



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE

RODRIGO ANSALONI DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTOXICA E
ANTIGENOTOXICA de *Euphorbia tirucalli* (Aveloz).**

Goiânia - GO

2017



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE

RODRIGO ANSALONI DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTOXICA E
ANTIGENOTOXICA de *Euphorbia tirucalli* (Aveloz).**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu*, Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis.

Goiânia - GO

2017



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 08 DE MARÇO DE 2017 E CONSIDERADA

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA:

1)

Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis / PUC Goiás (Presidente)

2)

Profa. Dra. Carolina Ribeiro e Silva / UFG (Membro Externo)

3)

Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi / PUC Goiás (Membro)

4)

Prof. Dr. Sérgio Henrique Nascente Costa / PUC Goiás (Suplente)

O48a

Oliveira, Rodrigo Ansaloni

Avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica de *Euphorbia tirucalli* (Aveloz)[manuscrito]/ Rodrigo Ansaloni de Oliveira. -- 2017.

78 f.; il. 30 cm

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais e Saúde, Goiânia, 2017

Inclui referências.

1. Toxicologia genética. 2. Plantas venenosas. 3. Medicina popular. 4. Látex. I.Reis, Paulo Roberto de Melo. II.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. III. Título.

CDU: 615.89(043)

Dedico este trabalho em especialmente à minha família, responsável por mais uma vitória de minha vida, sempre me dando muita força e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade.

A toda a minha família, em especial, meu filho João Gabriel que foi a razão e o motivo desta conquista, minha mãe Marta e esposa Sâmia, que foram os pilares da minha formação.

Ao meu orientador e aos professores da banca Examinadora, pela aceitação do convite e compartilhamento de novos conhecimentos.

“Quando morremos, nada pode ser levado conosco, com exceção das sementes lançadas por nosso trabalho do nosso conhecimento.”

(DALAI LAMA)

RESUMO

Introdução: A utilização de plantas medicinais, incluindo os extratos, de uso popular como recurso terapêutico é uma tendência generalizada na população brasileira. A *Euphorbia tirucalli* é amplamente utilizada pela medicina popular brasileira no tratamento de lesões, doenças infecciosas, tumores e doenças inflamatórias. Por meio deste trabalho. **Objetivo:** Avaliar a atividade genotóxica e antigenotóxica de *Euphorbia tirucalli* (aveloz). **Metodologia:** O látex foi obtido de um exemplar da planta, na cidade de Goiânia, e diluído para a concentração de 1mg/ml. Para a avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica da solução aquosa do látex da *Euphorbia tirucalli* foram realizadas pelo teste de micronúcleo na medula óssea hematopoiética de camundongos. A análise citogenética das lâminas foi realizada com a finalidade de se detectar possíveis alterações e/ou perdas cromossômicas (micronúcleos) nos eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. **Resultados:** Nos tratamentos concomitantes com as soluções aquosas do látex da *Euphorbia tirucalli* e Mitomicina C, houve diminuição dos números de micronúcleos em 2.000 EPC. Os resultados permitiram concluir que as soluções aquosas do látex da *Euphorbia Tirucalli* apresentaram atividade genotóxica, antigenotóxica, citotóxica e anticitotóxica e não indicado o uso concomitante das soluções aquosas do látex da *Euphorbia tirucalli* e Mitomicina C, pois os efeitos genotóxicos e citotóxicos da MMC foram diminuídos e assim não obtendo o efeito esperado deste agente altamente genotóxico.

Palavras-chave: *Euphorbia tirucalli*, látex, genotóxico, antigenotóxico.

ABSTRACT

Introduction: The use of medicinal plants, including extracts, of popular use as a therapeutic resource is a widespread trend in the Brazilian population. *Euphorbia tirucalli* is widely used by Brazilian popular medicine in the treatment of lesions, infectious diseases, tumors and inflammatory diseases. Through this work. **Objective:** To evaluate the genotoxic and antigenotoxic activity of *Euphorbia tirucalli* (aveloz). **Methodology:** Latex was obtained from a plant specimen, in the city of Goiânia, and diluted to the concentration of 1mg / ml. To evaluate the genotoxic and antigenotoxic activity of the aqueous solution of *Euphorbia tirucalli* latex were performed by the micronucleus test in the hematopoietic bone marrow of mice. The cytogenetic analysis of the slides was performed in order to detect possible chromosomal changes and / or losses (micronuclei) in the polychromatic erythrocytes of the bone marrow of the animals submitted to the different treatments. **Results:** In the treatments concomitant with the aqueous solutions of latex of *Euphorbia tirucalli* and Mitomycin C, there was a decrease in micronuclei numbers in 2000 EPC. The results allowed to conclude that the aqueous solutions of *Euphorbia Tirucalli* latex presented genotoxic, antigenotoxic, cytotoxic and anticitotoxic activity and the concomitant use of the aqueous solutions of the latex of *Euphorbia tirucalli* and Mitomycin C was not indicated, as the genotoxic and cytotoxic effects of MMC were decreased And thus not achieving the expected effect of this highly genotoxic agent.

Keywords: *Euphorbia tirucalli*, latex, genotoxic, antigenotoxic.

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

ANOVA - Análise de variância

EPC - Eritrócito Policromático

EPCMN - Eritrócito Policromático Micronucleado

ENC - Eritrócito Normocromático

DP - Desvio Padrão

DNA - ácido desoxirribonucleico

MMC - Mitomicina C

MN - Micronúcleo

OMS - Organização Mundial da Saúde

TPA - 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Euphorbia tirucalli – Detalhes dos galhos e substância branca (látex).....	15
Figura 2 – Processo de maturação normal das células da linhagem eritrocitária.....	20
Figura 3 – Observação de eritrócitos com policromáticos micronucleados (indicados pelas setas) em esfregaço de sangue da medula óssea de camundongo.....	27

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1. Frequência de MN/2000 EPC e relação entre EPC/ENC após 24 horas do tratamento com látex *Euphorbia tirucalli* em diferentes doses e controles.....29

Tabela 2. Frequência de EPCMN e relação entre EPC/ENC após tratamento simultâneo com MMC e de diferentes doses do látex da *Euphorbia tirucalli*.....31

Gráfico 1 – Frequência de MN/2000 EPC nas várias doses do látex da *Euphorbia tirucalli* e os controles.....30

Gráfico 2 – Frequência de MN/2000 EPC nas várias doses do látex da *Euphorbia tirucalli* e os controles.....31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	<i>Euphorbia tirucalli</i>	15
2.1.1	Avaliação das atividades genotóxica e antigenotóxica	17
2.2	TESTE DO MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA DE ROEDORES <i>IN VIVO</i>	20
3	OBJETIVOS	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	CERTIFICAÇÃO BOTÂNICA DA <i>Euphorbia tirucalli</i>	22
4.2	OBTENÇÃO DO LÁTEX DA <i>Euphorbia tirucalli</i>	22
4.3	MITOMICINA	24
4.4	ANIMAIS DA EXPERIMENTAÇÃO.....	24
4.5	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	24
4.5.1	Solubilização das células.....	24
4.5.2	Fixador	24
4.5.3	Tampão de Fosfato (pH 6,0)	25
4.5.4	Corante	25
4.6	CONTROLES	26
4.6.1	Controle Positivo	26
4.6.2	Controle Negativo	26
4.7	APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA	26
4.8	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	27
4.8.1	Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongo....	27
4.8.2	Análise Citogenética.....	28
4.8.3	Análise estatística.....	29
5	RESULTADOS	30
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÕES	37
8	BIBLIOGRAFIA	38

INTRODUÇÃO

O uso de plantas pelo homem como alimento e tratamento de doenças, é conhecido desde a antiguidade (PEREIRA & CARDOSO, 2012). A utilização de plantas medicinais, incluindo os extratos, de uso popular como recurso terapêutico é uma tendência generalizada na população brasileira. Esta tendência tem contribuído significativamente para o consumo não somente de plantas medicinais como também de fitoterápicos (GURIB, 2006).

