



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DOS PRINCIPAIS
EFEITOS BIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS *IN VITRO* DA
*EUPHORBIA TIRUCALLI L.***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Michel Mansur Machado

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DOS PRINCIPAIS
EFEITOS BIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS *In Vitro* DA
Euphorbia tirucalli L.**

por

Michel Mansur Machado

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Margareth Linde Athayde

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

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

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DOS PRINCIPAIS
EFEITOS BIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS *In Vitro* DA
Euphorbia tirucalli L.**

elaborada por
Michel Mansur Machado

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Margareth Linde Athayde, Prof^a. Dr^a. (UFSM)
(Presidente / Orientadora)

Melânia Palermo Manfron, Prof^a. Dr^a. (UFSM)

João Batista Teixeira da Rocha, Prof. Dr. (UFSM)

Santa Maria, 12 de dezembro de 2007.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus! Eu agradeço por me lembrar do poder que possuo. Agradeço por me mostrar que sou protegido, guiado e iluminado pela sua presença divina em cada momento de minha vida.

A Prof^ª. Dr^ª. Margareth Linde Athayde, meu agradecimento e admiração por ter proporcionado, durante toda minha vida acadêmica, uma atenção especial sendo muitas vezes mais que orientadora, uma amiga dando-me a força e estímulo necessários para que prosseguisse em busca do meu ideal.

A *Euphorbia tirucalli*, ou simplesmente Aveloz, minha maior companheira nos últimos anos, pela sua fundamental participação nesta pesquisa, serei eternamente grato.

Ao Prof. Dr. Ruy Carlos Beck, pelo uso de seu laboratório para realização das análises por HPLC, mas acima de tudo, pelas constantes conversas, novas idéias e palavras de amizade.

Ao Prof. Dr. Sydney Hartz Alves e à sua aluna, colega e amiga Patrícia Pozzatti, do laboratório de pesquisas micológicas da UFSM, pela realização dos testes acerca da atividade antimicrobiana dos extratos fracionados assim como pelo auxílio na interpretação dos resultados.

Ao Departamento de Farmácia Industrial da UFSM, na pessoa do Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora e de seu orientado, Ricardo Machado Ferreto, pela disponibilização de suas infra-estruturas e especialmente pela realização do teste de toxicidade aguda.

Aos professores do curso de pós-graduação pelos conhecimentos compartilhados durante minha formação, disponibilidade e atenção, mas principalmente pela constante amizade e incentivo de todos, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Carlos Mallmann pela realização das análises por Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa, meu muito obrigado. Sua ajuda foi fundamental neste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Melânia Palermo Manfron que também participou ativamente neste trabalho sempre com suas idéias, explicações e seu carinho todo especial pela “nossa” Aveloz.

Aos colegas de pós-graduação, sem exceções, por fazerem com que horas intermináveis de inúmeros problemas se tornassem momentos inesquecíveis de amizade, carinho e companheirismo.

A todos os alunos, graduação e pós-graduação, do laboratório de Fitoquímica, Mariane, Bruna, Ticiane, Aline Boligon, Aline Bolzan, Daiane, Maikon, Adiene, Janaína e aos já mestres Ricardo e Danielle, que conviveram comigo sempre com palavras de carinho, respeito e incentivo, meu muito obrigado a todos vocês.

A chefia e colegas de trabalho, funcionários, bolsistas e estagiários do Banco de Sangue do Hospital Universitário de Santa Maria, pela compreensão, pelos constantes pedidos de folga e trocas de plantões para que eu pudesse assistir às aulas e realizasse a pesquisa, meus infindáveis agradecimentos.

A todos aqueles, citados ou não, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta dissertação meus agradecimentos.

A minha namorada Luisa, meu nenê, pelo amor e carinho, por compreender quando eu não pude estar presente ao teu lado ou mesmo estando perto não te dei a atenção que tu sempre mereces. Obrigado por tudo meu anjinho, te amo sempre e cada vez mais.

Aos meus queridos pais, Geane e Juarez, vocês foram os responsáveis pela educação desde o início... Foram meus primeiros mestres, meus professores do certo e do errado, do aprender a caminhar, do falar e até da escrita do próprio nome... Me cobraram, me disciplinaram, me ajudaram. Vocês são os responsáveis pelo acadêmico, pelo profissional que sou hoje, mas o mais importante, vocês me fizeram o ser humano que sou hoje. É, eu dei trabalho, não é mesmo...

***“Ter problemas na vida é inevitável,
ser derrotado por eles é opcional.”***

(Roger Crawford)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

Perfil fitoquímico e avaliação dos principais efeitos biológicos e imunológicos *In Vitro* da *Euphorbia tirucalli* L.

AUTOR: MICHEL MANSUR MACHADO

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MARGARETH LINDE ATHAYDE

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de dezembro de 2007.

Atualmente podemos encontrar facilmente as mais diversas informações sobre uma determinada planta medicinal, mas que carecem de fundamento científico, tornando assim seu uso um potencial risco a saúde. Em geral, as conclusões sobre segurança e eficácia são baseadas em avaliações precárias do uso popular. Portanto, há necessidade de que profissionais qualificados possam, além de acessar tais informações, analisá-las criticamente para disponibilizá-las de forma que sejam facilmente compreendidas, não só por profissionais da saúde, mas também pelos usuários destes produtos. Um exemplo destas plantas utilizadas na medicina popular, mas sem comprovação científica, é a *Euphorbia tirucalli* L., conhecida popularmente como Graveto-do-cão, Árvore Lápis, ou mais comumente como **Aveloz**. Esta planta tem sido utilizada para o tratamento de inúmeras enfermidades, como afecções microbianas, problemas de imunossupressão, cicatrização de berrugas e até mesmo no tratamento do câncer. Entretanto, alguns trabalhos revelam justamente o contrário, ou seja, que o látex da *Euphorbia tirucalli* pode causar imunossupressão, e freqüentemente encontra-se associado ao aparecimento do *Linfoma de Burkitt*, que é um tipo de câncer.

Foram isolados e identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, 03 hidrocarbonetos, 07 ácidos graxos de cadeia longa, 02 esteróides, 03 compostos do metabolismo vegetal e 01 triterpeno, não relatado até o momento, o qual foi isolado da fração hexânica e identificado como sendo o lupeol. Foi realizada uma análise fitoquímica preliminar, o que permitiu a visualização dos grupos de compostos presentes na planta. A quantidade de polifenóis e taninos condensados foi determinada na planta e suas frações. Realizou-se o teste de atividade antioxidante e com ele verificamos uma excelente atividade das frações éter etílico e acetato de etila. Analisou-se a atividade antimicrobiana da planta e obtivemos resultados excelentes para os fungos *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*, bem como para a alga oportunista *Prototheca zopfii*. Realizou-se um estudo de toxicidade sobre a *Artemia salina* e estudo de toxicidade oral aguda. Os resultados apontam a espécie como sendo não tóxica. O látex da *E. tirucalli*, mesmo em doses pequenas (1%) pode causar inibição (*in vitro*) a enzima Acetilcolinesterase Humana. Uma acentuada atividade inibitória sobre a agregação plaquetária foi observada. O extrato da planta sobre cultura de células sanguíneas de ratos Wistar (ex-vivo) causou diminuição do número de leucocitos, linfócito e plaquetas.

Palavras-Chave: *Euphorbia tirucalli*, Fitoquímica, Atividade Biológica.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Program in Pharmaceutical Science
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

PHYTOCHEMISTRY PROFILE AND EVALUATION OF THE PRINCIPALS BIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL IN VITRO EFFECTS OF *Euphorbia tirucalli* L.

AUTHOR: MICHEL MANSUR MACHADO
ADVISER: PROF^a. DR^a. MARGARETH LINDE ATHAYDE
Date and Place of the Defense: Santa Maria, DECEMBER, 12TH, 2007.

Today we can easily find the most diverse kind of information about a particular medicinal plant, but without scientific basis, making their use a potential risk to health. Overall, the findings on the safety and efficacy are based on precarious evaluations and popular use. There is a need for qualified professionals to access, critical analyze and assign such information in a way that it could be easily understood, not only by health professionals, but also by the users of these products. One example of these plants used in popular medicine, but without scientific evidence, is *Euphorbia tirucalli* L., popularly known as Dog-Stick, Pencil tree, or more commonly as Aveloz. This plant has been used for the treatment of many diseases, such as microbial diseases, immunosuppression problems, and even in the cancer treatment. However, some works reveal precisely the opposite, namely that the latex of *Euphorbia tirucalli* can cause immunosuppression, and often is associated to the appearance of *Burkitt's Lymphoma*, a type of cancer.

Lupeol was isolated and identified from hexane fraction by GC-MS for the first time for the plant, among other 3 hydrocarbons, 7 long chain fat acids, 2 steroids, and 3 compounds of the vegetal metabolism. A preliminary phytochemistry screening allowed to the visualization of the principal groups in the plant. Polyphenols and condensed tannins contents were determined in the crude extract and fractions. Ethyl ether and ethyl acetate fractions showed the greatest antioxidant activity in the DPPH test. Antimicrobial activity was observed mainly against *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*, as well as for the opportunist algae *Prototheca zopfii*. A preliminary study of toxicity using *Artemia saline* and acute oral toxicity in mice, indicate the plant as low toxicity. The latex of the *E. tirucalli*, even in small doses (1%) can cause in vitro inhibition over the human Acetylcholinesterase enzyme. A prominent *in vitro* inhibitory activity over human platelets aggregation was also observed. The effects of the extract of the plant over the blood cells in a culture medium using *ex-vivo* blood samples of male Wistar rats were evaluated. The results demonstrated that the extract caused thrombocytopenia, leucopenia and lymphopenia.

Key-Words: *Euphorbia tirucalli*, *Phytochemistry*, *Biological Evaluation*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: <i>Euphorbia tirucalli</i> , conhecida popularmente como Aveloz	Página 22
Figura 02: Site da Internet que vende o extrato da <i>Euphorbia tirucalli</i> por US\$ 30,00 o frasco de 30 mLs	Página 23
Figura 03: Rota biossintética de esteróides e triterpenos	Página 26
Figura 04: Estruturas de <i>Ésteres de Forbol</i> isoladas por Kinghorn em 1979	Página 27
Figura 05: Estruturas de dois triterpenos isolados por NES et al em 1984	Página 28
Figura 06: Estruturas dos triterpenos isolados por KAHN et al em 1988	Página 28
Figura 07: Estruturas dos triterpenos isolados por RASOOL et al em 1989	Página 29
Figura 08: Estruturas dos três taninos hidrolisáveis inéditos isolados por YOSHIDA et al em 1991	Página 29
Figura 09: Estruturas dos dois taninos inéditos isolados por LIN et al em 2001	Página 30
Figura 10: Estrutura química do eufol isolado por MALLAVADHANI et al em 2006	Página 30
Figura 11: Estrutura química da acetilcolina	Página 32
Figura 12: Isoformas da AChE	Página 34
Figura 13: Sítio catalítico da AChE	Página 35
Figura 14a: Evaporador rotatório BÜCHI R – II	Página 40
Figura 14b: CG-MS Hewlett-Packard 6890 Series Plus.....	Página 40
Figura 15: HPLC Shimadzu LC – 10A	Página 40
Figura 16: HPLC Shimadzu LC – 20A Prominence.....	Página 40
Figura 17: Partição líquido-líquido e obtenção das frações orgânicas de <i>Euphorbia tirucalli</i> a partir de um fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico 70%.	Página 41
Figura 18: Etapas da obtenção das amostras de linfócitos.....	Página 50
Figura 19: Equipamento PENTRA 80 (ABX – Horiba)	Página 51
Figura 20: Cromatograma das frações de <i>E. tirucalli</i> com observação sob luz UV 254.	Página 52
Figura 21: Cromatograma da fração n-hexano particionada em coluna de sílica com observação sob luz UV 254. Sistema eluente composto por n-Hexano : Éter Etílico (2:1)	Página 53

Figura 22: Cromatogramas das sub-frações hexânica 01 (esquerda) e 02 (direita)	Página 53
Figura 23: Cromatogramas das sub-frações hexânica 03 (esquerda) e 04 (direita)	Página 54
Figura 24: Cromatograma da sub-fração hexânica 05	Página 54
Figura 25: 1º Espectro de massas obtido da sub-fração hexânica 01	Página 55
Figura 26: 2º Espectro de massas obtido da sub-fração 01	Página 55
Figura 27: 1º Espectro de massas obtido da sub-fração 02	Página 56
Figura 28: 2º Espectro de massas obtido da sub-fração 02	Página 56
Figura 29: 1º Espectro de massas obtido da sub-fração 03	Página 57
Figura 30: 2º Espectro de massas obtido da sub-fração 03	Página 58
Figura 31: 1º Espectro de massas obtido da sub-fração 05	Página 59
Figura 32: Esquema de fragmentação do Lupeol	Página 60
Figura 33: Cromatograma da fração diclorometano	Página 60
Figura 34: 1º Espectro de massas obtido da fração diclorometano	Página 61
Figura 35: 2º Espectro de massas obtido da fração diclorometano	Página 61
Figura 36: 3º Espectro de massas obtido da fração diclorometano	Página 62
Figura 37: Cromatograma da fração éter etílico	Página 63
Figura 38: 1º Espectro de massas obtido da Fração éter etílico.....	Página 63
Figura 39: 2º Espectro de massas obtido da Fração éter etílico.....	Página 64
Figura 40: 3º Espectro de massas obtido da Fração éter etílico.....	Página 64
Figura 41: Cromatograma da fração acetato de etila	Página 65
Figura 42: 1º Espectro de massas obtido da fração acetato de etila	Página 65
Figura 43: 2º Espectro de massas obtido da fração acetato de etila	Página 66
Figura 44: Curva de calibração preparada para a dosagem de taninos condensados, utilizando como padrão o ácido pirogálico	Página 68
Figura 45: Resultados da atividade antioxidante da <i>Euphorbia tirucalli</i> . Os resultados estão expressos como médias \pm desvio padrão (todos abaixo de 0,0014). Todas as frações foram estatisticamente diferentes ($p < 0.05$) comparadas com o controle (Ácido Ascórbico). Os resultados foram realizados em triplicata	Página 72
Figura 46: Valores de IC_{50} das amostras no teste de atividade antioxidante (DPPH), determinadas a partir da equação da reta	Página 73
Figura 47 – Curva de calibração do ácido pirogálico com suas concentrações versus absorbâncias e respectiva equação da reta e coeficiente de correlação	Página 75
Figura 48: Estabilização dos radicais livres pelos compostos fenólicos	Página 76
Figura 49: Avaliação dos efeitos do látex da <i>Euphorbia tirucalli</i> sobre a enzima acetilcolinesterase humana <i>In Vitro</i>	Página 81
Figura 50: Porcentagem de inibição da atividade plaquetária pela <i>Euphorbia tirucalli</i>	Página 83
Figura 51: Valores de IC_{50} das frações de <i>Euphorbia tirucalli</i> analisadas no teste de inibição plaquetária	Página 84

- Figura 52:** No item 01 podemos verificar a situação normal, onde o vaso está em manutenção da sua integridade. Na parte 02 observamos o processo de adesão plaquetária em um local danificado. Em 03 observa-se a agregação e liberação das substâncias mediadoras vasoativas, as quais possuem atividade pró-coagulante. Finalmente, em 04 observamos o final do processo normal com a formação do tampão hemostático Página 84
- Figura 53:** Amostras de culturas de células já com as amostras de *Euphorbia tirucalli* Página 86
- Figura 54:** Resultados dos efeitos da *Euphorbia tirucalli* sobre cultura de células de ratos – análise de leucócitos totais Página 86
- Figura 55:** Resultados dos efeitos da *Euphorbia tirucalli* sobre cultura de células de ratos – análise de linfócitos totais Página 87
- Figura 56:** Resultados dos efeitos da *Euphorbia tirucalli* sobre cultura de células de ratos – análise de plaquetas Página 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Cultivos padrões e fármacos utilizados no estudo	Página 46
Tabela 02: Rendimento das frações de <i>Euphorbia tirucalli</i> ..	Página 52
Tabela 03: <i>Screening</i> fitoquímico preliminar	Página 67
Tabela 04: Concentração de taninos condensados na planta <i>Euphorbia tirucalli</i>	Página 69
Tabela 05: Atividade antioxidante do ácido ascórbico, extrato bruto e das frações <i>Euphorbia tirucalli</i>	Página 73
Tabela 06: Equações da reta utilizadas para calcular os IC ₅₀	Página 74
Tabela 07: Concentração de polifenóis totais na planta <i>Euphorbia tirucalli</i>	Página 76
Tabela 08: Atividade antimicrobiana das frações de <i>E. tirucalli</i>	Página 77
Tabela 09: Relação e leituras dos antibióticos utilizados como controle	Página 78
Tabela 10: Resultados do teste de letalidade da <i>Artemia salina</i> para o extrato bruto e látex de <i>Euphorbia tirucalli L</i>	Página 79
Tabela 11: Resultados dos testes de toxicidade oral aguda para extrato bruto, butanol, hexano e látex de <i>Euphorbia tirucalli L</i>	Página 80
Tabela 12: Valor das absorvâncias obtidas no teste de inibição plaquetária	Página 83

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

^{13}C -RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

^1H -RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Abs – Absorbância

AcOEt – Acetato de etila

Avelóz = Avelós

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CC – Cromatografia em coluna

CCD – Cromatografia em camada delgada

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CH_2Cl_2 – Diclorometano

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CoA – Coenzima A

CV% - Coeficiente de variação percentual

DPPH - 1,1-difenil, 2-picrilidrazila

EB – Extrato bruto

EM – Espectrometria de massas

EM-IE - Espectrometria de massas por impacto eletrônico

EtOH – Etanol

eV – Elétron-Volts

GI – Grau de insaturação

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IV – Infravermelho

m/z – Massa sobre carga

n-BuOH – n-butanol

OECD/OCDE – Organization for Economic Co-operation and Development

OMS – Organização Mundial de Saúde

UFMS – Universidade Federal de Santa Maria

UV – Ultravioleta

λ - comprimento de onda

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 01:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Página 100
- ANEXO 02:** Trabalhos Apresentados em Congressos Página 101
- ANEXO 03:** Artigos com Resultados Desta Dissertação Submetidos a Revistas ...Página 104
- ANEXO 04:** Artigos com Resultados Desta Dissertação em Fase de RedaçãoPágina 105

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	Página18
OBJETIVOS	
Geral	Página 20
Específicos.....	Página 20
REFERENCIAL TEÓRICO	
Considerações gerais sobre a família	Página 21
Considerações gerais sobre o gênero	Página 21
Considerações gerais sobre espécie	Página 22
Metabólitos Secundários	
Definição	Página 24
Função e importância	Página 25
Metabolismo vegetal secundário	Página 26
Metabólitos secundários isolados até o momento	Página 27
Atividades biológicas conhecidas	
Atividade sobre sistema imune e sobre o câncer	Página 31
Efeitos sobre o sistema colinérgico	Página 32
Atividade antibacteriana, molusquicida e antiviral	Página 36
Outras ações conhecidas	Página 37
Estudos toxicológicos	Página 37

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais Utilizados	Página 38
Métodos Empregados	Página 40

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rendimento e perfil dos extratos da <i>Euphorbia tirucalli</i>	Página 52
Perfil cromatográfico da coluna de n-hexano	Página 53
Separação e identificação dos compostos por CG-MS	Página 54
Identificação dos compostos de sub-fração hexânica 01	Página 55
Identificação dos compostos de sub-fração hexânica 02	Página 56
Identificação dos compostos de sub-fração hexânica 03	Página 57
Identificação dos compostos de sub-fração hexânica 04	Página 58
Identificação dos compostos de sub-fração hexânica 05	Página 58
Perfil cromatográfico da fração diclorometano	Página 60
Perfil cromatográfico da fração éter etílico	Página 62
Perfil cromatográfico da fração acetato de etila	Página 65
Screening fitoquímico preliminar	Página 66
Dosagem de taninos condensados	Página 68
Avaliação da atividade antioxidante	Página 70
Doseamento de polifenóis em <i>Euphorbia tirucalli</i>	Página 75
Avaliação da atividade antimicrobiana	Página 77
Avaliação da toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>	Página 79
Avaliação da toxicidade oral aguda	Página 80
Avaliação dos efeitos da <i>Euphorbia tirucalli</i> sobre a enzima acetilcolinesterase humana <i>In Vitro</i>	Página 81
Avaliação dos efeitos da <i>Euphorbia tirucalli</i> sobre a atividade plaquetária	Página 82
Efeito da <i>Euphorbia tirucalli</i> sobre cultura de células de ratos	Página 85

CONCLUSÃO	Página 89
-----------------	-----------

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Página 91
---------------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais de uso popular como recurso terapêutico é uma tendência generalizada na medicina popular brasileira. Esta tendência tem contribuído significativamente para o consumo não só de plantas medicinais, como também de medicamentos fitoterápicos.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera que, no mundo, aproximadamente 80% da população depende principalmente da medicina tradicional para seus cuidados primários de saúde, bem como do uso de extratos de plantas ou de seus princípios ativos (AKELERE, 1992; FARNSWORTH *et al.* 1985).

A fitoterapia é um recurso terapêutico muito utilizado na automedicação e, devido à facilidade do acesso, pode agravar seus riscos potenciais. Além disso, há uma grande lacuna que deve ser preenchida através de ações que busquem melhorar a difusão do conhecimento sobre o uso seguro e racional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, entre elas, a disponibilização de informações com comprovação científica, as quais devem ser transmitidas aos médicos, farmacêuticos e aos usuários destes produtos (FARNSWORTH *et al.*,1985).

A medicina popular poderá ser entendida como um corpo de conhecimentos e práticas médicas, que se desenvolve numa dinâmica própria, com base no conhecimento empírico, segundo o contexto sócio-cultural e econômico em que se insere. Trata-se de uma medicina sincrética, que envolve componentes herdados da medicina dos antepassados que vão sendo reinterpretados e adequados às realidades do presente, somados a elementos resultantes de diferentes influências. Desta forma, a medicina popular vai sofrendo mudanças, cujos fatores determinantes devem-se, principalmente, às influências dos meios de comunicação de massa, e da coexistência e interinfluência, na mesma sociedade, do sistema médico oficial e do sistema médico popular, favorecendo, também, a urbanização da medicina rural (CAMARGO, 1985).

Atualmente pode-se encontrar facilmente as mais diversas informações sobre uma determinada planta medicinal, mas que carecem de fundamento científico, tornando assim seu uso um potencial risco a saúde. Em geral, as conclusões sobre segurança e eficácia são baseadas em avaliações precárias do uso popular. Portanto, há necessidade de que profissionais qualificados possam, além de acessar tais informações, analisá-las criticamente para disponibilizá-las de forma que sejam facilmente compreendidas, não só por profissionais da saúde, mas também pelos usuários destes produtos.

A família *Euphorbiaceae* é representada por aproximadamente 300 gêneros e cerca de 7500 espécies. Podem se apresentar como arbóreas, arbustivas, subarbustos e ervas. As espécies mais conhecidas estão: a Seringueira (*Hevea sp.*) e a Mamona (*Ricinus communis*). Entre suas características botânicas temos a presença de substâncias latexcentes, visíveis quando a planta é submetida às injúrias mecânicas (WEBSTER, 1967). As *Euphorbiaceae*s tem se destacado como uma família de importância econômica, especialmente na alimentação humana, produção de látex e óleos, e ainda na medicina popular. Algumas espécies são utilizadas na alimentação humana, principalmente na região Nordeste do Brasil, como *Manihot esculenta* Crantz, da qual se extrai a farinha de mandioca (CAMARGO, 1985).

Euphorbia é um gênero de plantas da família *Euphorbiaceae*, que inclui cerca de 3250 espécies de grande variedade morfológica. A maioria das *Euphorbia* são arbustos, mas também existem variedades de árvores e suculentas que se assemelham a cactos. Na sua diversidade, as *Euphorbia* distinguem-se das restantes *Euphorbiaceae* pela presença de uma inflorescência característica chamada ciátio. Este gênero caracteriza-se também pela produção de um suco leitoso (látex) de propriedades tóxicas. De acordo com WEBSTER (1967) ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies no Brasil, difundidas em todos os tipos de vegetação (WEBSTER, 1967).

Um exemplo de planta utilizada na medicina popular, mas sem comprovação científica, é a *Euphorbia tirucalli* Linneau. Proveniente da África e trazida para o Brasil com fins ornamentais, ficou conhecida aqui popularmente como Graveto-do-cão, Árvore Lápis, ou mais comumente como **Aveloz**. Esta é um arbusto, comumente, com altura em torno de 2 metros, cujos pequenos caules são, na verdade, folhas modificadas. Esta planta tem sido utilizada para o tratamento de inúmeras enfermidades, como infecções microbianas, em pacientes imunodeprimidos e até mesmo para o câncer (FURSTENBERGER, 1985).

A presente dissertação está dividida em duas partes. A primeira parte trata de um estudo fitoquímico da espécie *Euphorbia tirucalli*, visando identificar compostos presentes na planta. A segunda parte descreve estudos relacionados a análise de atividades biológicas, imunológicas e toxicológicas da mesma espécie.

2. OBJETIVOS

2.1 – Geral

O objetivo principal deste projeto é estudar fitoquimicamente a espécie *Euphorbia tirucalli* L. bem como avaliar alguns de seus efeitos biológicos.

2.2 – Específicos

- ✚ Identificar constituintes da planta por CG/MS;
- ✚ Avaliar a atividade antimicrobiana das frações do extrato da planta;
- ✚ Avaliar a capacidade antioxidante das frações do extrato da planta;
- ✚ Determinar a concentração de polifenóis nas frações do extrato da planta;
- ✚ Realizar doseamento de taninos totais nas frações do extrato desta planta;
- ✚ Realizar estudo de toxicidade aguda para o extrato bruto, frações e látex da planta;
- ✚ Avaliar os efeitos do látex sobre a enzima acetilcolinesterase humana *In Vitro*;
- ✚ Avaliar os efeitos do látex sobre a atividade antiplaquetária humana *In Vitro*;
- ✚ Avaliar os efeitos do extrato bruto sobre o Sistema Imune humano em culturas de células;
- ✚ Buscar o aprofundamento, o conhecimento e a familiarização dos métodos laboratoriais que serão utilizados na execução do trabalho e conseqüentemente desenvolver habilidades técnicas e teóricas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Considerações gerais sobre a família

As *Euphorbiaceae* tem se destacado como uma família de importância econômica, especialmente na alimentação humana, produção de látex e óleos, e ainda na medicina popular. Algumas espécies são utilizadas na alimentação humana, principalmente na região nordeste do Brasil, como *Manihot esculenta* Crantz, da qual se extrai a farinha de mandioca (BRAGA, 1976). Alguns representantes da família já movimentaram grandes riquezas no Brasil, especialmente pela extração de látex para a produção de borracha natural, como as espécies dos gêneros *Hevea aublet* (seringueira), que fortaleceram economicamente a região amazônica ou espécies de *Manihot sp* Miller, que foram responsáveis por manter, durante algum tempo, a economia da região da caatinga nordestina (BRAGA, 1976).

Além do uso industrial das borrachas naturais, as *Euphorbiaceae* destacam-se economicamente pela produção de óleos que apresentam diversos usos na indústria de tintas, plásticos, plastificantes, sabões duros, fibras sintéticas, pigmentos para tecidos, perfumes, batons, cosméticos, papel, fertilizantes ou como lubrificante de motores de alta rotação e turbinas de aviões a jato, especialmente os extraídos de espécies do gênero *Ricinus* L. (BRAGA, 1976).

A medicina popular também é contemplada com diversas espécies da família *Euphorbiaceae*: pelo uso do chá de efeito antilítico, diurético, anti-hepatóxico e antiespasmódico, extraído de espécies do gênero *Phyllanthus* ou o chá das raízes de efeito cicatrizante, tônico e diurético de espécies do gênero *Cnidoscolus sp* Pohl ou de espécies do gênero *Euphorbia* L., utilizadas como antidiarréicas (BRAGA, 1976).

3.2 Considerações gerais sobre o gênero

O gênero *Euphorbia* engloba cerca de 2000 espécies espalhadas pelo globo, em ecossistemas muito diversos e com aspectos morfológicos também muito diversos. Muitas são suculentas, outras são herbáceas, e outras arbustivas, chegando mesmo a ter porte de árvore. Em comum, têm, entre outras características, uma seiva branca que é frequentemente tóxica e irritante para a pele e olhos, daí que o manuseamento e principalmente operações que

envolvam cortes, devam ser feitos com luvas, tendo todo o cuidado de evitar qualquer contato com os olhos. Deve haver ainda o cuidado de não deixar cair pedaços em lagos com peixe, uma vez que a seiva pode matar o peixe ou outros animais aquáticos.

Várias espécies suculentas ou herbáceas são utilizadas como ornamentais como a conhecida “estrela de natal” - *E. pulcherrima*, originária do México. Algumas das *Euphorbias* mais populares em jardinagem são de origem mediterrânica, como a *E. characias* e a *E. myrsinites*. A maioria dos cultivares utilizados em jardinagem foram selecionados da *E. characias wulfenii*, que ocorre naturalmente na Turquia e Balcãs.

