

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - UFES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

THAMIRYS MARIA PANDOLFI DA FRAGA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA *EUPHORBIA TIRUCALLI* NA
REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS**

VITÓRIA - ES

2021

THAMIRYS MARIA PANDOLFI DA FRAGA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA *EUPHORBIA TIRUCALLI* NA
REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador (a): Prof. Silvana dos Santos Meyrelles

VITÓRIA - ES

2021

THAMIRYS MARIA PANDOLFI DA FRAGA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA *EUPHORBIA TIRUCALLI* NA
REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da
Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em
Ciências Fisiológicas.

Aprovada em _____ de _____ de _____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a **Silvana dos Santos Meyrelles (Orientadora – UFES)**

Prof Dr **Ricardo Machado Kuster (Co-Orientador – UFES)**

Prof^a Dr^a **Alessandra Simão Padilha (Membro Examinador Interno – UFES)**

Prof^a Dr^a **Camila Almenara Cruz Pereira (Membro Examinador Externo - UFOB)**

DEDICATÓRIA

A Deus, por ser meu sustento em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, a minha mãe por todo amor, cuidado e por me garantir sempre direito aos estudos, ao meu marido por total compreensão e motivação, por fim a todos os meus amigos e pessoas que rezaram e desejaram tudo de melhor durante este trabalho. Sem vocês eu não conseguiria.

É justo que muito custe, o que muito vale. (Santa Teresa D'Avila)

AGRADECIMENTOS

Quero começar agradecendo ao autor da minha vida. Deus planejou tudo no qual eu conquistei até hoje, e certamente esta etapa se concretiza pela permissão Dele. Meu Deus, teu amor, tua sabedoria, teu sustento me fez forte e capaz.

Agradeço a segunda autora da minha vida, Marta, que se doou e se absteve de muitas vaidades e sonhos desde o meu nascimento. Não tenho dúvidas que sem você mãe, eu não chegaria aqui. Você que me educou, me mostrou que antes de qualquer diversão eu precisava aprender e correr atrás daquilo que eu queria para minha vida.

Agradeço a minha família, Elena, Regina, Keyllo e Gustavo, que entenderam minha ausência em alguns momentos em família, devido a necessidade de estudar. Obrigada pelo apoio e confiança no caminho em que eu decidi traçar.

Ao meu marido, Regis, que suportou minhas mudanças de humor, ao meu tempo escasso durante esses anos de mestrado. Você amor, me amou, me incentivou e a cada obstáculo esteve ao meu lado, garantindo que eu enfrentasse com coragem. Você é o responsável pela minha sanidade mental, você sempre garantiu que eu me sentisse capaz para enfrentar os momentos mais difíceis e que por vezes eu quis desistir. Você sempre comemorou minhas vitórias e pelo tempo que Deus permitir, quero estar ao seu lado para juntos comemorarmos nossas vitórias futuras.

Agradeço as minhas luluzinhas, Danielle, Fabrícia, Fernanda, Juliana, Kamilla, Karol, Lorryne, Maria, Priscila, Thais e Thayanne, que me faziam por algumas horas aliviar a mente com boas comidas, boas conversas e excelentes risadas. Meninas, vocês são um grupo de amigas que eu nunca imaginei que teria, e hoje não me imagino sem. No nosso meio Deus reina e faz de nós suporte necessário uma as outras.

Agradeço aos meus amigos, Jeronino, Kethelen, Lucas, Nilza, Pricila, Ruth e Wil, que estiveram lado a lado aos meus dias felizes e aos dias de desespero. Vocês me incentivaram a cada momento, acreditando que eu conseguiria alcançar mais esse objetivo. Obrigada por tal amizade.

A minha orientadora Dra. Silvana dos Santos Meyrelles, que me acolheu sem reservas ao laboratório e que por anos se dedicou a me ensinar e me fazer uma pesquisadora mais capacitada. Certamente tudo o que aprendi ficará guardado em meu coração.

Ao professor Dr. Elisardo Corral Vasquez, que por vezes dedicou seu tempo a me instruir nos experimentos, em gráficos e em todos os meus questionamentos. Professor, eu sempre me lembrarei de cada reunião de laboratório, onde o senhor contava histórias inspiradoras, e as vezes mal sabia que elas mudavam o ânimo do nosso dia, e transformava um dia frustrante de experimento mal sucedido a mais um dia de aprendizado para futuros dias de sucesso. O senhor, é um ser humano magnífico e eu o levarei no coração.

