent the absorbance of the blank (Tsimogiannis and Oreopoulou, 2006).

#### *In vitro assay*

Heparinized venous blood was obtained from healthy volunteer donors from the Hospital of Federal University of Santa Maria (UFMS), Santa Maria, RS, Brazil (age 30

± 15). Committee of UFSM approved the protocol of study for performing of current tests under number (089.0.243.000-07). The leukocytes were separated by differential erythrocyte sedimentation utilizing dextran 5% and posterior adjust of samples to  $2 \times 10^6$  leukocytes / mL with Hank's buffer solution saline (HBSS) / heparin (KCl 5.4 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.3 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4 mM,  $\text{NaHCO}_3$  4.2 mM,  $\text{CaCl}_2$  1.3 mM,  $\text{MgCl}_2$  0.5 mM,  $\text{MgSO}_4$  0.6 mM, NaCl 137 mM and d-glucose 10 mM, Tris – HCl 10 mM, heparin 15 UI / mL, adjusted to pH 7.4). The method for separation of erythrocytes consisted of centrifugation (2000 rpm for 10 min at room temperature) and the plasma was aspirated. The cell pellet was washed three times with phosphate buffer saline (6.1 mM, containing NaCl 150 mM in pH 7.4). The leukocytes and erythrocytes isolated of total blood were pre-incubated with different concentrations of aqueous extract of *E. tirucalli* for 180 min at 37°C. After pre-incubation, cells were used for the *in vitro* assays. For Hemolysis activity, erythrocytes were pre-incubation further time as described below.

#### *Comet assay*

The comet assay (SCGE) was carried out according the method described by Collins (2004). Peripheral blood leukocytes isolated, as described above, were incubated for 180 min with the different concentrations (10-150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of the extract. Then, 15  $\mu\text{L}$  leukocytes suspension ( $2 \times 10^6$  leukocytes/mL) were mixed with low-melting point agarose and subsequently added to 90  $\mu\text{L}$  of LMP agarose 0.75 % (w/v), mixed, and placed on a microscope slide pre-coated with normal melting point agarose 1 % (w/v). A coverslip was added and the samples were left to solidify at 4°C. The coverslips were removed and the slides were placed on a lysis solution (NaCl 2.5M); EDTA 100mM; Tris-HCl 8mM; TritonX-100 1%; pH 10-10.5) during 24 hours at 4°C. Afterwards, the slides were incubated in an electrophoresis solution (NaOH 300 mM; EDTA 1 mM; pH 13.5) for 20 minutes at 4°C, which was performed (25V; 300mA; 7W). All the steps were performed in the dark until this moment. After electrophoresis, the slides were neutralized in Tris-HCl 400 mM; pH 7.5, rinsed three times in distilled water, and left to dry at room temperature. The slides were re-hydrated for 3 min in distilled water and fixed for 10 min in trichloroacetic acid 15% (w/v), zinc sulfate 5 % (w/v) and glycerol 5% (v/v), rinsed three times in distilled water, and left to dry room temperature. Then, the rehydrated slides were stained with sodium carbonate 5%, ammonium nitrate 0.1%, silver nitrate 0.1%, tungstosilicic acid 0.25% and formaldehyde 0.15% (w/v). The



staining was stopped with 1% acetic acid and slides were air-dried. One hundred randomly selected cells per sample were scored visually according to tail size and intensity in five classes (from undamaged, 0, to maximally damaged, 4), according to Figure 1. Damage index (DI) was defined as follows:  $DI = 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4$ , where,  $n_1$  represents the number of cells with damage level 1;  $n_2$ , represents the number of cells with damage level 2;  $n_3$ , represents the number of cells with damage level 3, and  $n_4$ , represents the number of cells with damage level 4. Positive control group was treated with methyl methanesulfonate (MMS) ( $2 \times 10^{-5}$  M) and negative control with distilled water.

#### *Cell viability analysis*

The cell viability was determined by trypan blue exclusion test following the method of Mischell and Shiingi (1980). The leucocytes were incubated for 180 min, as explained above. After, 50 $\mu$ L of Trypan's Blue (0.4%) was mixed with 50 $\mu$ L of leucocytes for 5 min at room temperature. Cell viability was determined microscopically and calculated as the number of living cells divided by the total number of cells multiplied by 100. The comet assay was performed only when cell viability was >90%, as defined by the method of Singh et al. (1988). Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (2mM) plus sodium azide 1mM were used as positive control.

#### *Osmotic fragility assay*

The osmotic fragility of erythrocytes was estimated by measuring their resistance to lysis by decreasing concentration of saline solutions as described by Oyewale (1993) with minor modifications. Five hundred microliters portion of erythrocytes suspended treated with aqueous extract in 900  $\mu$ L buffer solution (TFK 6.1 mM, NaCl 150mM) in ph 7.38, was added to test eppendorf. After incubation at room temperature, the samples were remixed and centrifuged at 2500 rpm for 10 min and submitted to varying concentrations of NaCl (0 to 0.9%). Subsequently, the contents of test eppendorfs were centrifuged again. The supernatants were removed and the hemoglobin content read at 540 nm. Results are expressed as a percentage of PBS control group.

### *Analysis of gene expression using RT-PCR*

Afterwards treatment, the leukocytes were immediately centrifuged at 700 g for 5 minutes, the supernatant discarded and the pellet resuspended in 1 ml Trizol™ (Invitrogen, USA). Purification of total RNA will be made according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, USA). RNA samples were treated with DNase (DNase amplification grade, Invitrogen, USA) and reverse-transcribed to cDNA using the enzyme reverse transcriptase MLVRT-M- (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) according to the instructions of the manufacturer (Invitrogen). PCR was performed within a linear range of amplification using these lected primer sets: 5'-AGATCCAACCCAAGGGCAAG-3' and 5'-GACGGTGTCCAAACTTGGTG-3' for Glutathione peroxidase 4 (GPX4); 5'-TCACATCAACGCGCAGATCA-3' and 5'-CTGGGCTGTAACATCTCCCTT-3' for Mn superoxide dismutase 2 (Mn-SOD); 5'-TGGAAAGAAGACTCCCATCG-3' and 5'- CCAACGAGATCCCAGTTACC-3' for Catalase (CAT) and 5'-TTCGTCATGGGTGTGAACC-3' and 5'-AGTTGTCATGGATGACCTTGG-3' for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), as the control housekeeping gene. All samples were run in triplicate.

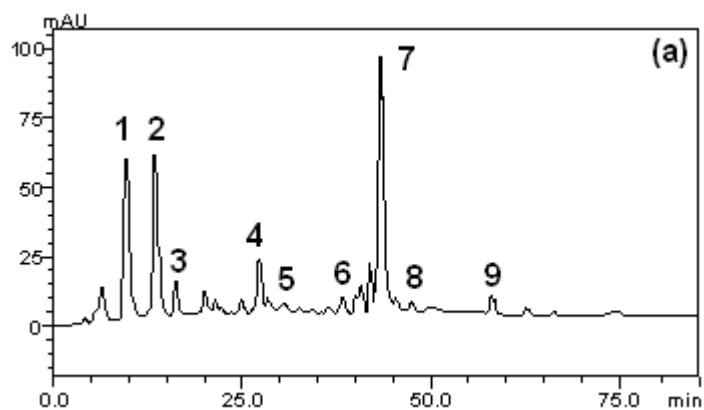
### *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed using analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple test when appropriate. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM for four independent replicates. The difference was considered significant when.

## RESULTS

### HPLC-DAD analysis

HPLC profile of branches aqueous extract of *E. tirucalli* revealed the presence of the gallic acid derivative (tR = 10.54 min; peak 1), gallic acid derivative (tR = 10.82 min; peak 2), gallic acid (tR = 15.17 min; peak 3), chlorogenic acid (tR = 27.08 min; peak 4), caffeic acid (tR = 31.17 min; peak 5), rutin (tR = 39.19 min; peak 6), flavonoid derivative (tR = 44.59 min; peak 7), quercetin (tR = 48.83 min; peak 8) and kaempferol (tR = 57.66 min; peak 9) shown in Fig. 1 and Table 1.



**Fig 1.** Representative HPLC profile of *E. tirucalli* L., detection UV was at 254nm. (a) *Euphorbia tirucalli* L. aqueous extract 5 mg/mL. Gallic acid derivatives (peak 1 and 2), Gallic acid (peak 3), chlorogenic acid (peak 4), caffeic acid (peak 5), rutin (peak 6), flavonoid derivative (peak 7), quercetin (peak 8) and kaempferol (peak 9).

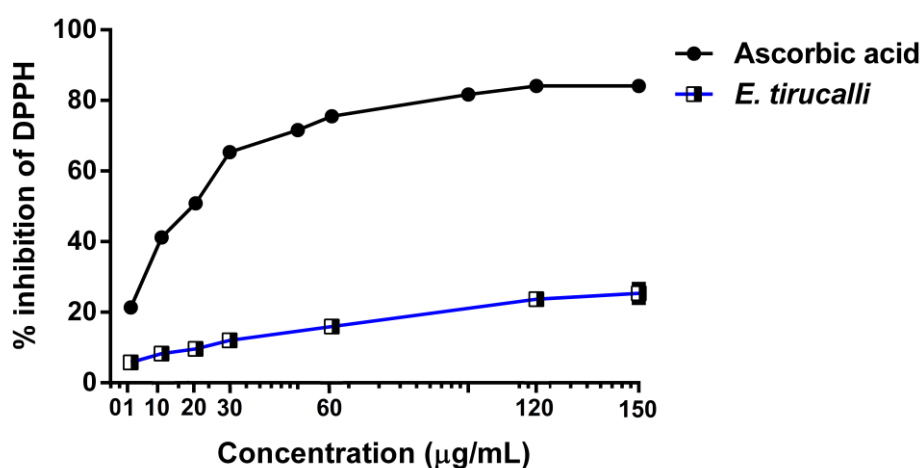
**Table 1. Composition of Flavonoids and Phenolic Acids in branches extract of *E. tirucalli*.**

Peak	Compounds	(a) Extract (5 mg/mL)	
		Quantities (mg/g)	Percent
1	Gallic acid derivative*	11.94 ± 0.05 a	1.19
2	Gallic acid derivative*	12.65 ± 0.02 a	1.26
3	Gallic acid	2.73 ± 0.11 b	0.27
4	Chlorogenic acid	5.09 ± 0.08 c	0.51
5	Caffeic acid	0.92 ± 0.06 d	0.09
6	Rutin	1.65 ± 0.13 e	0.16
7	Flavonoid derivative #	20.73 ± 0.04 f	2.07
8	Quercetin	1.49 ± 0.05 e	0.14
9	Kaempferol	11.94 ± 0.05 a	0.20

Results are expressed as mean ± standard deviations (SD) of three determinations. Quantified as: \*gallic acid and #quercetin. Averages followed by different letters in the column differ by Tukey test at  $p < 0.001$ .