As plantas medicinais representam opção terapêutica de grande importância para a manutenção das condições de saúde das pessoas, especialmente, para a população de baixa renda, com o intuito de substituir ou auxiliar as terapias convencionais no tratamento de várias doenças, da facilidade de obtenção e do baixo custo (Lima et al., 2013).

Segundo a OMS, cerca de 80% da população mundial utiliza medicamentos de origem natural como recurso terapêutico (OMS, 2004). Neste sentido, é estimado que o mercado farmacêutico tradicional tenha um crescimento mundial de 3% a 4% anualmente, e o de fitoterápicos de 6% a 7% (SOUZA & MACIEL 2010).

A *Euphorbia tirucalli*, também conhecida por diversas denominações populares, como aveloz, árvore-do-lápis, cega-olho, dedo do diabo, gaiolinha, espinho italiano, e muitos outros, tem como sua principal característica sua propriedade cáustica. Apesar de ser considerada uma planta tóxica, o gênero *Euphorbia* é amplamente utilizado pela medicina popular brasileira no tratamento de lesões, doenças infecciosas, tumores e doenças inflamatórias (YANG ET AL., 2005; AMIRGHOFAN ET AL., 2008; ZHANG ET AL., 2008; UZAIR ET AL., 2009; FERNANDEZ-ARCHE ET AL., 2010).

O látex da *Euphorbia tirucalli* contém constituintes irritantes tipo ingenane e tiglane, ésteres diterpênicos derivados de álcoois engenol e phorbol (BALOCH; 2010).

Nas últimas décadas o extrato etanólico total de caule vem sendo utilizado como solução ultra diluído como terapêutica complementar para pacientes com imunodeficiências (VARRICCHIO, 2005; VARRICCHIO, 2008).

As plantas medicinais apresentam ampla diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas, existindo a necessidade de um aprofundamento no conhecimento das propriedades farmacológicas das espécies vegetais e suas possíveis utilizações no desenvolvimento de novos medicamentos (OLIVEIRA et al., 2008; SIMÕES et al., 2010).

Uma vez que o uso popular de plantas medicinais fornece evidências de algumas atividades biológicas, a investigação científica através de modelos experimentais adequados torna-se necessária na formulação de um novo fármaco, sendo possível desta forma, validar o uso terapêutico de plantas. (HEINRICH & GIBBONS, 2001).

Considerando que inúmeras pesquisas científicas tem apresentado as atividades biológicas da *Euphorbia tirucalli* Linneau, espera se que a investigação das atividades genotóxica/antigenotóxica da *Euphorbia tirucalli*, possam colaborar significativamente para um melhor entendimento de tais atividades.

Diante do exposto, este estudo se objetivou em avaliar os efeitos da solução aquosa da *Euphorbia tirucalli* (Aveloz) em camundongos, observando possíveis atividades genotóxica, e/ou antigenotóxica.

2 - REFERÊNCIAL TEÓRICO

Euphorbia tirucalli

A *Euphorbia tirucalli*, da família das *Euphorbiaceas*, é uma planta utilizada na medicina popular. Proveniente da África e trazida para o Brasil com fins ornamentais, é comumente conhecida como aveloz. Possui altura em torno de 1,2 a 6,0 metros, apresenta ramos jovens cilíndricos da espessura de um lápis e folhas pouco visíveis (*Figura 1*), que caem logo após surgirem. As flores são pequenas, raras e muitas vezes passam despercebidas. A planta produz um látex de coloração branca com constituintes irritantes, que podem causar em contato com a pele, lesões, prurido e queimaduras (SAPIÊNCIA, 2010, BESSA et al., 2015).

Quimicamente o látex é constituído por ésteres de forbol, eufol, tirucalol, desoxiforbol, euforcinol, ciclotirucanenol, cicloeufordenol, euforginol, taninos hidrolisáveis, polifenóis, flavonóides, β -sitosterol, stigmasterol, campferol, ácido palmítico, ácido linoleico e eufol (MACHADO, 2007).

Atualmente as substâncias de maior interesse farmacológico são os diterpenos (ingenóis), triterpeno eufol, flavonóides e polifenóis respectivamente com ação antitumoral, antiinflamatória e antioxidante (BIXBI et al., 2005; SAPIÊNCIA, 2010).

Os ésteres de forbol também são alvos de estudos com atuação biológica comprovada em processos inflamatórios e modulação da expressão de citocinas (BISHAYI et al., 2002).



Figura 1 – *Euphorbia tirucalli* – Detalhes dos galhos e substância branca (látex). Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 6.0 mega pixels.

Popularmente conhecida como aveloz ou pau-pelado, essa espécie apresenta atividade no tratamento de diversas patologias sem comprovação científica da sua eficiência e segurança (VALE & ORLANDA, 2011).

Tradicionalmente, usa-se o látex diluído em água, sendo 6 gotas em 2 litros tomados em três dias, em tratamento de diversos males como câncer e doença de chagas (VARRICHIO ET AL, 2008).

Nas famílias das Euphorbiaceas são conhecidas por sua diversidade de propriedades químicas que vão desde substâncias tóxicas, angiogênicas, antiangiogênicas e outras (SALATINO et al., 2007).

Avelar (2010) afirma que o Aveloz estimula a produção de citocinas que excitam o sistema imune a combater tumores.

A utilização popular da *Euphorbia tirucalli* no tratamento de doenças, e pesquisas que demonstram efeitos antimicrobianos e imunomoduladores (PAREKH ET AL., 2005; VIEIRA; AVELAR ET AL., 2010; FERNANDEZ-ARCHE ET AL., 2010; FRANÇA, 2011).

As atividades biológicas com futuras aplicações terapêuticas da *Euphorbia tirucalli*, citadas na literatura científica recente, incluem ação antitumoral (VALADARES et al., 2006; LOPES, 2008), antiviral (VIEIRA; FRANÇA, 2011), antioxidante (MACHADO et al., 2007), angiogênica (BESSA, 2015), antiinflamatória (BANI et al., 2007) e imunomoduladora (AVELAR et al., 2010; CORONEL et al., 2010).

2.1 - Avaliações das atividades genotóxica e antigenotóxica

A ideia de que “o ‘natural’ não faz mal” já está ultrapassada na ciência e no meio acadêmico, no entanto, a população mais carente ainda acredita nessa ideia. Esta crença, aliada ao não conhecimento das atividades biológicas das plantas, pode torná-las nocivas para a população que faz uso delas como fonte de cuidados básicos da saúde, um meio alternativo ao uso de medicamentos.

Sem o conhecimento do perfil fitoquímico e das atividades farmacológicas reais de uma determinada espécie, as plantas podem se tornar danosas a quem as utiliza. Além disso, em quantidades não controladas, os ativos podem ser tóxicos (NELSON & COX, 2011).