As *Euphorbias* de origem mediterrânica são normalmente plantas pouco exigentes, uma vez que crescem em solos degradados e pobres. Normalmente crescem melhor se o solo for leve e profundo, algumas apresentam algumas dificuldades em solos pesados. A *E. myrsinites* propaga-se em solos arenosos, e poderá ter vida curta em solos pesados e mal drenados. Em solos muito pobres, à sombra ou em outras condições desfavoráveis, alguns cultivares de *E. characias* tendem a perder as folhas mais baixas, ficando esteticamente depreciados.

3.3 Considerações gerais sobre a espécie

A *Euphorbia tirucalli* L. é conhecida popularmente como graveto-do-cão, figueira-do-diabo, dedo-do-diabo, pau-pelado, árvore de São Sebastião e Aveloz (**Figura 01**). É uma planta nativa da África oriental sendo muito cultivada no Brasil com fins ornamentais e para a formação de cercas vivas. Foi introduzida na medicina popular brasileira por um médico de Pernambuco, Dr. Pamífilo, entre 1880 e 1890 (JURBERG, 1985).



Figura 01: *Euphorbia tirucalli*, conhecida popularmente como Aveloz.

< Disponível em <http://www.rain-tree.com/aveloz.htm>, acesso em 28/09/2007 >.

Entre os tratamentos populares, a *E. tirucalli* é utilizada na África como repelente de insetos; sua raiz para picadas de cobra, o látex é usado em tumores de pele e úlceras sifilíticas, as sementes e o látex são usados para parasitas intestinais e o chá das partes aéreas é utilizado para infecções bacterianas. Na Malásia, os galhos são triturados e aplicados sobre sangramentos. A infusão da raiz é utilizada para sangramentos nasais e crises de hemorróidas. O chá das partes aéreas é usado para tratamentos de lepra e paralisia das mãos e pés de recém nascidos. Na Índia, o látex é utilizado para asma, tosse, dores de ouvido, dores de cabeça, reumatismo, dores de dente e retirada de verrugas. O chá da planta inteira é utilizado para problemas gástricos. No Peru, a planta é utilizada de modo semelhante ao utilizado na Índia, e a também para cura de abscessos, câncer e cólicas (WEBSTER, 1967).

Segundo a medicina popular brasileira, esta planta pode ser usada como analgésico, antiinflamatório, emético, laxativo, como venenotvc para peixes, para o tratamento de impotência, como estimulante do sistema imune, para tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. Existe até mesmo propaganda do extrato da Aveloz para venda nos Estados Unidos (**Figura 02**) com finalidade de tratar câncer, tumores e cistos <disponível em <http://www.cantron.com/html/nutraceuticals/aveloz.html>, acesso em 23/09/2007>, o qual indica até a dosagem a ser utilizada.

The screenshot shows the website for 'Medical Research Products' (Cantron). The main content area is titled 'Aveloz Extract' and describes it as a 'tenuacious escharotic (tissue tearing) plant from South America'. It includes a 'Rich Folklore History' section mentioning Dr. Panfillo and Dr. Gomez Panto. A 'Quick Links' sidebar lists various products like Shark Liver Oil, Lapacho Extract, and Aveloz Extract. The main text provides botanical details, including the name *Euphorbia heterodoxa* and its medicinal uses. A 'Phytochemical Properties of Aveloz' section lists various compounds. The 'Ordering Information' section, circled in red, lists: 30 ml Bottle of Liquid Extract of Aveloz (1 bottle \$50.00), 2 bottles (\$27.50 each) \$55.00, and 6 bottles (\$25.00 each) \$150.00. Contact information for Cantron is provided at the bottom.

Figura 02: Site da Internet que vende o extrato da *Euphorbia tirucalli* por US\$ 30,00 o frasco de 30 mLs.

< Disponível em <http://www.cantron.com/html/nutraceuticals/aveloz.html>, acesso em 03/06/2007>.

Alguns pesquisadores relatam que o látex dos ramos da aveloz é usado tradicionalmente para a cauterização de verrugas e, muitas vezes, é empregado, duvidosamente, para o tratamento de câncer e problemas de imunossupressão (FURSTENBERGER, 1985). É importante ressaltar que não há estudos científicos que comprovem possíveis atividades anticancerígenas ou imunoestimulantes da aveloz. Entretanto, alguns trabalhos revelam justamente o contrário, ou seja, que o látex da *Euphorbia tirucalli* pode causar imunossupressão (SIGIURA, 1994), e freqüentemente encontra-se associado ao aparecimento do *Linfoma de Burkitt*, que é um tipo de câncer (BOSCH, 2004).

O Aveloz, apesar de não haver registros na literatura de nenhum tipo de estudo de toxicidade aguda, está incluído na lista de plantas tóxicas no sistema *Nacional de Informações Toxicológicas da Fiocruz*. Esta planta produz um látex que pode causar lesões na pele e mucosas, edema de lábios, boca e língua, dor em queimação e coceira. O contato com os olhos pode provocar irritação, lacrimejamento, edema de pálpebras e dificuldade de visão. Além disso, a ingestão do látex e/ou de preparações contendo o látex do aveloz pode causar náuseas, vômitos e diarreia, chegando a existir relatos de uma morte ocorrida em Zimbábue, na África, onde um homem morreu de hemorragia digestiva após ter ingerido uma pequena quantidade do látex puro para tratamento de impotência <disponível em <http://www.fiocruz.br/sinitox/avelos.htm>, acesso em 10/07/2007>.

3.4 Metabólitos secundários

3.4.1 Definição

Dá-se o nome de metabolismo ao conjunto de reações que continuamente estão ocorrendo em cada célula. Portanto, os compostos químicos formados, degradados, ou simplesmente transformados são chamados metabólitos.

Segundo SANTOS (1999) todos os seres vivos derivam de um precursor comum. Isso explica, por exemplo, porque as principais macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos), que vem a ser os constituintes químicos celulares, são essencialmente as mesmas, quer num organismo vegetal, quer num animal. Por serem considerados processos essenciais à vida e comuns aos seres vivos, têm sido definidos como integrantes do metabolismo primário. Ou seja, o metabolismo primário compreende as várias reações

químicas envolvidas na transformação de moléculas de nutrientes em unidades constitutivas essenciais da célula.

Vegetais, microorganismos e, em menor escala animais, entretanto, apresentam um metabolismo diferenciado (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Nesse grupo, encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, sendo a bioquímica e o metabolismo específico, características únicas, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização. A todo este conjunto metabólico costuma-se definir como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie, em seu ecossistema (SANTOS, 1999).

3.4.2 Função e importância

Durante muito tempo os metabólitos secundários foram considerados produtos de excreção dos vegetais. No entanto, atualmente já se sabe que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor ao meio. Diversas funções são atribuídas a esta classe de metabólitos como: defesa contra herbívoros; proteção contra raios UV; atração de polinizadores e de animais dispersores de semente, entre outras (SANTOS, 1999).

É característica dos vegetais a elevada capacidade biossintética desses metabólitos secundários, tanto em relação ao número como a diversidade em uma mesma espécie (SANTOS, 1999). Assim, por serem fatores de interação entre organismos, os metabólitos secundários, freqüentemente apresentam atividades biológicas interessantes. Muitos são de importância comercial, tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica, da perfumaria, entre outras. Pelo elevado número e grande diversidade destes metabólitos vegetais eles têm despertado interesse de pesquisadores de vários campos da ciência que vêem neles uma promissora fonte de novas moléculas potencialmente úteis ao homem (SANTOS, 1999).

3.4.3 Metabolismo vegetal secundário

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato.

O mevalonato é formado da condensação de uma unidade de acetoacetyl - CoA com uma molécula de acetil-CoA. Após a condensação aldólica, ocorre uma hidrólise originando o 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA que é reduzido a mevalonato, numa reação irreversível. O mevalonato é então convertido em isopentenil-pirofosfato, ou *isopreno ativo*, a unidade básica na formação dos terpenos e esteróides. A polimerização do mevalonato origina moléculas de cadeias carbonadas crescentes de cinco em cinco átomos de carbono. A molécula de isopentenil-pirofosfato e seu isômero dimetilalilpirofosfato formam o *trans*-geranil-pirofosfato, a partir do qual se formam os demais terpenos. Novas ligações cabeça-cauda entre *trans*-geranil-pirofosfato e isopentenil pirofosfato resultarão em sesqui (C15) e diterpenos (C20). Já a ligação cabeça-cabeça entre duas moléculas de farnesil-pirofosfato (C15) origina o esqualeno, o precursor da maioria dos triterpenos e esteróides (SANTOS, 1999). A rota biossintética de esteróides e triterpenos é apresentada na **Figura 03**.

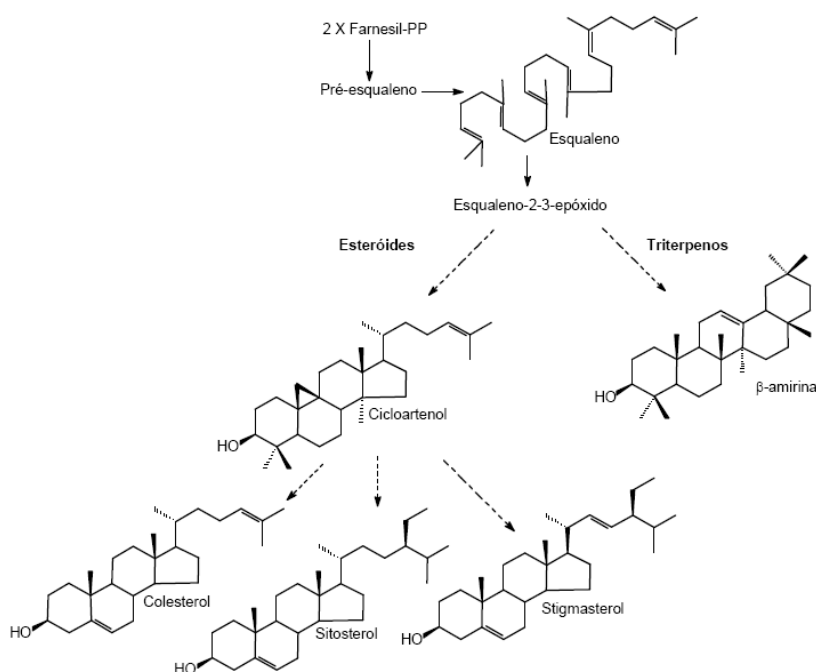


Figura 03: Rota biossintética de esteróides e triterpenos.

(Adaptado de Wagner, 1993).

3.4.4 Metabólitos secundários isolados até o momento

Até o momento foram isolados na família *Euphorbiaceae* diversos compostos como, por exemplo: ácido 3,3'-di-o-metilelágico, β -sitosterol, ácido cítrico, ácido elágico, glicose, resinas, acetatos sapogênicos, ácido succínico, taraxasterol, tirucalol, sendo que a presença destas substâncias e as concentrações variam entre as diversas espécies desta família (FURSTENBERGER, 1985).

Em 1979, KINGHORN realiza os primeiros estudos envolvendo a espécie *E. tirucalli* isolou 3 diferentes ésteres de Forbol por cromatografia e identificou por RMN e MS os compostos: 12-O-2Z-4E-octadienoil-4-desoxiforbol-13-Acetato (**Figura 04.1**), 4-desoxi-1 α -forbol-12-2Z-4E-octadienoato (**Figura 04.2**) e 4-desoxi-4 α -forbol-12-13-20-triacetato (**Figura 04.3**).

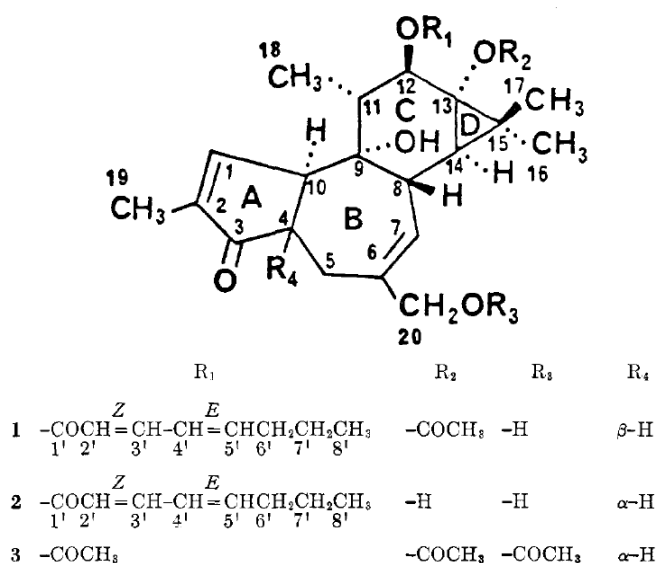


Figura 04: Estruturas de Ésteres de Forbol isoladas por Kinghorn em 1979.
(Adaptado de Kinghorn, 1979).

Em 1984, NES e colaboradores, isolaram e identificaram por cristalografia moléculas de eufol e tirucalol, ambas as estruturas são triterpênicas. (**Figura 05**).

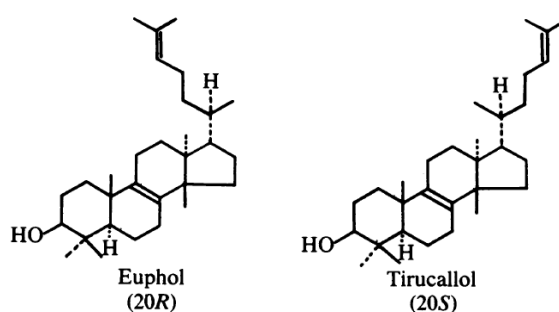


Figura 05: Estruturas de dois triterpenos isolados por NES et al em 1984.

(Adaptado de NES et al, 1984).

Já em 1986, FURSTENBERGER, identificou, tanto no látex, quanto nas demais partes da planta, a existência de um éster diterpenóide, altamente insaturado, denominado de **4-Desoxiforbol**, o qual, devido a sua estrutura altamente insaturada, “apontava” para a existência de uma atividade carcinogênica uma vez que os testes realizados por ele indicaram grande atividade irritante.

Em 1988a, KAHN e colaboradores, através de análise espectroscópica, identificaram a presença de outro triterpeno, denominado Ciclotirucanenol (**Figura 06.1**), o qual corresponde ao composto 24 β -metil-9 β -19-ciclolanost-20-en-3 β -ol. Um segundo trabalho (KAHN, 1988b), no mesmo ano, deste mesmo grupo, identificou a presença de outro triterpeno pentacíclico que foi denominado de Euforcinol (**Figura 06.2**), que corresponde à estrutura química do 1 α -hidroxi-friedelano. Ainda em 1988c, KAHN e colaboradores publicaram um terceiro trabalho e demonstraram a existência de outro triterpeno, o qual foi denominado de Cicloeufordenol, e corresponde a estrutura química do 4 α -14 α -24-trimetil-9 β -ciclocolest-20-en-3 β -ol (**Figura 06.3**).

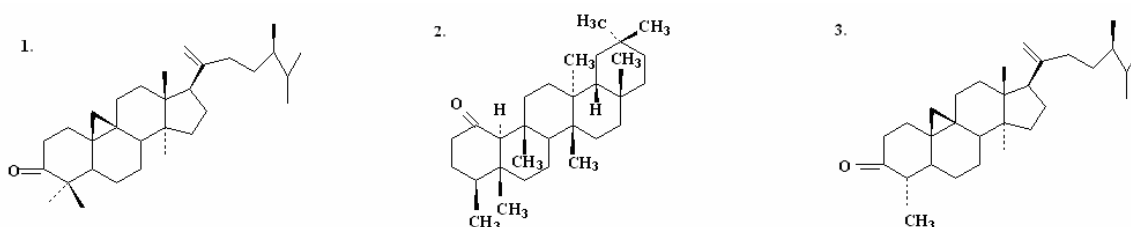


Figura 06: Estruturas dos triterpenos isolados por KAHN et al em 1988.

(Adaptado de KAHN et al, 1988).

RASOOL e colaboradores, todos pertencentes ao mesmo grupo de KAHN, em 1989, isolaram um novo composto, o taraxer-14-en-6 α -ol, ou simplesmente Euforginol (**Figura 07**).

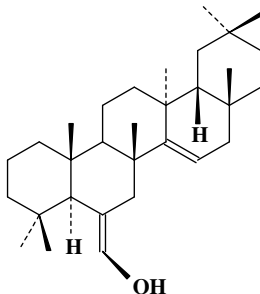


Figura 07: Estrutura do triterpeno isolados por RASOOL et al em 1989.

(Adaptado de RASOOL et al, 1989).

Em 1991, YOSHIDA e colaboradores identificaram três novos taninos hidrolizáveis que foram denominados de Tirucalin A (**Figura 08.1**), Tirucalin B (**Figura 08.2**) e Euforin F (**Figura 08.3**).

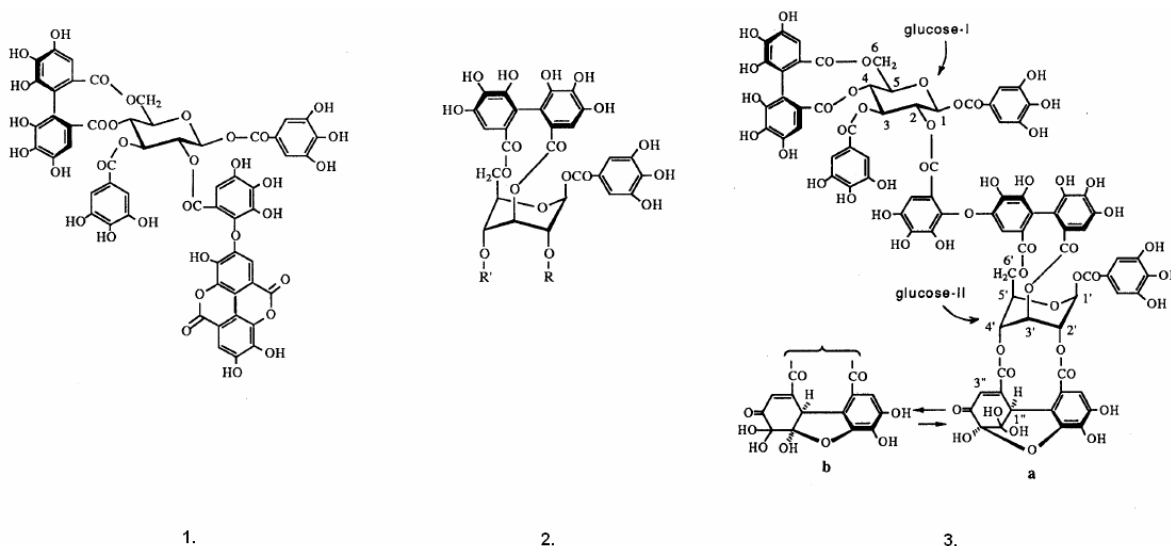


Figura 08: Estruturas dos três taninos hidrolizáveis inéditos isolados por YOSHIDA et al em 1991.

(Adaptado de YOSHIDA et al, 1991).

No ano de 2001, LIN e colaboradores, reportaram o isolamento de 13 compostos polifenólicos, sendo onze já conhecidos e dois inéditos. Os polifenóis já conhecidos são: ácido gálico, 1-O-galoil- β -D-glucoside, 1,2,3-tri-O-galoil- β -D-glucoside, pedunculagin, 2,3-(S)-hexahidroxidifenoil-D-glucopiranoside, putranjivain A, corilagin, casuariin, putrajivain B,

ácido 3,3-di-O-metil gallico, quercitrina, rutina. Os dois polifenóis inéditos são: 5-desgaloistarchiurin (**Figura 09.1**) e ácido 3,3',4-tri-O-metil-4'-O-rutinosil elagico (**Figura 09.2**).

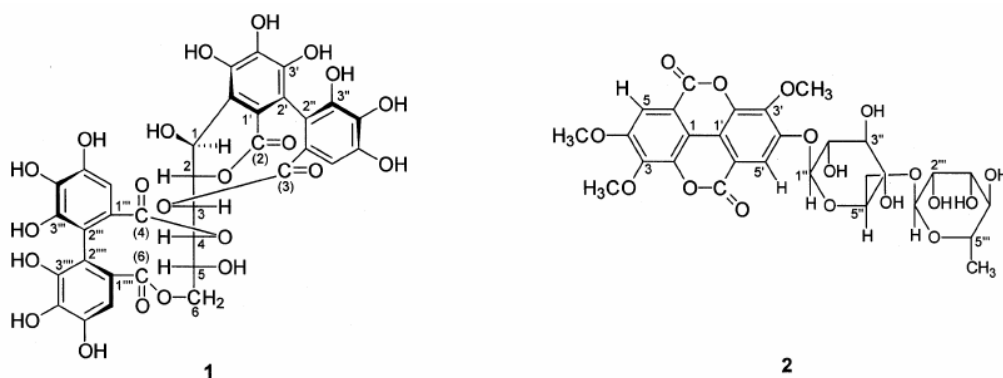


Figura 09: Estruturas dos dois taninos inéditos isolados por LIN et al em 2001.

(Adaptado de LIN et al, 2001).

YAMAMOTO, MIZUGUCHI e YAMADA, em 2004, identificaram no látex de *Euphorbia tirucalli* a presença dos compostos: β -sitosterol, stigmasterol e campferol, além dos compostos de metabolismo primário: ácido palmítico e ácido linoléico.

MALLAVADHANI e colaboradores em 2006 identificaram, agora no látex, da *Euphorbia tirucalli* a presença da substância Eufol, 5α -eufa-8-24-diene-3 β -ol, cuja estrutura química é mostrada na **Figura 10**. O mesmo trabalho demonstrou que não ocorreu variação nas concentrações de Eufol durante as estações do ano.

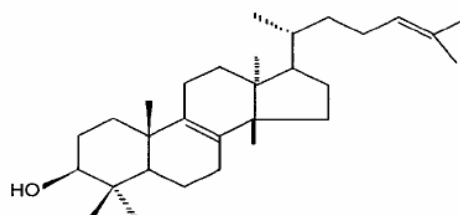


Figura 10: Estrutura química do Eufol isolado por MALLAVADHANI et al em 2006.

(Adaptado de MALLAVADHANI et al, 2006).

3.5 Atividades biológicas conhecidas

3.5.1 Atividade sobre sistema imune e sobre o câncer

O corpo humano é formado por células e cada grupo de células tem uma função clara e determinada. Um grupo de células, chamados linfócitos, um tipo de glóbulo branco, tem a função de defender o organismo das doenças e infecções. Estes se dividem em duas categorias: os linfócitos B e os linfócitos T. Os linfócitos B protegem o corpo contra os agentes infecciosos, fabricando anticorpos, impedindo-os de agir. Entre os linfócitos T, os CD4⁺ são os responsáveis no processo de defesa do organismo, por "alertar" o sistema imunológico que é necessário se defender. Sem estar avisado de que precisa combater os agentes infecciosos, o sistema imunológico não funciona. Já os linfócitos CD8⁺ destroem as células já infectadas ou doentes. A correta taxa dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ é imprescindível para se determinar se a resposta imune será eficaz (SIGIURA, 1994). A metodologia padrão para contagem destas células é a **Citometria de Fluxo** (OHNO, 1988). Nesta técnica, a amostra de sangue é colocada em contato com anticorpos monoclonais. Após o tempo de incubação, as amostras são analisadas em citômetro de fluxo e este mede a intensidade de células marcadas (OHNO, 1988).

Em 2004, BOSCH, identificou que a planta *Euphorbia tirucalli* apresentava algum componente que alterava a constituição de alguns tipos de linfócitos e facilitava a entrada de alguns vírus nos mesmos, levando à formação de Linfomas, como por exemplo, o *Linfoma de Burkitt*, causado pela entrada do *Epstein Barr Vírus* nos linfócitos. Neste trabalho, BOSCH relata então que esta planta seria, na verdade, um promotor de tumores devido aos efeitos sobre os linfócitos.

OLIVEIRA E NEPOMUCENO (2004) avaliaram os efeitos genotóxicos e antigenotóxicos em *Drosophila melenogaster*. Suas conclusões foram que o látex da *Euphorbia tirucalli* não apresentou atividade genotóxica ou antigenotóxica significativa nas concentrações testadas, porém verificaram que a medida que as concentrações do látex aumentam, ocorre também o aumento da atividade genotóxica.

Em 2004, REZENDE e colaboradores, realizando testes de mutagenicidade observaram que a presença do látex de *Euphorbia tirucalli* causava uma freqüência de cepas teste mutantes significativamente menor no tratamento em ambas as concentrações do látex

testadas. Estas análises indicaram um potencial antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli*.

VALADARES e colaboradores, em 2006, descreveram um aumento do número de linfócitos T normais após administração do látex desta planta a ratos Wistar, bem como uma redução do tamanho das células tumorais dos mesmos, tendo assim uma atividade imunoestimulante e antitumoral.

BANI e colaboradores, em 2006, analisaram uma fração biopolimérica da *Euphorbia tirucalli* produzida em seu laboratório e realizaram a análise dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ *in vivo* em roedores. Suas conclusões foram que os animais tratados com a fração biopolimérica de *Euphorbia tirucalli* apresentaram uma redução de até 17,96% nos níveis de CD4⁺ e até 9,68% de redução nos níveis de CD8⁺. Além deste efeito, foi constatada também uma inibição da Interleucina tipo 2 (um modulador da resposta imune) em linfócitos CD4⁺ e de γ -Interferon (um proteína que atua como anti-viral) em linfócitos CD8⁺. Tais efeitos podem comprometer a resposta imune seriamente.

3.5.2 Efeitos sobre o Sistema Colinérgico

A acetilcolina (ACh) (**Figura 11**) é o neurotransmissor das sinapses e junções neuroefetoras colinérgicas dos sistemas nervoso central e periférico. É sintetizada no citosol do neurônio a partir da acetil coenzima-A e da colina.

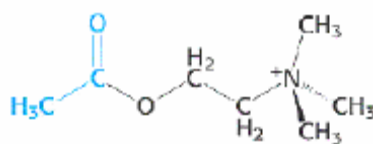


Figura 11: Estrutura química da acetilcolina (adaptado de [http:// www.unizar.es](http://www.unizar.es)).

A acetil coenzima-A tem origem mitocondrial, ao passo que a colina provém da fenda sináptica, extracelular. A colina atravessa a membrana do terminal axônico por um mecanismo de transporte ativo específico (SILVA, 1998). A combinação da acetil-CoA à colina é catalisada pela colina acetiltransferase (ChAT). Depois de sintetizada, a acetilcolina é armazenada nas vesículas sinápticas. Este neurotransmissor possui um papel crucial no

sistema nervoso central. No terminal axonal, as vesículas pré-sinápticas contendo acetilcolina ficam armazenadas até que haja um estímulo que as libere.

O impulso nervoso, ou potencial de ação, ao chegar ao botão sináptico onde estão as vesículas sinápticas, ocasiona uma despolarização da membrana pré-sináptica, aumentando a condutância do cálcio, o que favorece a entrada deste no axônio. A liberação da acetilcolina varia diretamente com a concentração de cálcio (PRADO et al., 2002). Posteriormente ocorre a fusão das vesículas com a membrana plasmática da pré-sinapse e o extravasamento do neurotransmissor na fenda sináptica, ocorrendo a fusão com a membrana. A acetilcolina liberada pode difundir-se no espaço extracelular, ser degradada em colina e ácido acético pela acetilcolinesterase ou ainda, combinar-se com receptores colinérgicos pós e pré-sinápticos. Os receptores colinérgicos são classificados em nicotínicos e muscarínicos, os quais transmitem os sinais por mecanismos diferentes. Os receptores muscarínicos e nicotínicos cerebrais atuam a nível pré-sináptico. Porém os receptores nicotínicos estão distribuídos de modo mais esparso e facilitam a liberação de outros neurotransmissores como a dopamina (RANG et al., 2004). Os receptores nicotínicos são formados por diversas subunidades α e β ($\alpha 2 - \alpha 10$, $\beta 2 - \beta 4$). As diferentes associações destas subunidades conferem propriedades estruturais e funcionais distintas aos diferentes subtipos de receptores nicotínicos (DAJAS-BAILADOR & WONNACOTT, 2004).

Logo após exercer sua ação a acetilcolina sofre hidrólise pelas colinesterases, liberando ácido acético e colina. Nesta hidrólise, que ocorre na fenda sináptica, cerca de 50% da colina produzida é recaptada pelo terminal axônico, e, posteriormente, é reutilizada para a biossíntese de acetilcolina (SILVA, 1998).

As colinesterases são classificadas de acordo com suas propriedades catalíticas e especificidade aos substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual. As colinesterases desempenham papel importante na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de outras funções, como a hidrólise e detoxificação de xenobióticos (MASSOULIÉ et al., 1993). Acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil, e a butirilcolinesterase (BChE; E.C. 3.1.1.8) hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina. Ambas as colinesterases são amplamente distribuídas no organismo (TAYLOR & BROWN, 1999).

A acetilcolinesterase (E.C. 3.1.1.7) possui um papel regulatório na neurotransmissão colinérgica. Ela é responsável pela hidrólise rápida do neurotransmissor acetilcolina. É uma glicoproteína globular encontrada nos neurônios colinérgicos, nas proximidades das sinapses colinérgicas e em concentrações elevadas na junção neuromuscular (MASSOULIÉ et al.,

1993). A AChE está amplamente distribuída no sistema nervoso central e também é encontrada em eritrócitos, linfócitos e plaquetas de mamíferos (SILVA, 1998).