#### *Effect of scavenging DPPH radicals*

In this experiment, was evaluated the antioxidative activity of the aqueous extract of *E. tirucalli* by using the DPPH assay, known formally as 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Figure 2 shows the antioxidant capabilities of the plant extract compared to ascorbic acid. The activities antioxidant of extract of *E. tirucalli* was increased gradually with the increased concentration but did not was higher than ascorbic acid.



Results are presented as means  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ ). Differences are considered to be statistically significant if  $P < 0.05$  when compared to control.

### Cell viability

Fig. 3 shows the percentage of cell viability of the leukocytes treated with different extract concentrations, using hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) as a positive control. After 90 min of exposure, the trypan blue dye exclusion test showed that aqueous extract of *E. tirucalli* L. did not cause any significant toxic effects on leukocytes at concentrations up to 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . However, cells exposed to the extract above the concentration 10  $\mu\text{g}$  ( $p=0.05$ ) caused a significant concentration-dependent decrease in the cell viability. Furthermore, the treatment with hydrogen peroxide caused a significant decrease in the cell viability (63.33%) when compared to control treatment (96.11%) ( $p=0.0001$ ).

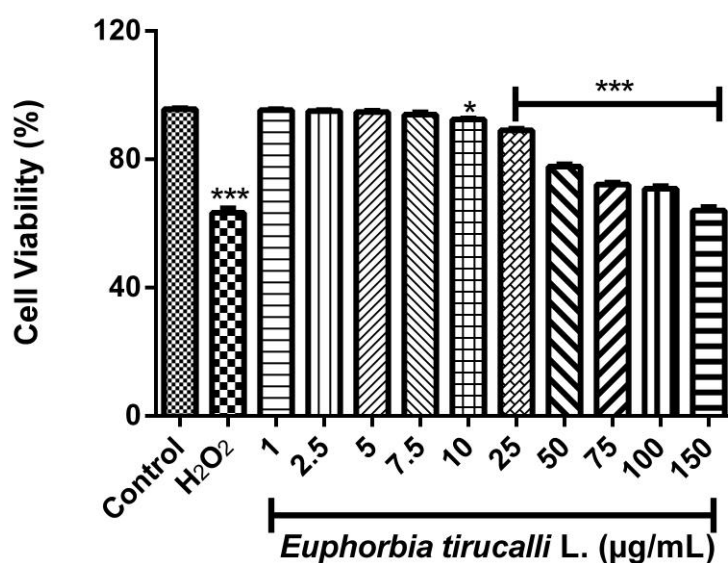


Fig 3. Effect of aqueous extract of *E. tirucalli* L. on the cell viability in human leukocytes *in vitro*. Denoted \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.0001$  different from negative control. Data are expressed as means and  $\pm$  SEM of four independent experiments.

### Assessment of genotoxicity

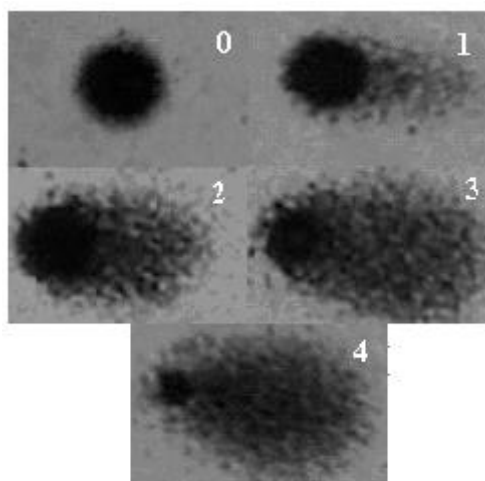
Table 2 shows the effects of aqueous extract of *Euphorbia tirucalli* L. on the DNA damage in human leukocytes *in vitro* was used the comet assay under alkaline conditions. *Euphorbia tirucalli* L. aqueous extract showed a significant increase in the damage index at concentrations of 100 and 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , inducing DNA breaks in a dose-

dependent manner. In contrast, low concentrations the aqueous extract did not induce a significant increase in damage index, suggesting that this extract did not induce DNA double-strand breaks in relation to the control. The MMS (Methyl methanesulphonate) used as a positive control caused a significant increase in the damage index when compared to the control ( $p=0.0001$ ). The damage score for each cell can range between 0 (no damage) and 4 (maximum damage), according to Figure 4.

**Table 2:** Comet Assay: Frequency of damage levels and index damage from the aqueous extract of *E. tirucalli* L.

Treatment	Concentration	Level of DNA damage a (percentage of cells)					D.I.
		0	1	2	3	4	
Control (H <sub>2</sub> O)	0	95,87 ± 0,62	3,00 ± 0,84	1,12 ± 0,23	0 ± 0	0 ± 0	5,25 ± 0,43
MMS	2 x 10 <sup>-5</sup> M	20,62 ± 2,26	20,37 ± 3,18	29,62 ± 2,65	11,12 ± 3,39	18,25 ± 2,78	186,0 ± 4,97***
Extract of <i>E. tirucalli</i> L.	10 µg	95,12 ± 0,23	4,12 ± 0,37	0,75 ± 0,32	0 ± 0	0 ± 0	5,62 ± 0,42
	25 µg	94,87 ± 0,23	4,25 ± 0,43	0,75 ± 0,14	0 ± 0	0 ± 0	5,75 ± 0,32
	50 µg	94,50 ± 0,35	4,25 ± 0,32	1,25 ± 0,32	0 ± 0	0 ± 0	6,75 ± 0,59
	75 µg	94,25 ± 0,59	4,75 ± 0,82	1,00 ± 0,45	0 ± 0	0 ± 0	6,75 ± 0,66
	100 µg	92,62 ± 0,12	4,00 ± 0,20	2,50 ± 0,20	0,87 ± 0,23	0 ± 0	8,12 ± 0,51*
	150 µg	91,87 ± 0,12	4,62 ± 0,12	2,5 ± 0,12	1,00 ± 0,20	0 ± 0	12,60 ± 0,52**

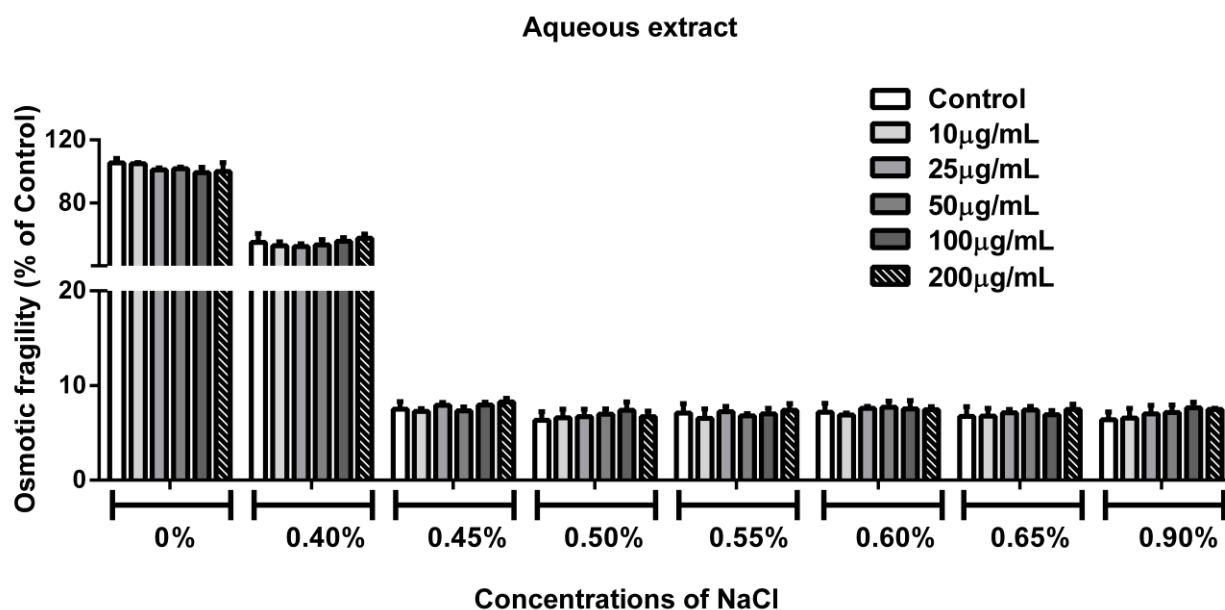
Results are expressed as mean ± SEM for four independent experiments. Levels of damage: Two-way ANOVA - Bonferroni post tests. Damage index (D.I): One way ANOVA - Kruskal-Wallis. The differences were considered significant when \* $p > 0.05$ , \*\*  $p > 0.01$  and \*\*\* $p > 0,0001$  as compared to control values.



**Fig 4.** DNA damage levels in human leukocytes was performed by visual score, using an optical microscope to evaluation of DNA migration length in the tail, classified in damage levels from 0 to 4 by comet assay.

### *Osmotic fragility test*

The effect of different concentrations of *Euphorbia tirucalli* aqueous extract on the Osmotic fragility test in erythrocytes is shown in Figure 5. The results obtained from osmotic fragility assay indicated that different concentrations of *Euphorbia tirucalli* L extract did not change the osmotic fragility along time. However, the maximal hemolysis effect (100%) was obtained with Triton X-100 detergent used as a positive control when compared with the control group ( $p = 0.0001$ ).



**Fig 5.** Osmotic fragility of erythrocytes treated with aqueous extract of *E. tirucalli* L. Absorbances of the supernatants were measured at 540 nm. Hemolysis in each tube was expressed as a percentage of the absorbance in distilled water (control). The bars represent the means of  $n = 3$  independent experiments performed in duplicate  $\pm$  SEM

### *Gene expression of the antioxidant enzymes*

Fig. 6 shown the gene expression of the antioxidant enzymes (Catalase, MnSOD and GPx4) in leukocytes treated with aqueous extract determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). Leucocytes exposed to aqueous extract had a significant increased of gene expression of Catalase and MnSOD at the lowest doses tested when compared to the control expression respectively (Fig. 6A and 6B). On the other hand, was observed a significant decrease of expression of MnSOD and GPx4 at

the highest concentrations (Fig. 6B and 6C). Although a significant decreased of the GPx4 expression has been observed at lowest dose (Fig. 6C).