Na dieta humana encontra-se uma rica e complexa mistura de compostos genotóxicos e antigenotóxicos. Já se conhece que as plantas também possuem substâncias que apresentam propriedades antigenotóxicas e anticarcinogênicas como as fibras, compostos polifenólicos, isoflavonas, vitaminas (A, B, C, E e outras), dentre outras (HIRAMATSU et al., 2004). Muitos compostos antigenotóxicos são

agentes antioxidantes e atuam sequestrando os radicais livres de oxigênio (KHAN et al., 2005; MALINS et al., 2002).

Genotoxicidade é a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético de organismos a elas expostos, e essas alterações são responsáveis pelo surgimento de cânceres e doenças hereditárias (HEDDLE et al. 1991).

A informação genética está contida no DNA e é transmitida para cada célula de forma conservada e replicada. Entretanto, o DNA pode sofrer lesões por agentes genotóxicos (agentes químicos, físicos ou biológicos) modificando sua estrutura, e que são denominadas de mutações (RIBEIRO, 2003).

Mutações são alterações permanentes na sequência de nucleotídeos do DNA e, ao acumular mutações, um gene de divisão celular pode ser afetado, podendo originar um câncer (KLUG et al. 2010).

Existem substâncias naturais ou sintéticas que protegem o DNA do dano ou modulam a ação do agente genotóxico. Essas substâncias são conhecidas por agentes antigenotóxicos ou antimutagênicos (WATERS et al., 1996).

A antimutagênese inclui a inibição de absorção e ativação de substâncias cancerígenas, a detoxificação de carcinógenos, o bloqueio da ligação carcinógeno DNA e a otimização de reparo do DNA (NAMASIVAYAM, 2011).

As substâncias antimutagênicas podem ser classificadas em desmutagênicos e bioantimutagênicos. Os desmutagênicos desempenham a sua atividade protetora por inativação das substâncias mutagênicas antes que elas atuem sobre o DNA. Já os bioantimutagênicos são capazes de suprimir a mutação por interferirem sobre os processos metabólicos de reparação inerentes á célula (MELO-REIS et al., 2011).

Pesquisas sobre antigenotoxicidade apresentam potencial promissor, pois poderiam vir a elucidar a efetividade de algumas substâncias antigenotóxicas, encontradas nas plantas usadas na medicina popular (VEIGA-JR, 2008; YUNES & CALIXTO, 2001). A prevenção de neoplasias malignas seria diminuir a exposição da célula a mutágenos e carcinógenos e também pela utilização de substâncias que atenuam a ação de agentes genotóxicos (BAGATINI et al., 2007).

O frequente uso de substâncias antigenotóxicas e anticarcinogênicas é um meio de prevenir doenças degenerativas e neoplásicas. Várias substâncias de uso frequente na terapia alopática e homeopática são provenientes das plantas (VEIGA JÚNIOR, 2008).

Substâncias antimutagênicas têm despertado interesse pela comunidade científica e também das indústrias farmacêuticas, pois esses agentes apresentam propriedades que podem ser empregados para a prevenção de danos ao DNA. Pesquisas sobre antigenotoxicidade apresentam potencial promissor, pois poderiam vir a elucidar a efetividade de algumas substâncias antigenotóxicas, encontradas nas plantas usadas na medicina popular (VEIGA JÚNIOR, 2008).

Para avaliar a atividade genotóxica e/ou antigenotóxica de agentes físicos, químicos e biológicos existem uma variedade de testes laboratoriais *in vivo* e *in vitro*.

Os diferentes testes genotóxicos detectam mutações gênicas e cromossômicas. Dentre eles, o teste do micronúcleo fornece informações primárias, em nível cromossômico, sobre os danos no DNA causados por agentes químicos e físicos. Os micronúcleos originam-se de fragmentos cromossômicos acêntricos (efeito clastogênico) ou de cromossomos inteiros que não completam a migração anafásica da divisão celular (efeito aneugênico) (KLUG et al. 2010).

2.2 - Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongos *in vivo*

Um dos testes *in vivo* muito utilizado na avaliação da ação clastogênica e/ou aneugênica de composto é o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongo. Este ensaio é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais como parte dos ensaios recomendados para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos (RIBEIRO, 2003).

O teste do micronúcleo em camundongos tem por objetivo detectar e quantificar a ação de substâncias indutoras de mutagênese e/ou antimutagênese. Este teste tem sido largamente utilizado na avaliação do potencial genotóxico de agentes físicos e químicos (CHUNG et al., 2002; DING et al., 2003), no biomonitoramento de populações humanas ocupacionalmente expostas a agentes mutagênicos (BOLOGNESI et al., 2004), na pesquisa de compostos inibidores de carcinogênese (ROY et al., 2003) e em estudos ecotoxicológicos (LLORENTE et al., 2002). É um método eficaz e possível de ser realizado com baixo custo (ROSEFORT et al., 2004).

O ensaio do MN pode ser executado em qualquer população de células que estejam em constante divisão. Nesse caso, a medula óssea hematopoiética de mamíferos é indicada para o estudo, uma vez que as células levam de 10 a 24 horas para completar um ciclo de divisão (*Figura 2*) (RIBEIRO, 2003).

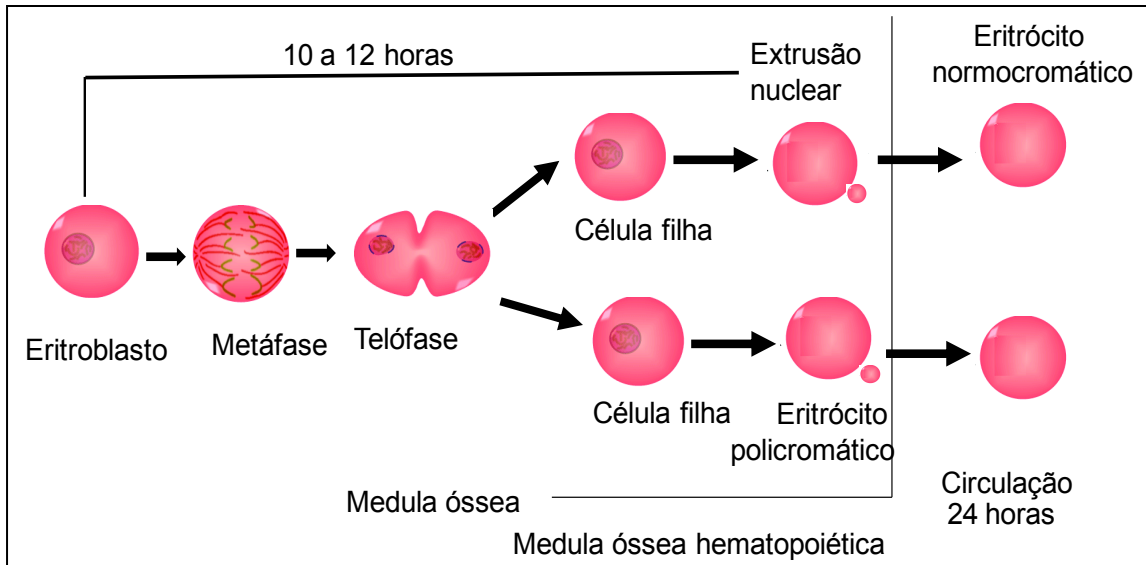


Figura 2 – Processo de maturação normal das células da linhagem eritrocitária. Esquema desenvolvimento segundo Ribeiro et al. (2003), em PowerPoint® 2007, da Microsoft®.