A AChE existe em duas classes gerais de formas moleculares: como oligômeros homoméricos simples de subunidades catalíticas e como associações heteroméricas de subunidades catalíticas e subunidades estruturais. Os oligômeros homoméricos simples aparecem como: monômeros, dímeros e tetrameros, dando origem, assim, às formas globulares (G): G1, G2 e G4. As associações heteroméricas de subunidades catalíticas e subunidades estruturais resultam nas formas estruturais assimétricas (A): A4, A8 e A12 (**Figura 12**) (MASSOULIÉ et al., 1993). As formas homoméricas são encontradas como espécies solúveis na célula, provavelmente com o intuito de exportação, ou então se apresentam associadas à membrana externa da célula por meio de uma seqüência de aminoácidos hidrofóbicos intrínsecos ou de um glicofosfolípídeo acoplado. A AChE que se apresenta nas formas heteroméricas encontra-se associada com a lâmina basal externa na sinapse e é particularmente abundante na junção neuromuscular (TAYLOR & BROWN, 1999). A maior parte da AChE encontrada no tecido nervoso é do tipo globular, predominantemente G4, ligada à membrana (MASSOULIÉ et al, 1993). Os eritrócitos, linfócitos e plaquetas contêm a forma globular dimérica G2, tetramérica G4 e a assimétrica A12, respectivamente.

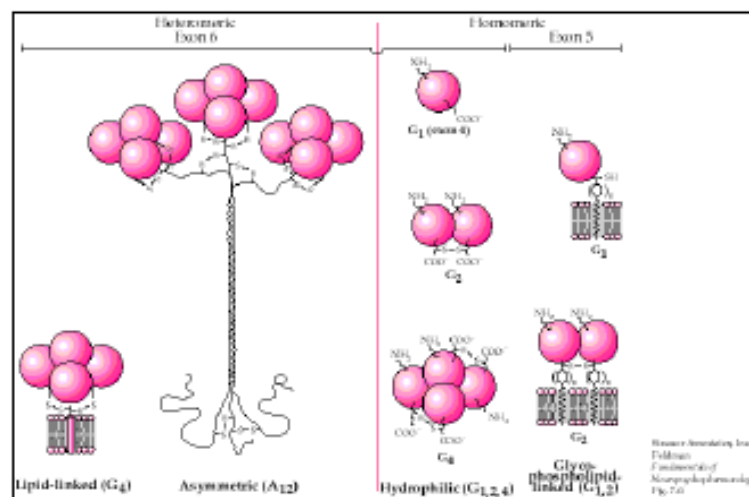


Figura 12: Isoformas da AChE (http://www.chemistry.emory.edu/ach_inactivation.htm).

A estrutura tridimensional da AChE demonstra que seu centro ativo é formado por resíduos da chamada tríade catalítica: serina 203, histidina 447 e glutamato 334. A visão

tradicional do sítio ativo da AChE foi considerada como tendo dois subsítios: um sítio carregado negativamente ou aniônico, ao qual a cadeia de nitrogênio quaternário da ACh carregada positivamente se liga, e um sítio esterásico contendo os verdadeiros resíduos catalíticos, o qual aloja o grupamento éster e carbonila da ACh (**Figura 13**) (TAYLOR & BROWN, 1999). Um segundo sítio aniônico que se tornou conhecido como sítio aniônico periférico (peripheral anionic site-PAS), foi proposto com base na ligação de compostos bis quaternários. Tem sido proposto que este sítio possa estar envolvido na ação de determinados inibidores da enzima ou ainda na inibição por excesso de substrato (NUNES-TAVARES et al., 2002).

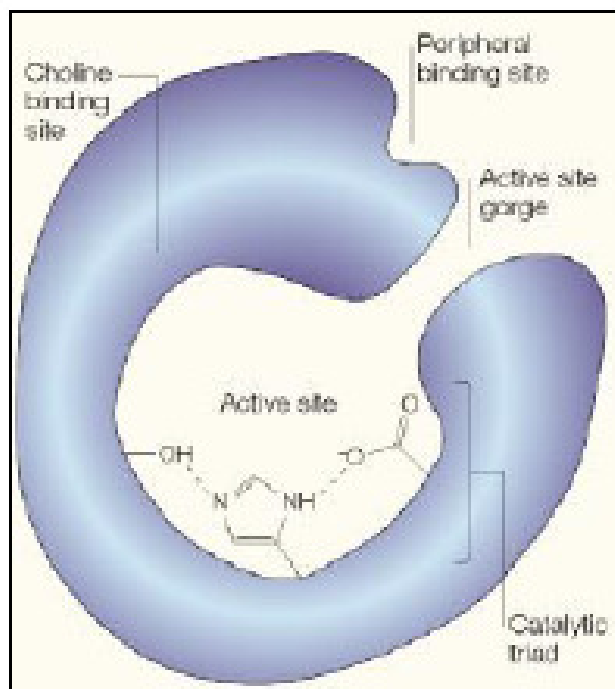


Figura 13: Sítio catalítico da AChE (adaptado de Soreq & Seidman, 2001).

A enzima é classificada como uma serina hidrolase. Seu mecanismo catalítico assemelha-se ao de outras hidrolases, onde o grupamento hidroxila da serina torna-se altamente nucleofílico por um sistema de reposição de cargas que envolve o grupamento carboxila do glutamato, o imidazol da histidina e a hidroxila da serina (TAYLOR, 1996). Quando do ataque enzimático sobre o éster, é formado um intermediário tetraédrico entre a enzima e o éster que se rompe e forma um conjugado acil-enzima, com a liberação

concomitante da colina. A acetil enzima é passível de hidrólise e esta resulta na liberação de acetato e na regeneração da enzima ativa (TAYLOR, 1996).

TIWARI e SINGH, em 2003, demonstraram que o látex da *Euphorbia tirucalli*, causava severa inibição na enzima Acetilcolinesterase em caramujos, sendo este o motivo da mortalidade dos mesmos após o tratamento. Neste trabalho, era sugerido que fosse realizado um estudo envolvendo a acetilcolinesterase humana, a fim de verificar se poderia ser responsável por alguma toxicidade em humanos.

Por outro lado, BARBOSA-FILHO et al em 2006, demonstrou que plantas que inibem a acetilcolinesterase estão sendo pesquisadas com finalidades de auxílio no tratamento da Doença de Alzheimer.

3.5.3 Atividade antibacteriana, molusquicida e antiviral:

JURBERG et al, em 1985, demonstraram que a *E. tirucalli* apresenta atividade contra o molusco *Biomphalaria glabrata*. A importância deste trabalho é a possibilidade que a planta possa ser utilizada contra a Esquistossomose, uma vez que este molusco é o vetor da doença.

Em 1998, LÍRIO, HERMANO E FONTANILLA demonstraram atividade contra *Erwinia carotovora* (bactéria que causa o apodrecimento da raiz da cenoura), *Xanthomonas campestris* (bactéria causadora de cancro em frutas cítricas) e *Pseudomonas solanacearum* (bactéria que ataca as folhas das frutas e leva ao apodrecimento).

Já no ano de 2002, BETANCUR-GALVIS e colaboradores, identificaram uma ação antiviral forte contra o vírus *Herpes simplex 2* na fração alcoólica do extrato, e de média intensidade na fração diclorometano.

Em 2005, PAREKH e colaboradores, determinaram que o extrato metanólico da *Euphorbia tirucalli* apresenta atividade antimicrobiana para algumas cepas testadas, com por exemplo: *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* e *Salmonella typhimurim*. O mesmo grupo de pesquisadores, porém um ano depois, demonstrou atividade também contra o *Bacillus cereus* e *Enterobacter aerogenes* (PAREKH, et al, 2006).

3.5.4 Outras ações conhecidas

AYA e colaboradores em 1991, determinaram que o extrato de Aveloz está envolvido na translocação entre os cromossomos 8 e 14, o que levaria a maior permeabilidade dos linfócitos B ao *Epstein Barr Vírus*, causador do *Linfoma de Burkitt*.

KAMAT e colaboradores em 1997, estudaram os efeitos da *Euphorbia tirucalli* sobre a enzima *Anidrase Carbônica* em peixes e camarões. Seus resultados mostraram que o látex inibiu 40% da atividade da enzima nas guelras dos peixes e 15% nos camarões. Ainda houve uma diminuição de 61% da atividade no sangue de Tilápias.

Em 2005, TIWARI e SINGH, publicaram um segundo trabalho mostrando que a administração do látex a caramujos induzia efeitos tóxicos sobre os carboidratos e sobre o metabolismo de proteínas, bem como alterava as rotas aeróbicas do metabolismo, levando a uma reduzida formação de moléculas de ATP.

Novamente TIWARI e SINGH, agora no ano de 2006, evidenciaram que, doses sub-letais de extratos aquosos de *E. tirucalli* a peixes da espécie *Channa punctatus* causavam alterações nos níveis de proteínas totais, nível de aminoácidos livres, ácidos nucléicos, glicogênio, piruvato e lactato, bem como provocava alterações na atividade de enzimas como proteases, alanine aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), acetilcolinesterase e citocromo oxidase em tecidos hepáticos e musculares. Estas alterações foram determinadas como sendo dose e tempo dependentes.

3.6 Estudos Toxicológicos

Em 2006, um trabalho de BRASILEIRO e colaboradores demonstrou a atividade de várias plantas da região de Governador Valadares (Minas Gerais). Entre as plantas testadas, encontra-se a Aveloz. O estudo demonstrou que no teste da *Artemia salina*, considerado um teste de triagem para a avaliação de toxicidade os resultados apontaram uma atividade altamente tóxica do extrato bruto.

Em 2007, um trabalho de SILVA e colaboradores, também em Minas Gerais, demonstrou a atividade do látex sobre o desenvolvimento gestacional de ratas Wistar. Os resultados apontaram a ocorrência de pequenas alterações placentárias, mas sem nenhum caso de alterações do desenvolvimento fetal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais utilizados

4.1.1 Material vegetal: O material vegetal constituiu-se de folhas frescas de *Euphorbia tirucalli*, coletadas no município de Bagé – RS (31°19'51"S / 54°6'25"W) no mês de março 2006 e identificadas pela bióloga Dr^a. Thaís do Canto Dorow do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria. As exsicatas encontram-se depositadas no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM sob o registro SMDB 10.127.

4.1.2 Amostra animal: Os animais utilizados foram ratos machos Wistar adultos todos com idade entre oito e doze semanas, e com peso entre 250 e 300 gramas, e camundongos Balb/c, jovens com peso de 20 ±2 g, todos obtidos do Biotério da Universidade Federal de Santa Maria.

4.1.3 Amostras de sangue humano: Foram utilizadas amostras de sangue de doadores do Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário de Santa Maria. Estas amostras são coletadas como triagem para possíveis doadores e são desprezadas no final do dia, sendo assim, não trouxeram ônus ao hospital ou qualquer tipo de prejuízo aos doadores. Por se tratar de amostras humanas, este projeto foi submetido ao Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria e aprovado (Carta de Autorização – nº 0084.0.243.000-06).

4.1.4 Solventes e reagentes: Os solventes e reagentes utilizados foram procedentes das marca Belga Quimex, Vetec ou Merck de grau p.a. e a água utilizada nos experimentos foi submetida a uma destilação prévia.

Para as cromatografias analíticas em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas redimensionáveis recobertas com gel de sílica GF₂₅₄ Merck de espessura 0,2 mm com suporte de alumínio 20x20 cm. As análises por CCD foram realizadas em cuba saturada, com migração ascendente, sendo utilizadas diferentes proporções de misturas de solventes como eluente.

A detecção das substâncias sobre CCD se deu pela visualização sob luz visível e ultravioleta (UV) em comprimentos de onda de 254 e 365 nm, seguida de aspensão da placa

com o reagente cromogênico anisaldeído-sulfúrico, cuja composição está descrita a seguir e posterior aquecimento a 100°C.

Anisaldeído sulfúrico	0,5 mL
Ácido sulfúrico concentrado	1,0 mL
Ácido acético glacial	25,0 mL
Etanol	25,0 mL

Para as cromatografias em coluna (CC) foram utilizados gel de sílica 60 Merck com tamanhos de partículas 63-200 µm.

Neste trabalho foi utilizado ainda: diclorometano, acetato de etila, acetona, éter etílico, n-hexano, etanol, metanol (P.A. e grau HPLC), ácido fosfórico, butanol, Reagente de Folin Ciocalteau's Phenol 2N, Meio de cultura celular RPMI 1640, soro fetal bovino, tampão PBS, kit comercial para dosagem de Acetilcolinesterase, kit comercial para dosagem de Tempo de Protrombina e Reagente de DPPH (1,1-difenil, 2-picrilidrazila).

4.1.5 Equipamentos: No desenvolvimento do trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- ✚ Balança analítica OHAUS Voyager;
- ✚ Balança semi-analítica MARTE AS5500C;
- ✚ Banho de ultrassom THORNTON Unique;
- ✚ Bomba de vácuo PRIMAR;
- ✚ Estufa BIOMATIC;
- ✚ Evaporador rotatório BÜCHI R – II, acoplado a um banho de água BÜCHI Waterbath B – 480 e a uma trompa d'água (**Figura 14a**);
- ✚ Lâmpada de UV CHROMATOVUE;
- ✚ Lâmpada de UV BOITTON;
- ✚ Espectrofotômetro SHIMADZU – UV – 1201;
- ✚ Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) modelo Hewlett-Packard (HP) 6890 Series Plus, equipado com injetor automático split-splitless modelo HP 6890 Series GC AutoSampler Controller e detector seletivo de massas modelo HP 5973 MSD (**Figura 14b**);

- ✚ Equipamento de HPLC modelo Shimadzu LC – 10A, equipado com duas bombas de injeção LC – 10AD Vp, controlador SCL – 10 Vp e detector Ultra – Violeta SPD – 10A Vp (**Figura 15**);
- ✚ Equipamento de HPLC modelo Shimadzu Prominence LC – 20A, equipado com bombas quaternária de injeção LC – 20AT, injetor automático SIL 20 – A, desgaseificador on-line DGU – 20A5, controlador CBM – 20 A, detector Ultra – Violeta V SPD – 20AV e detector de fluorescência SPD – M20A (**Figura 16**).



Figura 14a: Evaporador Rotatório BÜCHI R – II **Figura 14b: CG-MS Hewlett-Packard 6890 Series Plus**



Figura 15: HPLC Shimadzu LC – 10A



Figura 16: HPLC Shimadzu LC – 20A Prominence

4.2 Métodos empregados

4.2.1 Obtenção do látex da planta: O látex foi coletado da planta por punção das folhas modificadas e caule para os testes que necessitavam dele em separado e outra parte foi extraída juntamente as folhas modificadas para preparação do extrato.

4.2.2 Obtenção do extrato das folhas do vegetal: As folhas modificadas frescas e cortadas foram submetidas à maceração hidroalcoólica (EtOH:H₂O 70:30 v/v) por sete dias, na proporção de 20g de planta seca para 100mL de solução hidroalcoólica, com agitação ocasional. Após esse período, o extrato foi filtrado. Este procedimento foi repetido por três vezes para obter um esgotamento maior dos princípios ativos da planta. Os extratos foram unidos e colocados em evaporador rotatório para eliminação do etanol.

4.2.3 Fracionamento dos extratos: O extrato aquoso resultante foi colocado em ampola de separação para extração líquido/líquido com solventes de polaridade crescente: n-hexano, diclorometano, éter etílico, acetato de etila e butanol (3 X 100mL cada um).

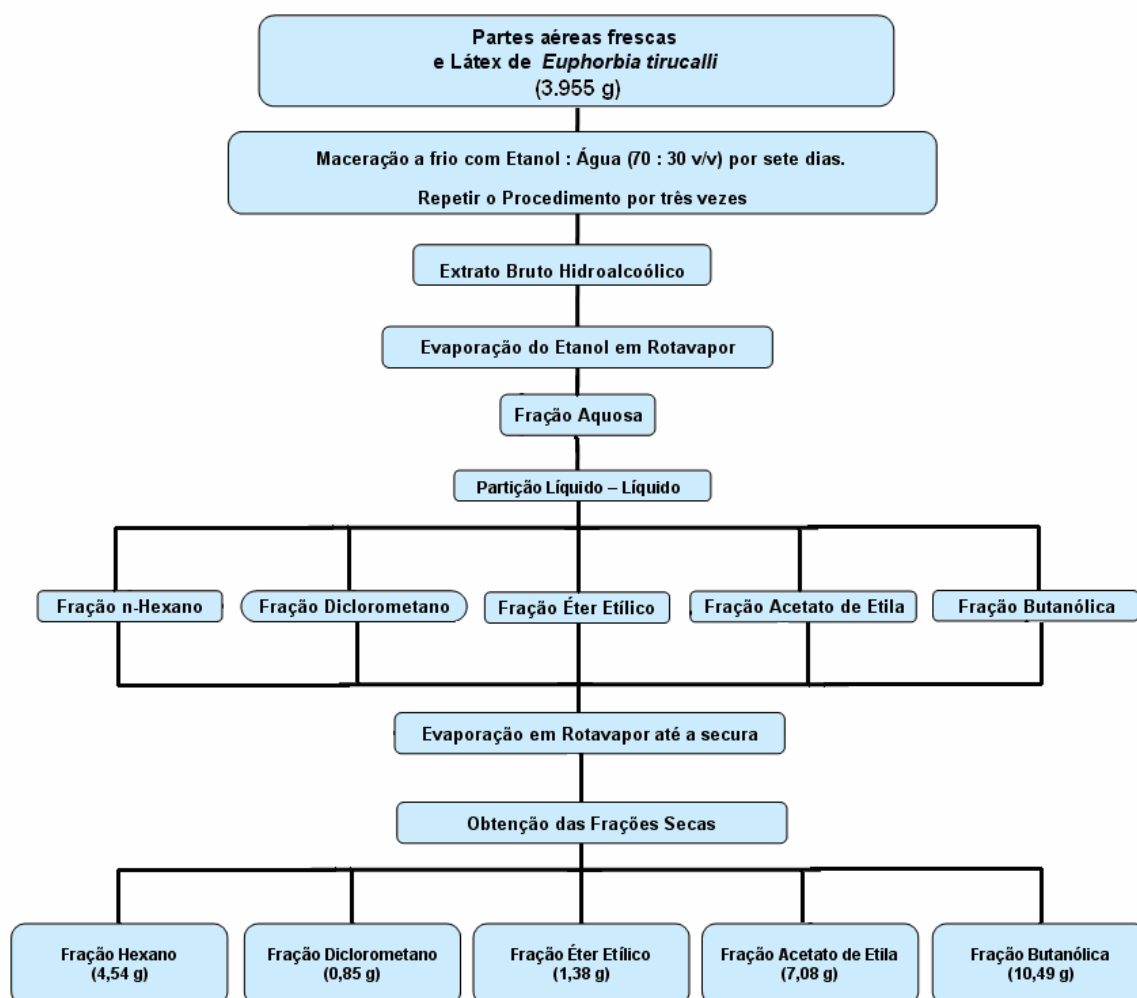


Figura 17: Partição líquido-líquido e obtenção das frações orgânicas de *Euphorbia tirucalli* a partir de um fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico 70%.

4.2.4 Análise das frações obtidas: De modo a avaliar o melhor extrato fracionado (*n*-hexano, diclorometânico, éter etílico, acetato de etila ou *n*-butanol) a ser trabalhado foram feitas diversas CCD em cromatofolhas de sílica gel G 60 F₂₅₄, utilizando diversos sistemas eluente. No total, foram testados 18 sistemas diferentes e os melhores encontrados foram os seguintes:

- ✚ Metanol : diclorometano : éter etílico (1:1:1 v/v/v) – para fração *n*-hexano;
- ✚ *n*-Hexano: acetato de etila (1:1 v/v) – para as frações diclorometano e acetato de etila;
- ✚ Metanol – para a fração butanol;
- ✚ Diclorometano : metanol (1:1 v/v) – para a fração éter etílico.

4.2.5 Fracionamento em coluna: Para obter uma separação preliminar da fração *n*-hexânica, foi realizada uma coluna cromatográfica com 50g de Sílica Gel 60 e aplicou-se 500mg da fração *n*-hexano na coluna utilizando como fase móvel composta por *n*-hexano : acetato de etila em diferentes concentrações. Utilizou-se 100 mL de cada concentração de fase móvel, iniciando apenas com *n*-hexano puro e em seguida adicionou-se 5% de acetato de etila a cada uma das fases móveis, terminando com acetato de etila puro, Observou-se uma vazão de 15 a 20 gotas/minuto.

4.2.6 Comparação das frações coletadas da coluna: Os resultados da separação foram monitorados por CCD utilizando-se anisaldeído-ácido sulfúrico como revelador, sendo que as frações foram reunidas conforme a semelhança de seus constituintes. As frações reunidas foram novamente analisadas por CCD e logo depois por HPLC.

4.2.7 Condições para HPLC: injeção de 20µl de amostra em Loop, detector UV ajustado em 270 nm, tempo de corrida de 15 minutos, fluxo de fase móvel de 1 mL / minuto, fase móvel composta por Metanol (HPLC) : Água MilliQ : Ácido fosfórico (100:100:1), filtrada e degaseificada em banho de ultra-som.

4.2.8 Identificação de compostos isolados: Para separação e identificação das substâncias foi realizada Cromatografia Gasosa Acoplada a espectrometria de Massas (CG-MS). Os espectros foram obtidos no Laboratório de Micotoxicologia (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria.

4.2.9 Parâmetros da CG-MS: injeção da amostra no modo split, com razão de 20:1; coluna capilar cromatográfica de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,32 mm i.d e espessura do filme 0,25 mm) com 5% fenil e 95% de metilsiloxano. O gás de arraste: hélio; fluxo: 2 mL/min; temperatura do injetor: 250 °C; programação do forno: 12 °C/min até 280 °C; energia de ionização: 70 eV.

4.2.10 Análise fitoquímica preliminar: Foi realizado conforme técnica descrita por MOREIRA et al, 1979, com pequenas modificações. Constitui-se de uma série de reações de caracterização clássicas.

4.2.11 Determinação de taninos condensados: O extrato bruto e todas as frações foram preparados conforme descrito: 0,25g de cada fração seca foi dissolvido em 10 mL de metanol, obtendo-se a concentração final de 25 mg/mL. A concentração de taninos condensados totais no extrato bruto, n-hexano, diclorometano, éter etílico, acetato de etila, e na fração butanólica das partes aéreas foi determinada espectrofotometricamente como descrito pelo método modificado da Vanilina (MORRISON et al, 1995). Em um tubo de ensaio, 0,9 mL de metanol foram adicionados a 0,1 mL de cada amostra (25 mg/mL). A esta amostra, 2,5 mL da solução A (8mL de HCl R em 100mL de metanol) e 2,5 mL da solução B (1g de vanilina em 100mL de metanol) foram adicionados. A solução foi aquecida por 10 minutos em 60°C antes de ler em 730 nm em espectrofotômetro Shimadzu-UV-1201. O tubo com a amostra do branco, utilizado para calibrar o aparelho, foi preparado com 0,1 mL de água em 0,9ml de metanol e em 2,5mL da solução A mais 2,5 mL da solução B. A dosagem da quantidade de taninos condensados no extrato bruto e nas frações foi realizada em triplicata. Os resultados foram expressos em equivalentes de mg de pirogalol por mL dos extratos e das frações ou como equivalentes em miligramas de pirogalol por grama da fração fresca (FF) (F.BRAS.IV, 2003). A equação obtida para a curva padrão do pirogalol na escala de 2,5 - 20 mg/mL foi $y = 0,0423x + 0,1362$ ($R = 0,9924$).

4.2.12 Avaliação da atividade antioxidante: A preparação do material vegetal se deu conforme os itens 4.2.3 e 4.2.4. Foram avaliadas as frações n-hexânica, diclorometânica, etérea, acetato de etila, butanol e o extrato bruto das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli*. Para avaliação da atividade antioxidante foi usado o método fotocolorimétrico do DPPH (1,1-difenil, 2-picrilidrazila) utilizando o método de CHOI et al., 2002. Para o ensaio foram

preparadas soluções de 125; 62,5; 31,25; 15,6 e 7,8 µg/mL de cada amostra em etanol. A 2,5 mL das amostras adicionou-se 1mL da solução de DPPH 0,3 mM em etanol. Após 30 minutos foram feitas as leituras das absorbâncias a 518nm, onde o radical DPPH apresenta máximo de absorção. Uma solução de DPPH (1mL, 0,3 mM) em etanol (2,5 mL) foi usada como controle negativo e uma preparação de ácido ascórbico foi utilizada como padrão (controle positivo) nas mesmas concentrações das frações. Etanol foi usado para calibrar o espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1021), tendo como branco as soluções testes de cada fração sem adição do DPPH visando minimizar a interferência de componentes dos extratos na leitura. As leituras foram efetuadas em triplicata, sendo determinados o desvio padrão e o coeficiente de variação percentual (CV%) para cada uma das concentrações. A porcentagem da inibição de cada fração analisada frente ao DPPH foi determinada pela seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[\frac{(\text{Ab amostra} - \text{Ab branco})}{\text{Ab controle}} \times 100 \right]$$

onde:

Ab amostra = absorbância da amostra;

Ab branco = absorbância do branco;

Ab controle = absorbância do controle.

4.2.13 Determinação de polifenóis totais: A determinação de polifenóis foi realizada com as mesmas frações utilizadas para a realização do método do DPPH, com a finalidade de estabelecer uma possível correlação entre ambos, uma vez que os polifenóis possuem atividade antioxidante reconhecida (GOUPY et al., 1999; HOUR et al., 1999). Foram dosadas as frações n-hexânica, diclorometânica, etérea, acetato de etila e butanol. Para o doseamento dos polifenóis foi utilizado o método de CHANDRA E MEJIA (2004) modificado, o qual usa Folin-Ciocalteu (reagente para fenóis) que permite a determinação indireta dos compostos fenólicos utilizando o ácido gálico como padrão de todos os fenóis. Nesta reação forma-se um complexo de cor azulada, que absorve radiação no comprimento de onda de 760 nm. O método não é específico, porque outros compostos podem ser reduzidos, como açúcares e ácido ascórbico (SINGLETON, RODOLF e ROSA, 1974). Este método foi adaptado utilizando como padrão o ácido pirogálico no lugar do ácido gálico (F.BRAS.IV, 2003). As concentrações de polifenóis das amostras foram determinadas por comparação com a curva de

calibração elaborada com o ácido pirogálico. Para o ensaio foram preparadas soluções de 0,15mg/mL de cada amostra onde se utilizou 10mL etanol de modo a solubilizar as frações e após o volume total foi completado a 100 mL com água destilada. À 1mL das amostras foram adicionados 0,5mL do reagente de Folin-Ciocalteu, após 5 minutos acrescentou-se 2mL de carbonato de sódio 20% e as leituras das absorbâncias foram realizadas após 10 minutos, em 730 nm. Todas as amostras foram preparadas em triplicata. A curva de calibração foi feita com ácido pirogálico nas concentrações de 0,005; 0,01; 0,015; 0,025 e 0,03mg/mL e suas leituras procedidas da mesma forma das amostras. Para calibrar o espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1021) foi utilizada água destilada.

4.2.14 Determinação da atividade antimicrobiana: Os testes para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos fracionados de *Euphorbia tirucalli* foram realizados no Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da UFSM, com a colaboração do Profº. Drº. Sydney Hartz Alves. Para tanto, utilizou-se o método de microdiluição em caldo, baseado nos documentos M27-A2 para fungos leveduriformes (NCCLS, 2002) e M7-A4 para bactérias (NCCLS, 2000). Esta metodologia avalia a Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a mais baixa concentração da substância que inibe completamente o crescimento do microorganismo. A interpretação dos resultados é baseada na turvação ou não das cavidades da microplaca de 96 cavidades. A turvação evidencia a ineficácia da amostra na concentração testada perante o microorganismo, enquanto que a limpidez indica a concentração inibitória mínima (CIM) da fração testada em relação ao microorganismo em questão. Na possibilidade de se estabelecer a CIM, é feito um repique dessa concentração objetivando a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), quando se trata de bactérias e concentração fungicida mínima (CFM) quando o microorganismo em questão pertence a classe dos fungos ou algas. As concentrações das frações testadas variaram de 125 µg/mL até 4.000 µg/mL. A **Tabela 01** apresenta os microorganismos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana além dos fármacos utilizados como controle frente a cada cepa testada.

Tabela 01 – Cultivos padrões e fármacos utilizados no estudo.