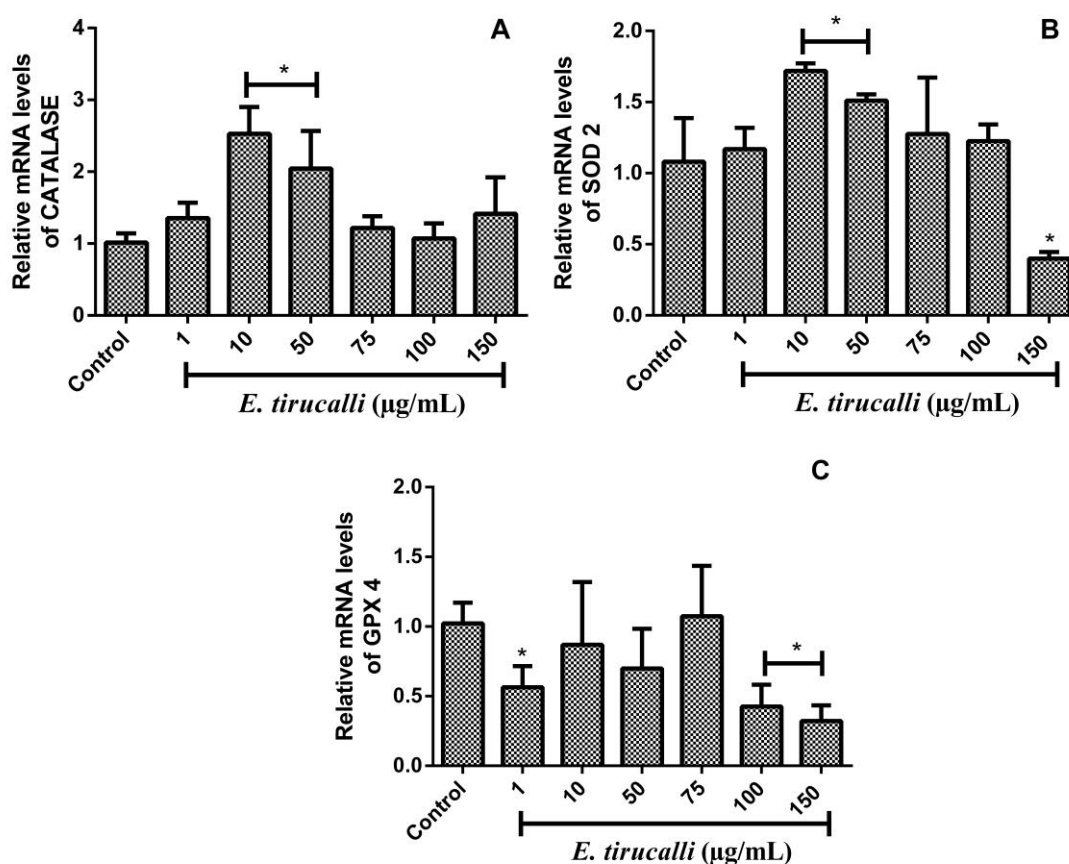


Figure. 6 Response of gene expressions (mRNA) of the antioxidant enzymes (a) Catalase, (b) MnSOD and GPx4 to increasing concentrations of extract aqueous of *E. tirucalli* L. in human leukocytes in vitro. Values are given as mean  $\pm$  SEM of n=3 independent experiments and triplicate measurements.

## DISCUSSION

Currently, about 50 % of all drugs submitted for anticarcinogenic activity during clinical trials were isolated from natural sources or are related to them (Cragg and Newman, 2000). The plants from the Euphorbiaceae family are widely distributed in almost all habitats resulting in a richer assemblage of unusual secondary metabolites within the family (Seigler, 1994). Studies have shown that some of these plants may exhibit therapeutic and/or toxic properties (Hirota and Suttajit, 1988; Vogg et al., 1999; Fürstenberger and Hecker, 1985; Bani et al., 2007). Although, some species of this family have been reportedly used as medicinal herbs because of their antiviral and



antitumor properties (Kuo et al., 2006; Amirghofran et al., 2006; Yang et al., 2005; Lage et al., 2010; Alves and Nepomuceno, 2012), however, other members of these species are potentially poisonous (Seigler, 1994). On the other hand, the biological pathways involved in these processes have not been identified. Previous studies have shown that plants of the genus *Euphorbia* have the ability to alter some cellular and molecular parameters of the immune system (Amirghofran, et al., 2008; Singh et al., 2006). It is now well established that some phytochemicals may affect or modulate antioxidant enzymes activities leading to the generation of important pharmacological and toxicological consequences (Middleton et al., 2000). Moreover, the genotoxic assessment of natural herbs with promising therapeutic potential is of utmost importance because DNA damage induced by several agents including plants could play a key role in the process of carcinogenesis and inherited genetic diseases (Middleton et al., 2000).

Since the human population would benefit maximally from herbs only when rigorous toxicological analysis are performed incidental to their clinical use (WHO, 2002), the present study was carried out to investigate the toxicity potential of *E. tirucalli* L using human leucocytes as model. Although, *E. tirucalli* L has been the subject of several studies due the discovery of its potent biological and toxicological properties in traditional folk uses. However, to our, there are still few toxicological studies on the plant and besides, the existing reports present conflicting results depending on the model used. At present, no genotoxic or cytotoxic activity of *E. tirucalli* on the peripheral blood cells has been demonstrated.

Thus, this investigation was undertaken *in vitro*, not only to evaluate of this aspect but also of possible modulatory effect of intracellular redox equilibrium based on changes in gene expression of some antioxidant enzymes also using human leukocytes. The preparation method of the extract established in the present study was based on its folk use by humans. The range of doses tested was based on preliminary experiments (data not shown) as the concentrations that did not induce genotoxicity, cytotoxicity and gene expression of antioxidant enzymes in human leukocytes and erythrocyte hemolysis *in vitro*. In the first set of experiments, we evaluated the general toxicity from aqueous extract using the comet assay and cell viability tests *in vitro*. The comet assay is the most useful means for the detection of potential genotoxicity (Hartmann and Speit, 1997). An increase in genotoxicity is associated with an increased overall risk of cancer (Granath et al., 1999). The *in vitro* alkaline version of the comet assay is increasingly

being utilized in genotoxicity assays due to its applicability to various cell types and tissues, detection of momentary DNA damage such as strand breaks, DNA-DNA and alkali-labile sites (Tice et al., 2000).

In the present study, the results showed that the highest concentrations tested increased the DNA damage in human leukocytes using comet assay compared with that in undamaged cells, indicating a genotoxic effect of this extract. Our literature review found only which two studies analysed the genetic toxicity, but only of the plant latex *E. tirucalli*, demonstrating absence of genotoxicity (Paiva et al., 2011; Oliveira and Nepomuceno, 2004). However our results suggest which there are in the aqueous extract of the branches genotoxic compounds that should be evaluated in future studies. Furthermore, under certain conditions, plant products may induce genotoxic effects, due to the presence of multiple chemical constituents and biological properties. The chemical constituents frequently found in extract of this plant are the flavonoids, triterpenoids and diterpenoids, phorbol esters, which is the main constituents of Aveloz, which are believed to be responsible for its activities both *in vivo* and *in vitro*. Some studies on genotoxicity of flavonoids reported both protective and genotoxic effects depending on the specific compound and/or assay. However, other studies have demonstrated that some flavonoids, such as kaempferol, quercetin, and Rutin possess toxic and genotoxic effects depending of their concentrations (Silva et al., 2002; Soares et al., 2006; Carlo et al., 1999).

Moreover, our other goal was to determine whether the extract is cytotoxic to human leukocytes *in vitro*. According to the American National Cancer Institute, a cytotoxic effect of a promising anticancer product is only considered significant if it exerts an effect below the dose of 30mg/mL (Suffness and Pezzuto, 1990). However, the toxic effects of the extract of *E. tirucalli* could be attributed mainly to phorbol esters, which are toxic phytochemicals commonly found in plants of the Euphorbiaceae family, primarily in the genus *Euphorbia*. Thus, we reason that the flavonoids previously mentioned and the phorbol esters could be associated with the genotoxicity, cytotoxicity and even changes in gene expression demonstrated by extract of *E. tirucalli*, and thereby deserve further evaluation (Goel et al., 2007). In addition, our recent data showed a induction of the oxidative stress and mitochondrial dysfunction of the aqueous extract from branches of *E. tirucalli* in mitochondria of the liver of rat *in vitro* (Waczuk et al, Unpublished data). Oxidative stress and, thus, ROS play an important role in the modulation of several physiological functions, but also accounts for changes that can

be detrimental to the cells (Dröge, 2002). ROS are shown to contribute to cellular damage, apoptosis and cell death, but also involved in regulation of gene expression by controlling signal transduction through direct participation in cell signaling, and/or modulation of cell redox state (Dalton et al., 1999; Finkel, 1998).

Under physiological conditions, ROS are effectively neutralized by primary enzymes of the antioxidant defense system constituted by the SOD, CAT, GPx and non-enzymic antioxidants (El-Bahr, 2013). Therefore, this study also aimed to evaluate the effects of this extract on gene expression of antioxidant enzymes defense system of human leukocytes *in vitro*. The reports in the literature regarding the involvement of constituents of plants of the family euphorbiaceae in the modulation of intracellular redox equilibrium of the expression of antioxidant enzymes are contradictory. However, some studies have shown which plant constituents may act directly or indirectly modifying antioxidant enzyme gene expression involved in oxidative metabolism (Masella et al., 2005; Schroeter et al., 2002), but the mechanisms of this modulation still need to be better understood in future studies. The majority of free radical are produced in the mitochondria where MnSOD and GPX 4 are believed to play central role in protecting against oxidative damage (Weisiger and Fridovich, 1973; Matés et al., 1999), and its antioxidant effect is strongly dependent on its expression level (Silva et al., 2005).