Comparado com outros testes citogenéticos, o teste de MN apresenta algumas vantagens, incluindo baixo custo, rapidez de análise para triagem de grande número de substâncias. É capaz de considerar e avaliar as diferentes fases avalia danos cromossômicos e possui reprodutibilidade satisfatória, já que foi adaptado por vários autores ao estudo em diferentes espécies (GARAJ-VRHOVAC; ZELJEZIC, 2001).

3 - OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o látex da *Euphorbia tirucalli* em relação as suas possíveis atividades genotóxica, e/ou antigenotóxica.

Objetivos específicos

- Caracterizar a possível presença da atividade genotóxica do látex da *Euphorbia tirucalli* mediante a realização de experimentos “*in vivo*”, utilizando como modelo experimental o teste de micronúcleo em medula óssea hematopoiética de camundongos.

- Determinar a possível presença da atividade antigenotóxica do látex da *Euphorbia tirucalli* mediante realização de experimentos “*in vivo*”, pelo tratamento simultâneo do látex da planta e de um composto sabidamente genotóxico à Mitomicina C utilizando-se o teste de micronúcleo em medula óssea hematopoiética de camundongos.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Certificação botânica da *Euphorbia tirucalli*

O látex da planta *Euphorbia tirucalli* (1894) foi coletado na cidade de Goiânia-Goiás (-16° 40' 32.79", - 49° 14' 38.58"). A identificação botânica do exemplar utilizado no experimento foi realizada pelo Dr. José Ângelo Rizzo, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (ICB-UFG). A exsicata foi depositada no herbário da referida instituição, sob o número de registro 47797.

4.2 – Obtenção do látex da *Euphorbia tirucalli* (1894)

O látex da *Euphorbia tirucalli* foi extraída por meio de uma incisão no tronco e nos galhos da planta adulta, em seguida, coletada 1,0 ml utilizando-se seringa descartável e transferida imediatamente para um recipiente de vidro estéril contendo água destilada. A concentração inicial foi de 0,1 ml de látex puro correspondente a 100 mg. Após a diluição em 9,9 ml de água destilada, sua concentração final foi de 10 mg/ml. Esta concentração final foi estabelecida durante avaliação toxicológica em experimento. A qualidade da solução foi determinada pela ausência de coágulos e pela sua homogeneidade do material, que ficou estocado a 4°C pelo período máximo de 30 dias (MELO-REIS et al 2010).

A concentração do látex puro foi de 1g/ml. Posteriormente, diluiu-se em água destilada para obtenção das concentrações do estudo de 10, 50 e 100 mg/ml.

4.3 – Mitomicina C

Segundo Wallau et al. (2005), a mitomicina C (MMC) é um antimetabólito alquilante derivado do *Streptomyces caespitosus* e usada como agente quimioterápico sistêmico. Atua bloqueando a replicação de DNA e RNA e inibindo a síntese protéica, sem ciclo celular específico de ação.

4.4 - Animais da experimentação

Para realizar o teste do micronúcleo, foram utilizados 48 camundongos machos, saudáveis, da espécie *Mus musculus* "outbred" linhagem Swiss Webster, oriundo do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás, apresentando peso corpóreo entre de $41,0 \pm 5,2$ g e faixa etária entre 2 e 3 meses no dia do experimento. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de polipropileno, com piso sólido, forradas com maravalha previamente esterilizada, conforme padrões internacionais e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (DAMY et. al. 2010). Os animais foram acomodados em ambiente com temperatura média de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $55 \pm 5\%$; com ciclo de claro-escuro de 12 horas e tiveram água e alimentação *ad libitum*.

4.5 – Reagentes e Soluções

4.5.1 – Solubilização das células

- Soro fetal bovino de Laborclin Produtos para Laboratórios.

4.5.2 – Fixador

- Metanol absoluto – Labsynth Produtos para Laboratórios

4.5.3 – Tampão Fosfato (pH 6,0)

- Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich Chemical Company
- Fosfato de sódio monobásica ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich Chemical Company.

Composição do tampão fosfato pH 6,0

Solução A

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$17,9 g

Água destilada.....100 ml

Solução B

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$344,5 g

Água destilada.....500 ml

Tampão fosfato pH 6,0

Solução A..... 74 ml

Solução B..... 426 ml

Água destilada.....1.500 ml

4.5.4 - Corante

- Tampão fosfato pH 6,0

- Giemsa, Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios

Composição do Corante Giemsa tamponado*

Tampão fosfato pH 6,0.....100 ml

Água destilada.....100 ml

Solução Giemsa..... 9 ml

- Filtrado em papel filtro

4.6 – Controles

4.6.1 – Controle positivo

- Mitomicina C (MMC), Bristol-Myers Squibb

Solução de Mitomicina C

Mitomicina C..... 5mg

Água destilada estéril..... 5 ml

4.6.2 – Controle negativo

- Água destilada estéril

4.7 – Aprovação em comitê de ética

O presente trabalho teve a avaliação e a aprovação da Comissão Ética em Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, protocolo n. 3319140516, de 26/08/2016.

4.8 - Procedimento Experimental

4.8.1 – Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongo

Cada grupo foi constituído por sei camundongos, que foram tratados, intraperitonealmente, com as doses de 10, 50 e 100 mg.kg⁻¹ por peso corpóreo do látex da *Euphorbia tirucalli*, no tempo de 24 horas. O grupo controle negativo foi tratado com água destilada estéril, enquanto que o grupo controle positivo recebeu dose única intraperitoneal de 4 mg.kg⁻¹ correspondente a 80% da DL₅₀ de mitomicina C. Para a avaliação da antimutagenicidade, foram administrados as doses de 10, 50 e 100 mg.kg⁻¹ do látex da *Euphorbia tirucalli* concomitantemente com dose de 4 mg.kg⁻¹ de MMC.

Após 24 horas, os camundongos foram submetidos à anestesia por Tiopental (30 mg/kg), em seguida, a eutanásia por deslocamento cervical. Os fêmures foram retirados. As epífises do fêmur foram seccionadas e a medula óssea lavada com 1 ml de soro fetal bovino. Após homogeneização da medula no soro, foi centrifugada a 300 x g durante 5 minutos e o sobrenadante, parcialmente descartado. O precipitado de células foi homogeneizado com pipeta de Pasteur. Uma gota de suspensão celular foi transferida para a lâmina de vidro onde foi confeccionado do esfregaço das células da medula óssea hematopoiética. Após secagem das lâminas, elas foram fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em solução Corante de Giemsa tamponado, pH 6,8, por um período de 15 minutos (HEDDLE, 1990). As lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar em temperatura ambiente. A confecção dos esfregaços e contagens foram realizadas pelo procedimento “duplo-cego”.

4.8.2 – Análise Citogenética

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum Nikon com a finalidade de se detectar possíveis alterações e/ou perdas cromossômicas (micronúcleos) nos eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. As células foram visualizadas em objetiva de imersão (1000x), usando duas lâminas para cada animal, avaliando-se 2.000 EPC por lâmina (*Figura 3*). Foi utilizada a média de duas lâminas como resultados. Para a avaliação da citotoxicidade, foram contados eritrócitos policromáticos (EPC) e eritrócitos normocromáticos (ENC). A razão EPC/ENC foi determinada conforme Schmid (1975).