<i>Microorganismo</i>	<i>ATCC / isolado clínico</i>	<i>Controle µg/mL</i>
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 2792	Ampicilina 8,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Ceftriazone 16,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25293	Ampicilina 2,0
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	ATCC 10031	Imipenem 0,06
<i>Candida albicans</i>	ATCC 44773	Fluconazol 16,0
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 10231	Fluconazol 32,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 28952	Fluconazol 2,0
<i>Prototheca zopfii</i>	Isolado clínico	Anfotericina B 0,5

4.2.15 Estudo de toxicidade aguda: Foi realizado segundo o protocolo “*Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method*”, de 2001, da Organization for Economic Co-Operation and Development. A preparação do material vegetal se deu conforme o item 4.2.3 e 4.2.4. Foram avaliados o látex, o extrato bruto e as frações n-hexânica, diclorometânica, etérea, acetato de etila e butanol das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli*. Foram utilizados camundongos Balb/C jovens, machos e fêmeas, pesando $20,0 \pm 2g$. Os animais foram mantidos em gaiolas com temperatura controlada de $22 \pm 3^{\circ}C$ recebendo ciclo 12 horas-luz diária com alimentação (pellets) e água *ad libitum*, durante o período de experimentação. Foram preparadas soluções dos extratos secos e do látex. Os camundongos foram randomicamente divididos em grupos (n=6) e administrados oralmente com 0,5 mL de solução aquosa de cada fração e do látex. Um grupo serviu como controle e recebeu igual volume do veículo utilizado (água destilada). Os extratos testes foram administrados em uma única dose por gavagem através de sonda gástrica. Os animais foram alimentados, mas não receberam água três horas antes da administração dos extratos. Após a administração, o alimento foi detido por duas horas. As doses foram aumentadas progressivamente (2.000 – 5.000 mg/kg) para a determinação da dose letal (DL₅₀). Os animais foram observados por sete dias após serem tratados. O número de camundongos que tiveram óbito durante o período do estudo foi verificado para cada grupo visando a determinação da DL₅₀.

4.2.16 Estudo de toxicidade sobre o crustáceo *Artemia salina*: O extrato bruto e o látex foram avaliados em um teste de letalidade contra *Artemia salina*, utilizando a técnica descrita

por SAM em 1993, com modificações menores. A toxicidade dos compostos foi testada em concentrações de 10, 100 e 1000 ppm em soluções de 10 mL. Dez *nauplios* com um dia de vida foram usados em cada teste e os sobreviventes contados após 24 horas. Três replicatas foram usadas para cada concentração. Uma série paralela dos testes com a solução padrão de dicromato de potássio ($DL_{50} = 20 - 40$ ppm) também foi utilizada. A concentração letal para a mortalidade de 50% após 24 h da exposição, DL_{50} , foi calculada conforme o que descrito por SAM (1993).

4.2.17 Avaliação dos efeitos sobre a acetilcolinesterase humana: A população foi escolhida ao acaso entre candidatos a doadores de sangue do Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário de Santa Maria. Todos os candidatos selecionados tiveram que assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O TCLE foi explicado e coletado durante a triagem hematológica do doador, momento onde é coletada a amostra para seleção do doador de sangue. Os voluntários não tiveram que sofrer nenhum tipo de coleta adicional, pois foi utilizada a mesma amostra coletada para realização do hemograma, o qual é obrigatório aos candidatos à doação e, amostra esta, que é desprezada no final da rotina do dia. Não houve riscos para o voluntário que participou da pesquisa. As amostras de sangue humano coletadas com anticoagulante EDTA foram separadas, aleatoriamente, em cinco grupos, cada um com 06 amostras. Todas as amostras foram dosadas e selecionou-se as com atividade entre 8 e 10 UI/mL para obter-se uma maior homogeneidade dos resultados iniciais. Cada grupo foi contaminado com 100µL de Soluções Aquosas de Látex em três concentrações diferentes: 1%, 5% e 10%, e dosadas em três tempos diferentes: Zero hora, 24 horas e 48 horas. Foi testado ainda um grupo branco (sem contaminação) e outro Positivo (contaminado com Carbofuram comercial, com concentração de 45% de princípio ativo), nos mesmos tempos. A dosagem de acetilcolinesterase foi realizada utilizando kit comercial da marca Doles[®], próprio para determinação da atividade da acetilcolinesterase, com leitura em espectrofotômetro UV/Vis, seguindo técnica descrita na bula do Kit, sempre em triplicata. Os resultados foram analisados utilizando ANOVA, Teste de Tukey e Teste-t de Student.

4.2.19 Avaliação dos efeitos sobre a atividade plaquetária humana: Seguiu a técnica descrita por AFIFI e colaboradores (2004), utilizando Kit comercial da marca CLOT[®] (Minas Gerais, Brasil). As amostras de *Plasma Rico em Plaquetas* (PRP) e *Plasma Pobre* (PP) foram obtidas junto ao Banco de Sangue do Hospital Universitário de Santa Maria. Foram analisadas as amostras de extrato bruto, frações n-hexânica, acetato de etila e butanol, além do ácido

acetilsalicílico (AAS) como padrão de inibição e de um branco contendo apenas solução fisiológica 0,9%. Prepararam-se as amostras das frações e do AAS na concentração de 300 µg/mL em solução fisiológica 0,9%. O espectrofotômetro Shimadzu UV-1021 foi calibrado utilizando Plasma Pobre. Utilizando o espectrofotômetro, ajustou-se a Absorbância do Plasma Rico em plaquetas em 1.000 diluindo o mesmo com o Plasma Pobre. Ajustou-se o espectrofotômetro em 490 nm. Em um tubo de ensaio foram pipetados 400 µl de PRP ajustado em Abs 1.000 e adicionou-se 100 µl de cada amostra. Deixou-se em temperatura ambiente por 5 minutos e adicionou-se 100 µl de tromboplastina cálcica a cada tubo. As amostras foram lidas em espectrofotômetro. Para a obtenção do valor que representaria 100% de atividade plaquetária, foi adicionado 400 µl de PRP ajustado em Abs 1.000 e adicionou-se 100 µl tromboplastina cálcica. Aguardou-se 2 minutos e leu-se no espectrofotômetro em 490 nm. Os resultados foram avaliados em triplicata e as médias e desvios padrões foram calculados.

4.2.20 Avaliação dos efeitos da *Euphorbia tirucalli* sobre cultura de linfócitos:

4.2.20.1 Protocolo de preparação do meio de cultura - RPMI 1640 marca Sigma - Aldrich (R6504):

- ✚ Preparar o meio na seguinte proporção: 103,9 g de MEIO RPMI 1640 para 10 litros de água MilliQ;
- ✚ Distribuir 90% do volume de água destilada num recipiente limpo contendo um bastão de vidro para homogeneizar;
- ✚ Observar a temperatura da água que deverá estar entre 15 e 20°C;
- ✚ Mexendo cuidadosamente, adicionar o meio em pó à água MilliQ. Mexer até dissolver;
- ✚ Ajustar o pH da solução para 4,0 com HCl 1N para dissolver completamente o produto;
- ✚ Adicionar 2g de bicarbonato de sódio para cada litro de água MilliQ colocada e mexer até dissolver;
- ✚ Ajustar o pH para 7,1 com utilização de NaOH 1N ou HCl 1N;
- ✚ Esterelizar imediatamente por filtração em membrana com porosidade de 0,22 micra;
- ✚ O procedimento de esterilização irá deixar o pH entre 7,2 e 7,5;
- ✚ Distribuir de forma asséptica o meio para um recipiente estéril;
- ✚ Adicionar 2,5 UI/mL de penicilina e 2,5 ug/mL de estreptomicina;

- ✚ No momento dos experimentos suplementar o meio com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino inativado e estéril.

4.2.20.2 Obtenção das amostras de linfócitos:

- ✚ Utilizar ratos machos Wistar;
- ✚ Realizar este procedimento em câmara de fluxo laminar;
- ✚ Promover o deslocamento cervical do animal;
- ✚ Borrifar álcool 70% sobre o abdômen, pinçar a pele e abrir um corte medial longitudinal da pele do animal (**Figura 18.A**);
- ✚ Localizar o ceco intestinal, afastar o intestino e, em seguida, localizar a cadeia de linfonodos que se encontra paralela ao íleo, começando na junção cecal. Retirar os linfonodos que estão envoltos em gordura (**Figura 18.B-a e Figura 18.B-b**);
- ✚ Colocar os linfonodos sobre um papel filtro e retirar o tecido adiposo que os envolve (**Figura 18.C**);
- ✚ Macerar os linfonodos com a lâmina do bisturi;
- ✚ Colocar o material triturado em PBS estéril e com gelo;
- ✚ Localizar o baço do animal na porção esquerda do abdômen, abaixo do estômago, de coloração vermelho-intensa (**Figura 18.D**);
- ✚ Pinçar o tecido e cortá-lo do tecido conectivo que o prende ao abdômen (**Figura 18.E**);
- ✚ Cortar em pequenos pedaços para facilitar a maceração;
- ✚ Colocar os pequenos pedaços do baço em uma peneira e macerá-los com a ajuda de um êmbolo de seringa coletando o macerado em uma placa de petri contendo tampão PBS estéril e com gelo;
- ✚ Filtrar a suspensão de linfócitos;
- ✚ Centrifugar a suspensão de linfócitos por 8 minutos a 200 x G, a 4° C.
- ✚ Ressuspender o precipitado celular em tampão PBS estéril;
- ✚ Repetir o procedimento por três vezes.

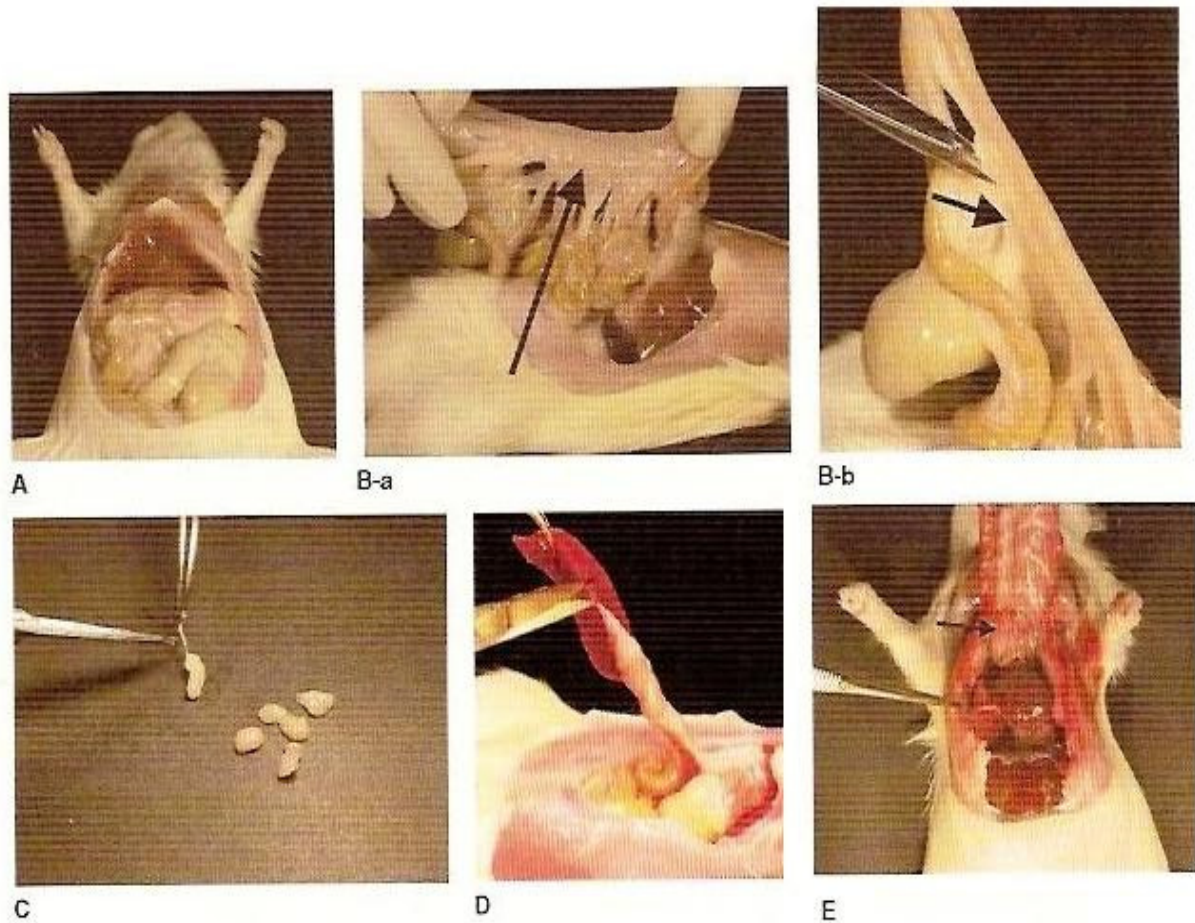


Figura 18: Etapas da Obtenção das Amostras de Linfócitos (Adaptado de PERES e CURI, 2005).

4.2.20.3 Preparo das soluções utilizadas:

- ✚ *Tampão PBS Esteril*: Pesar 136,8 mM de NaCl + 2,7 mM de KCl + 0,9mM de KH₂PO₄ + 6,4 mM de Na₂PO₄ em 1 litro de Água destilada. O pH deve ficar em 7,2. Esterilizar.
- ✚ *Meio RPMI de Uso*: Adicionar 900 mL de meio preparado + 100 mL de Soro Fetal Bovino Inativado + 2500 UI de Penicilina + 2500 ug/mL de Estreptomicina.
- ✚ *Solução Aquosa de E.tirucalli a 1%*: Pesar 10mg de extrato bruto de *E. tirucalli* e adicionar a 01 mL de Água MilliQ.
- ✚ *Solução Aquosa de E.tirucalli a 5%*: Pesar 50mg de extrato bruto de *E. tirucalli* e adicionar a 01 mL de Água MilliQ.
- ✚ *Solução Aquosa de E.tirucalli a 10%*: Pesar 100mg de extrato bruto de *E. tirucalli* e adicionar a 01 mL de Água MilliQ.

4.2.20.4 Preparo da Cultura de Linfócitos:

- ✚ Utilizar os tubos próprios para cultura de células;
- ✚ Ressuspender as células preparadas em 1 litro de meio RPMI 1640 preparado com Soro Fetal Bovino e Antibióticos;
- ✚ Colocar 30mL de meio preparado por tubo de cultura de células;
- ✚ Adicionar 500 μ L das amostras em cada meio;
- ✚ Proceder à contagem dos totais de leucócitos, plaquetas e linfócitos em equipamento PENTRA 80 (ABX – Horiba – **Figura 19**).



Figura 19: Equipamento PENTRA 80 (ABX – Horiba)

- ✚ Incubar por 96 horas a temperatura de 37° C com a tampa do frasco de cultura na posição "VENT".
- ✚ Após o período de incubação, efetuar nova leitura dos mesmos parâmetros.
- ✚ Os resultados serão analisados por ANOVA e Teste-t de Student.

5. Resultados e Discussão

5.1 Rendimento e perfil dos extratos da *Euphorbia tirucalli*

Os resultados são mostrados na **Tabela 02**:

<i>Tabela 02: Rendimento das frações de Euphorbia tirucalli.</i>		
<i>Fração obtida</i>	<i>Peso de fração seca</i>	<i>Rendimento obtido</i>
Fração <i>n</i>-hexano	4,54 g	0,11 %
Fração diclorometano	0,85 g	0,02 %
Fração éter etílico	1,38 g	0,03 %
Fração acetato de etila	7,08 g	0,18 %
Fração butanólica	10,49 g	0,26 %
<i>Planta Fresca Utilizada</i>	3955,0 g	-----

Todas as frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada para obtermos uma avaliação inicial (**Figura 20**):

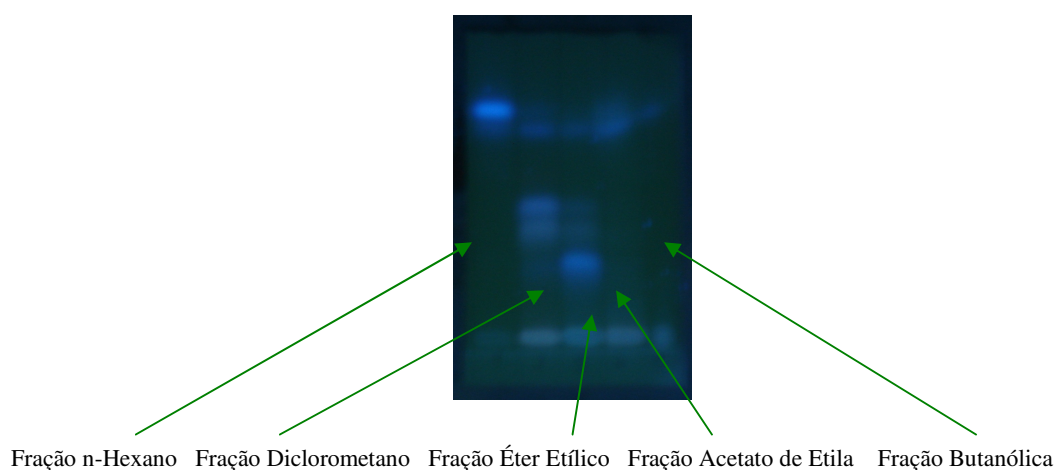


Figura 20: Cromatograma das frações de *E. tirucalli* com observação sob luz UV 254 nm. Sistema eluente composto por *n*-Hexano : Éter Etilíco (2:1).

5.2 Perfil cromatográfico da coluna de n-hexano:

Foram coletadas e analisadas 31 frações. Destas, foram juntadas as de perfil cromatográfico semelhante, restando assim 5 amostras que foram avaliadas por CCD conforme pode ser visto na **Figura 21**.

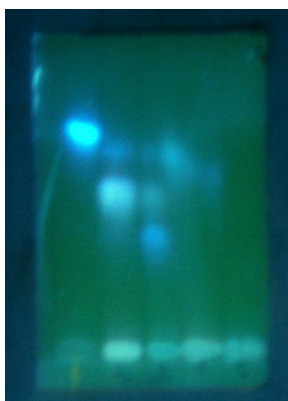


Figura 21: Cromatograma da fração n-hexano particionada em coluna de sílica com observação sob luz UV 254 nm. Sistema eluente composto por n-Hexano : Éter Etilico (2:1).

As cinco sub-frações foram analisadas por HPLC para verificar as diferenças entre as mesmas. Os resultados podem ser observados nas **Figuras 22, 23 e 24** que estão a seguir:

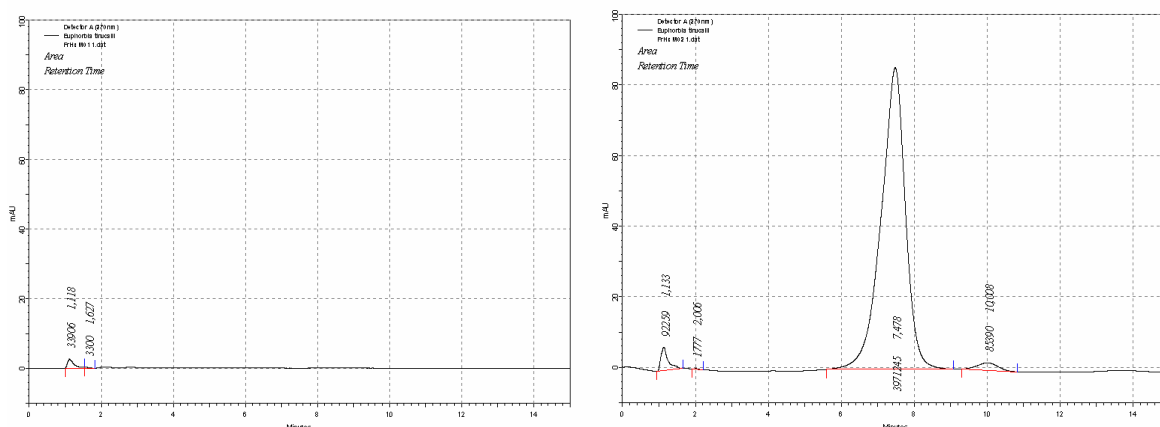


Figura 22: Cromatogramas das Sub-frações hexânica 01 (esquerda) e 02 (direita). Condições para HPLC: detector UV em 270 nm, tempo de corrida de 15 minutos, fluxo de 1 mL / minuto, fase móvel composta por metanol : água : ácido fosfórico (100:100:1).

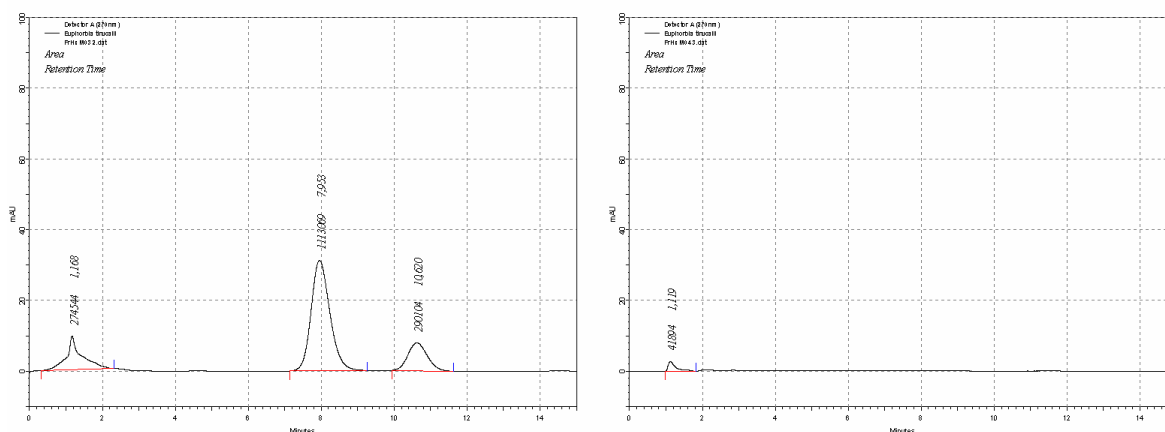


Figura 23: Cromatogramas das Sub-frações hexânica 03 (esquerda) e 04 (direita).

Condições para HPLC: detector UV em 270 nm, tempo de corrida de 15 minutos, fluxo de 1 mL / minuto, fase móvel composta por metanol : água : ácido fosfórico (100:100:1).

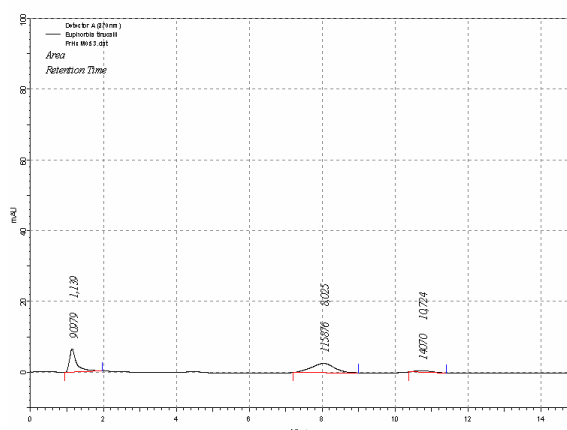


Figura 24: Cromatograma da Sub-fração hexânica 05.

Condições para HPLC: detector UV em 270 nm, tempo de corrida de 15 minutos, fluxo de 1 mL / minuto, fase móvel composta por metanol : água : ácido fosfórico (100:100:1).

5.3 Separação e identificação dos compostos por CG-MS

Visando identificar as substâncias observadas nos cromatogramas de HPLC das sub-frações hexânicas, as mesmas foram submetidas a análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas. Os resultados estão mostrados a seguir:

5.3.1 Identificação dos compostos de sub-fração hexânica 01:

Conforme foi observado na **Figura 22** (à esquerda), existem dois picos nesta amostra. Os picos foram analisados por CG-MS e estão apresentados a seguir:

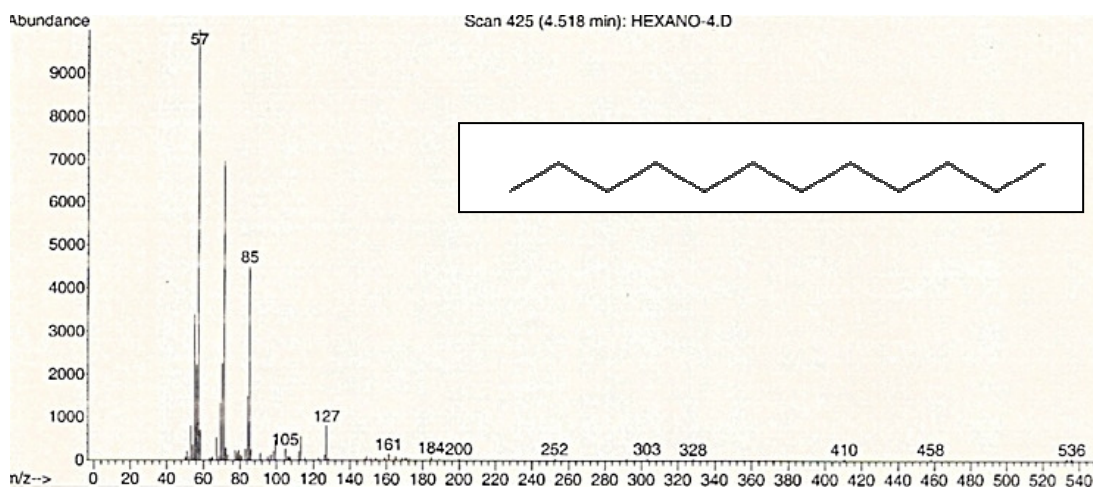


Figura 25: 1º Espectro de massas (abundância de 0,183%) obtido da sub-fração hexânica 01. Os parâmetros da CG-MS podem ser vistos no item 4.2.9.

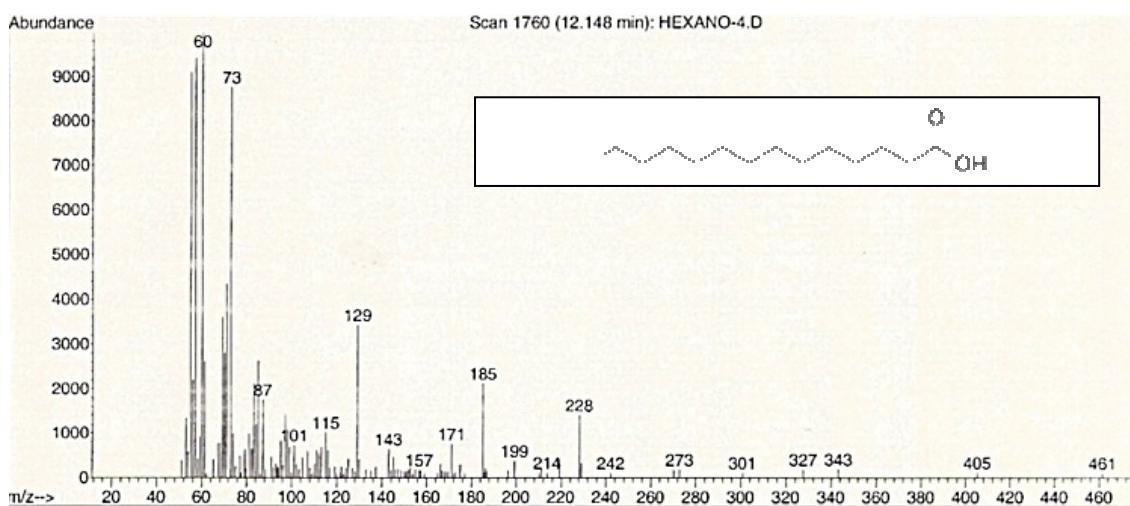


Figura 26: 2º Espectro de massas (abundância de 0,331%) obtido da sub-fração hexânica 01. Os parâmetros da CG-MS podem ser vistos no item 4.2.9.

Os compostos foram identificados com base na biblioteca do aparelho e podem ser identificados, respectivamente, como o **Hidrocarboneto Dodecano** ($C_{12}H_{26}$) e o **Ácido Tetradecanóico** ($C_{14}H_{28}O_2$) que é um ácido graxo. Estes compostos já foram relatados anteriormente uma vez que esta planta é rica em diversos hidrocarbonetos e substâncias orgânicas (FURSTERSBERG, 1986).

5.3.2 Identificação dos compostos de sub-fração hexânica 02:

Conforme foi observado na **Figura 22** (a direta), existem três picos nesta amostra. Os picos foram analisados por CG-MS e estão apresentados a seguir:

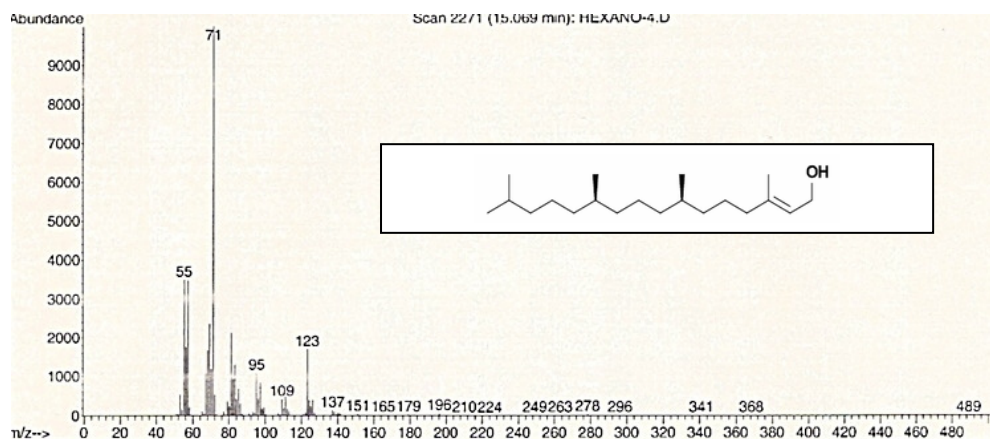


Figura 27: 1º Espectro de massas (abundância de 9,80%) obtido da sub-fração hexânica 02. Os parâmetros da CG-MS podem ser vistos no item 4.2.9.