The results presented here suggests that compensatory increases in enzymes expression of CAT and Mn SOD were to overcome raised oxidative stress or direct inhibitory effects of ROS. This defensive mechanism is postulated by many authors (Go et al., 2010; Farmand et al., 2005; Lodi et al., 2011; Moro et al., 2010). However, a suggestive increase in the cell oxidative stress in leukocytes led to a reduction in the expression of mRNAs coding for the antioxidant enzymes Mn-SOD and GPx 4. A decrease in SOD activity could be due to massive production of superoxide anions, which override enzymatic activity (Hamed et al., 2010; Weisiger and Fridovich, 1973). Moreover, ROS may act as signals to directly or indirectly modify gene expression patterns involved in oxidative metabolism but the mechanisms of this modulation still need to be better understood. The non significant effect of the extract on total red blood cells may be due the interaction of the flavonoids or other chemical constituents with the membrane of erythrocytes inhibits lipid peroxidation, and at the same time enhances their integrity against hypotonic lysis (Chaudhuri et al., 2007). The observed differences between effects of the extract in leukocytes and erythrocytes may be due to the fact that

anucleate protein biosynthesis in red blood cells differs from protein biosynthesis in leukocytes. Besides, the differences in metabolism between these cells and their possible interactions with countless natural constituents may also influence with the activity and expression of antioxidant enzymes (Drew, 2012).

## CONCLUSION

In conclusion, the determination of the safety of natural products is very important since toxicity represents an important obstacle in drug development. Therefore, despite the fact that plants are known to possess natural compounds with promising anticarcinogenic activity, however, based on the genotoxicity of toxicity *E. tirucalli* observed in our study, we recommend caution in the acute or chronic use of this homemade prepared. The results revealed that the aqueous extract from branches of *E. tirucalli* has the capability to induce genotoxicity and cytotoxicity, that may interact with the antioxidant enzyme system increasing thereby the formation of ROS and decreasing the cellular tolerance level to chemical constituents of this plant. Although, the aqueous extract of *E. tirucalli* seems to up-regulated the gene expression of antioxidant enzymes, the present study did not clarify the exact mechanism of action of the extract on the examined genes. Therefore, the present study recommends further investigation regarding this point.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The financial support by FAPERGS / PRONEX, CNPq, CAPES.

## REFERENCES

Amirghofran, Z., Azadmehr, A., Bahmani, M.; Javidnia, K. Stimulatory effects of *Euphorbia cheiradenia* on cell mediated immunity and humoral antibody synthesis. *Iran J Immunol*, v. 5, n. 2, p. 115-123, Jun. 2008.

Amirghofran, Z., Bahmani, M., Azadmehr, A., Javidnia, K. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by *Linum persicum* and *Euphorbia cheiradenia*. *J. Cancer Res Clin Oncol*, v.132, n.7, p. 427-432, Jul. 2006.

Avelar, Bethânia A., Lélis, Felipe J. N., Avelar, Renato S., Weber, Mathias, Souza-Fagundes, Elaine M., Lopes, Miriam T. P., Martins-Filho, Olindo A., & Brito-Melo, Gustavo E. A. The crude latex of *Euphorbia tirucalli* modulates the cytokine response of

leukocytes, especially CD4+ T lymphocytes. Rev. bras. farmacogn., Curitiba, v. 21, n. 4, Aug. 2011.

Alves, E.M, Nepomuceno, J.C. Evaluation of the anticarcinogenic effect of the latex of “avelós” (*Euphorbia tirucalli*), through the test for detection of tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. Perquirere, 9(2):125-140, dez. 2012.

Albuquerque, H.N, Albuquerque, I. C. S, Menezes, I. R, Monteiro, J. A., Barbosa, A. R., Cavalcanti, M. L.F. Utilização da Maniçoba (*Manihot glaziovii* Mull., Euphorbiaceae) na caça de aves em Sertânia-PE. Revista de Biologia e Ciências da Terra. v.4, nº2, 2004.

Atsamo, A.D., Nguenefack, T.B., Datté, J.Y., Kamanyi, A., 2011. Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. Journal of Ethnopharmacology 134, 697–702.

Bani S., Kaul A., Khan B., Gupta V.K., Satti N.K., Suri K.A., Qazi G.N. (2007). Anti-arthritic activity of a biopolymeric fraction from *Euphorbia tirucalli*. Journal of Ethnopharmacology 110:92-98

Betancur, G. L. A.; Morales, G. E.; Forero, J. E.; Roldan, J. Cytotoxic and Antiviral Activities of Colombian Medicinal Plant Extracts of the *Euphorbia* genus. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 97:541-546; 2002.

Biesboer, D.D.; Damour, P.; Wilson, S.R.; Mahlberg, P. (1982). Sterols and Triterpenols in latex and cultured tissues of *Euphorbia pulcherrima*. Phytochemistry; USA, 21 (5).

Bosch Ca Van Den. (2004). Is endemic Burkitt’s lymphoma an alliance between three infections and a tumour promoter? The Lancet Oncology. 5:738–746.

Cairns, A. R., Harris, I. S., Mak, T. W (2011). Regulation of cancer cell metabolism. Nature Reviews Cancer. 11:85-95

Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with cancer. Life Sci. 74:2157-2184

Carlo, G. D., Mascolo, N and Izzo, A.A. Flavonoids: Old and New aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sciences 1999. 4:337-353.

Correia, M. P. Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, . v. 63, Rio de Janeiro, 1994.

Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair. Molecular Biotechnology 26, 249–261.

Cragg G.M.; Newman D.J. (2000) Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Expert Opin Invest Drugs* 9, 1-15.

Chaudhuri, S; Banerjee, A; Basu, K; Sengupta, B; Sengupta, P. K. (2007) Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(1), 42-48.

Dalton, T.P., Shertzer, H.G., Puge, A., 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 67–101.

Dickancaitė, E.; Nemeikaitė, A.; Kalvelytė, A.; Cėnas, N. Prooxidant character of flavonoid cytotoxicity: structure-activity relationships. *Biochem. Molec. Biol. Int.* 45(5):923-930;1998.

Duarte, N., Ramalheite, C., Varga, A., Molnar, J.; Ferreira, M. J. Multidrug resistance modulation and apoptosis induction of cancer cells by terpenic compounds isolated from *Euphorbia* species. *Anticancer Res.* 29:4467-4472; 2009.

Drew, J. E. Cellular Defense System Gene Expression Profiling of Human Whole Blood: Opportunities to Predict Health Benefits in Response to Diet. American Society for Nutrition. *Adv. Nutr.* 3: 499–505, 2012

Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.

Ernst E (2002). Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines. *Trends Pharmacol. Sci.*23: 136-139.

Estruch R, Sacanella E, Mota F, Chiva-Blanch G, Antúnez E, Casals R, Deulofeu R, Rotillo D, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventos RM, de Gaetano G, Urbano-Marquez A. Moderate consumption of red wine, but not gin, decreases erythrocyte superoxide dismutase activity: a randomised cross-over trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:46–53.

El-Bahr SM. Biochemistry of free radicals and oxidative stress. *Science International.* 2013;13:111–117.

Farmand, F., Ehdaie, A., Roberts, C.K., Sindhu, R.K., 2005. Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environ. Res.* 98, 33–39.

Fürstenberger G., Hecker E. (1985). On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). XI. The skin irritant and tumor promoting diterpene esters of *Euphorbia tirucalli*L. originating from South Africa. *Zeitschrift für Naturforschung. Section C: Biosciences* 40:631-646.

Finkel, T., 1998. Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 248–253

Fernández-Pachón MS, Berná G, Otaolauruchi E, Troncoso AM, Martín F, García-Parrilla MC. Changes in antioxidant endogenous enzymes (activity and

gene expression levels) alter repeated red wine intake. *J Agric Food Chem* 2009;57:6578–83.

Fukai T.; Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:1583–606.

Furstenberger, G.; Hecker, E. (1986). On the active principles of the Euphorbiaceae, XII. Highly unsaturated irritant diterpene esters from *Euphorbia tirucalli* originating from Madagascar. *Journal of Natural Products*; Germany, may-jun.

Go, Y.M., Jones, D.P., 2010. Redox control systems in the nucleus: mechanisms and functions. *Antioxid. Redox Signal*. 13, 489–509.

Goel G; Harinder P. S; Makkar HP; Francis G; Becker K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *Int J Toxicol*; 26(4): 279-88, 2007

Gildenhuis S. (2006). The three most abundant tree Euphorbia species of the Transvaal (South Africa). *Euphorbia World* 2:9-14.

Gilston, V.; Williams, M. A.; Newland, A. C.; Winyard, P. G. Hydrogen peroxide and tumour necrosis factor- $\alpha$  induce NF- $\kappa$ B-DNA binding in primary human T lymphocytes in addition to T cell lines. *Free Radic. Res.* 35:681–691; 2001.

Granath FN, Vaca CE, Ehrenberg LG, Törnqvist MA. Cancer risk estimation of genotoxic chemicals based on target dose and a multiplicative model. *Risk Anal.* 1999 Apr; 19(2):309-20.

Gschwenot, M., Hecker, E., 1969. Tumor promoting compounds from *E. triangularis*. *Tetrahedron Letters* 40, 3509-3512.

Hamed, E.A., Meki, A.R., Abd El-Mottaleb, N.A., 2010. Protective effect of green tea on lead-induced oxidative damage in rat's blood and brain tissue homogenates. *J. Physiol. Biochem.* 66, 143–151.

Halliwell B, Gutteridge MC (1998). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford Science Publications. Pp. 617-784

Hartmann A and Speit G (1997). The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.* 90: 183-188.

Hecker, E., 1968. Co-carcinogenic principles from seed oil of *Croton tiglium* and other Euphorbiaceae. *Cancer Research*, 28, 2338-2349.

Hirota M., Suttajit M. (1988). A new tumor promoter from the seed oil of *Jatropha curcas* L. an intramolecular diester of 12-deoxy-16-hydroxyphorbol. *Cancer Research* 48:5800-5804.

Hsueh K.F.; Lin P.Y.; Lee S.M.; Hsieh C.F. Ocular injuries from plant sap of genera *Euphorbia* and *Dieffenbachia*. *Journal of the Chinese Medical Association*, v.67, p. 93-98, 2004.

Imai, S., Sugiura, M. Mizuno, F., Ohigashi, H., Koshimizu, K. Chiba,S., Osato, T., 1994. African Burkitt's Lymphoma: a plant, *Euphorbia tirucalli*, reduces Epstein-Barr virus-specific cellular immunity. *Anticancer Research* 14, 933-936.

Ito, Y.; Kawanishi, M.; Harayama, T.; Takabayashi, S. (1981). Combined effect of the extracts from *Croton tiglium*, *Euphorbia lathyris* or *Euphorbia tirucalli* and n-butyrate on Epstein-Barr Virus expression in human lymphoblastoid P3HR-1 and Raji cells. *Cancer letters*, USA, 12 : 175 – 180.