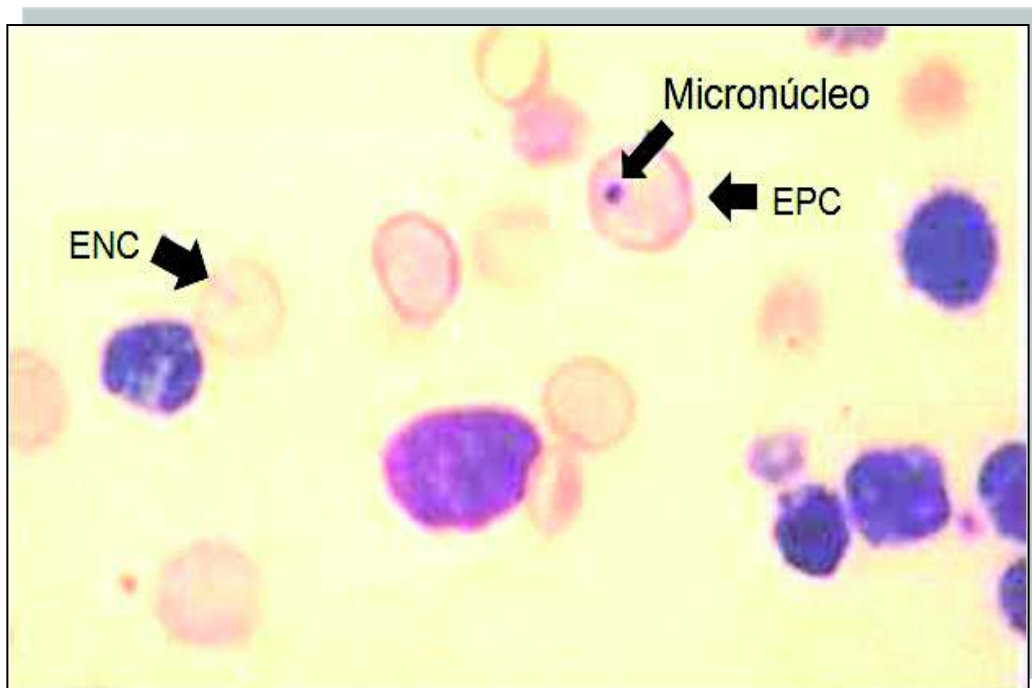


Figura 3 – Observação de eritrócitos com policromáticos micronucleados (indicados pelas setas) em esfregaço de sangue da medula óssea de camundongo. ENC – Eritrócito normocromático. EPC – Eritrócito policromático. Fotomicrografia obtida pela câmera JVC TK1270 acoplado ao microscópio para captura das imagens usando placa Pinnacle Studio AV/DV Deluxe.

4.8.3 – Análise estatística

As frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em 2.000 EPC de cada grupo foram comparadas em relação ao grupo controle negativo ou positivo pelo teste de análise de variância (ANOVA) e todos os pares comparados pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 - RESULTADOS

Para a avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica da solução aquosa do látex da *Euphorbia tirucalli* foi realizado o teste de micronúcleo em medula óssea hematopoiética de camundongos.

Os resultados da frequência de EPCMN, média, desvio padrão e relação EPC/ENC para a atividade genotóxica estão representados nas tabelas 1 e gráfico 1.

Tabela 1 Frequência de MN/2000 EPC e relação entre EPC/ENC após 24 horas do tratamento com látex *Euphorbia tirucalli* em diferentes doses e controles.

Dose látex da <i>Euphorbia tirucalli</i> (mg.kg ⁻¹ peso corporal)	Nº de animais	Eritrócitos policromáticos micronucleados (MNEPC)	RELAÇÃO EPC/ENC
		MN/2000EPC Média ± DP	MÉDIA ± DP
10	6	8,67 ± 2,16 ^b	0,79 ± 0,07 ^d
50	6	16,50 ± 4,09 ^b	0,65 ± 0,04 ^d
100	6	26,17 ± 4,26 ^b	0,50 ± 0,05 ^d
H ₂ O (controle negativo) *	6	2,33 ± 1,21 ^a	0,95 ± 0,05 ^c
MMC (controle positivo) **	6	30,67 ± 6,31	0,40 ± 0,08

^a P > 0,05 ; ^b P < 0,05; ^c P > 0,05; ^d P < 0,05. Todos os resultados foram comparados com o grupo controle negativo. O valor de P menor de 0,05 (P < 0,05) foram considerados indicativos de significância.

*Controle negativo: água destilada; ** Controle Positivo: MMC (4mg.kg⁻¹ peso corporal).

Frequência de MN / 2000 EPC

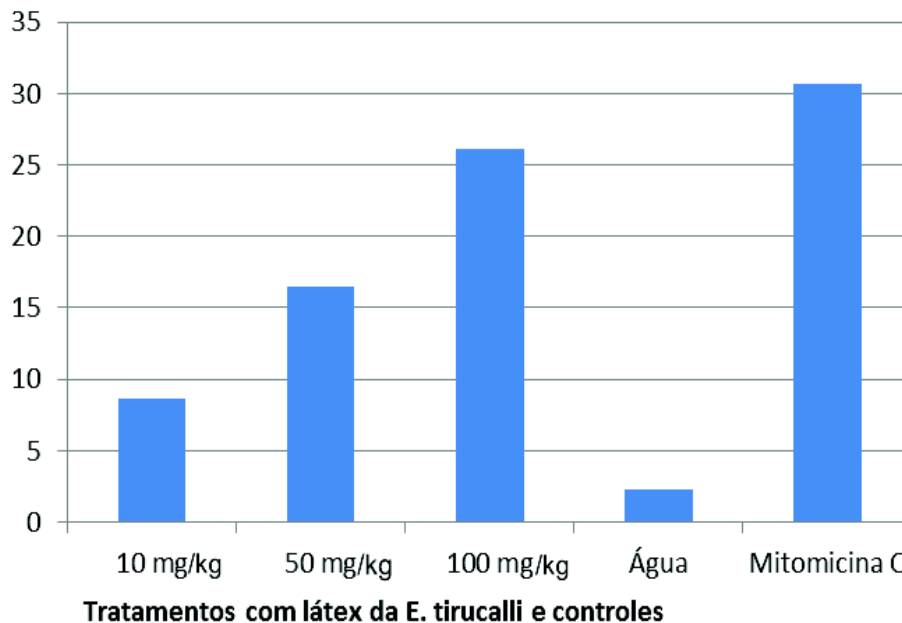


Gráfico 1 – Frequência de MN/2000 EPC nas doses do látex da *Euphorbia tirucalli* e os controles.

Na tabela 1 observa-se que as diversas doses da solução aquosa do látex da *Euphorbia tirucalli* apresentarem atividades genotóxica e citotóxica. As doses de 100 mg.kg⁻¹ e 50 mg.kg⁻¹ e 10 mg.kg⁻¹ do látex apresentaram diferenças significantes ($p < 0,05$) na frequência de EPCMN quando comparadas ao grupo controle negativo. Já a relação EPC/ENC comparadas controle negativo as diferenças também foram significativas ($p < 0,05$) para as três doses.