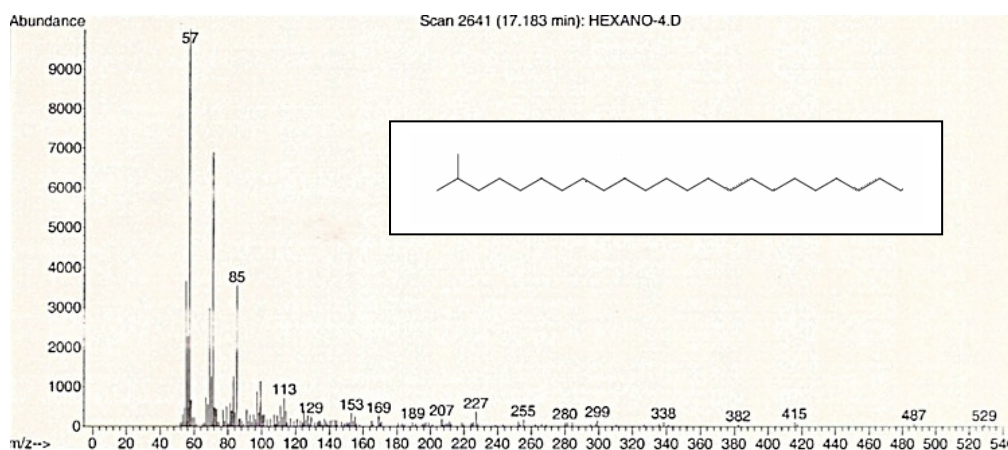


Figura 28: 2º Espectro de massas (abundância de 0,215%) obtido da sub-fração hexânica 02. Os parâmetros da CG-MS podem ser vistos no item 4.2.9.

Os compostos foram identificados com base na biblioteca do aparelho e podem ser identificados como o **Fitol** (C₂₀H₄₀O) e o segundo como **2-Metil-Tricosano** (C₂₄H₅₁). O terceiro composto que aparece no cromatograma, ainda não foi identificado. O Fitol é um produto de decomposição da clorofila, portanto esperado. O 2-metil-tricosano é um hidrocarboneto de cadeia longa e comum em misturas de hidrocarbonetos como as encontradas nesta planta.

5.3.3 Identificação dos compostos de sub-fração hexânica 03:

Conforme foi observado na **Figura 23** (à esquerda), existem três picos nesta amostra. Os picos foram analisados por CG-MS e estão apresentados a seguir:

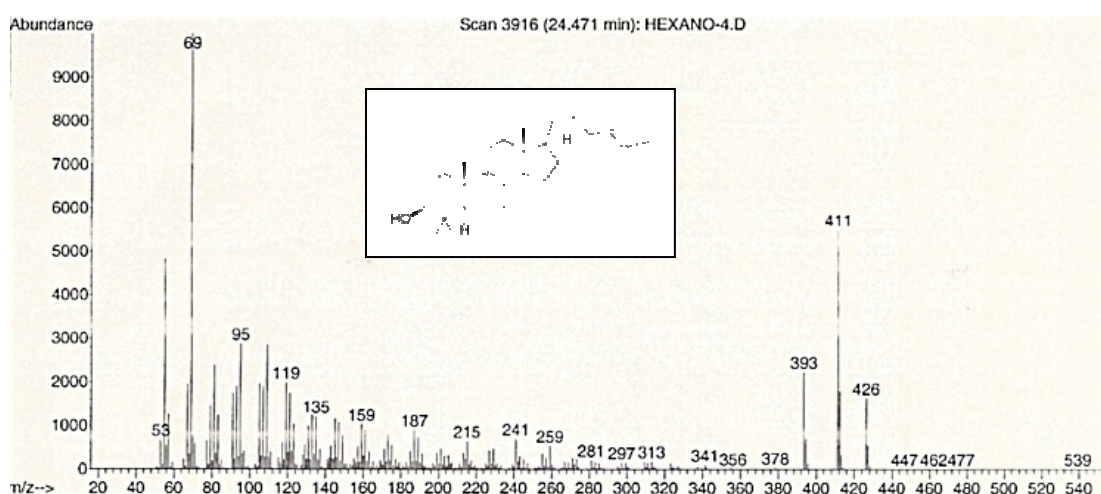


Figura 29: 1º Espectro de massas (abundância de 36,053%) obtido da sub-fração hexânica 03.

Os parâmetros da CG-MS podem ser vistos no item 4.2.9.

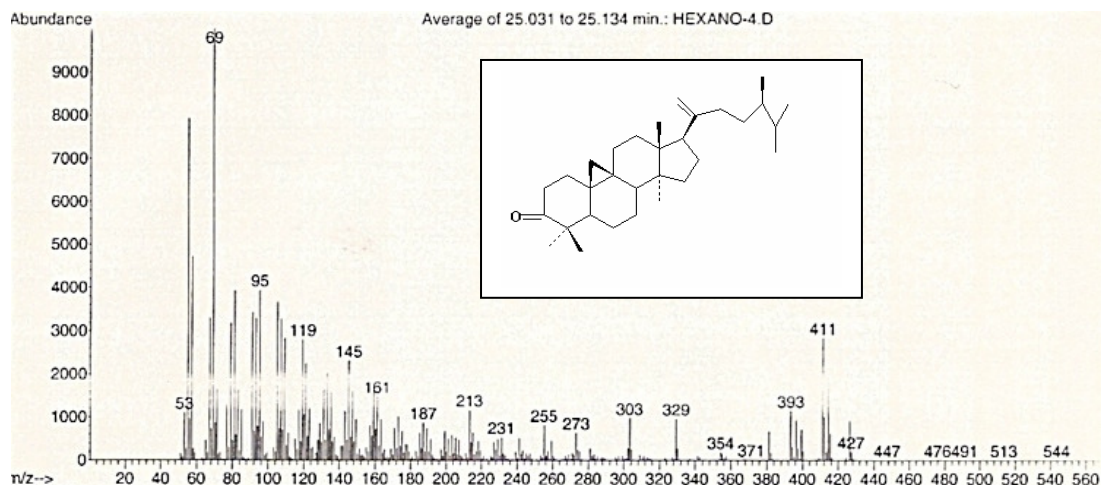


Figura 30: 2º Espectro de massas (Abundância de 20,574%) obtido da sub-fração hexânica 03. Os parâmetros da CG-MS podem ser vistos no item 4.2.9.

Os compostos foram identificados com base na literatura apropriada e podem ser identificados, respectivamente, como **Lanosterol** ($C_{30}H_{50}O$) e o **Ciclotirucanenol** ($C_{29}H_{39}O$). O terceiro composto que aparece no cromatograma, ainda não foi identificado. O Ciclotirucanenol já foi relatado e o lanosterol é o precursor de todos os esteróides, substâncias que sabidamente existem nesta planta (RASOOL, 1988).

5.3.4 Identificação dos compostos de sub-fração hexânica 04:

Conforme foi observado na **Figura 23** (à direita), existe apenas um pequeno pico nesta amostra. O pico foi analisado por CG-MS, porém não foi possível fazer a sua identificação.

5.3.5 Identificação dos compostos de sub-fração hexânica 05:

Conforme foi observado na **Figura 24**, existem três picos nesta amostra. Os picos foram analisados por CG-MS sendo que dois picos, ainda não puderam ser identificados. Somente um dos compostos foi identificado:

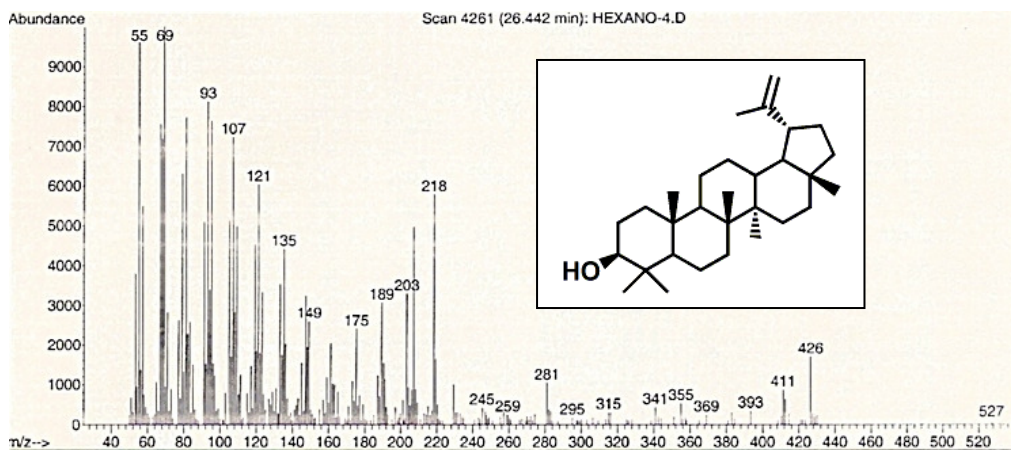


Figura 31: 1º Espectro de massas (abundância de 1,960%) obtido da sub-fração hexânica 05.

Os parâmetros da CG-MS podem ser vistos no item 4.2.9.

O composto foi identificado com base na biblioteca do aparelho e na literatura apropriada e pode ser identificado como sendo o **Lupeol** ($C_{30}H_{50}O$). Este composto ainda não havia sido relatado, porém sua presença não surpreende, uma vez que o Lupeol é um triterpeno e estes são comuns nesta espécie (KINGHORN, 1979).

Na análise por CG foi possível observar no cromatograma um pico principal com tempo de retenção de 26,442 minutos. O espectro de massa por impacto eletrônico (**Figura 31**) do composto mostrou pico em m/z 426 u.m.a, que corresponde ao pico do íon molecular do composto. Outros picos oriundos da fragmentação do tipo Retro-Diels-Alder (RDA) do anel C são típicos de triterpenos pentacíclicos, principalmente os de maiores intensidades como os m/z 218; 207; 203 e 189 u.m.a (MENDES et al., 1999; OGUNKOYA et al., 1981). Destes, os mais intensos foram m/z 189 e 207 u.m.a., que são característicos de fragmentações de compostos do tipo lupeno (OGUNKOYA et al., 1981, MEBE et al., 1998; KOTOWICZ et al., 2005). O esquema de fragmentação do Lupeol está mostrado na **Figura 32**.

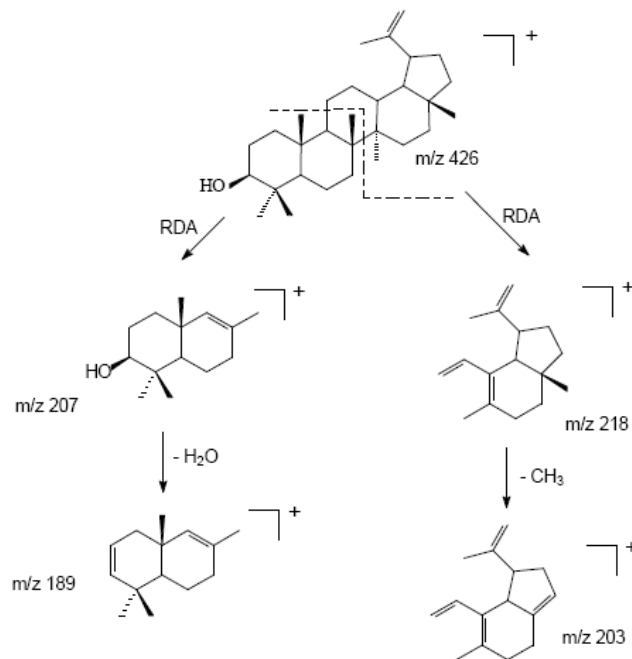


Figura 32: Esquema de fragmentação do Lupeol (adaptado de MENDES et al, 1998).

5.4 Perfil cromatográfico da fração diclorometano:

A fração foi analisada por HPLC para verificar o número de substâncias presentes na mesma. Os resultados podem ser observados nas **Figuras 33**:

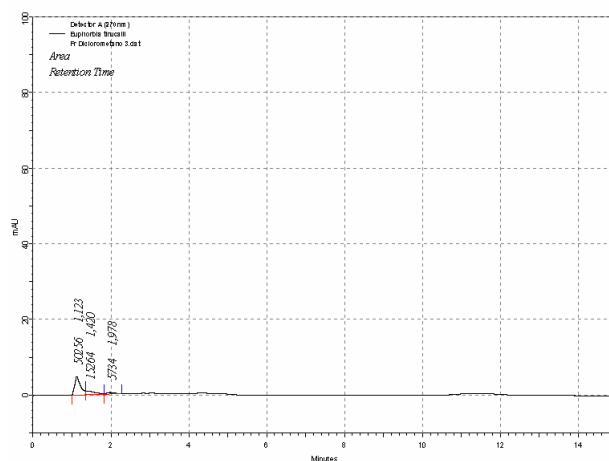


Figura 33: Cromatograma da fração Diclorometano.

Condições para HPLC: detector UV em 270 nm, tempo de corrida de 15 minutos, fluxo de 1 mL / minuto, fase móvel composta por metanol : água : ácido fosfórico (100:100:1).

Visando identificar as substâncias observadas no cromatograma de HPLC da fração diclorometânica, a mesma foi submetida à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Os resultados estão mostrados a seguir:

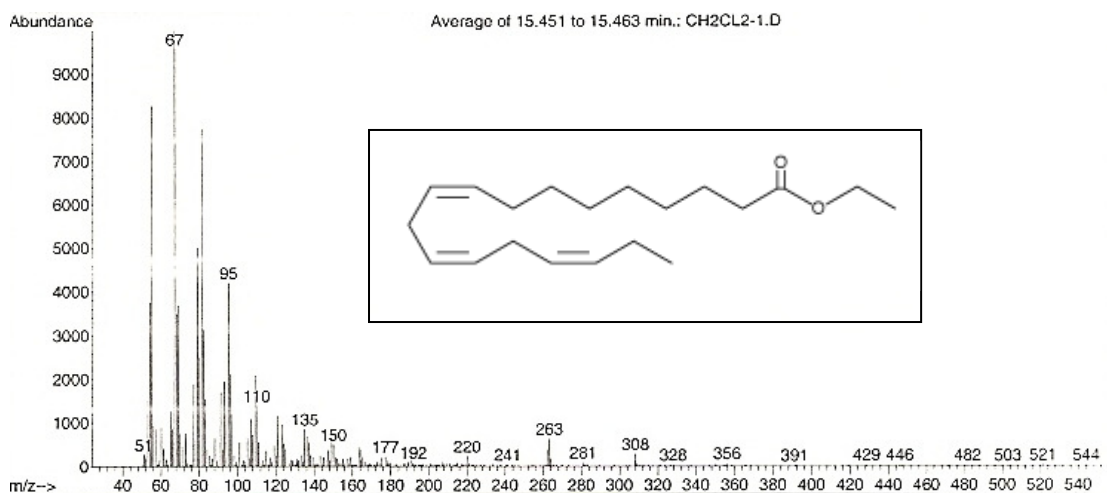


Figura 34: 1º Espectro de massas (abundância de 0,925%) obtido da fração diclorometano. As condições cromatográficas podem ser vistas no item 4.2.7.

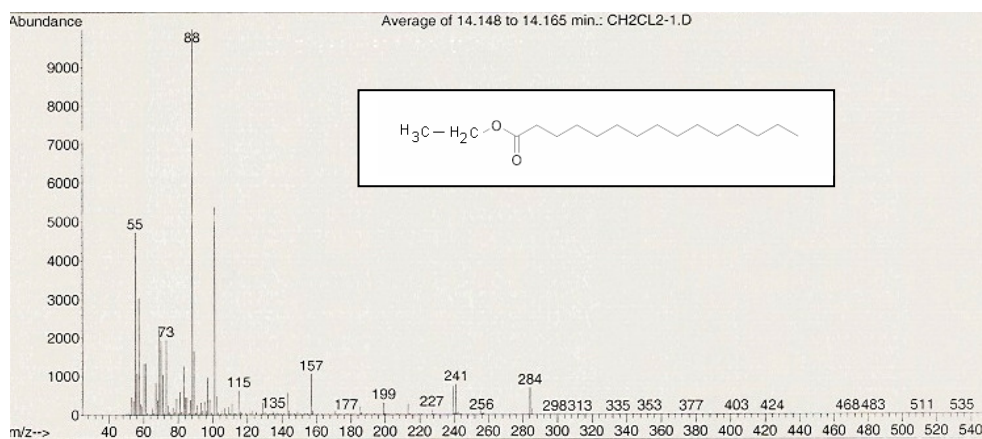


Figura 35: 2º Espectro de massas (abundância de 1,127%) obtido da fração diclorometano. As condições cromatográficas podem ser vistas no item 4.2.7.

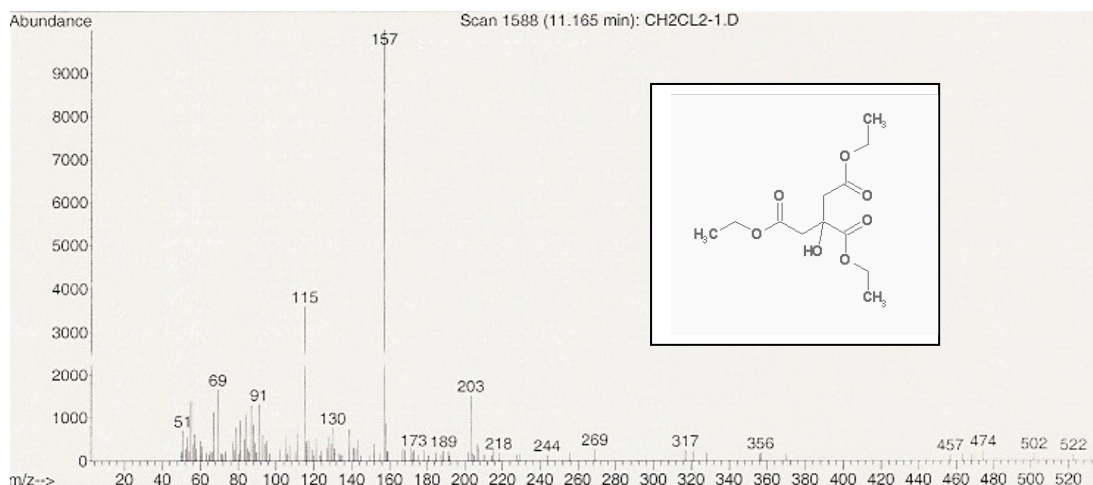


Figura 36: 3º Espectro de massas (abundância de 2,265%) obtido da fração diclorometano. As condições cromatográficas podem ser vistas no item 4.2.7.

Os compostos foram identificados com base na biblioteca do aparelho e podem ser identificados, respectivamente, como **Etil-Éster do Ácido Linoléico** ($C_{20}H_{37}O_2$), o segundo **Etil-Éster do Ácido Pentadecanóico** ($C_{17}H_{35}O_2$) e o terceiro como **Etil-Citrato** ($C_{12}H_{20}O_7$). O ácido linoléico já foi descrito previamente por YAMAMOTO e colaboradores em 2004. O Citrato faz parte do metabolismo vegetal. Já o Ácido Pentadecanóico, faz parte da formação dos lipídeos, os quais foram verificados por OHYAMA (1984) em culturas de células vegetais.

5.5 Perfil cromatográfico da fração éter etílico:

A fração foi analisada por HPLC para verificar o número de substâncias presentes na mesma. Os resultados podem ser observados na **Figura 37**:

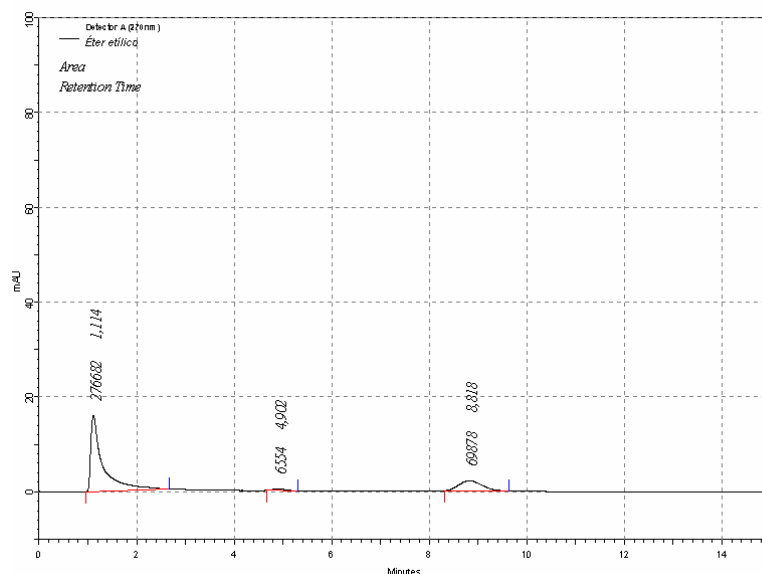


Figura 37: Cromatograma da fração éter etílico.

Condições para HPLC: detector UV em 270 nm, tempo de corrida de 15 minutos, fluxo de 1 mL / minuto, fase móvel composta por metanol : água : ácido fosfórico (100:100:1).

Visando identificar as substâncias observadas no cromatograma de HPLC da fração Éter Etílico, a mesma foi submetida à análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas. Os resultados estão mostrados a seguir:

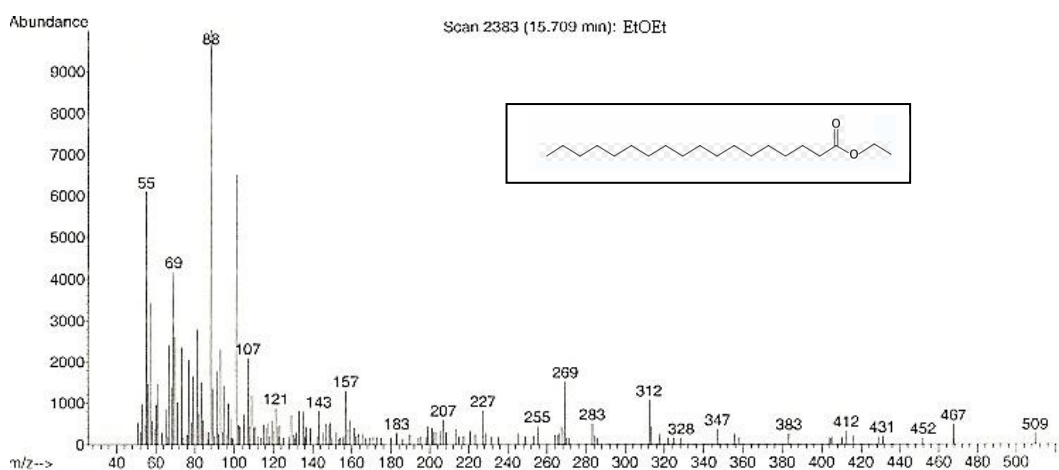


Figura 38: 1º Espectro de massas (abundância de 2,957%) obtido da fração éter etílico.

As condições cromatográficas podem ser vistas no item 4.2.7.

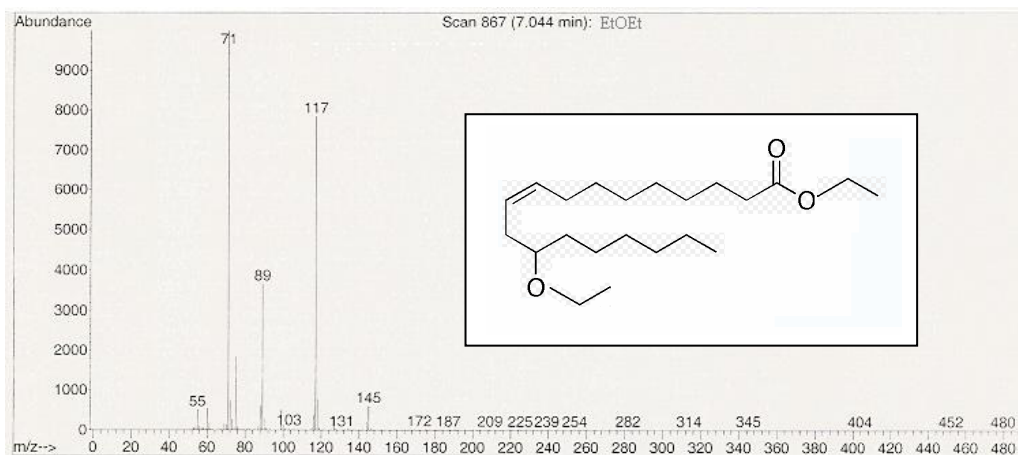


Figura 39: 2º Espectro de massas (abundância de 4,568%) obtido da fração éter etílico.
As condições cromatográficas podem ser vistas no item 4.2.7.

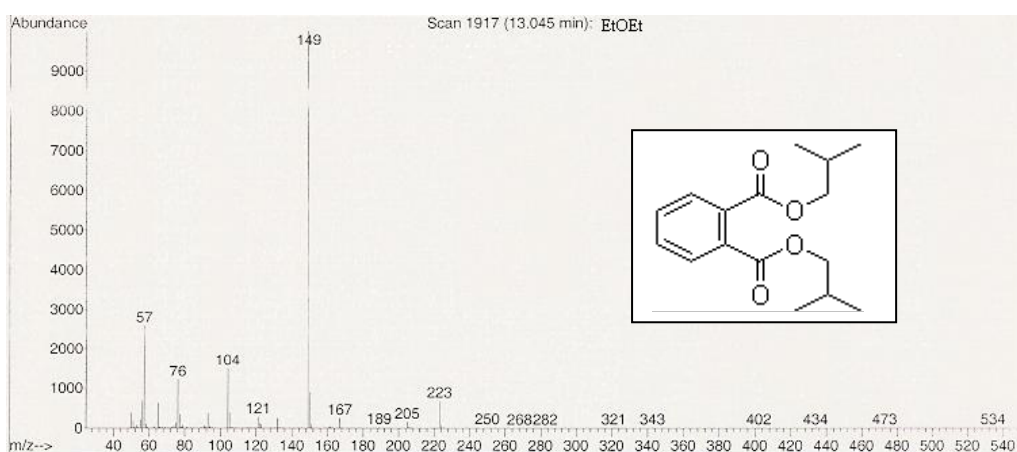


Figura 40: 3º Espectro de massas (abundância de 9,525%) obtido da fração éter etílico.
As condições cromatográficas podem ser vistas no item 4.2.7.

Os compostos foram identificados com base na literatura apropriada e podem ser identificados, respectivamente, como o **Ácido Esteárico** ($C_{18}H_{36}O_2$), **Ácido Rinoléico** ($C_{22}H_{42}O_3$) e o **Diisobutil Ftalato** ($C_{16}H_{22}O_4$). O ácido esteárico e o ácido rinoléico são dois ácidos graxos e diisobutil ftalato é um derivado do ácido ftálico, comum em resinas de borracha e látex de plantas (KAHN, 1988).

5.6 Perfil Cromatográfico da Fração Acetato de Etila:

A fração foi analisada por HPLC para verificar o número de substâncias presentes na mesma. Os resultados podem ser observados na **Figura 41**:

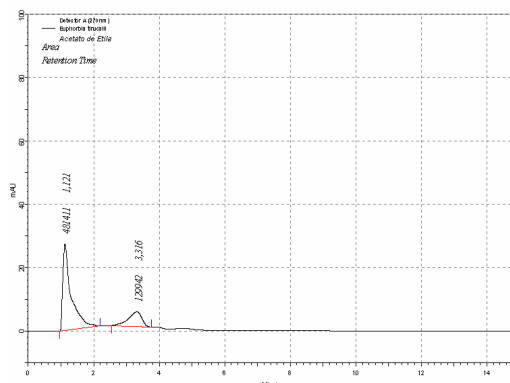


Figura 41: Cromatograma da fração acetato de etila.

Condições para HPLC: detector UV em 270 nm, tempo de corrida de 15 minutos, fluxo de 1 mL / minuto, fase móvel composta por metanol : água : ácido fosfórico (100:100:1).

Visando identificar as substâncias observadas no cromatograma de HPLC da fração acetato de etila, a mesma foi submetida à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Os resultados estão mostrados a seguir:

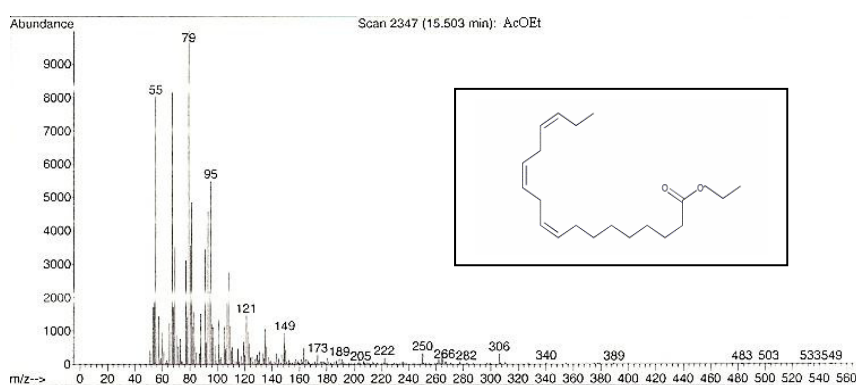


Figura 42: 1º Espectro de massas (abundância de 6,547%) obtido da fração acetato de etila.