Jordan, S.A., Cunningham, D.G., Marles, R.J., 2010. Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 243, 198–216

Juberg, P., Cabral Neto, J.B., Schall, V.T., 1985. Molluscicide activity of the “avelós” plant (*Euphorbia tirucalli*, L.) on *Biomphalaria glabrata*, the mollusk vector of schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 80, 423-427.

Kinghorn, A. D. Characterization of an irritant 4-deoxyphorbol diester from *Euphorbia tirucalli*. *Journal of Natural Products*. 42:112-115; 1979.

Koleva J, Beek TA, Linssen J, Groot A, Evstatieva L. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study of three testing methods. *Phytochem Anal* 2002;13:8–17.

Kuo PL, Cho CY, Hsu YL, Lin TC, Lin CC (2006). Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits proliferation of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 213(1): 37-45

Khan AQ, Malik A (1990). A new macrocyclic diterpene ester from the latex of *Euphorbia tirucalli*. *J. Nat. Prod.*, 53: 728-731

Lage, H., Duarte, N., Coburger, C., Hilgeroth, A., Ferreira, M. J. Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine*, v. 17, v. 6, p. 441-448, Mai. 2010.

Laghari, A.H, Memon, S., Nelofar, A., Khan, K.M., Yasmin, A., 2011. Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. *Food Chem*. 126, 1850–1855.

Lirio L, Hermano M, Fontanilla M (1998). Note Antibacterial Activity of Medicinal Plants from the Philippines. *Pharm. Biol.*, 36: 357-359



- Lodi, S., Sharma, V., Kansal, L., 2011. The protective effect of *Rubia cordifolia* against lead nitrate-induced immune response impairment and kidney oxidative damage. *Indian J. Pharmacol.* 43, 441–444.
- Masella R, Benedetto RD, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 577– 586.
- MacNeil, A., Sumba, O.P., Lutzke, ML., Moormann, A., Rochford, R., 2003. Activation of the Epstein-Barr virus lytic cycle by the latex of the plant *Euphorbia tirucalli*. *British Journal of Cancer* 88, 1566-1569.
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32, 595–603.
- Middleton, E, Jr.; Kandaswami, C.; Theoharis C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*, 52:673–751, 2000.
- Mischell, B.B., Shiingi, S.M., 1980. *Selected Methods in Cellular Immunology*. W.H. Freeman Company, New York. pp. 1–469.
- Moro, A.M., Charão, M., Brucker, N., Bulcão, R., Freitas, F., Guerreiro, G., Baierle, M., Nascimento, S., Waechter, F., Hirakata, V., Linden, R., Thiesen, F.V., Garcia, S.C., 2010. Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. *Sci. Total Environ.* 408, 4461–4467.
- McCune LM, Johns T: Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus by the indigenous peoples of the North American boreal forest. *J Ethnopharmacol* 2002;82:197–205.
- Mclarity JW (1997). Antioxidants and cancer: the epidemiologic evidence. In: Garewall HS (Ed), *Antioxidants and Disease Prevention*. CRC Press, New York. pp.45-66
- Neiva, L. *A cura do câncer pelo Aveloz*. (1968) RJ: Arte Nova S.A., 1ª ed., 54p.
- Niki E (1997). Free radicals, antioxidants, and cancer. In: Ohigashi H, Osawa T, Terao J, Watanabe S, Yoshikawa T(Eds.), *Food Factors for Cancer Prevention*. Springer, Tokyo. pp. 55-57
- Oyewale, J. O., 1993. Effect of storage of blood on the osmotic fragility of mammalian erythrocytes. *J. Vet. Med.*, 40: 258-264.
- Oliveira, A. P.; Nepomuceno, J. C. Avaliação dos efeitos genotóxicos e antigenotóxicos do avelóz (*Euphorbia Tirucalli*), em *Drosophila melanogaster*. *Biosci. J.*, Uberlândia, v.20, n.2, p.179-186, 2004.
- Paiva J.P.; Lima L.G.S.; Siqueira C.M.; Cardoso J.S.; Holandino C.; Costa Leitão A. 2011. Evaluation of the genotoxic and mutagenic potentials of phytotherapeutic and

homeopathic solutions of *Euphorbia tirucalli* Lineu (Aveloz). *Int J High Dilutions Res* 10: 71-72.

Perry, G., Raina, A.K., Nunomura, A., Wataya, T., Sayre, L.M., Smith, M.A., 2000. How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 831–834

Poulson HE, Prieme H, Loft S (1998). Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur. J. Cancer Prevent.* 7(1):9-16.

Puiggròs F, Sala E, Vaque M, Ardevol A, Blay M, Fernández-Larrea J, Arola L, Blade C, Pujadas G, Salvado MJ. In vivo, in vitro, and in silico studies of CU/ZN-superoxide dismutase regulation by molecules in grape seed procyanidin extract. *J Agric Food Chem* 2009;57:3934–42.

Prigione, A., Fauler, B., Lurz, R., Lehrach, H., Adjaye, J., 2010. The senescence-related mi-tochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 28, 721–733.

Rahman, I., Adcock, I.M., 2006. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur. Respir. J.* 28, 219–242

Rahman, I., Biswas, S.K., Jimenez, L.A., Torres, M., Forman, H.J., 2005. Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 42–59.

Rezaie, A., Parker, R. D., & Abdollahi, M. (2007). Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: An epiphenomenon or the cause? *Digestive Diseases and Sciences*, 52(9), 2015–2021.

Robb EL, Stuart JA. Resveratrol interacts with estrogen receptor- $\beta$  to inhibit cell replicative growth and enhance stress resistance by upregulating mitochondrial superoxide dismutase. *Free Radical Biol Med* 2011;50:821–31.

Rodrigo R, Rivera G, Orellana M, Araya J, Bosco C. Rat kidney antioxidant response to long-term exposure to flavonol rich red wine. *Life Sci* 2002;71:2881–95.

Sahu, S. C.; Gracy, G.C. Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. *Food Chem. Toxicol.* 35(5):443-447;1997.

Singh GD, Kaiser P, Youssouf MS, Singh S, Khajuria A, Koul A, Bani KBK, Satti NK, Suri KA, Johri RK 2006. Inhibition of early and late phase allergic reactions by *Euphorbia hirta* L. *Phytother Res* 20(4): 316-321.

Silva J, Hermann S M, Heuser W, Marroni N, González-Gallego J, Erdtmann B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 2002; 40 : 941 – 7.

Soares EA, Varanda B, MSG, Raddi B. In vitro basal and metabolism-mediated cytotoxicity of flavonoids. *Food Chem Toxicol* 2006; 44:835–8.

Schmelzer G.H., Gurib-Fakim A. (2008). Medicinal plants. *Plant Resources of Tropical Africa*. pp. 412–415

Skibola, C. F., Smith, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology & Medicine*. 29:375-387, 2000.

Stewart MJ, Moar JJ, Steenkamp P and Kokot M (1999). Findings in fatal cases of poisoning attributed to traditional remedies in South Africa. *Forensic Sci. Int.* 101: 177-183.

Seigler D.S. (1994). Phytochemistry and systematics of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*: 81:380-401.

Silva J. P., Shabalina I. G., Dufour E., Petrovic N., Backlund E. C., Hulthenby K., Wibom R., Nedergaard J., Cannon B., Larsson N. G. (2005) *EMBO J.* 24, 4061–4070.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184–191.

Suffness, M. & Pezzuto, J.M. (1990). Assays related to cancer drug discovery (Eds. Hostettmann, K.) *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*, Academic Press, London, p.71-133.

Schroeter H, Boyd C, Spencer JPE, et al. 2002. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric acid. *Neurobiol Aging*, 23:861-80.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35(3):206-21.

Tiwari, T.; Singh, A. Biochemical stress response in freshwater fish *Channa punctatus* induced by aqueous extracts of *Euphorbia tirucalli* plant. *Chemosphere*, 64:36-42; 2006.

Tsimogiannis, D.I., Oreopoulou, V., (2006). The contribution of flavonoids C-ring on the DPPH free radical scavenger efficiency. A kinetic approach for the 30,40-hydroxy substituted members. *Food Sci. Emerging Technol.* 7, 140–146.

Uchida H, Ohyama K, Suzuki M, Yamashita H, Muranaka T (2010). Triterpenoid levels are reduced during *Euphorbia tirucalli* L. callus formation. *Plant Biotechnol.*, 27: 105-109

Upham, B.L., Trosko, J.E., 2009. Oxidative-dependent integration of signal transduction with intercellular gap junctional communication in the control of gene expression. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 297–307

Valadares MC, Carrucha SG, Accorsi W, Queiroz ML 2006. *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumour-bearing mice. *Int Immunopharmacol* 6: 294-299.

Van den Bosch, C., Griffin, B.E., Kazembe, P., Dziweni, C., Kadzamira L., 1993. Are plant factors a missing link in the evaluation of endemic Burkitt's lymphoma? *British Journal of Cancer* 68, 1232-1235.

Varricchio, M. C.B.N, Sales, F., Silva, S.; Kuster,R. M.; Pyrrho, A.S.; Castelo Branco, M.L.T.Efeitos Toxicológicos Crônicos do látex bruto de *E. tirucalli* (Aveloz) sobre peso de fígado e baço conforme uso tradicional: Um estudo preliminar. *Biofarm.* 2(2): 6-11, 2008.

Varricchio, M.C.B.N. Estudos Integrados: Biotecnologia, Toxicologia, Metabólitos Especiais e Atividade Antitumoral de *Euphorbia tirucalli* L. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

Van Damme PLJ (2001) *Euphorbia tirucalli* for high biomass production. In:Schlissel A, Pasternak D, editors. *Combating desertification with plants*, Kluwer Academic Pub. pp. 169–187.

Van Damme P. (1989). Het traditioneel gebruik van *Euphorbia tirucalli*. (The traditional uses of *Euphorbia tirucalli*). *Afrika Focus* 5:176-193

Veiga-Junior VF, Pinto AC and Maciel MAM (2005). Medicinal plants: safe cure? *Quim. Nova*28: 519-528.

Vogg G., Mattes E., Rothenburger J., Hertkorn N., Achatz S., Sandermann H. (1999). Tumor promoting diterpenes from *Euphorbia leuconeura*L. *Phytochemistry* 51:289-295.

Williamson, E., 2003. Drug interactions between herbal and prescription medicines. *Drug Safety* 26, 1075–1092

Webster G.L. (1994). Classification of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81:3-32.

Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem.* 1973 May 25;248(10):3582–3592.

WHO (World Health Organization) (2002). *Drug Information Herbal Medicines*. Vol. 16. World Health Organization, Geneva.