Os resultados da frequência de EPCMN, média, desvio padrão e relação EPC/ENC para a atividade antigenotóxica estão representados nas tabelas 2 e gráfico 2.

Tabela 2 – Frequência de EPCMN e relação entre EPC/ENC após tratamento simultâneo com MMC e de diferentes doses do látex da *Euphorbia tirucalli*.

Dose (mg.kg ⁻¹) (Et látex +MMC)	Nº de animais	Micronúcleos em eritrócitos	EPC/ENC MÉDIA ±
---	---------------	-----------------------------	-----------------

		<i>policromáticos</i> (MNEPC)	<i>DP</i>
		Média ± DP	
10 + 4.0	6	24,2 ± 5,15 ^a	0,72 ± 0,07 ^d
50 + 4.0	6	14,7 ± 2,88 ^b	0,63 ± 0,05 ^d
100 + 4.0	6	12,2 ± 3,54 ^b	0,49 ± 0,03 ^d
H ₂ O (controle negativo) *	6	2,3 ± 1,21	0,95 ± 0,06
MMC (controle positivo) **	6	30,7 ± 6,31 ^a	0,40 ± 0,08 ^c

^a P > 0,05; ^b P < 0,05; ^c P > 0,05; ^d P < 0,05. Todos os resultados foram comparados com o Grupo controle positivo. Os valor de P menor que 0,05 (P < 0,05) foram considerados significativos.

Frequência de MN / 2000 EPC

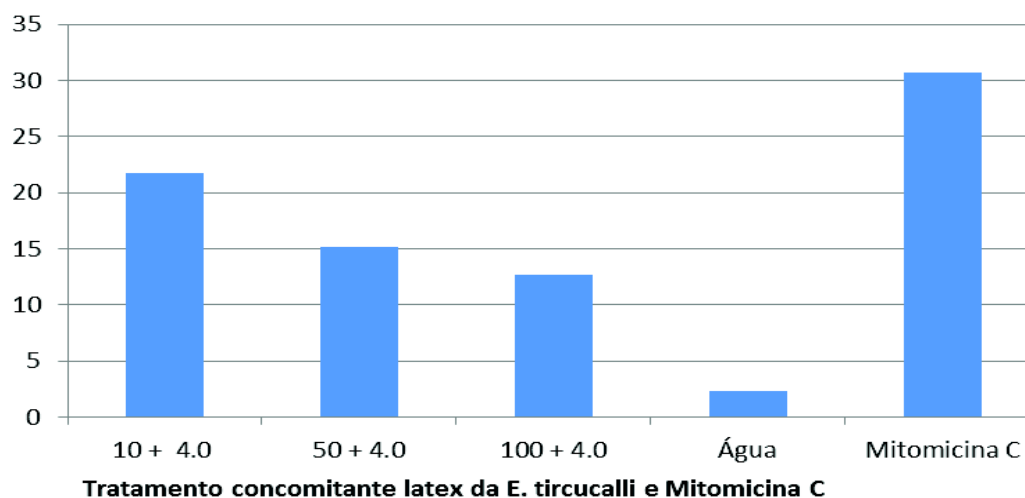


Gráfico 2 – Frequência de MN/2000 EPC nas doses do látex da *Euphorbia tirucalli* e os controles.

Na tabela 2 apresenta os resultados do tratamento concomitante do látex da *Euphorbia tirucalli* na doses de 10 mg.kg⁻¹ mais 4 mg.kg⁻¹ de Mitomicina C, 50 mg.kg⁻¹ mais 4 mg.kg⁻¹ e 100 mg.kg⁻¹ mais 4 mg.kg⁻¹ apresentaram diferenças

significativas ($p < 0,05$) na frequência de EPCMN quando comparadas ao grupo controle positivo. Já a relação EPC/ENC comparadas controle positivo as diferenças também foram significativas ($p < 0,05$) para as três doses.

A frequência de EPCMN para tratamento concomitante do látex da *Euphorbia tirucalli* e Mitomicina C nas doses de 10 mg.kg^{-1} mais 4 mg.kg^{-1} , não houve diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparada ao controle positivo. Entretanto, nas 50 mg.kg^{-1} mais 4 mg.kg^{-1} e 100 mg.kg^{-1} mais 4 mg.kg^{-1} houve diferença estatística quando comparada ao controle positivo.

6 – 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).

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).

Este trabalho avaliou o potencial genotóxico, antígenotóxico e citotóxico e anticitotóxico da solução aquosa do látex da *Euphorbia tirucalli* pelo teste do micronúcleo em medula óssea hematopoiética de camundongos, que é o teste mais utilizado para a detecção de agentes clastogênicos, de agentes aneugênicos e citotóxico de substâncias *in vivo*. A via de administração escolhida para avaliação das diferentes doses da solução aquosa e também dos controles foi a intraperitoneal, que é considerada a melhor, uma vez que otimiza a exposição da medula óssea aos agentes químicos (RIBEIRO, 2003).

Nossos resultados mostraram a toxicidade do látex da *Euphorbia tirucalli* nas doses de 10 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg, quando comparadas aos valores da água destilada, sendo concordante com algumas pesquisas que demonstram os efeitos tóxicos do extrato aquoso de *Euphorbia tirucalli* utilizando diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (TIWARI, 2006; SILVA et al., 2007; VARRICCHIO et al., 2008).

Lin et al. (2012), demonstra que a *Euphorbia tirucalli* contém um éster de forbol altamente tóxico, o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA).

Este resultado pode sugerir que o efeito genotóxico e citotóxico do extrato podem ser devido a algum dos constituintes químicos citados (CHAUDHURI et al. 2007).

Por outro lado, quando comparada a frequência de EPCMN após tratamento simultâneo com MMC e diferentes doses do látex da *Euphorbia tirucalli*. A solução aquosa nas doses de 100 mg/kg e 50 mg/kg impediram a ação da Mitomicina C, já a dose de 10 mg/kg não impediu a ação da Mitomicina C, desta forma caracterizando atividade antigenotóxica. Este dados estão concordante com Caseiro et al (2006) utilizou uma receita caseira em camundongos para estudar a atividade antitumoral do látex, onde demonstrou a diminuição da proliferação celular das células cancerígenas e ainda no grupo tratado com a associação de quimioterápico e látex de *Euphorbia tirucalli* houve uma diminuição dos efeitos colaterais induzidos pelo quimioterápico.

Provavelmente, esse efeito pode ter sido causado pelo um dos constituintes do látex da *Euphorbia tirucalli*. Os polifenóis têm sido extensivamente relatados como tendo atividade antigenotóxica e efeitos altamente protetores para material genético (ZHENG ET AL., 2010; RAJAVELU ET AL., 2011; KATIYAR, 2011; PEDRET ET AL., 2012). Por outro lado, o éster de forbol é um agente genotóxico (OKABE ET AL., 2011; KUMAR ET AL., 2012; KAWABE ET AL., 2013).

Em nosso estudo quando comparada a relação entre EPC/ENC após tratamento simultâneo com MMC e as doses de 10 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg do látex da *Euphorbia tirucalli*, apresentou - se diferenças significativas, caracterizando atividade anticitotóxica.