As condições cromatográficas podem ser vistas no item 4.2.7.

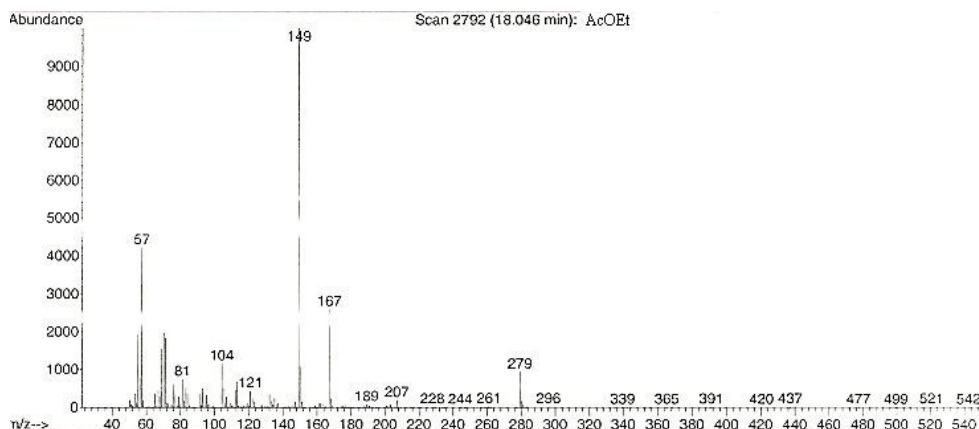


Figura 43: 2º Espectro de massas (abundância de 8,679%) obtido da fração acetato de etila. As condições cromatográficas podem ser vistas no item 4.2.7.

Os compostos foram identificados com base na literatura apropriada e podem ser identificados, respectivamente, como o **Ácido α -Linoléico** ($C_{20}H_{34}O_2$) e **2-(2butylcyclopropyl)-9-Ácido Cyclopropanenonanóico**, cuja estrutura ainda não está estabelecida em definitivo (LARSSON, 1975). O α -Linoléico e o 2-(2butilciclopropil)-9-Ácido Ciclopropanenonanóico são ácidos graxos, porém o segundo, tem estudos apontando sua atividade antifúngica contra *Fusarium roseum* (LARSSON, 1975).

5.7 Screening fitoquímico preliminar

A análise fitoquímica foi realizado segundo MOREIRA et al (1979), com pequenas modificações. Os resultados são apresentados como positivos ou negativos para determinado grupo de substâncias. O *Screening* Fitoquímico Preliminar permite uma visão geral dos grupos químicos da planta mas, estudos mais aprofundados são necessários para determinar a concentração destas substâncias. Os resultados obtidos podem ser vistos na **TABELA 03**:

<i>Tabela 03: Análise fitoquímica preliminar</i>	
<i>Composto químico / aspecto pesquisado</i>	<i>Resultado</i>
Cor	Verde Claro
Odor	Mascarado pelo Etanol
pH	5,0
Ácidos orgânicos em geral	Positivo
Ácidos voláteis	Negativo
Alcalóides	Positivo
Amino – grupos	Positivo
Esteróides ou triterpenos	Positivo
Fenóis em geral	Positivo
Gomas, taninos ou mucilagens	Positivo
Heterosídeos antociânicos	Negativo
Heterosídeos antraquinônicos	Negativo
Heterosídeos cardioativos	Negativo
Heterosídeos cumarínicos	Negativo
Heterosídeos flavônicos	Positivo
Heterosídeos saponínicos	Negativo
Óleos essenciais	Positivo
Oses	Positivo (+ + +)
Osídes	Negativo
Taninos condensados	Positivo
Taninos hidrolisáveis	Negativo
Extrato seco %	1,90 %

As diferenças encontradas entre as espécies relatadas na literatura e a testada fica apenas na pesquisa de *Taninos Hidrolisáveis*, os quais estão negativos para a amostra em teste, porém com relatos de isolamentos na literatura (YOSHIDA, 1991).

5.8 Dosagem de taninos condensados:

A análise de taninos condensados é complicada pela diversidade das estruturas encontradas dentro deste grupo de compostos. O método da vanilina depende da reação da vanilina com taninos condensados e da formação de um complexo colorido (SCHOFIELD, MBUGUA & PELL, 2001; HAGERMAN & BUTLER, 1980). Para dosagem de taninos condensados, foi realizada uma curva de calibração, utilizando o ácido pirogálico como padrão (F.BRAS.IV, 2003). A curva de calibração está mostrada na **Figura 44** e os resultados estão na **Tabela 04**:

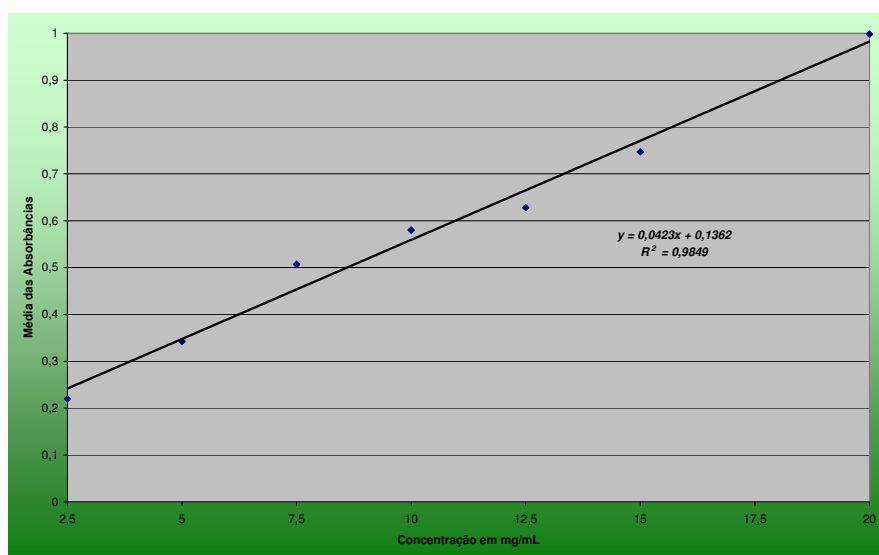


Figura 44: Curva de calibração preparada para a determinação de taninos condensados, utilizando como padrão o ácido pirogálico.

Tabela 04: Taninos condensados na planta *Euphorbia tirucalli*

	<i>Média das leituras</i> ¹	<i>Desvio padrão</i>	<i>Concentração de taninos cond.</i>
Extrato bruto	0,210	± 0,001	0,197 mg / grama de planta fresca
Fração hexano	0,002	± 0,0005	N.D. ²
Fração diclorometano	0,006	± 0,0005	N.D. ²
Fração éter etílico	0,006	± 0,0005	N.D. ²
Fração acetato de etila	0,209	± 0,0005	0,194 mg / grama de planta fresca
Fração butanol	0,002	± 0,0005	N.D. ²

¹ As médias representam a média aritmética de três leituras.

² Valores não detectáveis.

Para os taninos já foram relatadas diversas atividades e efeitos fisiológicos, por exemplo, podem reduzir a pressão sanguínea, aceleram a coagulação do sangue, diminuem o nível de lipídios no soro, modulam as respostas imunes e podem produzir necrose do fígado (MUCHUWETI, NDHLALA e KASIAMHURU, 2006).

Os resultados mostraram uma concentração de 0,194 mg de taninos condensados por grama da *E. tirucalli* fresca somente na fração acetato de etila. Isto pode ajudar a explicar a atividade antimicrobiana apresentada por esta fração (DJADJO-DJIPA, DELMEE e QUENTIN-LECLERCQ, 2000).

5.9 Avaliação da atividade antioxidante

O método utilizado para estimar a capacidade antioxidante das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli*, foi o de CHOI et al. (2002), empregando-se como padrão o ácido ascórbico, uma vez que este possui atividade antioxidante comprovada. Foram testadas todas as frações e o extrato bruto. O comprimento de onda utilizado para o monitoramento do decréscimo da absorbância foi 518 nm.

A **Tabela 05** mostra a média das leituras (em absorbâncias) do DPPH, após 30 minutos de contato com o ácido ascórbico (padrão) e com as amostras testadas. A partir dessas absorbâncias foi obtido o percentual de inibição, que corresponde à atividade antioxidante dos extratos. A análise de uniformidade dos dados foi efetuada através do cálculo de desvio padrão e do coeficiente de variação percentual.⁴

Tabela 05 – Atividade antioxidante do ácido ascórbico, extrato bruto e das frações <i>Euphorbia tirucalli</i>.				
Concentrações µg/mL	Média (Abs)	Desvio padrão (±)	Coefficiente de variação percentual (CV%)	% de inibição (IP%)
Ácido Ascórbico				
250	0,061	0,0009	1,52	96,62
125	0,061	0,0007	1,18	92,62
62,5	0,062	0,0008	1,26	96,34
31,25	0,066	0,0007	1,11	95,21
15,62	0,185	0,0014	0,74	61,69
7,81	0,351	0,0010	0,28	14,93
Extrato Bruto				
250	0,165	0,0007	0,40	79,87
125	0,462	0,0008	0,17	43,66
62,5	0,586	0,0007	0,12	28,54
31,25	0,667	0,0009	0,13	18,66
15,62	0,780	0,0010	0,12	4,88
7,81	0,796	0,0013	0,16	2,93

(Continuação da Tabela 05.)

Concentrações µg/mL	Média (Abs)	Desvio padrão (±)	Coefficiente de variação percentual (CV%)	% de inibição (IP%)
Fração n- Hexano				
250	0,143	0,0007	0,51	73,52
125	0,208	0,0007	0,32	47,86
62,5	0,243	0,0007	0,27	45,35
31,25	0,285	0,0007	0,25	33,52
15,62	0,295	0,0006	0,20	30,70
7,81	0,302	0,0005	0,17	28,73
Fração Diclorometano				
250	0,110	0,0008	0,71	82,81
125	0,136	0,0011	0,77	75,49
62,5	0,188	0,0011	0,56	60,84
31,25	0,254	0,0012	0,46	42,25
15,62	0,277	0,0008	0,30	35,77
7,81	0,292	0,0005	0,17	31,54
Fração Éter Etilico				
250	0,123	0,0007	0,57	79,15
125	0,130	0,0008	0,58	77,18
62,5	0,135	0,0008	0,60	75,77
31,25	0,136	0,0011	0,80	75,49
15,62	0,152	0,0011	0,74	70,98
7,81	0,195	0,0005	0,26	58,87
Fração Acetato de Etila				
250	0,131	0,0007	0,51	76,90
125	0,133	0,0005	0,39	76,34
62,5	0,140	0,0007	0,50	74,37
31,25	0,142	0,0005	0,37	73,80
15,62	0,145	0,0005	0,36	72,96
7,81	0,195	0,0005	0,27	58,87

(Continuação da Tabela 05.)

Concentrações µg/mL	Média (Abs)	Desvio padrão (±)	Coefficiente de variação percentual (CV%)	% de inibição (IP%)
Fração Butanol				
250	0,266	0,0007	0,27	38,87
125	0,284	0,0008	0,28	33,80
62,5	0,286	0,0007	0,25	33,24
31,25	0,297	0,0009	0,29	30,14
15,62	0,299	0,0015	0,50	29,58
7,81	0,303	0,0009	0,29	28,45

A representação gráfica das concentrações de cada amostra em relação à sua atividade antioxidante está representada na **Figura 45**:

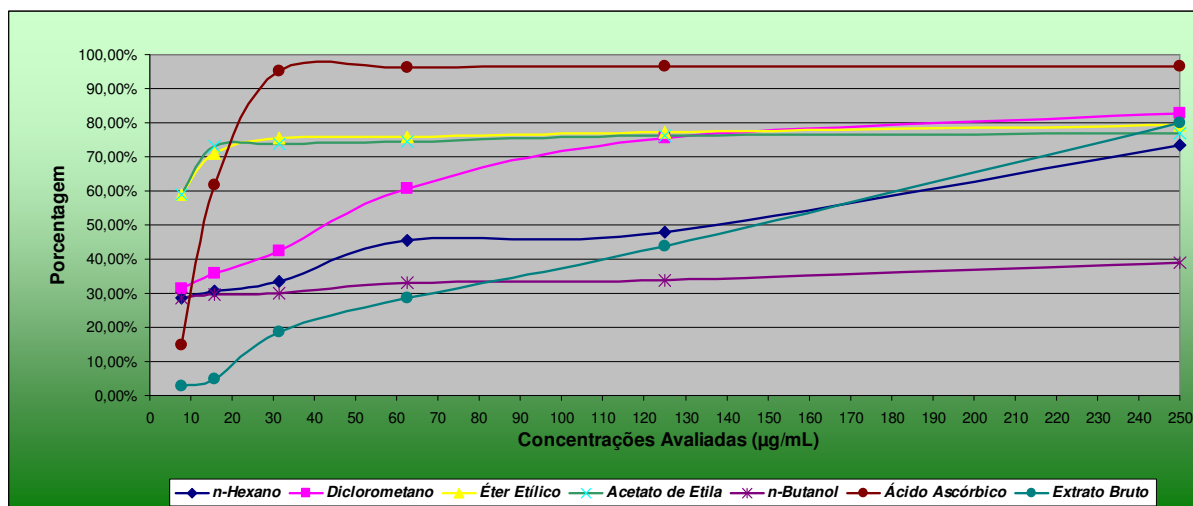


Figura 45: Resultados da atividade antioxidante da *Euphorbia tirucalli*. Os resultados estão expressos como médias \pm desvio padrão (todos abaixo de 0,0014). Todas as frações foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) comparadas com o controle (ácido ascórbico). As avaliações foram realizadas em triplicata.

As atividades foram dose-dependente, o que permitiu o cálculo do IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50 % da atividade do DPPH) para cada uma das frações analisadas. As

médias das absorvâncias referentes a cada concentração foram utilizadas no cálculo da porcentagem de inibição do DPPH e as porcentagens de inibição obtidas para cada fração foram plotadas em gráfico de concentração versus % de inibição, calculando-se o coeficiente de regressão linear e equação da reta correspondente pelo método dos mínimos quadrados. O cálculo do IC₅₀ foi efetuado levando-se em consideração o intervalo de concentração que apresentou linearidade (tomando-se como referência a faixa ascendente da reta). As equações da reta são mostradas na **Tabela 06**. Este procedimento foi semelhante ao apresentado por TSIMOGLIANNIS e OREOPOULOU (2005). Os resultados dos IC₅₀ estão mostrados graficamente na **Figura 46**.

Tabela 06: Equações da reta utilizadas para calcular os IC₅₀

Fração analisada	Equação da reta	Valor do “r” (correlação)
Fração <i>n</i> -hexano	$y = 0,0018 x + 0,2867$	0,9845
Fração diclorometano	$y = 0,0038 x + 0,3076$	0,9802
Fração éter etílico	$y = 0,0065 x + 0,5662$	0,9011
Fração acetato de etila	$y = 0,0055 x + 0,5845$	0,7877
Fração butanol	$y = 0,0005 x + 0,2885$	0,9168
Extrato bruto	$y = 0,0031 x + 0,0445$	0,9901
Ácido ascórbico	$y = 0,0324 x - 0,0181$	0,9595

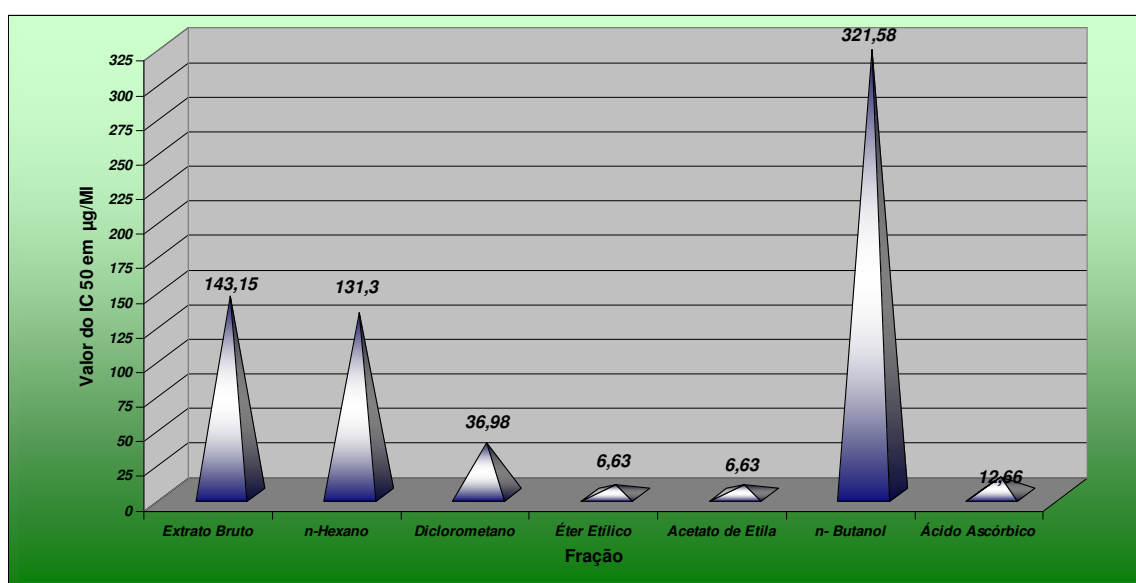


Figura 46: Valores de IC₅₀ em µg/mL das amostras no teste de atividade antioxidante (DPPH), determinadas a partir da equação da reta.

É sabido que o processo de envelhecimento e do surgimento de diversas doenças é decorrente da ação de agentes oxidantes no organismo. Estes oxidantes são, geralmente, ânions superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas. As reações dos radicais resultam em danos celulares e teciduais que contribuem no surgimento de patologias. Os radicais livres agem nos componentes celulares oxidando lipídeos, lisossomas e membranas mitocondriais. Como muitas destas enzimas são responsáveis pelo equilíbrio dos constituintes endo e exocelular, ocorre um desequilíbrio eletrolítico resultando em danos celulares por diferentes mecanismos que precedem a várias doenças como inflamações, reumatismo, doenças gastrintestinais, isquemia, cardiovasculares, desordens no sistema nervoso e processos neurodegenerativos (CHOI et al., 2002). Com isso, captadores radicalares surgem como uma promissora alternativa terapêutica para várias doenças (CHO et al., 2003).

Essas espécies reativas são produzidas em reações químicas no metabolismo de nosso organismo, mas nossos mecanismos de defesa (enzima/proteínas) muitas vezes não conseguem eliminá-los totalmente. Sendo assim, torna-se importante a busca por compostos químicos que possam ser ingeridos e que sejam capazes de inibir estes processos de oxidação in vivo sem apresentar risco à saúde humana.

É atualmente bem documentado o papel desempenhado por polifenóis e flavonóides como protetores contra diversas doenças degenerativas (TSUDA et al., 1994; RICE-EVANS et al., 1996, ZIELINSKA et al., 2003) Os efeitos benéficos da ingestão de antioxidantes são evidenciados por vários estudos e dados epidemiológicos sugerem uma associação entre dietas ricas em vegetais, frutas, vinho tinto e o decréscimo de doenças degenerativas (FILIP et al., 2000, BIXBI et al., 2005).

Um método simples e rápido de avaliar plantas promissoras quanto ao potencial antioxidante in vitro consiste no método fotolorimétrico do DPPH, um radical livre relativamente estável que produz coloração violeta em etanol. Neste método os extratos ou compostos a serem testados são colocados em contato com o DPPH em uma solução etanólica, e a redução na concentração de DPPH é monitorada pelo decréscimo de sua absorbância em um comprimento de onda fixo durante a reação (518 nm). Na sua forma radicalar o DPPH absorve no comprimento de onda de 518 nm, mas havendo sua redução por um agente antioxidante ou outra espécie radicalar a absorção desaparece.

Em relação à atividade antioxidante, observou-se que as frações diclorometano, éter e acetato de etila apresentaram forte atividade contra o radical DPPH, com o IP% acima de 70%. Os valores de IC₅₀ encontrado para as frações éter etílico e acetato de etila (ambos 6,63 µg/mL) foram inferiores ao encontrado para a referência, o ácido L-Ascorbico, que

apresentou 12,66 µg/mL. O n-hexano, o diclorometano e a fração butanol mostraram valores de IC₅₀ de 131,3 µg/mL, de 36,98 µg/mL e de 321,58 µg/mL respectivamente. Pode-se supor que estas atividades elevadas sejam, principalmente, devido à presença dos flavonóides e taninos, que foram encontrados no *Screening* e apresentam um potencial elevado de atividade antioxidante (RICE-EVANS, et al. 1996).

5.10 Doseamento de polifenóis em *Euphorbia tirucalli*

No presente estudo a metodologia aplicada foi a descrita por CHANDRA & MEJIA (2004) a qual faz uso de Folin-Ciocalteu como reagente. As diluições das amostras e do ácido pirogálico foram feitas com água destilada, sendo assim, fez-se uso desta como branco, usado para calibrar o espectrofotômetro.

A média das leituras (em absorbância) da curva padrão e das amostras, após contato durante 5 minutos com o reagente de Folin-Ciocalteu e mais 10 minutos com o carbonato de sódio 20%, está mostrada na **Tabela 07**. A análise da uniformidade dos dados foi efetuada através do cálculo do desvio padrão e do coeficiente de variação percentual. A representação gráfica da curva de calibração do ácido pirogálico é apresentada na **Figura 47**.

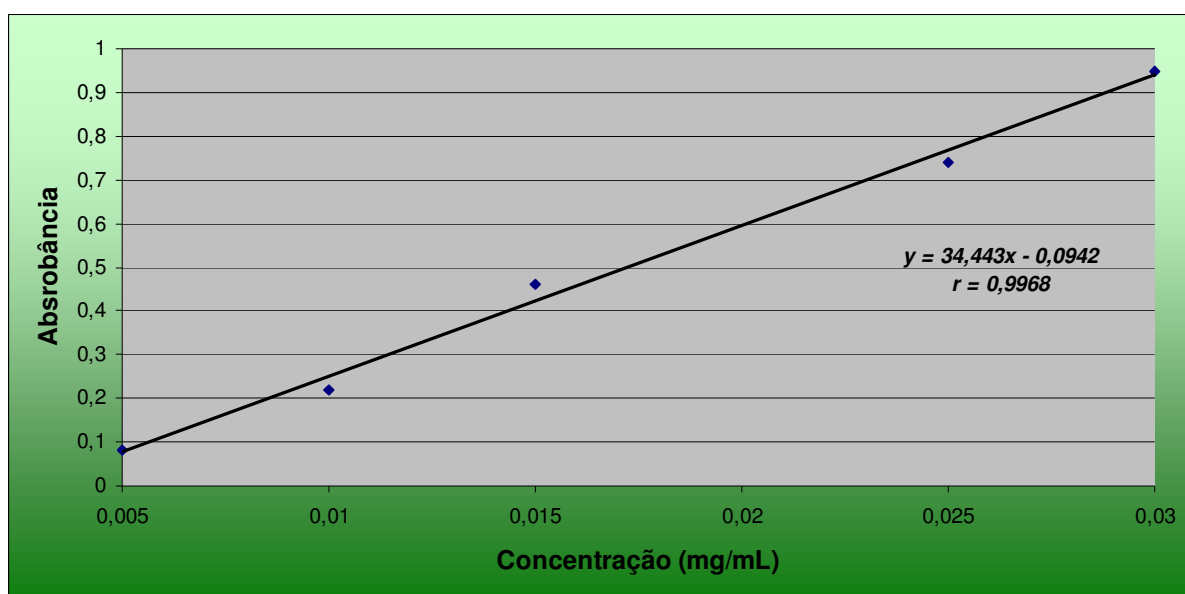


Figura 47 – Curva de calibração do ácido pirogálico com suas concentrações versus absorbâncias e respectiva equação da reta e coeficiente de correlação.

Tabela 07: Concentração de polifenóis totais na planta *Euphorbia tirucalli*

	<i>Média das leituras¹</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Coefficiente de variação %</i>	<i>Concentração de polifenóis (mg / g de planta fresca)</i>
Fração hexano	0,070	0,0009	0,75	0,061
Fração diclorometano	0,145	0,0005	0,60	0,011
Fração éter etílico	0,401	0,0012	0,30	0,048
Fração acetato de etila	0,343	0,0017	0,48	0,234
Fração butanol	0,118	0,0013	1,12	0,238
Total na planta <i>Euphorbia tirucalli</i>				0,592

¹ As médias representam a média aritmética de três leituras.

Como podem ser visualizados na **Figura 48**, os radicais livres reagem com os polifenóis formando radicais estáveis (CHO et al., 2003). Como os flavonóides geralmente são hidroxilados, formam um grupo bastante interessante na busca por novos compostos que apresentem esta atividade antioxidante. Outros componentes fitoquímicos como aminoácidos, vitaminas e pigmentos podem contribuir sinergicamente fortalecendo a atividade antioxidante (CHOI et al., 2002).

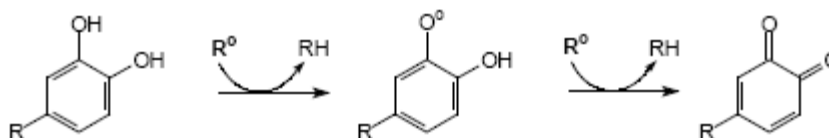


Figura 48: Estabilização dos radicais livres pelos compostos fenólicos.

A avaliação dos níveis de compostos fenólicos totais mostrou uma quantidade considerável deste tipo de substância, com valores de 0,592 mg / g de planta fresca. Este valor

é similar ao encontrado em plantas como *Nelumbium speciosum* (0.61mg/g) e superior ao encontrado em *Symphytum officinale L.* (0.25mg/g), as quais são consideradas ricas em polifenóis. (MAMBRO & FONSECA, 2005).

5.11 Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método da microdiluição em caldo, em microplaca de 96 poços, seguindo os documentos M27- A2 para fungos leveduriformes (NCCLS, 2002) e M7-A5 para bactérias (NCCLS, 2000). A **Tabela 08** mostra os resultados de atividade antimicrobiana para cada fração e extrato bruto e a **Tabela 09** mostra os valores dos antibióticos testados como controles positivos de inibição:

Tabela 08: Atividade antimicrobiana das frações de *E. tirucalli*

Bactéria / Fungo testado	Fração n-Hexano		Fração Diclorometano		Fração Éter Etílico		Fração Acetato de Etila		Fração Butanol	
	CIM	CBM ou CFM	CIM	CBM ou CFM	CIM	CBM ou CFM	CIM	CBM ou CFM	CIM	CBM ou CFM
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25293)	>4000	N.T. ²	4000	4000	2000	2000	500	1000	>4000	N.T. ²
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 2792)	>4000	N.T. ²	>4000	N.T. ²	>4000	N.T. ²	>4000	N.T. ²	>4000	N.T. ²
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	>4000	N.T. ²	>4000	N.T. ²	>4000	N.T. ²	>4000	N.T. ²	>4000	N.T. ²
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 10031)	>4000	N.T. ²	2000	2000	2000	2000	500	500	>4000	N.T. ²
<i>Candida albicans</i> (ATCC 44773)	>2000	N.T. ²	>2000	N.T. ²	1000	1000	2000	>2000	>2000	N.T. ²
<i>Candida glabrata</i> (ATCC 10231)	1000	1000	250	500	500	500	1000	2000	>2000	N.T. ²
<i>Prototheca zopfii</i>	>2000	N.T. ²	250	500	2000	2000	1000	2000	>2000	N.T. ²
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 28952)	125	125	500	500	2000	2000	1000	>2000	125	250

¹ CIM, CBM e CFM estão expressos em µg/mL.

² Não testado devido ao CIM não ter sido estabelecido.

Tabela 09: Relação dos antibióticos utilizados como controle

<i>Bactéria / fungo testado</i>	<i>ATCC ou isolado</i>	<i>Antibiótico utilizado</i>	<i>CBM / CFM</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25293	Ampicilina	2 µg/mL
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 2792	Ampicilina	8 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Ceftriazone	16 µg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031	Ampicilina	14 µg/mL
<i>Candida albicans</i>	ATCC 44773	Fluconazol	16 µg/mL
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 10231	Fluconazol	32 µg/mL
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 28952	Fluconazol	2 µg/mL
<i>Prototheca zopfii</i>	Isolado Clínico	Anfotericina	0,5 µg/mL

Atualmente é crescente o interesse por compostos antibacterianos de origem natural, uma vez que, grande parte dos microorganismos tende a desenvolver resistência aos antibióticos rotineiramente empregados na clínica e, assim, faz-se necessário essa busca constante por novos princípios ativos contra bactérias e fungos amplamente conhecidos.

A avaliação da atividade antimicrobiana mostrou bons resultados quando comparado com os valores de CIM reportados por ALIGIANNIS et al. (2001) para a espécie *Origanum sp.* A fração Acetato de Etila foi ativa contra *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. As atividades antifúngicas foram melhor detectadas nas frações éter e diclorometano, sendo eficientes contra as duas cepas de *Candida* testadas. O fungo *Sacharomyces cerevisiae* foi sensível a até cinco frações testadas.