Yang, C. M., Cheng, H. Y., Lin, T. C., Chiang, L. C., Lin, C. C. *Euphorbia thymifolia* suppresses herpes simplex virus-2 infection by directly inactivating virus infectivity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 32, n. 5-6, p. 346-349, Mai-Jun. 2005.

Yoshida T, Yokoyama K, Namba O, Okuda T (1991). Tannins and related polyphenols of euphorbiaceous plants: VII. Tirucallins A, B and euphorbin F, monomeric and dimeric ellagitannins from *Euphorbia tirucalli* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 39: 1137-1143.

## 5. DISCUSSÃO

A avaliação da genotoxicidade é um dos mais importantes estudos de segurança não-clínicos exigidos para o registro, aprovação e posterior comercialização de produtos farmacêuticos (MUHAMMAD et al., 2011). Além disso, estudos sobre o potencial genotóxico e citotóxicos de plantas utilizadas pela população, são necessários para identificar os possíveis riscos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos que os inúmeros constituintes químicos podem causar ao organismo humano (ARUOMA, 2003).

Os testes *in vitro* estão sendo muito utilizados em vários estudos científicos para identificação e monitorização de agentes tóxicos (KURODA et al., 1992; HARBELL, et al., 1997). Com isso, o nosso estudo avaliou se o extrato aquoso de *E. tirucalli* poderia apresentar alguma efeito genotóxico, citotóxico e ou modulatório sobre a expressão gênica de algumas enzimas antioxidante inicialmente *in vitro*.

A família botânica da planta *E. tirucalli*, denominada de *Euphorbiaceae*, vem sendo muito estudada devido a utilização popular de várias de suas espécies nas terapias e pela descoberta através dos estudos científicos de algumas moléculas bioativas e outras potencialmente tóxicas (BANI, et al., 2006; GRANJA; QUEIROZ, 2003; HARBELL, et al., 1997).

Assim, com o nosso estudo *in vitro*, pode-se observar que o extrato aquoso de *E. tirucalli* apenas nas duas maiores concentrações testadas induziu um aumento significativo no dano do DNA. Além disso, a exposição dos leucócitos ao extrato aquoso demonstrou atividade citotóxica significativa, caracterizada pela diminuição da viabilidade celular a partir da concentração de 10µg/mL do extrato. Esses resultados sugerem que, o extrato aquoso de *E. tirucalli* poderia apresentar risco toxicológico aos seus usuários, uma vez que, até o presente momento não haviam sido desenvolvidos estudos de genotoxicidade e citotoxicidade com os modelos utilizados.

Algumas pesquisas vinham demonstrando os efeitos tóxicos do extrato aquoso de *E. tirucalli* utilizando diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (KINGHORN, 1979; FURSTENBERGER; HECKER, 1986; AYA, et al., 1991; TIWARI et al., 2003; SOUZA; LORENZI, 2005; SILVA et al., 2007; VARRICCHIO et al., 2008). Uma dessas pesquisas realizada por Silva e colaboradores (2007) demonstrou que o efeito *in vivo*, do extrato desta planta na gestação, tem a capacidade de promover leucopenia, e sugeriu

que tal efeito poderia estar relacionado a um constituinte presente na espécie, o acetato miristato de forbol (SILVA, et al., 2007). Já em outro estudo, Aya e colaboradores (1991), sugerem que a exposição do vírus Epstein Barr *in vitro* ao constituinte 4 deoxyphobol presente na planta *E. tirucalli*, promove um aumento da infecção viral dos linfócitos B devido a possíveis danos no DNA das células de defesa, aliados a uma redução na imunidade celular, que como consequência leva a uma diminuição da capacidade imunitária dos leucócitos (AYA, et al., 1991). Estes resultados podem sugerir que o efeito genotóxico e citotóxico nos leucócitos expostos ao extrato podem ser devido a algum dos constituintes químicos citados, ou de algum outro constituinte que deve ser descoberto com mais estudos científicos. A ausência de efeitos significativos nos eritrócitos pode ser devido a interação dos flavonóides ou outros constituintes químicos com a membrana dos eritrócitos, no qual inibe a peroxidação lipídica e ao mesmo tempo aumenta a sua integridade contra a lise hipotônica (CHAUDHURI et al., 2007).

Sabe-se que a família *Euphorbiaceae* é reconhecida cientificamente pela toxicidade de algumas de suas espécies vegetais, na qual incluem a *Euphorbia tirucalli*, mas o princípio tóxico da família e da planta citada, ainda não está completamente elucidado (SILVA, et al. 2007; ALBUQUERQUE, et al. 2004; LORENZI; MATOS, 2002).

Os resultados obtidos da expressão gênica sugerem que aumentos compensatórios na expressão de enzimas CAT e SOD Mn foram para superar o estresse oxidativo elevado ou efeitos inibitórios diretos das ROS. Este mecanismo de defesa é postulado por muitos autores (GO et al , 2010; . FARMAND et al, 2005 ; . LODI et al , 2011; . MORO et al , 2010). No entanto, um aumento sugestivo na tensão celular oxidativa em leucócitos conduziu a uma redução da expressão de mRNAs que codificam as enzimas antioxidantes MnSOD e GPx 4.

Os relatos na literatura a respeito do envolvimento de constituintes de plantas da família *Euphorbiaceae* na modulação do equilíbrio redox intracelular da expressão de enzimas antioxidantes são contraditórias. No entanto, alguns estudos têm mostrado que os constituintes de plantas podem agir direta ou indiretamente, modificando a expressão do gene da enzima antioxidante envolvida no metabolismo oxidativo (Masella et al, 2005; Schroeter et al, 2002), fato que é sugestivo para os encontrados nesse estudo. Entretanto, os mecanismos dessa modulação ainda precisa ser melhor entendido em estudos futuros.

## 6. CONCLUSÕES

- a) O extrato aquoso de *E. tirucalli* causou danos ao DNA de leucócitos e reduzindo a viabilidade dos mesmos;
- b) O extrato causou aumento na expressão de catalase e MnSOD, indicando uma tentativa de superar o estresse oxidativo elevado ou efeitos inibitórios diretos das ROS, enquanto que um aumento sugestivo na tensão celular oxidativa em leucócitos conduziu a uma redução da expressão de mRNAs que codificam as enzimas antioxidantes MnSOD e GPx 4;
- c) O extrato aquoso de *E. tirucalli* não afetou os eritrócitos expostos, sugerindo uma possível interação de flavonóides ou outros constituintes químicos com a membrana dos eritrócitos, no qual inibe a peroxidação lipídica e ao mesmo tempo pode aumentar a sua integridade contra a lise hipotônica.



## 7. PERSPECTIVAS

Baseado nos resultados apresentados nesse trabalho faz-se necessário:

- a) Elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos observados nesse estudo;
- b) Identificar os constituintes químicos envolvido nos efeitos demonstrados;
- c) Avaliar a influência da variação sazonal no perfil fitoquímico e atividade biológica da planta *E. tirucalli* L.;
- d) Avaliar o perfil fitoquímico de diferentes frações extrativas da planta *E. tirucalli* L. e os seus possíveis efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

ABIFISA – Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica. Informações sobre os fitoterápicos brasileiros, 2009. <www.abfisa.org.br> Acesso em 23 de abr. 2013

ALBUQUERQUE, H.N, ALBUQUERQUE, I. C. S, MENEZES, I. R, MONTEIRO, J. A., BARBOSA, A. R., CAVALCANTI, M. L.F. Utilização da Maniçoba (*Manihot glaziovii* Mull. Euphorbiaceae) na caça de aves em Sertânia-PE. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. v.4, n2, 2004.

AMIRGHOFRAN, Z., AZADMEHR, A., BAHMANI, M. JAVIDNIA, K. Stimulatory effects of *Euphorbia cheiradenia* on cell mediated immunity and humoral antibody synthesis. *Iran J Immunol*, v. 5, n. 2, p. 115-123, Jun. 2008.

ANWAR, W. A. Monitoring of human populations at risk by different cytogenetic end points. *Environ Health Perspect*, v. 102, p. 131-134, 1994.

ARUOMA, O. I.. Methodological considerations for characterizing potential antioxidante actions of bioactive components in plant foods. *Mutat Res*, v. 523, p.9-20, 2003.

AYA, T.; KINOSHITA, T.; IMAI, S.; KOIZUME, S. MIZUNO, F.; OSATO, T.; SATOH, C.; OIKAWA, T.; KUZUMAKI, N.; OHIGASHI, H. Chromosome translocation and c-MYC activation by Epstein-Barr virus and *Euphorbia tirucalli* in B Lymphocytes. *Lancet*, v.337, p. 1190, may, 1991.

BARBOSA F. J.M. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.16, ed. 2, pp. 258-285, 2006.

BARROS, S. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extrato of *Pothomorphe umbellate* L. Miq (Pariparoba). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo (SP), v. 41, n. 1, p. 53-61, 2005.

BANI, S.; KAUL, A.; KHAN, B.; GUPTA, V.K.; SATTI, N.K.; SURI, K.A.; QAZI, G.N.. Anti-arthritis activity of a biopolymeric fraction from *Euphorbia tirucalli*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 37 n.4, p.333-336, 2006.

BETANCUR, G. L. A.; MORALES, G. E.; FORERO, J. E.; ROLDAN, J. Cytotoxic and Antiviral Activities of Colombian Medicinal Plant Extracts of the Euphorbia genus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.97, n.4, p.541-546, Jun. 2002.

BICKHAM, J. W.; SANDHU, S.; HERBERT, P. D. N.; CHIKHI, L.; ATHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research*. v. 463, p. 33-51, 2000.

BOCHNER, R.; SOUZA, V.M.F.A. Panorama das intoxicações e envenenamento registrados no Brasil pelo Sistema Nacional de Intoxicações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX). *Rev. Racine, São Paulo*, v.18, n.106, set.-out. 2008.

BORCHERT, A.; SAVASKAN, N. E.; KUHN, H. Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene: tis-sue-specific expression pattern and identification of functional cis-and trans-regulatory elements. *J. Biol. Chem.* 278:2571–2580; 2002.

BOHR, V.A. DNA damage and its processing. Relation to human disease. *J. Inherit. Metab. Dis.*, v. 25, p. 215-222, 2002.

BOSCH, C. A. V. D. Is endemic Burkitt's lymphoma an alliance between three infections and a tumor promoter ? *The Lance Oncology, UK*, v.5, p.738-746, dec. 2004.

BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M. G. CGAR E CGAR-EM na análise dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Sebastiania argutides* (EUPHORBIACEAE). *Quim. Nova, São Paulo*, v. 25, n.1, p. 15-19, jan-fev. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Novas regras padronizam produção de fitoterápicos. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004.