Mesmo que a *Euphorbia tirucalli* seja utilizada pela população para o tratamento de doenças, é potencialmente um agente genotóxico, pois apresenta ésteres de forbol (MACHADO et. al. 2016).

Assim, o uso indiscriminado do extrato bruto pode ter consequências devastadoras, com isso, a lesão do material genético de uma célula pode causar mutações (SAEIDNIA, 2013).

Segundo Machado et. al. (2016), observou-se um aumento da frequência de micronúcleos, danos no DNA e anormalidades cromossômicas, indicando assim uma atividade genotóxica em concentrações de 1% e 10% de extrato bruto do látex de *Euphorbia tirucalli*. Tais efeitos são amplamente divulgados e bem caracterizados em estudos anteriores (OKABE et al. 2011, KUMAR et al. 2012, KAWABE et al. 2013).

7 - CONCLUSÕES:

- 1) Nas condições experimentais desse estudo, os resultados permitiram concluir que as soluções aquosas do látex da *Euphorbia tirucalli* apresentaram atividade genotóxica, antigenotóxica, citotóxica anticitótoxica.
- 2) Nos tratamentos concomitantes com as soluções aquosas do látex da *Euphorbia tirucalli* e Mitomicina C, houve diminuição dos números de micronúcleos em 2.000 EPC.
- 3) No tratamento concomitante do látex da *Euphorbia tirucalli* e Mitomicina C nas doses de 10 mg.kg⁻¹ mais 4 mg.kg⁻¹, houve atividade genotóxica, entretanto, nas 50 mg.kg⁻¹ mais 4 mg.kg⁻¹ e 100 mg.kg⁻¹ mais 4 mg.kg⁻¹ houve atividade antigenotóxica.
- 4) As doses 10 mg.kg⁻¹ mais 4 mg.kg⁻¹, 50 mg.kg⁻¹ mais 4 mg.kg⁻¹ e 100 mg.kg⁻¹ mais 4 mg.kg⁻¹ da *Euphorbia tirucalli* diminuíram o efeito citotóxico da Mitomicina C ou seja o látex da *Euphorbia tirucalli* foi anticitotóxico.
- 5) Portanto, não indicado o uso concomitante das soluções aquosas do látex da *Euphorbia tirucalli* e Mitomicina C, pois o efeito genotóxico e citotóxico da MMC foram diminuídos e assim não obtendo o efeito esperado deste agente altamente genotóxico.

8 - BIBLIOGRAFIA

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

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

AVELAR, Bethania Alves de. Detecção in vitro de citocinas intracitoplasmáticas (interferon gama, fator de necrose tumoral, interleucina 4 e interleucina 10) em leucócitos humanos tratados com extrato bruto diluído de *Euphorbia tirucalli*. 2010. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2010.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. 2007. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17(3):444-447.

BALOGH, I. B.; BALOGH, M. K (2010). Irritant and co-carcinogenic diterpene esters from the latex of *Euphorbia cauducifolia* L. *J Asian Nat Prod Res.* 12(7), 600-13.

BANI, S.; KAUL, A.; KHAN, B.; GUPTA, V. K.; SATTI, N. K.; SURI, K. A.; QAZI, G. N. Anti-arthritic activity of a biopolymeric fraction from *Euphorbia tirucalli*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.110, n. 1, p. 92-98, 2007.

BESSA, G, MELO-REIS, PR, ARAÚJO, LA, MRUÉ, F, FREITAS, GB, BRANDÃO, ML, & SILVA JÚNIOR, NJ. (2015). Angiogenic activity of latex from *Euphorbia tirucalli* Linnaeus 1753 (Plantae, Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Biology*, 75(3), 752-758. <https://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.01214>

BISHAYI, B.; SAMANTA, A. K. Modulation of interleukin-8 receptor expression by lipopolysaccharide (LPS) and phorbol myristate acetate (PMA) in human peripheral monocytes--a preliminary study. *Indian Journal Physiology Pharmacology*, v. 46 n.4, p.407- 422, 2002.

BIXBI, M. et al. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitor of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. *Life Sciences*, v. 77, n. 3, p. 345-358, 2005.

BOLOGNESI, C.; LANDINI, E.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P. 2004. Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. *557 (2): 109-117*

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

CHUNG, H.W.; KANG, S.J.; KIM, S.Y.A. 2002. A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. *Mutation Research*, 516:49-56.

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

DAMY SB, CAMARGO RS, CHAMMAS R, FIGUEIREDO LFP. Aspectos Fundamentais da Experimentação Animal - Aplicações em Cirurgia Experimental. *Rev Assoc Med Bras* 2010;56(1):103-11.

DING, G.R.; NAKAHARA, T.; MIYAKOSHI, J. 2003. Induction of kinetochore-positive and kinetochore-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-rays. *Mutagenesis*, 18(5):439-443.

FERNANDEZ-ARCHE A, SAENZ MT, ARROYO M, DE LA PUERTA R, GARCIA MD 2010. Topical anti-inflammatory effect of tirucallol, a triterpene isolated from *Euphorbia lactea* latex. *Phytomedicine* 17: 146-148.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. *J Appl Toxicol.*, v. 22, p. 255, 2002.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p. 1-93, 2006.

HEDDLE, J.A. (1990). Micronuclei in vivo. *Prog. Clin. Biol. Res.* 340: 185-194.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPARYS, P. H. & MacGREGOR, J. T., 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18:277-291.

JASSBI, A. R. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry*, 67(18), 2006.

KATIYAR SK. 2011. O chá verde previne o cancer da pele do non-melanoma realizando o reparo do ADN. *Arch Biochem Biophys* 508: 152-158.

KAWABE M, URANO K, SUGURO M, NUMANO T, TAGUCHI F, TSUTSUMI H AND FURUKAWA F. 2013. Tumor Promotion by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate in an Ultra- Short-Term Skin Carcinogenesis Bioassay Using rasH2 Mice. *Vet Pathol* 50: 903-908.

KHAN, T.H.; PRASAD, L.; SULTANA, A.; SULTANA, S. 2005. Soy isoflavones inhibits the genotoxicity of benzo(a)pyrene in Swiss albino mice. *Human & Experimental Toxicology*, 24:149-155.

KLUG, W.S.; CUMMINGS, M.R.; SPENCER, C.A.; PALLADINO, M.A. (2010) *Conceitos de genética*. 9ª edição. Artmed, Porto Alegre, RS. 863p.

KUMAR G, DANGE P, KAILAJE V, VAIDYA MM, RAMCHANDANI AG AND MARU GB. 2012. Polymeric black tea polyphenols modulate the localization and activity of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-mediated kinases in mouse skin: Mechanisms of their anti-tumor-promoting action. *Free Radical Bio Med* 53:1358-1370.

LIMA, L.R. et al. Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (A. C. Smith) (Imburana-decheiro). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Campinas, v.15, n.3, p.415-422, 2013.

LIN MW, LIN AS, WU DC, WANG SS, CHANG FR, WU YC. Euphol from *Euphorbia tirucalli* selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(12):4333-9.

LLORENTE, M.T.; MARTOS, A.; CASTAÑO, A. 2002. Detection of Cytogenetic Alterations and Blood Cell Changes in Natural Populations of Carp. *Ecotoxicology*, 11(1): 27-34.

LOPES, X. Avelós: Esperança brasileira no combate ao câncer. 2008. Disponível em <<http://olharglobal.net/2008/10/23/avels-esperana-brasileira-nocombate-ao-cncer/>>. Acesso em: Fev. 2016.