Esta planta possui algumas atividades antibacterianas conhecidas como, por exemplo, atividade contra *Erwinia carotovora* (bactéria que causa o apodrecimento da raiz da cenoura), *Xanthomonas campestris* (bactéria causadora de cancro em frutas cítricas) e *Pseudomonas solanacearum* (bactéria que ataca as folhas das frutas e leva ao apodrecimento), demonstrada em 1998 por LÍRIO, HERMANO e FONTANILLA. Um outro trabalho demonstrou que o extrato metanólico da *Euphorbia tirucalli* apresenta atividade antimicrobiana para algumas

cepas testadas, como por exemplo: *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Salmonella typhimurim* *Bacillus cereus* e *Enterobacter aerogenes* (PAREKH et al., 2005).

5.12 Avaliação da toxicidade sobre *Artemia salina*

Foi utilizada a técnica descrita por SAM (1993), onde 10 náupios com um dia de vida são colocados em diferentes concentrações das amostras. A dose letal de 50% da amostra para tempo de 24 horas, DL_{50} , foi calculada e está relatada na **Tabela 09**.

<i>Tabela 10: Resultados do teste de letalidade da Artemia salina para o extrato bruto e látex de Euphorbia tirucalli L.</i>		
<i>Amostra Analisada</i>	<i>Diluyente</i>	<i>DL₅₀</i>
<i>Extrato Bruto</i>	Etanol	15,85 µg/ml
<i>Látex</i>	H2O	24,55 µg/ml

Valores são médias de cinco análises independentes para cada grupo.

O extrato estudado neste trabalho mostrou significativa letalidade contra a *Artemia salina*, o qual foi utilizado como teste biológico simples e de triagem a fim de detectar a toxicidade desta planta. O extrato bruto apresentou um DL_{50} de 15,85 µg/ml e o látex um DL_{50} de 24,55 µg/ml. Pelo trabalho de classificações de VERDI (2004), a planta deve ser classificada como tóxica. Estes resultados podem ser causados pela presença das estruturas derivadas do forbol, os quais são carcinogênicos e causam a morte da *Artemia salina*, a qual é muito sensível a variações do meio (SAM, 1993).

5.13 Avaliação da toxicidade oral aguda

O estudo seguiu as normas da Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD/OCDE, 2001). Os resultados estão dispostos na **Tabela 10**:

Tabela 11: Resultados dos testes de toxicidade oral aguda para extrato bruto, butanol, hexano e látex de *Euphorbia tirucalli* L.

<i>Fração / Dose</i>	<i>N - Hexano</i>	<i>n- Butanol</i>	<i>Látex</i>	<i>Extrato Bruto</i>
2000 mg/Kg	Nenhuma morte ou sintoma em nenhuma dosagem.	Sem mortes,	Nenhuma morte ou sintoma em nenhuma dosagem.	Sem mortes,
3000 mg/Kg		mas com		mas com
4000 mg/Kg		aumento da		aumento da
5000 mg/Kg		frequência respiratório em todas as dosagens.		frequência respiratório em todas as dosagens.

n = 6 por grupo.

Analisando os resultados obtidos nos testes de toxicidade oral aguda, podemos observar resultados característicos de uma planta não tóxica, embora tenham ocorridos sintomas anormais nas frações n-butanol e no extrato bruto, nenhuma morte foi observada no estudo. Com isso, DL₅₀ não pôde ser determinada. Embora estudos de toxicidade em experimentos animais não possam ser totalmente extrapolados para humanos, os resultados, mesmo necessitando de mais estudos, mostram que a planta em questão não é tóxica e isto é um indício de que o seu eventual uso como um fito-medicamento seja seguro.

Estes resultados são conflitantes com os encontrados com a *Artemia salina*, porém este fato pode ser atribuído a esta espécie de crustáceo ser um organismo com baixa tolerância a alterações do seu meio (SAM, 1993) diferente de animais superiores como o camundongo.

5.14 Avaliação dos efeitos da *Euphorbia tirucalli* sobre a enzima acetilcolinesterase humana *In Vitro*

A *Doença de Alzheimer* é uma doença neurológica degenerativa progressiva tendo por resultado danos na memória e no comportamento. A maioria das estratégias de tratamento está baseada na hipótese colinérgica, ou seja, os transtornos da memória nos pacientes que sofrem desta doença resultam de um déficit da função colinérgica no cérebro. A neurotransmissão colinérgica é afetada especialmente nos pacientes com doença de Alzheimer. Uma das aproximações mais promissoras para tratar esta doença é aumentar os níveis de acetilcolina no cérebro usando inibidores da Acetilcolinesterase (BARBOSA-FILHO, 2006; VIEGAS, et al, 2004).

Os testes de inibição da acetilcolinesterase foram realizados com plasma humano, em triplicata. Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA, Teste de Tukey e Teste-t de Student. Os resultados estão dispostos na **Figura 49**.

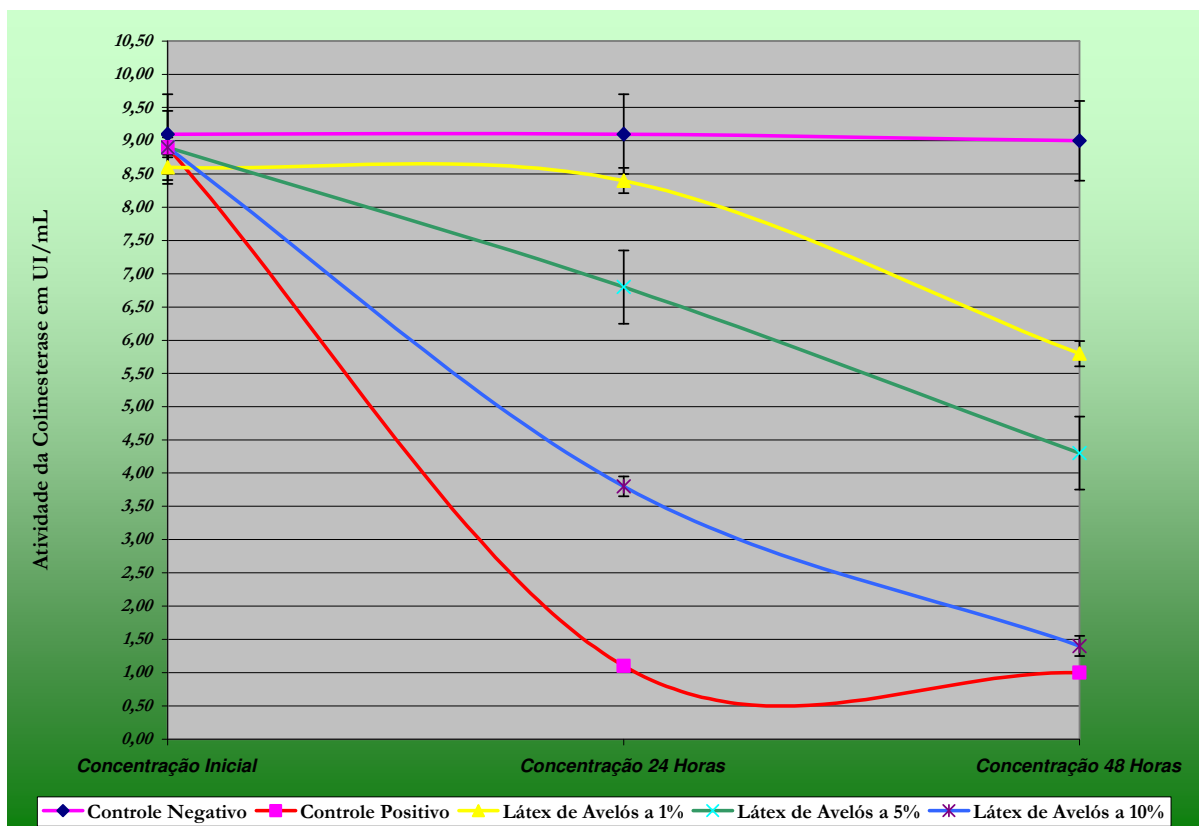


Figura 49: Avaliação dos efeitos do látex da *Euphorbia tirucalli* sobre a enzima acetilcolinesterase humana *In Vitro*. Os valores representam médias (n=8) de triplicatas \pm Desvio Padrão.

Pelos resultados apresentados, pode-se observar que o único resultado não estatisticamente significativo foi o de látex em 1% após 24 horas da contaminação que mostrou uma inibição de 2,33%. Nesta mesma concentração, mas em 48 horas, a inibição obtida foi de 32,56%. Na concentração de 5% de látex em solução salina os resultados em 24 horas (23,60%) e em 48 horas (51,69%) foram ambos estatisticamente significativos. Em 10% de látex em solução salina os resultados obtidos por 24 e 48 horas foram, respectivamente, 57,30% e 84,27%, e também significativos. O IC₅₀ calculado para 24 horas depois da contaminação foi 8,72% do látex em solução salina (0.9%) (v/v) e para 48 horas depois da contaminação foi 4,83% (v/v).

A ação farmacológica de plantas do gênero *Euphorbia* é devido à presença de um grupo de Ésteres Diterpênicos de Forbol, que são relatados por promover a atividade da enzima *Proteína-C-Quinase* (EVANS & EDWARDS, 1987), que especificamente fosforila os resíduos de serina e de treonina das proteínas (AITKEN, 1987). Uma vez que o sítio ativo da enzima Acetilcolinesterase contém resíduos de serina (KOELLE, 1975), é possível que a inibição desta enzima ocorra devido a fosforilação de seu sítio ativo. Como o 4-Desoxiforbol (um dos representantes do grupo de ésteres dipterpênicos de forbol) é também um constituinte ativo da *E. tirucalli* (KAMAT E MUTHE, 1995), a possibilidade acima não pode ser desprezada no estudo atual.

5.15 Avaliação dos efeitos da *Euphorbia tirucalli* sobre a atividade plaquetária

A respeito das atividades de plantas sobre as plaquetas humanas, há numerosos relatos que detalham os principais processos celulares de inibição e alteração plaquetária (HEEMSKERK E SÁBIO, 1994). Recentemente, muita ênfase tem sido dada sobre as novas descobertas de agentes farmacológicos seguros a base de compostos isolados na natureza (GILANI et al. 1992).

Conforme foi descrito por BOSCH (1994) esta planta é utilizada como anti-hemorrágico, porém nenhum estudo sobre os efeitos sobre a coagulação foi encontrado.

Os resultados dos efeitos da *Euphorbia tirucalli* sobre as plaquetas humanas podem ser vistos na **Tabela 12** e na **Figura 50**:

Grupo	Leitura 01	Leitura 02	Leitura 03	Leitura 04	Média	DP	CV %
Grupo 01	1,510*	1,520*	1,610*	1,498*	1,535	0,044	2,89
Grupo 02	0,381	0,397	0,398	0,402	0,395	0,008	2,03
Grupo 03	1,616*	1,718*	1,710*	1,702*	1,687	0,041	2,44
Grupo 04	1,308*	1,304*	1,309*	1,312*	1,308	0,003	0,22
Grupo 05	0,460	0,452	0,466	0,469	0,462	0,006	1,41
Grupo 06	0,423	0,424	0,420	0,426	0,423	0,002	0,51
Coágulo	1,904*	1,900*	1,898*	1,906*	1,902	0,003	0,17

* Absorvâncias resultantes da multiplicação das diluições apropriadas.

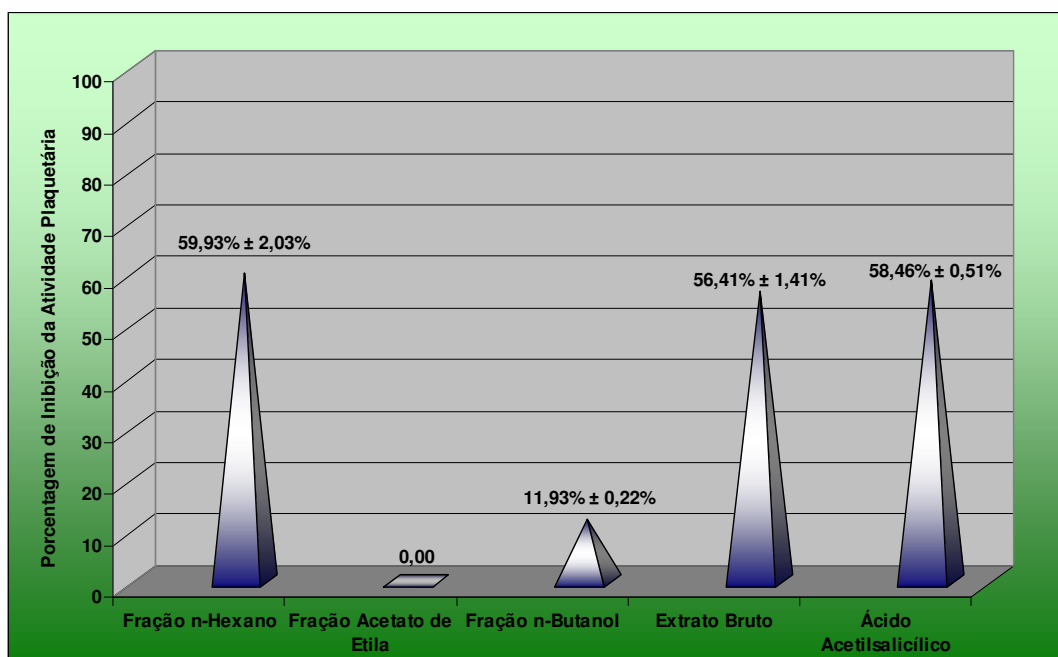


Figura 50: Porcentagem de inibição da atividade plaquetária pela *Euphorbia tirucalli*.

Os valores representam médias (n=5) de triplicatas ± CV%.

Para melhor relacionarmos os valores obtidos com o controle, o IC₅₀ foi calculado e pode ser visto na **Figura 51**:

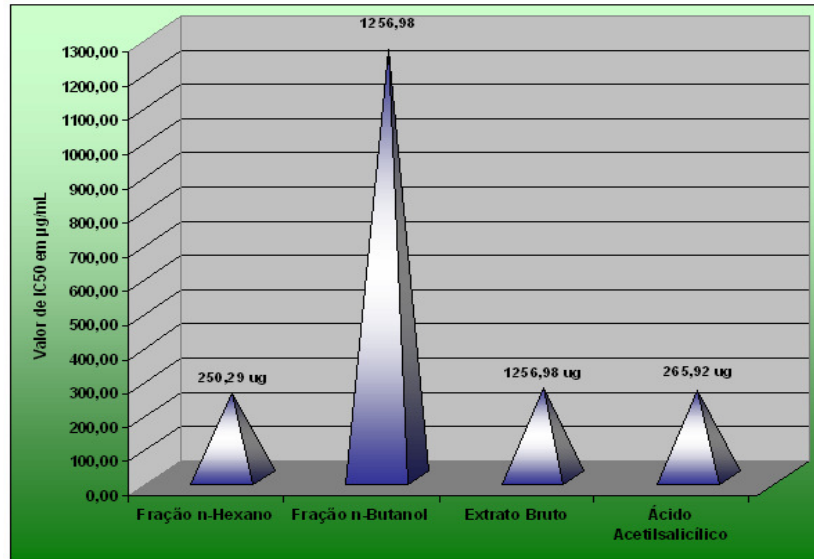


Figura 51: Valores de IC₅₀ em µg/mL das frações de *Euphorbia tirucalli* analisadas no teste de inibição plaquetária. Os valores representam as médias (n=5) de triplicatas ± Desvio Padrão.

As plaquetas são fragmentos de megacariócitos (células da medula óssea). São anucleadas, medem de 1,5 - 3,0 micrômetros de diâmetro e circulam no sangue com o formato de disco achatado quando não estão estimuladas. Duram em média circulando no sangue de 9 - 10 dias. Depois disso, elas são seqüestradas pelo baço e destruídas. O processo de ativação plaquetária é mostrado na **Figura 52**.

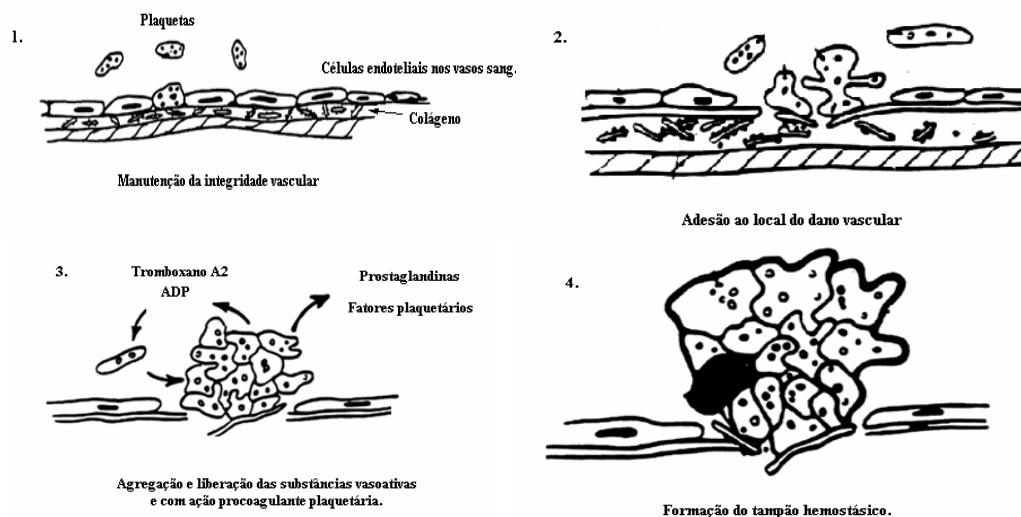


Figura 52: No item 01 podemos verificar a situação normal, onde o vaso está em manutenção da sua integridade. Na parte 02 observamos o processo de adesão plaquetária em um local danificado. Em 03 observa-se a agregação e liberação das substâncias mediadoras vasoativas, as quais possuem atividade pró-coagulante. Finalmente, em 04 observamos o final do processo normal com a formação do tampão hemostático (Adaptado de Akre, Ekström e Signorello, 2001).

O ácido acetilsalicílico, assim como outros antiinflamatórios não esteroidais, possuem atividade antiagregante plaquetária. Esta ação deve-se ao efeito inibidor da síntese de prostaglandinas, mediante a inativação da cicloxigenase (COX), enzima responsável por catalisar a síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico e por liberar tromboxano A₂, que é um potente vasoconstritor e estimulador da agregação plaquetária. Diferentemente de outros AINE, o ácido acetilsalicílico inibe a agregação plaquetária irreversivelmente. Por isso, a recuperação da hemostasia normal, após o uso de ácido acetilsalicílico, depende da produção de novas plaquetas funcionantes (7 a 10 dias) (AKRE, EKSTRÖM e SIGNORELLO, 2001). A presença destes mediadores é responsável pela ativação de outras plaquetas e com isso de desencadear a agregação plaquetária (MUSTARD, KINLOUGH-RATHBONE e PACKHAM, 1980).

Os resultados da análise das frações n-hexano e n-butanol, além do extrato bruto mostram claramente uma **Atividade Inibitória** sobre as plaquetas humanas. A fração acetato de Etila foi à única a não mostrar esta atividade inibitória. A fração n-hexano mostrou uma atividade de inibição de 59,93%. Já a fração butanólica inibiu 11,93% da agregação plaquetária e o extrato bruto 56,41%. Este resultado indica a presença de compostos que apresentam este tipo de atividade, e que parecem existir na fração n-hexano. Neste estudo, o ácido acetilsalicílico foi usado como o controle positivo e apresentou uma inibição plaquetária de 58,46%. Quando comparamos os resultados obtidos com o padrão utilizado, verificamos uma atividade da fração hexânica de 102,51% do padrão e o extrato bruto uma atividade de 96,5% quando comparada com a substância de referência.

Uma das hipóteses mais fortes para esta atividade é a presença do composto triterpênico lupeol, o qual foi identificado por CG-MS na fração hexânica. Em seu trabalho de 2006, VALADARES e colaboradores demonstraram que algum componente da planta *Euphorbia tirucalli* podia causar acentuada redução dos níveis de Prostaglandina E₂. Em 2001, FERNÁNDEZ e colaboradores demonstraram que o Lupeol pode reduzir significativamente os níveis de prostaglandina E₂. Esta hipótese é compatível com os resultados apresentados, os quais apresentaram os maiores níveis de inibição na fração hexano, a mesma fração onde o Lupeol foi identificado.

5.16 Efeito da *Euphorbia tirucalli* sobre cultura de células de ratos

Para realizar este teste foram utilizados ratos machos Wistar adultos. Seus baços e linfonodos foram retirados e após procedimento de preparo, adicionados ao meio apropriado para cultura de células. As culturas foram divididas em grupos (**Figura 53**) e receberam o tratamento com *Euphorbia tirucalli* adequado.



Figura 53: Amostras de culturas de células já com as amostras de *Euphorbia tirucalli*.

As amostras foram analisadas antes e após o período de incubação nos parâmetro de **Leucócitos Totais, Linfócitos Totais e Plaquetas**. A análise estatística foi realizada através de ANOVA e de Teste-T de Student. Os resultados podem ser vistos nas **Figuras 54, 55 e 56**:

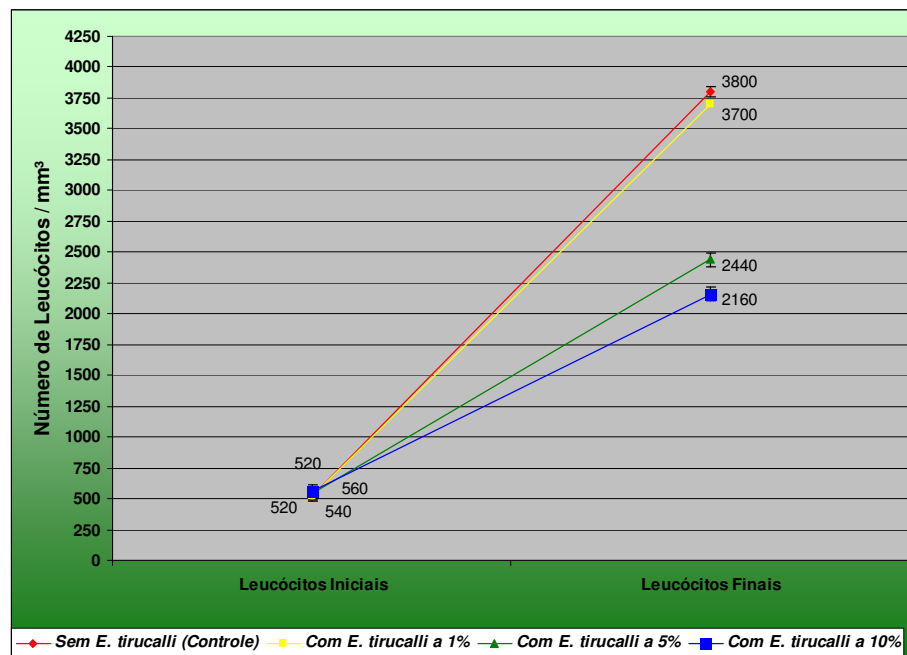


Figura 54: Resultados dos efeitos do extrato bruto da *Euphorbia tirucalli* sobre cultura de células de ratos – análise de leucócitos totais.

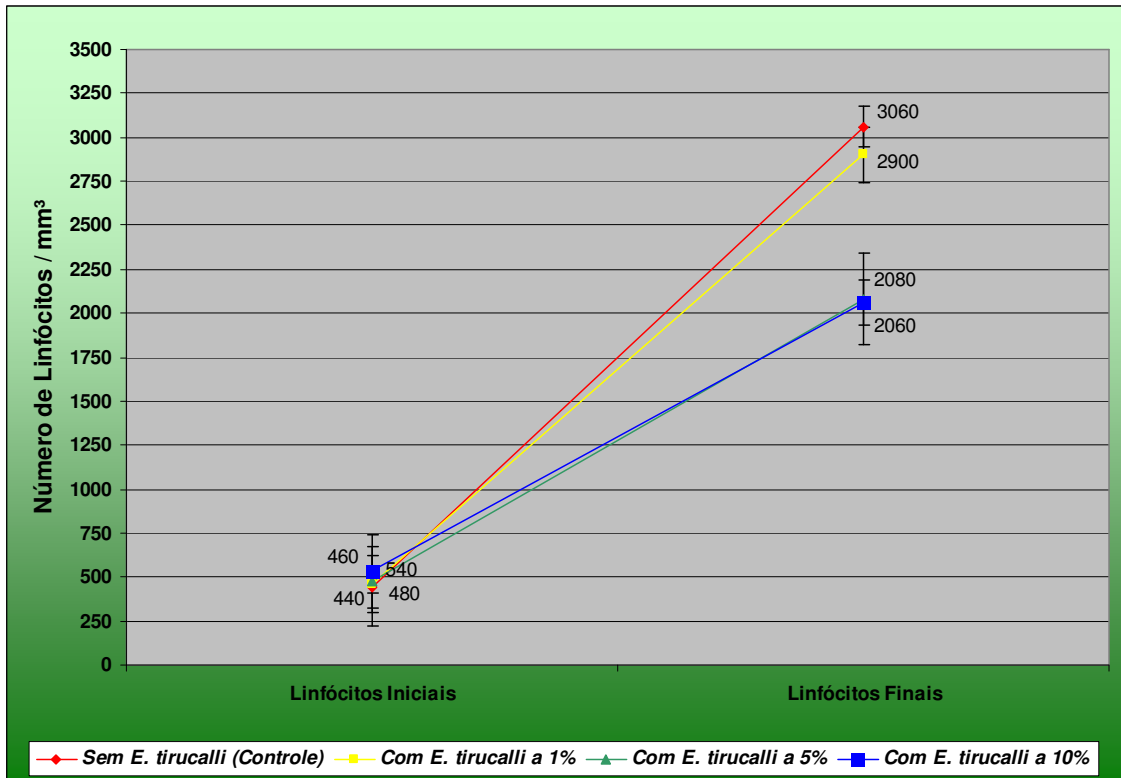


Figura 55: Resultados dos efeitos do extrato bruto a *Euphorbia tirucalli* sobre cultura de células de ratos – análise de linfócitos totais.

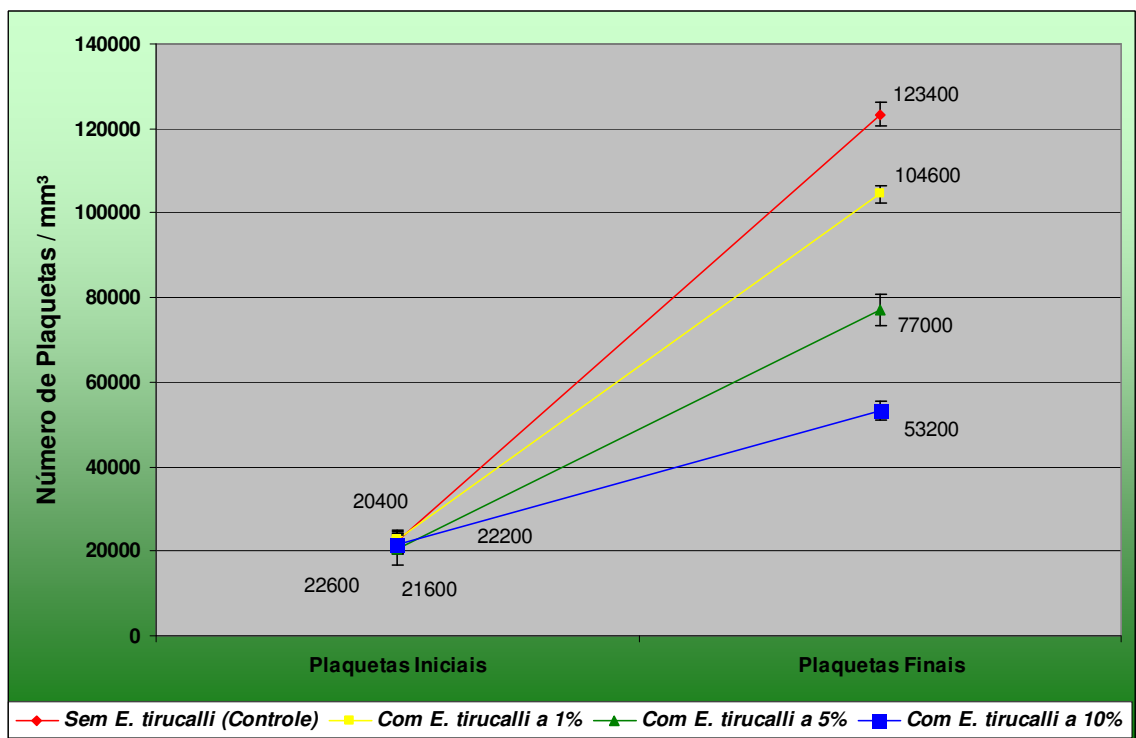


Figura 56: Resultados dos efeitos do extrato bruto da *Euphorbia tirucalli* sobre a cultura de células de ratos – análise de plaquetas.

Ao analisarmos a estatística dos resultados dos leucócitos totais, podemos verificar que não ocorreu variação significativa entre o grupo controle e o grupo com 1% de *Euphorbia tirucalli*, porém os resultados para os grupos 5% e 10% são significativos quando comparados com os dois e entre si. Já para as plaquetas, todos os grupos foram significativos e para os Linfócitos totais, assim como para os leucócitos, apenas as diferença entre o grupo controle e o grupo com 1% de *Euphorbia tirucalli* e entre os grupos 5% e 10% não foram significativas.