CALIXTO, J. B.; Scheidt C., Otuki M., Santos A. R. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. *Expert Opinion Emerging Drugs*. [S.l.], v.6, n.2, p. 261-279, 2001.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Méd. Biol. Res. Florianópolis*, v.33, n.2, p. 179-189, 2000.

CASEIRO, B.M.; FERREIRA, E.P.; GRILLO, J.G.B.; ARAÚJO, J.H.B. Estudo do potencial de cura de formas de câncer utilizando Avelóz (*Euphorbia Tirucalli*). Mostra de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar (MICTI), Camboriú, Out. 2006.

CECHINEL, F. V., YUNES, R.A. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, p. 47-75, 2001.

CHEMELLO, E.; GUERRA, R. Biossíntese do Ácido Mevalônico. [S.l.], 2004, Disponível em: [www.ucs.br/.../textos\\_interativos\\_09.htm](http://www.ucs.br/.../textos_interativos_09.htm), Acesso em: 25 abr. 2013.

CORREIA, M. P. Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, . v. 63, Rio de Janeiro, 1994.

COSTA, C. T. C; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S. Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.10, n.4, p.108-116, 2008.

COLLINS, A.R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *Molecular Biotechnology*. v. 26, p. 249-261, 2004.

COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, v. 23, p.143–151, 2008.

DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M. Plantas Medicinais: fármacos derivados de plantas. In: SILVA, P. Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 134-145, 2002.

DEY, P. M.; HARBONE, J. B. Plant biochemistry. London: Academic Press, 1997.

DEVASENA, T; LALITHA, S.; PADMA, K. Lipid peroxidation, osmotic fragility and antioxidant status in children with acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Clin Chim Acta*, v. 308, p. 155-161, 2001.

DI STASI, L. C. Plantas medicinais, arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1995.

DUARTE, F. D. Uma breve história do ópio e dos opióides. *Rev. Bras. de Anestesiologia*. v. 55, n.1, p. 135-146, 2005

FERRO, D. Fitoterapia: conceitos clínicos. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégia para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre a modulação estrutural para otimização da atividade. Quim. Nova. Florianópolis, v.21, n.1, 1998.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUZA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F.; Plantas medicinais como Fonte de Recursos terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. MultiCiência. Campinas, n.7, out. 2006.

FUNASAKI, M.; KATO, M.J. Estruturas, atividade biológica e biossíntese de metabólitos secundários de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

FRANCO, S. S.; NARDOCCI, A. C.; GÜNTHER, W. M. R.. PAH biomarkers for human health risk assessment: a review of the state-of-the-art. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 24, p. 569-580, 2008.

GARÓFOLO, A.; AVESANI, C.M.; CAMARGO, K.G.; BARROS, M.E.; SILVA, S. R.J.; TADDEI, J.A.A.C.; SIGULEM, D.M. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. Rev. Nutr., Campinas, n.17 v.4, p. 491-505, out./dez. 2004.

GILSTON, V.; WILLIAMS, M. A.; NEWLAND, A. C.; WINYARD, P. G. Hydrogen peroxide and tumour necrosis factor-alpha induce NF-kappaB-DNA binding in primary human T lymphocytes in addition to T cell lines. Free Radic. Res.35:681-691; 2001.

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, São Paulo, 2003.

GSCWHENOT, M.; HECKER, E.. Tumor promoting compounds from *E. triangularis*. Tetrahedron Letters. v. 40, p. 3509-3512, 1969.

HARBELL, J.W.; KOONTZ, S. W.; LEWIS, R. W.; LOVELL, D.; ACOSTA, D. Cell cytotoxicity assays. *Food and Chemical Toxicology*. v. 35, p. 79-126, 1997.

HECKER, E. Co-carcinogenic principles from seed oil of *Croton tiglium* and other Euphorbiaceae. *Cancer Research*, v. 28, p. 2338–2349, 1968.

ITO, Y.; KAWANISHI, M.; HARAYAMA, T.; TAKABAYASHI, S.. Combined effect of the extracts from *Croton tiglium*, *Euphorbia lathyris*, or *Euphorbia tirucalli* and *n*-butyrate on *Epstein-barr* virus expression in human lymphoblastoid P3HR-1 and Raji cells. *Cancer letters*, v12, p. 175-180, 1981.

JONES, S.B.; DEPRIMO, S. E.; WHITFIELD, M. L.; BROOKS, J. D. Resveratrol-induced gene expression profiles in human prostate cancer cells. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prec.*, v. 14, p. 596-604, 2005.

JURBERG, P.; CABRAL, N. J. B.; SCHALL, V. T.. Molluscicide activity of the avelós plant (*Euphorbia tirucalli*, L.) on *Biomphalaria glabrata*, the mollusk vector of schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 80, p. 423–427, 1985.

JOLY, A.B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. 12 ed. São Paulo: Nacional, 1998.

JYOTHI, T. M.; SHANKARIAH, M. M.; PRABHU, K.; LAKSHMINARASU, S.; SRINIVASA, G.. M.; RAMACHANDRA, S. S. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Euphorbia tirucalli*. *Iran. J. Pharmacol. Ther.* v. 7, p. 25–30, 2008.

KINGHORN, A.D. Characterization of an irritant 4-deoxyphorbol diester from *Euphorbia tirucalli*. *Journal of Natural Products*. Estados Unidos, n.42, v.1, p. 112-115, 1979.

KOEFENDER, J.; BURIOL, G.A. Crescimento de Calêndula e produção de flavonóides em diferentes épocas de semeadura e suprimento hídrico. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

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

KUMAR, A.; PRADAD, M.; MISHRA, D.; SRIVASTAV, S.K.; SRIVASTAV, A.K.. Toxicity of aqueous extract of *Euphorbia tirucalli* latex on catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, p. 1671–1673, 2010.

KURODA, Y.; JAIN, K. A.; TEZUKA, H.; KADA, T. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. *Mutation Research*, v.267, p.201-209, 1992.

KLAASSEN, Curtis D.; WATKINS, John B. Toxicologia: a ciência básica dos tóxicos de Casarett e Doull. Editora McGraw-Hill. 5. Edição, Lisboa, 2001.

LEITE, J. P. V. Fitoterapia: Bases Científicas e tecnológicas. Ed. Atheneu, São Paulo, 2009.

LENZ, G.; SALBEGO, C.G. Efeito da lesão com ácido caínico sobre a fosforilação e o imunoconteúdo da proteína glial fibrilar ácida em hipocampo de ratos. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

LIRIO, L.G.; HERMANO, M. L.; FONTANILLA, M. Q.. Antibacterial activity of medicinal plants from the Philippines. *Pharmaceutical Biology*. v. 36, p. 357–359, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

LUDWIG, G.; AGUIAR, L.M.; ROCHA, V.J. Comportamento de obtenção de *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae), mandioca, por *Cebus nigrurus* (Goldfuss) (Primates, Cebidae) como uma adaptação alimentar em períodos de escassez. *Rev. Bras. Zool.*, Curitiba, v.23, n.3, p. 888-890, 2006.

MALUF S.W.; ERDTMANN, B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*, v. 471, p. 21-27, 2000.

MARINHO, V.M.; SEIDL, P.R.; PIRRÓ, W.; LONGO, W. O papel governamental como ator essencial para a P&D de medicamentos – um estudo de caso. *Quim. Nova*, Rio de Janeiro, v. 31, n. 7, p. 1912-1917, 2008.

MATOS, F.J.A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. 2.ed. Fortaleza: Imprensa Universitária – UFC, 2000.

MATOS, T. G. F.; ARMELIN, H. A. Mecanismos anti-proliferativo disparados por FGF2 e éster de forbol em células de camundongos transformadas por Rãs. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MELO, J.G.; MARTINS, J.D.G.R.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializadas no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiática* (L.) Urban). Acta bot. bras. Recife, v. 21, n 1, p. 27-36, mar. 2007.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Desenvolvimento de Fitoterápicos. Editora Robe, São Paulo, 2000.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: Tecmedd, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plantas medicinais – Orientações gerais para o cultivo. Brasília, DF, 2006.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. Química Nova, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MONTE, C. Fitos e interfaces. Revista T&C Amazônia, v.5, n.11, p. 2-8, jun. 2007.

MUHAMMADA, H.; GOMES-CARNEIRO, M. R.; POC, K. S.; OLIVEIRA, A. C. A.; AFZANC, A.; SULAIMAND, S. A.; ISMAIL, Z.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Evaluation of the genotoxicity of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract. Journal of Ethnopharmacology, v. 133, p. 647-653, 2011.

NADKARNI, K. M. Indian Matéria Médica,. Bombay Popular Prakashan, Mumbai, v. 1, p. 529, 1976.

NETO, L.G.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quim. Nova, São Paulo, v.30, n.2, p. 374-381, 2007.

NIKI, E.; YAMAMOTO, Y.; KOMURO, E.; SATO, K. Membrane damage due to lipid oxidation. Am J Clin Nutr, v. 53, p. 201-205, 1991.



OLIVEIRA, A. P.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação dos efeitos genotóxicos e antigenotóxicos do avelóz (*Euphorbia Tirucalli*), em *Drosophila melanogaster*. Biosci. J., Uberlândia, v.20, n.2, p.179-186, 2004.

OLIVEIRA, R.B. Metabolismo primário e secundário. [S.l.] 2009. Disponível em: <<http://br.geocities.com/plantastoxicas/rota-metabolica.html>> Acesso em: 3 maio 2013.

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.

PRASANTHI, K.; MURALIDHARA; RAJINI, P.S. Morphological and biochemical perturbations in rat erythrocytes following in vitro exposure to Fenvalerate and its metabolite. *Toxicol Vitro*, v. 19, p.449-456, 2005.

RAHMAN, I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J. Biochem. Mol. Biol.*, v. 36, p. 95-109, 2003.

RAJASEKARAN, P.; SWAMINATHAN, R.; JAYAPRAGASAM, M. Biogás Production Potential of *Euphorbia tirucalli* L. along with cattle Manure. *Biological Wastes, England*, v.30, p.75-77, 1989.

RAVIKANTH, V.; REDDY, L. N.; RAO, T. P.; DIWAN, P. V.; RAMAKRISHNA, S.; VENKATESWARLU, Y. Macrocyclic diterpenes from *Euphorbia nivulia*. *Phytochemistry, Índia*, v.59, p.331-335, 2002.