Agradeço também a professora Ágata Lages Gava, que me enriqueceu com seus conhecimentos e parceria ao logo dos anos. Sempre que recorri a seus ensinamentos, fui contemplada com mais do que eu precisava. Obrigada por tanto professora.

Aos alunos de doutorado, Edgar, Maria Eduarda e a atual doutora Rafaela, Gratidão resume tudo que vivemos neste tempo. Vocês foram sempre solícitos a tudo o que pedi e precisei. Vocês são pessoas incríveis e de coração enorme. Eu nunca esquecerei nossa parceria, muito menos vocês. Estão todos guardados a sete chaves no meu coração.

Agradeço a todos os alunos de iniciação científica que passaram pelo laboratório de fisiologia translacional, tanto quando eu ainda era aluna da iniciação científica, tanto no momento em que eu me tornei mestrandia. De forma especial, Arthur Roberto, Carol, Lorena, Nayara e Rossana, vocês me ajudaram em cada situação difícil, e eu nunca esquecerei cada momento que vivenciamos naquele laboratório. Devo tudo no qual aprendi nos momentos iniciais da minha vida científica a vocês, desejo todo sucesso do mundo.

Agradeço todo aprendizado que obtive com meus colegas de laboratório, vocês enfrentaram juntamente comigo cada matéria aprovada, cada crédito conquistado, desejo a vocês sucesso e defesa marcada. Quero em especial agradecer a Thais Roza por todas as conversas, incentivos, e apoio que obtive durante esse tempo. Tenho certeza que Deus me permitiu ter você nessa pós-graduação para me mostrar leveza nos momentos mais pesados. Nunca esquecerei a plantinha Alfredo, e sua alegria pelos corredores do prédio.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de estudo concedida, bem como as demais instituições financiadoras (CAPES e FAPES), também agradeço por toda colaboração do programa de pós-graduação em ciências fisiológicas (PPGCF) da UFES.

RESUMO

Euphorbia tirucalli (Aveloz) é uma planta originada na África, que ganhou espaço nas regiões de clima tropical. Tem sido utilizada para inúmeros fins terapêuticos, sendo bastante conhecida e estudada por conter um látex rico em compostos bioativos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu sua comercialização devido aos diversos acidentes que podem ocorrer quando ingerida e quando em contato com pele e olhos. No entanto, estudos têm apresentado que muitos compostos presentes no látex, possuem ações benéficas como atividade antiproliferativa, antimicrobiana, antioxidantes, anti-inflamatórias e antimutagênica. Objetivo: Elucidar os efeitos do látex da *E. tirucalli* sobre o sistema cardiovascular, especificamente em artérias aorta de ratos Wistar. Metodologia: Duas doses de 500 ng do látex da Aveloz (AV) em meio aquoso foi padronizada, sendo que uma delas, foi submetida a hidrólise química. Em seguida, os animais foram sacrificados e o protocolo de curvas concentração resposta a fenilefrina (FE), Acetilcolina (ACh) e Nitroprussiato (NPS) foram realizadas antes e após a incubação do látex no banho. Análise Estatística: Os valores indicam média \pm EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle. Resultados: Verificou-se que AV promove vasoconstrição, e quando submetidos a curva de FE não respondem com eficiência quando comparado ao controle (Ct $R_{m\acute{a}x}$ 141.9 \pm 3.06% vs. AV $R_{m\acute{a}x}$ 107.9 \pm 0.94%). Ao utilizar um bloqueador dos receptores alfa 1 adrenérgico (prazosina), notou-se quase abolição total da contração no grupo controle (Ct $R_{m\acute{a}x}$ 142.7 \pm 4.92% vs. Ct+Prazosina $R_{m\acute{a}x}$ 107.7 \pm 1.42%). Contudo, no grupo AV não foram observadas diferenças antes e após o bloqueio. (AV $R_{m\acute{a}x}$ 107.9 \pm 0.94% vs. AV+Prazosina $R_{m\acute{a}x}$ 108.8 \pm 2.46%). Este fármaco inibe a ativação da enzima Fosfolipase C e consequentemente toda a cascata de reações subsequentes, e este resultado nos mostra que possivelmente esta não é a principal via pela qual o látex causa contração vascular. Para elucidar se o princípio ativo das respostas poderia ser pelos ésteres de forbol, utilizamos o látex na forma hidrolisada e a contração dos anéis foram marcadamente reduzidas ($R_{m\acute{a}x}$ AVH 2.03 \pm 0.29g) vs. (Ct 3.30 \pm 0.16g). O relaxamento dependente de endotélio também foi avaliado, e na presença do látex, apresentou prejuízo de função quando comparado ao controle (AV 51.6 \pm 10.45%) vs. (Ct 85.23 \pm 1.77 %). Ao utilizar o inibidor da enzima óxido nítrico sintase, L-NAME, verificamos a abolição total de relaxamento, e redução da biodisponibilidade de NO no grupo AV (AV 51.69 \pm 13.49 vs. AV+L-NAME -11.30 \pm 2.43) vs. (CT 85.84 \pm 1.86 vs. CT+L-NAME -6.11 \pm 4.91). O relaxamento independente de endotélio não apresentou diferença significativa na resposta (CT 100.0 \pm 0.00 vs. AV 87.77 \pm 8.5). Esses resultados demonstram que o látex da planta