Podemos verificar uma redução no número de leucócitos, linfócitos e plaquetas, em todas as concentrações em uma relação dose dependente. Este efeito, associado aos efeitos relatados por BANI (2006), ou seja, a redução dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ vão de encontro a utilização popular indicada por FURSTENBERGER (1985), como imunoestimulante, tornando assim seu uso, um grande risco a saúde humana.

As topoisomerase tipo II são enzimas essenciais que possuem um papel fundamental em todos os processos celulares do DNA. Esta enzima interconverte diferentes formas do DNA. Além desta importante atividade biológica, as topoisomerases do tipo II são o alvo favorito das drogas anticâncer usadas nos tratamentos das malignidades humanas (FORTUNE e OSHEROFF, 2000.). A DNA topoisomerase II é essencial para divisão e proliferação celular. Tumores com alta proliferação celular expressam esta enzima de 25-300 vezes mais que em células normais (HECK e EARNSHAW, 1986).

Em 2006, MIYATA e colaboradores, relataram que diversos compostos terpênicos possuem atividade inibidora das topoisomerases II. De acordo com SALEEMY e colaboradores (2005), o lupeol, identificado na fração hexano da *Euphorbia tirucalli*, é um composto terpênico, o qual possui atividade inibidora conhecida sobre as Topoisomerases, e com isso pode ser o responsável pela inibição mitótica que gerou a diminuição das células sanguíneas nas culturas em relação ao grupo controle.

6. CONCLUSÃO

- ✚ O lupeol foi identificado pela primeira vez nesta espécie. Além deste, foram identificados: 03 hidrocarbonetos, 07 ácidos graxos de cadeia longa, 02 esteróides e 03 compostos do metabolismo vegetal;
- ✚ A análise fitoquímica indicou como principais constituintes os grupos: alcalóides, amino-grupos, esteróides ou triterpenos, fenóis em geral, heterosídeos flavônicos e taninos condensados.
- ✚ Realizou-se o teste de atividade antioxidante e com ele verificamos uma excelente atividade das frações éter etílico e acetato de etila, com valores melhores que os encontrados para a substância de referência, o ácido ascórbico;
- ✚ A análise da atividade antimicrobiana indicou resultados excelentes para os fungos *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*, bem como para a alga oportunista *Prototheca zopfii*;
- ✚ Realizou-se um estudo de toxicidade sobre a *Artemia salina* e estudo de toxicidade oral aguda em camundongos. Os resultados foram conflitantes, porém apontam a espécie como sendo não tóxica, apesar de apresentar alguns sintomas nos testes orais, porém nenhuma morte foi relatada;
- ✚ Avaliamos os efeitos do látex sobre a sobre a enzima acetilcolinesterase humana e assim, o possível emprego desta planta como alternativa para o tratamento da Doença de Alzheimer. Baseado nos resultados, concluiu-se que o látex da *E. tirucalli*, mesmo em pequenas concentrações (1%) pode causar inibição (*in vitro*) da enzima Acetilcolinesterase Humana.
- ✚ O teste de atividade sobre plaquetas indicou uma acentuada atividade inibitória, comparável à do ácido ascórbico, utilizado como referência. Este resultado contraria o uso popular.

- ✚ Foi realizada uma técnica de cultura de células visando verificar os efeitos sobre os leucócitos e plaquetas, bem como sobre o sistema imune. Concluímos que o extrato da planta *Euphorbia tirucalli* causa severa plaquetopenia (redução do número de plaquetas), leucopenia e de linfopenia *in Vitro*, nas concentrações testadas. Para verificarmos se o uso pode levar a um déficit de resposta imune *in vivo*, novos testes são necessários, já que nas técnicas *in vitro*, as concentrações utilizadas são altas e não necessariamente as alcançadas nos usos domésticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIFI, F.U.; ABURJAI, T. Antiplatelet activity of *Varthemia iphionoides*. **Fitoterapia** v. 75, pp. 629– 633, 2004.

AITKEN, A. The activation of protein kinase C by dephnane, ingenane and tiglane diterpenoid esters. **Botanical Journal of Linneau Society**, v. 94, pp 247– 263, 1987.

AKELERE, O. **Importance of Medicinal Plants: WHO'S Programme in Naturalm resources and Human Health**. Elsevier Amsterdam-London-New York-Tokyo, 1992.

AKRE, K.; EKSTRÖM, A.M.; SIGNORELLO, L.B. Aspirin and risk for gastric cancer: a population-based case-control study in Sweden. **British Journal of Câncer**, vol. 84, n° 07, pp. 965 – 968, 2001.

ALIGIANNIS, N., et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, pp. 4168-4170, 2001.

AYA, T. et al. Chromosome translocation and c-MYC activation by Epstein-Barr virus and *Euphorbia tirucalli* in B lymphocytes. **Lancet**, v. 18, n° 337, pp 1190 – 1991, 1991.

BANI, S. et al. Anti-arthritic activity of a biopolymeric fraction from *Euphorbia tirucalli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, ed. 01, pp 92 – 98, 2007.

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

BETANCUR-GALVIS, LA., *et al.* Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n° 97 (4), pp. 541-546, 2002.

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

BOSCH, C.A.V. Is Endemic Burkitt's Lymphoma an alliance between three infections and a tumour promoter? **The Lancet Oncology**, nº 05, pp. 738-746, 2004.

BRASILEIRO, B.G., et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, nº.2, pp. 70-72, 2006.

CAMARGO, M.T.L.A. **Medicina popular. Aspectos metodológicos de pesquisa**. Editora ALMED, São Paulo, 1985.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, pp. 3583-3589, 2004.

CHO, E. J. et al. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydralyl radical. **Phytomedicine**, v. 10, pp. 544-551, 2003.

CHOI C.W., et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, nº 163, p.1161-1168, 2002.

COMISSÃO PERMANENTE DE REVISÃO DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Farmacopéia Brasileira**, Fascículo 4, Parte II, da 4ª Edição, 2000.

DAJAS-BAILADOR, F. & WONNACOTT, S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signaling. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 25, ed. 6, pp. 317-324, 2004.

DJADJO-DJIPA C., DELMEE M., QUENTIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae) **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, pp. 307-313, 2000.

EVANS, F.J., EDWARDS, M.C. Activity correlation in the phorbol ester series. **Botanical Journal of Linneau Society**. V. 94, pp. 231-246, 1987.

FARNSWORTH, N. R. et al. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**. v. 63, n. 6, pp. 965-981, 1985.

FERNÁNDEZ M.A.; DE LAS HERAS B.; GARCÍA M.D.; SÁENZ M.T.; VILLAR A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 53, nº 11, pp. 1533-1539, 2001.

FERREIRA, M., MADUREIRA, A.M. A tetracyclic diterpene and triterpene from *Euphorbia tirucalli*. **Phytochemistry**, nº 01, pp. 179-183, 1998.

FILIP, R. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, pp.1437-1446, 2000.

FORTUNE JM, OSHEROFF N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, vol. 64, pp.221-53, 2000.

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

FURSTENBERGER G. On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). XI. [1] The skin irritant and tumor promoting diterpene esters of *Euphorbia tirucalli* L. originating from South Africa. **Z Naturforsch** v 40, ed. 9-10, pp.631-646, 1985.

GILANI A.H., MOLLA N., ATTA-UR-REHMAN AND SHAH B. H. Role of natural products in modern medicine (Review). **Pharmacologic Medicine**, v. 2, pp.111-118, 1992.

GOUPY, P. et al. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. **Journal of Science and Food Agricultural**, v. 79, pp. 1625-1634, 1999.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Condensed tannin purification and characterization of tannin associated proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, ed. 4, pp. 947-952, 1980.

HEEMSKERK J. W. M.; SABIO, G. Calcium signalling in platelets and other cells. **Platelets**, v. 5, pp 295-316, 1994.

HECK, M. M.; EARNSHAW, W. C. Topoisomerase II: A Specific Marker for Cell Proliferation. **Journal of Cell Biology**, vol. 103, n°6, pp 2569-2581, 1986.

HOUR, T. C. et al. Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-) epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffeine. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 37, pp. 569-579, 1999.

JURBERG P. Molluscicide activity of the "avelos" plant (*Euphorbia tirucalli*, L.) on *Biomphalaria glabrata*, the mollusc vector of schistosomosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, ed. 4, pp. 423-427, 1985.

KAHN, A.Q. et al. The structure and absolute configuration of Cyclotirucanenol, a new tripterene from *Euphorbia tirucalli* Linn. *Zeitschrift für Naturforschung. B, A Journal of Chemical Sciences*, vol. 43, n° 8, pp. 1059-1062, 1988a.

KAHN, A.Q. et al. Cycloeuphordenol, a new triterpene from *Euphorbia tirucalli*. **Phytochemistry**, v. 27, ed.7, pp. 2279-2281, 1988b.

KAHN, A.Q. et al. Euphorcinol: A New Pentacyclic Triterpene from *Euphorbia tirucalli*. **Planta Med**, v. 55, pp.290-291, 1988c.

KAMAT, D.V., et al. Inhibition of Carbonic Anhydrase by extracts of *Euphorbia tirucalli* and *E. antiquorum* in fish and prawn. **Journal of Animal Morphology and Physiology**, v. 44, n° 02, pp 153 – 155, 1997.

KAMAT, D.V., MUTHE, P.T. Poisonous effect of *Euphorbia tirucalli* on fish. **Journal of Animal Morphology and Physiology**, v. 42, pp. 65–68, 1995.

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

KOELLE, G.B. Anticholinesterase agents. In: **Goodman, L.S., Gillman, A. (Eds.), The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Macmillan Publishing Co., New York, pp. 404–466, 1975.

KOTOWICZ, C. et al. Triterpenes and other constituents of *Nassaouvia axillaris*. **Biochemical systematics and ecology**, v.33, pp. 737-742, 2005.

LARSSON, K.; NORAN, B.; ODHAM, G. Antimicrobial Effect of Simple Lipids with Different Branches at the Methyl End Group. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 08, n° 06, pp. 57-63, 1975.

LASS-FLÖRL, C. et al. Disseminated infection with *Prototheca zopfii* after unrelated stem cell transplantation for leukemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, pp. 4907-4908, 2004.

LIN, S.; YEH, C., LIU, L.Y.P.; HSU, F. Phenolic Compounds from Formosan *Euphorbia tirucalli*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 48, pp. 105-108, 2001.

LIRIO, L.G., et al. Antibacterial activity of medicinal plant from the Philippines. **Pharmaceutical Biology**, n° 36, pp. 357-359, 1998.

MALLAVADHANI, U.V., et al. Development of Diagnostic Microscopic and Chemical Markers of Some *Euphorbia* Latexes. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 48, ed. 9, pp. 1115–1121, 2006.

MAMBRO, V.M., FONSECA, M.J.V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. ed. 37, pp. 287-295, 2005.

MASSOULIÉ, J., PEZZEMENTI, L., BON, S., KREJCI, E., VALLETTE, F.M. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Programming the Neurobiology**. v. 41, pp. 31-91, 1993.

MEBE, P. P.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M. Pentacyclic triterpenes and naphthoquinones from *Euclea divinorum*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, pp.311-313, 1998.

MEDICAL RESEARCH PRODUCTS. *Euphorbia tirucalli* látex. Disponível em <<http://www.cantron.com/html/nutraceuticals/aveloz.html>>. Acessado em 03/04/2006.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpenicos isolados de *Byrsonima microphylla*. **Química Nova**, v.22, n.2, pp.185-188, 1999.

MIYATA, S., WANG, L., YOSHIDAA, C., KITANAKA, S. Inhibition of cellular proliferation by diterpenes - Topoisomerase II inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 14, pp.2048–2051, 2006.

MOREIRA, E.A. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassler*, A. Zahlb & L. stellfeldii R. Braga. Campanulaceae. **Tribuna Farmacêutica**, ed. 47, pp. 13-39, 1979.

MORRISSON, I.M., et. al. Determination of Lignin and Tannin Contents of Cowpea Seed Coats. **Annals of Botany**, ed. 76, pp. 287-290, 1995.

MUCHUWETI, M., NDHLALA, A.R., KASIAMHURU, A. Analysis of phenolic compounds including tannins, gallotannins and flavanols of *Uapaca kirkiana* fruit. **Food Chemistry**, v. 94, pp. 415–419, 2006.

MUSTARD, J.F.; KINLOUGH-RATHBONE, R.L. PACKHAM, M.A. Prostaglandins and Platelets. **Annual Review of Medicine**, vol. 31, pp. 89-96, 1980.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Approved Standart M27-A2: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. NCCLS, Wayne, PA; 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Approved Standard M7-A5. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 4th ed. NCCLS, Wayne, PA; 2000.

NES, W.D.; et al. Rotational isomerism about the 17(20)-bond of steroids and euphoids as show by the crystal structures of euphol and tirucallol. **Procedures of National Academy of Science**, v. 81, pp. 5896-5900, 1984.

NUNES-TAVARES, N., MATTA, A.N., BATISTA E SILVA, C.M., ARAUJO, G.M.N, LOURO, S.R.W., HASSON-VOLOCH, A. Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by tricyclic antidepressants. **International Journal of Biochemistry and Cell Biololgy**, v. 34, pp. 1071-1079, 2002.

OGUNKOYA, L. Aplication of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. **Phytochemistry**, v. 20, pp.121-126, 1981.

OHNO T. Comparative analysis of lymphocyte phenotypes between carriers of human immunodeficiency virus (HIV) and adult patients with primary immunodeficiency using two-color immunofluorescence flow cytometry. **Journal of Experimental Medicine**, pp.154-157, 1988.

OHYAMA, K. et al. Oil body formation in *Euphorbia tirucalli* L. cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v. 3, pp 21 – 22, 1984.

OLIVEIRA, A.P.; NEPOMUCENO, J.C. Avaliação dos efeitos genotóxicos e antígenotóxicos do avelós (*Euphorbia tirucalli*) em *Drosophila melanogaster*. **Bioscience Journal**, v. 20, ed. 02, pp. 179-186, 2004.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DESENVOLVEMENT. **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**, 2001.

PAREKH, J., CHANDA, S. In vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Some Indian Medicinal Plants. **Turk Journal of Biology**, nº 31, pp. 53-58, 2006.

PAREKH, J., JADEJA, D., CHANDA, S. Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. **Turk Journal of Biology**, nº 26, pp. 203-210, 2005.

PERES, C.M.; CURI R. **Como Cultivar Células**. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro Brasil, p. 106-110, 2005.

PRADO, M.A.M., REIS, R. A. M., PRADO, F. V., MELLO, M. C. GOMEZ, M. V., MELLO, F. G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry International**, ed.41, pp. 291-299, 2002.

RAINTREE NUTRITION. **Tropical Plant Database**. Disponível em <<http://www.raintree.com/aveloz.htm>>. Acessado em 03/04/2006.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., MOORE, P.K., 2004. Dependência e abuso de fármacos. In: Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K. (Ed.). **Farmacologia**. Elsevier, São Paulo, Brasil, p. 676-695.

RASOOL, N.; KHAN, A.Q.; MALIK, A. A taraxerane type triterpene from *Euphorbia tirucalli*. **Phytochemistry**, v. 28, ed. 4, pp. 1193-1195, 1989.

REZENDE, J.R., *et al.* Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. **Acta Scientiarum**, nº 26, ed. 4, pp. 481-484, 2004.

RICE-EVANS, C. A., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, pp. 933-956, 1996.

SALEEMY, M., KAURY, S., KWEONY, M., ADHAMI, V.M. AFAQ, F., MUKHTAR, H. Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. **Carcinogenesis** vol.26 nº.11 pp.1956–1964, 2005.

SAM, T.W. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. **Bioactive Natural Products**. Cap. 18, pp. 441 – 456, 1993.

SANTOS, R.I. Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários in SIMÕES C. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p.333-364, 1999.

SCHOFIELD, P., MBUGUA, D.M., PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, pp. 21-40, 1991.

SIGIURA M. Cryptic dysfunction of cellular immunity in asymptomatic human immunodeficiency virus (HIV) carriers and its actualization by an environmental immunosuppressive factor. **In Vivo**, v. 8, ed. 6, pp.1019-1022, 1994.

SILVA, A.C.P., et al. Toxicological screening of *Euphorbia tirucalli* L.: Developmental toxicity studies in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, ed. 01, pp. 154 – 159, 2007.

SILVA, P. **Farmacologia**. 1998. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 1314 pp.

SINGLETON, V. L.; RODOLF, O. ROSA, M. L. **Analisis of total pholifenol and other oxidation substract and anti-oxidant by means of focin-siocal reagent. Methods enzimology**. Dissertação, pp. 152-178, 1974.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICAS. **Plantas Tóxicas no Brasil**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox/avelos.htm>>, Acessado em 10/07/2006.

TAYLOR, P. & BROWN, J.H., 1999. Acetylcholine. In: Siegel, G.J., Agranof, B.W., Albers, R.W. & Molinoff, P.B. (Ed.). **Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and Medical Aspects**. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, U.S.A, pp. 214-242.

TAYLOR, P., 1996. Anticholinesterase agents. In: Hardman, J.G., Gilman, A.G. & Limbrid, L.E. (Ed.). **The Pharmacologic Basis of Therapeutics**. McGraw-Hill, New York, USA, pp.161-176.

TIWARI, S., SINGH, A. Alterations in carbohydrates and the protein metabolism of the harmful freshwater vector snail *Lymnaea acuminata* induced by the *Euphorbia tirucalli* latex extract. **Environmental Research**, nº 99, pp. 378-386, 2005.

TIWARI, S., SINGH, A. Biochemical stress response in freshwater fish *Channa punctatus* induced by aqueous extracts of *Euphorbia tirucalli* plant. **Chemosphere**, v.64, nº 01, pp. 36 – 42, 2006.

TIWARI, S., SINGH, P., SINGH, A. Toxicity of *Euphorbia tirucalli* plant against freshwater target and non-target organisms. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 06, ed. 16, pp. 1423-1429, 2003.

TSIMOGIANNIS, D. I.; OREOPOULOU, V. Free radical scavenging and antioxidant activity of 5,7,3'4'-hydroxy-substituted flavonoids. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, pp.523-528, 2004.

TSUDA, T. et al. Radical scavenger effect of *Boschniakia rossica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, pp.85-90, 1994.

VALADARES, M.C., *et al.* *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumor-bearing mice. **International Immunopharmacology**, nº 06, pp. 294-299, 2006.

VERDI, L.G., *et al.* Antibacterial and brine shrimp lethality tests of biflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*. **Fitoterapia**, v. 75, ed. 3-4, pp. 360-363, 2004.

VIEGAS JR., C., BOLZANI, V.S., FURLAM, M. Produtos naturais como candidatos a fármacos no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, ed. 4, pp. 655-660, 2004.

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

YAMAMOTO, Y.; MIZUGUCHI, R.; YAMADA, Y. Chemical constituents of cultured cells of *Euphorbia tirucalli* and *E. millii*. **Plant Cell Reports**, v. 01, ed. 01, pp 1154-1159, 2004.

YOSHIDA, T.; YOKOYAMA, K.; NAMBA, O.; OKUDA, T. Tannins and Related Polyphenols of Euphorbiaceous Plants. VII. Tirucallins A, B and Euphorbin F, Monomeric and Dimeric Ellagitannins from *Euphorbia tirucalli* L. **Chemical & pharmaceutical Bulletin**, col.39, ed.5, pp. 1137-1143, 1991.

ZIELINSKA, M.; GÜLDEN, M.; SEIBERT, H.; Effects of quercetin and quercetin-3-Oglucosides on oxidative damage in rat C6 glioma cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, pp.47-53, 2003.

ANEXOS

ANEXO 01: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROJETO DE PESQUISA: “PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DOS
PRINCIPAIS EFEITOS BIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS *In Vitro*
DA *Euphorbia tirucalli* L.”

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ DECLARO para fins de participação em pesquisa, que fui devidamente esclarecido do Projeto de Pesquisa intitulado: “PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DOS PRINCIPAIS EFEITOS BIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS *In Vitro* DA *Euphorbia tirucalli* L., desenvolvido pelo Farm. Bioq. Michel Mansur Machado, CRF-RS 7956, do Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria. Fui informado que o objetivo deste trabalho é verificar se esta planta, que é utilizada popularmente para tratamento de câncer, pode causar efeitos semelhantes aos venenos de lavoura (Organoforforados). Fui informado também que o motivo deste trabalho estar sendo feito é que muitas pessoas usam essa planta em casa, porém não existe nenhuma pesquisa que informe se esse uso não é prejudicial a saúde. Recebi explicações sobre procedimentos que serão utilizados na pesquisa; garantia de esclarecimentos antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia, liberdade de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e estou informado de que os pesquisadores se comprometerão a manter meu nome em sigilo absoluto.

DECLARO, outrossim, que após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, autorizo a utilização de minha amostra de sangue nesta pesquisa.

Assinatura do voluntário

Assinatura do Pesquisador

Santa Maria, ____ de _____ de 2006.

Para qualquer informação, favor contatar o pesquisador acima pelo telefone 3220-85-81.
Universidade Federal de Santa Maria – Centro de Ciências da Saúde – Prédio 26 – Sala 1417
Documento em duas vias: 1º via para o voluntário e 2º via para o pesquisador.

ANEXO 02: TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS



Avaliação Preliminar da *Euphorbia tirucalli* L.: Screening, Concentração de Polifenóis, Taninos e Atividade Antioxidante

Michel Mansur Machado¹; Aline Augusti Boligon²; Daiane dos Santos Soares²; Margareth Linde Athayde³

¹Aluno de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

²Aluno de Iniciação Científica, Universidade Federal de Santa Maria

³Professor do Departamento de Farmácia Industrial.

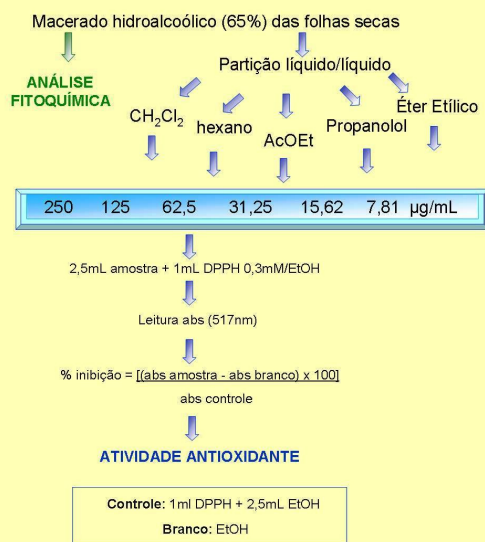
INTRODUÇÃO

A *Euphorbia tirucalli* L., conhecida popularmente como Aveloz, tem sido usada para o tratamento de inúmeras enfermidades, como infecções microbianas, problemas de imunossupressão, cicatrização de verrugas e até tratamento do câncer. Por serem fontes ricas de substâncias antioxidantes, muitas plantas estão sendo investigadas na busca da prevenção de ações danosas dos radicais livres.

OBJETIVOS

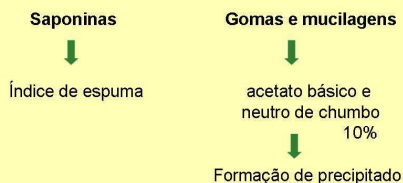
Determinar os grupos fitoquímicos principais da planta, a concentração de polifenóis e avaliar a capacidade antioxidante das frações.

METODOLOGIA



RESULTADOS DA ANÁLISE FITOQUÍMICA

POSITIVOS:

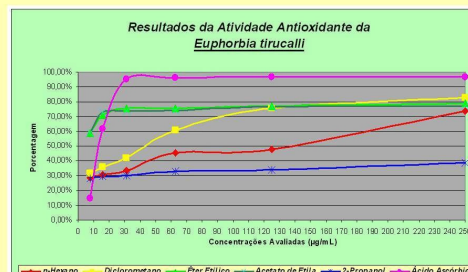
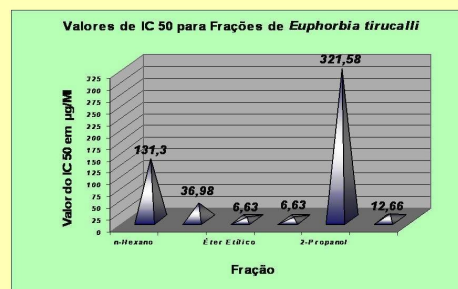


Triterpenos ou esteróides

resíduo seco
↓
clorofórmio
↓
anidrido acético e ácido sulfúrico
↓
Anel azul/verde

Flavonóides

limalha de magnésio ácido clorídrico conc
↓
Ausência de coloração rosa



CONCLUSÃO E DISCUSSÃO

As frações hexano, éter etílico, acetato de etila e diclorometano apresentaram grande atividade contra radicais livres, todas mantendo-se acima de 70% de inibição.

As frações éter etílico e acetato de etila obtiveram valores de IC₅₀ de 6,63µg/mL, foram melhores que a do ácido ascórbico, o qual apresentou 12,66µg/mL.

A atividade antioxidante pode ser justificada pela presença de flavonóides e taninos encontrados no screening fitoquímico preliminar, pois apresentam alto potencial de inibição da atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHOI, C.W., KIM, S.C.; HWANG, S.S.; CHOI, B.K.; ANH, H.J.; Lee, M.Y.; PARK, S.H.; KIM, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

In: I CONGRESSO DE FARMÁCIA DE MARINGÁ, realizado pela Universidade Federal de Maringá – PR, realizado em Maringá – PR, nos dias 08 a 11 de novembro de 2006.


34º CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS
 CONGRESSO BRASILEIRO DE OTORRINOLARINGOLOGIA CLÍNICA | 10 a 14 de Junho de 2007 | Belo Horizonte - MG | Centro de Convenções Espíovas

CERTIFICADO
 de
Apresentação de Tema Livre

**A PLANTA *Euphorbia tirucalli* INIBE A ACETILCOLINESTERASE:
 UMA NOVA ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER?**

**Autores: MICHEL M. MACHADO, JANAINA D. MAHLKE, ALINE A. BOLIGON,
 LUISA ZURAVSKI, MARGARETH LINDE ATHAYDE**

Apoio:


INSTITUTO H. PARDINI


 Dr. Ulisses Tuna,
 Presidente da SBAC


 Dra. Rita Maria do Amparo B. Palhano,
 Presidente da SBCC


 Dr. José Ronaldo Cardoso,
 Presidente do 34º CBAC

Realização:


 SBAC
 Sociedade Brasileira de Análises Clínicas


 SBCC
 Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia e Fonoaudiologia


 Qualidade Eventos
 Federação Espíovas Brasileira

In: 34º CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS, realizado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, realizado em Belo Horizonte – MG, nos dias 10 a 14 de Junho de 2007.


34º CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS
 CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS
 7º CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOLOGIA CLÍNICA
 10 a 14 de Junho de 2007
 Belo Horizonte - MG
 Centro de Convenções Expoviva

CERTIFICADO
 de
Apresentação de Tema Livre

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PLANTA *Euphorbia tirucalli* L

**Autores: MICHEL M. MACHADO, ALINE A. BOLIGON,
 LUISA ZURAVSKI, PATRÍCIA POZZATTI,
 SYDNEY H. ALVES e MARGARETH L. ATHAYDE**

Apoio:


H. PARDINI

Dr. Ulisses Tuma
 Presidente da SBAC


 Dra. Rita Maria do Amparo B. Pahlhano
 Presidente da SBAC


 Dr. José Ronaldo Cardoso
 Presidente do 34º CBAC

Realização:


 SBAC
 Sociedade Brasileira de Análises Clínicas


 JBCC
 Brazilian Journal of Clinical Chemistry


 Qualidade Eventos
 Organizando sua melhor experiência

In: 34º CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS, realizado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, realizado em Belo Horizonte – MG, nos dias 10 a 14 de Junho de 2007.

**ANEXO 03: ARTIGOS COM RESULTADOS DESTA DISSERTAÇÃO
SUBMETIDOS A REVISTAS**

ARTIGO 01

**“The *in vitro* inhibitory effect of *Euphorbia tirucalli* L. over the human
Acetylcholinesterase enzyme and platelets”**

Michel Mansur Machado; Janaína Dorneles Mahlke; Aline Augusti Boligon;

Margareth Linde Athayde.

SUBMETIDO A REVISTA

JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACETICAL SCIENCES

(QUALIS A INTERNACIONAL – FI = 1,592)

ARTIGO 02

**“*Inhibitory effect of Euphorbia tirucalli over
the blood cells mitosis in rats.*”**

Michel Mansur Machado; Janaína Dorneles Mahlke;

Margareth Linde Athayde.

SUBMETIDO A REVISTA

INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY

(QUALIS A INTERNACIONAL – FI = 2,157)

**ANEXO 04: ARTIGOS COM RESULTADOS DESTA DISSERTAÇÃO
EM FASE DE REDAÇÃO**

ARTIGO 03

In vitro antioxidant and antimicrobial activities, polyphenolic and condensed tannins contents of Euphorbia tirucalli L.

Michel Mansur Machado; Aline Augusti Boligon; Patrícia Pozzatti; Sydney Hartz Alves,
Margareth Linde Athayde.

ARTIGO 04

“Two Bioassays For The Toxicology Study of The Plant Euphorbia tirucalli L.”

Michel Mansur Machado; Ricardo Machado Ferreto; Sérgio Luiz Dalmora;
Margareth Linde Athayde.