REZENDE, J.R.; RODRIGUES, S.B.; JABOR, I.A.S.; PAMPHILE, J.A.; ROCHA, C.L.M.S.C.. Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* L. no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. *Acta Scientiarum Biological Sciences, Maringá*, v. 26, n. 4, p. 481-484, 2004.

REZENDE, E. A., RIBEIRO, M. T. F. Conhecimento tradicional, plantas medicinais e propriedade intelectual: biopirataria ou bioprospecção. *Rev. Bras. de Plantas Medicinai. Botucatu*, v.7, n.3, p.37-44, 2005.

SCHAAN, B. D. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab, São Paulo*, v.47, n.6, dec. 2003.

SILVA, A.R.; ZUCOLOTO, S.. O papel do vírus epstein-barr na tumorigênese humana. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 36, p. 16-23, jan./mar., 2003.

SILVA, C. J.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; NUNES, W. B.; PEREIRA, D. G.; CARVALHO, S. Ausência de atividade mutagênica de *Guazuma ulmifolia* Lamb. (mutamba) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. *Rev. Biol. Neotrop.* v. 3, n. 2, p. 163-168, 2006.

SILVA, C.A.M.; SILVEIRA, D.. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart.&Miq.) Baehni (*Sapotaceae*). Dissertação (Mestrado em Ciências da saúde) - Universidade de Brasília. Brasília, 2007.

SILVA, B. V; HORTA, B. A. C; ALENCASTRO, R. B; PINTO, A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Quím. Nova*, São Paulo, v.32, n.2, p.453-462, 2009.

SILVA, J. A. A. Plantas medicinais. Itajaí: Epagri, [s.d.] 1 CD-ROM.

SILVA, R. B. L.; SANTOS, J. U. M. A etnobotânica de plantas medicinais da comunidade Quilombola de Curiaú, Macapá – AP, Brasil. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2002.

SILVA, A. C. P.; FARIA, D. E. P.; BORGES, N. B. E. S.; Souza, I. A.; PETERS, V. M.; GUERRA, M. O.. Toxicological screenig of *Euphorbia tirucalli* L.: Developmental toxicity studies in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, Minas Gerais, n.110, p.154-159, 2007.

SINGH GD, KAISER P, YOUSOUF MS, SINGH S, KHAJURIA A, KOUL A, BANI KAPAH BK, SATTI NK, SURI KA, JOHRI RK 2006. Inhibition of early and late phase allergic reactions by *Euphorbia hirta* L. *Phytother Res* 20(4): 316-321.

SOARES, A. I. S. M.; FONSECA, B. M. R. Cafeína: A cafeína é uma das substâncias mais estudadas, será que realmente a conhece? E os seus malefícios, sabe quais são? Terá ela efeitos benéficos?. Trabalho da disciplina de Toxicologia I e Análises Toxicológicas. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. p. 55, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005.

SOUZA, D.P.; FREITAS, C.D.; PEREIRA, D.A.; NOGUEIRA, F.C.; SILVA, F.D.; SALAS, C.E.; RAMOS, M.V. Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. *Planta*, v.234, n.1, p.183-193, 2011.

STARCEVIC, S .L.; DIOTTE, N. M.; ZUKOWSKI, K. L.; CAMERON, M. J.; NOVAK, R. F. Oxidative DNA Damage and repair in a cell lineage model of human proliferative breast disease (PBD). *Toxicol. Sci.*, v. 75, p. 74-81, 2003.

TELLES, P. A. F. Asma Brônquica. 2009. Fotografia do *Papiro de Ebers*. Disponível <[http://www.asma-bronquica.com.br/medical/historia\\_da\\_asma.html](http://www.asma-bronquica.com.br/medical/historia_da_asma.html)> Acesso em 24 abr. 2013.

TIWARI, S.; SINGH, P.; SINGH, A.. Toxicity of *Euphorbia tirucalli* plant against freshwater target and non-target organisms. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.6, p.1423–1429, 2003.

TIWARI, T.; SINGH, A. Biochemical stress response in freshwater fish *Channa punctatus* induced by aqueous extracts of *Euphorbia tirucalli* plant. *Chemosphere*, Índia, v.64, p.36-42, 2006.

TOLEDO, A.C.O.; HIRATA, L.L.; BUFFO, M. C. M.; MIGUEL M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Rev. Lecta*, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, jan./dez. 2003.

TOP TROPICALS: rare plants for home and garden. [S.l.], 2009. Disponível em: <[http://www.top-tropicals.com/pics/garden/m1/euph\\_gallery.htm](http://www.top-tropicals.com/pics/garden/m1/euph_gallery.htm)>. Acesso em 27 abr. 2013.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas*. v. 42, p. 289-306, 2006.

UZABAKILIHU, B.; LARGEAU, C.; CASADEVALL, E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. Grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium Grantii*. *Phytochemistry*, v.26, n.11, p. 3041-3045, 1987.

WADA, R.; SUTO, Y.; KANAI, M.; SHIBASAKI, M. Dramatic Switching of Protein Kinase C Agonist/Antagonist Activity by Modifying the 12-ester chain of Phorbol Esters. *J. Am. Chem. Soc.*. Japão, v.124, n.36, p.10658-10659, 2002.

WHO - World Health Organization/unicef. Primary health care: report of the International Conference on Primary Health Care. Alma-ata, URSS, 1978. Geneva. sept. 1978.

VALADARES, M.C.; CARRUCHA, S.G.; ACCORSI, W.; QUEIROZ, M.L.S. *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumour-bearing mice. *International Immunopharmacology*. São Paulo, v.6, p.294-299, 2006.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. São Paulo, v. 43, n. 4, out./dez., 2007

VAN DAMME P. (1989). Het traditioneel gebruik van *Euphorbia tirucalli*. (The traditional uses of *Euphorbia tirucalli*). *Afrika Focus* 5:176-193

VANDEBRORCK, I.; CALEWAERT, J.B.; JONCKHEERE, S.; SANCA, S.; SEMO, L.; DAMME, P. V.; PUYVELDE, L.V.; KIMPE, N.. Use of medicinal plants and pharmaceuticals by indigenous communities in the Bolivian Andes and Amazon. *Bulletin of the World Health Organization (OMS)*, v. 82, n. 4, april, 2004.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada, Araraquara*, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

VARRICCHIO, M.C.B.N.; PEREIRA, C.; SALES, F.; GOMES, T.; DAUDT, E.; AQUINO, C.L.; BARBOSA, G.M.; GOMES, M.; PYRRHO, A.S.; HOBAICA, P.E.M.; BRANCO, M.C.; KUSTER, R.; HOLANDINO, C. Chronic toxicological effects of high diluted solutions of Aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.) on healthy mice: a preliminary study. *Int. J. High Dilution Res.*, Rio de Janeiro, v.7, n. 25, p.174-178, 2008.

VARRICCHIO, M.C.B.N.; SILVA, S.; GOMES, N.B.N.; KUSTER, R.M.; LAGE, C.L.S. O uso de *Euphorbia tirucalli* (Aveloz) em medicina tradicional e as evidências científicas. *Rev. Bio. e Farmácia*. Rio de Janeiro, v.3, n. 1, 2008.

VARRICCHIO, M.C.B.N.; ORMELEZ, E.G.; SILVA, S.; SATO, A.; HENRIQUES, A.B.; LAGE, C.L.S. *Euphorbia tirucalli* L: Análise qualitativa do desenvolvimento vegetal durante o cultivo *in vitro*. *Rev. Bio. e Farmácia*. Rio de Janeiro, v.3, n.1, 2008.

VARRICCHIO, M.C.B.N.; SALES, F.; SILVA, S.; KUSTER, R.M.; PYRRHO, A.S.; CASTELO, B.M.L.T. Efeitos toxicológicos crônicos do látex bruto de *Euphorbia tirucalli* L. (Aveloz) sobre peso de fígado e baço conforme uso tradicional: um estudo preliminar. *Rev. Bio. e Farmácia*, Rio de Janeiro, n.2, v.2, 2008.

WEBSTER, G. L. The genera of the Euphorbiaceae in the Southeastern. *Journal of the Arnold Arboretum*. v. 48, ed. 33, pp. 303-361, 1967.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quim. Nova*. São Paulo, v. 24, n.1, jan./fev. 2001.

YUNES, R. A; CALIXTO, João Batista. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia, patente*. Chapecó: Argos, 2001.

**APÊNDICE A****UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine no final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador.

**Título do projeto: AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EXTRATO AQUOSO DOS RAMOS DE *E. tirucalli* L. IN VITRO**

Pesquisadora: Emily Pansera Waczuk.

Telefone para contato: (XX) XXXX-XXXX ou (XX) XXXX-XXXX.

Orientadora Profª Drª. Daiana Silva de Ávila

Co-orientador: Profº Drº João Batista Teixeira da Rocha

Telefone: (XX) XXXX-XXXX.

O objetivo desta pesquisa é avaliar *in vitro* o potencial toxicológico do chá, dos ramos da planta *Euphorbia tirucalli*. popularmente conhecida como Avelós, em células sanguíneas de um doadores voluntários do Hemocentro Hospital da UFSM de Santa Maria/RS, com o intuito de assegurar previamente a utilização pela medicina popular.

A sua participação na pesquisa consiste em ser doador voluntário de sangue, (aproximadamente 10 ml), saudável, sendo que a coleta será realizada no Hemocentro do Hospital da UFSM, por punção venosa, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Quem irá fazer o procedimento de coleta será a própria pesquisadora, no qual está devidamente capacitada e conhecedora das metodologias que serão aplicadas nas análises, sem qualquer prejuízo ou constrangimento para o pesquisado. Os procedimentos aplicados por esta pesquisa não oferecem risco a sua integridade moral, física, mental ou efeitos colaterais. A sua

participação é fundamental para que se alcance o objetivo acima proposto, no qual será sempre resguardada a sua identidade. Caso não queira mais fazer parte da pesquisa, favor entrar em contato pelos telefones acima citados.

Este termo de consentimento livre e esclarecido é feito em duas vias, sendo que uma delas ficará com os pesquisadores e outra com o sujeito participante da pesquisa. Você poderá retirar o seu consentimento a qualquer momento.

### **CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO**

Eu,

\_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_ CPF \_\_\_\_\_

Abaixo assinado, concordo em participar do estudo como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido, pela pesquisadora Emily Pansera Waczuk sobre a pesquisa e, os procedimentos nela envolvidos, bem como os benefícios decorrentes da minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento.

Local: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**Nome e assinatura do sujeito:**

\_\_\_\_\_.