MACHADO, M. M. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of hydroalcoholic extract of *Euphorbia tirucalli* (Euphorbiaceae) in cell cultures of human leukocytes. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, n. AHEAD, p. 0-0, 2016.

MACHADO, M. M. Perfil fitoquímico e avaliação dos principais efeitos biológicos e imunológicos in vitro da *Euphorbia tirucalli* L. 2007. 105p.

MALINS, D.C.; HELLSTRÖM, K.E.; ANDERSON, K.M.; JOHNSON, P.M.; VINSON, M.A. 2002. Antioxidant-induced changes in oxidized DNA. *PNAS*, 99(9):5937-5941.

MELO-REIS, P. R.; ANDRADE, L. S.; SILVA, C. B.; ARAÚJO, L. M. M.; PEREIRA, M. S.; MRUE, F.; CHEN-CHEN, L.. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax látex. *Brazilian Journal of Biology*, v. 70, n. 1, p. 189-194, 2010.

MELO-REIS, P.R.; BEZERRA, L.S.A.; VALE, M.M.A.; CANHÊTE, R.F.R.; CHEN-CHEN, L. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica do látex 62 de *Synadenium umbellatum* Pax pelo teste do micronúcleo em camundongos. *Brazilian Journal of Biology*, v. 71, n. 1, 2011.

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.

NAMASIVAYAM, N. Chemoprevention in experimental animal. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1215, p.60-71, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5. ed, Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274 p.

NETZEL, Guilherme Torrecilia; ARAUJO, Jose Hilton Bernardino de. Estudo da atividade antimicrobiana in vitro do latex de *Euphorbia tirucalli* L. *SICITE*, XIV. [S.I.], v. 2, 2009.

OKABE K, KATO K, TERANISHI M, OKUMURA M, FUKUI R, MORI T, FUKUSHIMA N AND TSUJIUCHI T. 2011. Induction of lysophosphatidic acid receptor-3 by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate stimulates cell migration of rat liver cells. *Cancer letters* 309: 236-242.

OLIVEIRA, R.B. et al. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em

camundongos albinos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.44, n.3, p.485-491, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2004). 134ª Sessão do Comitê Executivo. Tema 4.4. Washington, D. C., EUA.

PAREKH, Jigna; CHANDRA, Sumitra V.; In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. Turk. J Biol. 2007.

PEDRET A, VALLS RM, FERNÁNDEZ-CASTILLEJO S, CATALÁN Ú, ROMEU M, GIRALT M, RM LAMUELA-RAVENTÓS, MEDINA- REMÓN A, ARIJA V E ARANDA N. 2012. Os alimentos ricos em polifenóis exibem propriedades antioxidantes de ADN e protegem a glutatona Em indivíduos saudáveis. Mol Nutr Food Res 56: 1025-1033.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. Journal of Biotechnology and Biodiversity, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PORTAL DA SAÚDE - Ministério da Saúde. Fitoterápicos são alternativas de tratamento no SUS. 2012.

RAJAVELU A, TULYASHEVA Z, JAISWAL R, JELTSCH A E KUHNERT N. 2011. A inibição da DNA metiltransferase 3a (Dnmt3a) de mamífero por chá preto de dieta e polifenóis de café. BMC bioquímica 12: 16.

RIBEIRO, L.R. 2003. Teste do micronúcleo em medulla óssea de roedores *in vivo*. In: Mutagênese Ambiental (Ribeiro LR, Salvadori). Editora ULBRA, p. 173-200.

ROSEFORT, C.; FAUTH, E.; ZANKL, H. 2004. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. Mutagenesis, 19 (4): 277-284,

ROY, .M.; CHAKRABARTY, S.; SINHA, D.; BHATTACHARYA, R. K.; SIDDIQI, M. 2003. Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. Mutation Research, 523-524: 33-41. 64

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Antioxidants: Friends or foe in prevention or treatment of cancer: The debate of the century. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 271, p. 49-63, 2013.

SALATINO A, SALATINO MLF, NEGRI G 2007. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). J Brazil Chem Soc 18: 11-33.

SAPIÊNCIA JORNAL - Informativo científico da FAPEPI. [Online]. n. 23, Ano 6, p. 04-09, 2010. Teresina-PI. Acesso em; 30 jun. 2016.

SCHMID, W. (1975). The micronucleus test. Mutat. Res. 31: 9-15.

SILVA AC, DE FARIA DE, BORGES NB, DE SOUZA IA, PETERS VM, GUERRA MDE, O. 2007. Toxicological screening of Euphorbia tirucalli L.: developmental toxicity studies in rats. J Ethnopharmacol 110(1): 154-159.

SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2010. 1102p.

SOUZA, F. S.; MACIEL, C. da. C. S. Produtos fitoterápicos e a necessidade de um controle de qualidade microbiológico. VEREDAS FAVIP - Revista Eletrônica de Ciências, v. 3, n. 2, 2010.

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.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. Dr. Duke's phytochemical and ethnobotanical databases. Base de dados. Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/duke/>. Acesso em: 30 de Junho de 2016.

UZAIR M, LOOTHAR BA, CHOUDHARY BA 2009. Biological screening of *Euphorbia helioscopia* L. *Pak J Pharm Sci* 22: 184- 186

VALADARES, M. C.; CARRUCHA, S. G.; ACCORSI, W.; QUEIROZ, M. L. *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumour-bearing mice. *International Immunopharmacology*, São Paulo, vol. 6, n. 2, p. 294-299, 2006.

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

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

VARRICCHIO, M.C.B.N; ORMELEZ, E.G.; SILVA, S. DA; MOREIRA, C.B.; LIMA, S.S.; VICTÓRIO, C.P.; LOPES, J.B.; HENRIQUES, A B.; SATO, A.; ESQUIBEL, M. A.; KUSTER, R.M.; LAGE, C.L.S. (2008). Contribuição Multidisciplinar da Biotecnologia Vegetal às Áreas de Saúde. *ARQUIVOS FOG – Saúde, Sociedade, Gestão, Meio Ambiente*; RJ: v. 4, n.1, p. 15.

VEIGA-JUNIOR, V.F. 2008. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev. bras. farmacogn.*, 18(2):308-313.

YANG CM, CHENG HY, LIN TC, CHIANG LC, LIN CC 2005. *Euphorbia thymifolia* suppresses herpes simplex virus-2 infection by directly inactivating virus infectivity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 346-349.

YUNES, R.A. & CALIXTO, J. B. 2001. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. 500 p. Editora Argos.

WALLAU AD, LEORATTI MCV, CAMPOS M. Mitomicina C e excimer laser. *Arq Bras Oftalmol.* 2005;68(6):867-72.

WATERS, M.D.; STACK, H.F.; JACKSON, M.A.; BROCKMAN, H.E.; FLORA, S. 1996. Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data. *Mutat Res.* 350(1): 109-129.

ZHANG WK, XU JK, ZHANG XQ, YAO XS, YE WC 2008. Chemical constituents with antibacterial activity from *Euphorbia sororia*. *Nat Prod Res* 22: 353-359.

ZHENG R, SHI Y, JIA Z, ZHAO C, ZHANG Q E TAN X. 2010. Rápido reparo de radicais de DNA. *Chem Soc Rev* 39: 2827-2834.