age como potente vasoconstritor, possivelmente pela ação de ésteres de forbol, além de causar prejuízo no relaxamento a ACh na aorta de ratos normotensos.

Palavras-chave: *Euphorbia tirucalli*, Aveloz, Éster de Forbol, Reatividade vascular

ABSTRACT

Euphorbia tirucalli (Aveloz) is a plant originated in Africa, which gained space in tropical regions. It has been used for several therapeutic purposes, its well known for containing a latex rich in bioactive compounds. The (ANVISA) prohibited its commercialization due to the various accidents that can occur when ingested and when in contact with skin and eyes. However, studies have shown that many compounds present in latex have beneficial actions such as antiproliferative, antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and antimutagenic activities. Objective: To elucidate the effects of *E. tirucalli* latex on the cardiovascular system, specifically in the aorta arteries of Wistar rats. Methodology: Two 500 ng doses of Aveloz latex (AV) in aqueous medium were standardized and one was subjected to chemical hydrolysis. Then, the animals were sacrificed and the protocol of concentration-response curves to phenylephrine (FE), Acetylcholine (ACh) and Nitroprusside (NPS) were performed before and after the incubation with latex in the bath. Statistical Analysis: Values indicate mean \pm SEM. * $P < 0.05$ in relation to the control group. Results: We observed that AV promotes vasoconstriction, and when submitted to the FE curve, they do not respond efficiently when compared to the control. (Ct R_{máx} 141.9 \pm 3.06% vs. AV R_{máx} 107.9 \pm 0.94%). When using an alpha 1 adrenergic receptor blocker (prazosin), almost total abolition of contraction was observed in the control group control (R_{máx} 142.7 \pm 4.92%) vs. (Ct+Prazosin 107.7 \pm 1.42%). However, in the AV group, no difference was observed before and after the blockade. (AV R_{máx} 107.9 \pm 0.94% vs. AV+Prazosina R_{máx} 108.8 \pm 2.46%). Because Prazosin inhibits the activation of the Phospholipase C enzyme and consequently the entire cascade of subsequent reactions, this result shows us that Aveloz vessel contraction is due to another pathway. To elucidate whether the vasoconstriction induced by the Aveloz was due to phorbol ester compound, we incubate the vessels with a hydrolyzed form of the latex and the vessel contraction was markedly decreased (R_{max} AVH 1.78 \pm 44g). Endothelium-dependent vasodilation was evaluated, and in the presence of latex, a decrease of function was observed when compared to control (AV 51.6 \pm 10.45%) vs. (Ct 85.23 \pm 1.77 %). When using the nitric synthase enzyme inhibitor, L-nitric oxide, a total abolition of relaxation, and reduced NO bioavailability in the AV group was observed AV (AV 51.69 \pm 13.49 vs. AV+L-NAME - 11.30 \pm 2.43) vs. (CT 85.84 \pm 1.86 vs. CT+L-NAME -6.11 \pm 4.91). Endothelium-independent vasodilation was not different between groups (CT 100.0 \pm 0.00 vs. AV 87.77 \pm 8.5). These results characterize the plant latex as potent vasoconstrictor, possibly due to the action of phorbol esters, in addition, incubation with Aveloz caused an impairment in the aorta vasodilation in response to ACh.

Keywords: *Euphorbia tirucalli*, Phorbol ester, Vascular reactivity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação da *E. tirucalli* e coleta do látex em um dos ramos. (adaptado Blanco, 1880).....21
- Figura 2** – Estrutura química dos triterpenos euphol e tirucallol e principais núcleos diterpenoídicos da *E. tirucalli*, forbol e ingenol (adaptado SILVA, 2019).....23
- Figura 3** - Coleta do látex bruto da *E. tirucalli*.....28
- Figura 4** – Esquema demonstrativo da preparação e isolamento da artéria aorta de ratos. Após o isolamento e limpeza da aorta, ela foi seccionada em anéis com cerca de 3-4 mm. Os anéis foram delicadamente colocados em um sistema de registro para verificação da alteração na vasomotricidade da artéria (adaptado MUSTAFA *et al.*, 2009).....29
- Figura 5** – Aortas acopladas ao sistema de banho de órgãos para avaliação da reatividade vascular *in vitro* (adaptado MUSTAFA *et al.*, 2009).....30
- Figura 6** - Representação esquemática do protocolo inicial de reatividade vascular.....31
- Figura 7** – Registro típico de duas curvas controle de contração a fenilefrina (apontados na seta) a fim de comparação temporal.....32
- Figura 8** - Representação esquemática do protocolo de investigação dos efeitos do látex da *E. tirucalli* em curvas de FE (A), ACh (B) e NPS (C).....33
- Figura 9** - Representação esquemática do protocolo de investigação dos efeitos do látex da *E. tirucalli* em curvas de FE, ACh e na presença de bloqueio farmacológico.....34
- Figure 10** - Cromatograma GC-MS apresentando triterpenos presentes no látex de *E. tirucalli* respectivamente os majoritários: euphol: 23.279; tirucallol, e minoritários: 23.810; 24.192; 24961; 25.190; 25.906; 25.994.....35
- Figura 11**- ESI (-) FT-ICR MS das hidrólises realizada no látex aquoso da *E. tirucalli*. De baixo para cima: (em preto), látex bruto com picos evidenciando a presença de éster de forbol (449.17414) e seu aduto de cloro (547.24743); (em azul), látex com hidrólise básica evidenciando picos com presença de forbois (383.11561, 683.01007, 898.64284, 982.99156);

(em vermelho), látex com hidrólise ácida evidenciando picos com presença de forbóis (383.11566, 517.24459, 655.42195).....37

Figura 12- Esquema representando o mecanismo de hidrólise básica dos ésteres diterpênicos.....38

Figure 13 - Gráfico representando a mudança no basal dos anéis de aorta após 30 minutos na presença de 500ng (132 µl/ml) do látex da *E. tirucalli* (barra em branco), comparado ao basal do controle (barra em preto). Os resultados são expressos como média ± EPM. *p<0,05 Ct vs. AV, usou-se *teste t de Student*.....39

Figure 14 - Curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos Wistar (A). Em (B) resposta máxima. O N° de animais está na legenda. Abreviações: Controle (CT); Aveloz (AV). Os resultados são expressos como média ± EPM. *p<0,05 CT vs. Aveloz usando ANOVA duas vias e *post hoc* de Bonferroni entre as curvas do gráfico A, em B teste t de Student.....40

Figure 15 - Participação da via α1 adrenérgica na contração do músculo liso vascular. Em (A) curva de contração CT vs. CT+prazosina, em (B) curva de contração AV vs. AV+Prazosina. Em (C) Representação da diferença entre as áreas abaixo da curva (AUC) e R_{máx}. O N° de animais está na legenda. Abreviações: Controle (CT); Aveloz (AV). Os resultados são expressos como média ± EPM. *p<0,05 CT vs. Aveloz usando ANOVA duas vias e *post hoc* de Bonferroni, em C, ANOVA uma via e *post hoc* de Tukey.....41

Figure 16 - Figure 16 - Curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos Wistar (A). Em (B) basal dos anéis de aorta após 30 minutos na presença de 500ng (132 µl/ml) do látex não hidrolisado (barra branca) e do látex hidrolisado (barra azul) da *E. tirucalli*, comparado ao basal do controle (barra em preto). O N° de animais está na legenda. Abreviações: Controle (CT); Aveloz (AV); Aveloz hidrolisado (AVH). Os resultados são expressos como média ± EPM. *p<0,05 CT vs. Aveloz; #p<0,05 AV vs. AVH, usando ANOVA duas vias e *post hoc* de Bonferroni, em B ANOVA 1 via *post hoc* de Tukey.....42

Figure 17 - Curva de relaxamento concentração-resposta à acetilcolina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos Wistar (A). (B) resposta máxima. Abreviações: Controle (Ct), Aveloz (AV). Os resultados são expressos como média ± EPM. *p<0,05 CT vs. Aveloz, usando ANOVA duas vias e *post hoc* de Bonferroni em B teste t de Student.....43

Figure 18 - Participação da via da enzima óxido nítrico sintase no relaxamento dependente de endotélio. Em (A) curva de contração CT vs. CT+L-NAME, em (B) curva de contração AV vs. AV+L-NAME. Em (C) Representação da diferença entre as áreas abaixo da curva (AUC's) e R_{máx}. O N° de animais está na legenda. Abreviações: Controle (CT); Aveloz (AV). Os resultados são expressos como média ± EPM. *p<0,05 CT vs. Aveloz usando ANOVA duas vias e *post hoc* de Bonferroni, em C, ANOVA uma via e *post hoc* de Tukey.....44

Figure 19 - Curva de relaxamento concentração-resposta à nitroprussiato de sódio em segmentos de artéria aorta torácica de ratos Wistar (A). (B) resposta máxima. Abreviações: Controle (CT); Aveloz (AV). O N° de animais está na legenda. Os resultados são expressos como média ± EPM. *p<0,05 CT vs. Aveloz usando ANOVA duas vias e *post hoc* de Bonferroni em B teste t de Student.....45

Figura 20 – Proposta de ação dos ésteres de forbol. As estrelas representam as moléculas de éster de forbol que são capazes de atravessar a membrana lipídica e ligar-se diretamente a PKC (adaptado Travassos, 2010).....49

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Ésteres diterpênicos obtidos por ESI (-) do extrato bruto do látex de <i>E. tirucalli</i> | 36 |
| Tabela 2 - Doses do látex da <i>E. tirucalli</i> , investigadas para obter a menor concentração capaz de desenvolver resposta vascular..... | 38 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

AA: cido araquidnico

ACh: Acetilcolina

AMPc: Adenosina monofosfato cíclica

ANOVA: Análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP: Adenosina trifosfato

AV: aveloz

CAM: Calmodulina

CAV: Canais sensíveis a voltagem

CEUA-UFES: Cmite de tica no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo

CG/EM: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CML: Célula muscular lisa

CONCEA: Controle de experimentação animal

CT: Controle

DAG: Diacilglicerol

dAUC: Diferença entre as áreas abaixo da curva

DCV: Doenças cardiovasculares

DNA: cido desoxirribonucleico

EDRF: Fator de relaxamento derivado do endotélio

EPM: Erro padrão da média

ERN: Espécie reativa de nitrogênio

ERN: Espécie reativa de nitrogênio

ESI (-) FT-ICR MS: Espectrometria de massas de altíssima resolução

FE: Fenilefrina

GDP: Guanosina difosfato

GMPc: Guanosina monofosfato cíclica

GS: Guanilato ciclase

GTP: Guanosina trifosfato

IP3: Inositol-1-4-5 trifosfato

KCl: Cloreto de potássio

L-NAME: N-G-nitro-L-arginina metil Ester

pEC50: Concentração de agonista que produziu metade da resposta máxima

LPS: Lipopolissacarídeo

MLC: Cadeia leve da miosina

MLCK: Quinase da cadeia leve da miosina

MLV: Musculo liso vascular

Ng: Nanograma

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

NPS: Nitroprussiato de sódio

OH: Hidroxila

OMS: Organização Mundial de Saúde

ONOO-: Peroxinitrito

PGL2: Prostaglandina

PIP2: Fosfatidilinositol –a- 5- bifosfato

PKC: Proteína Quinase C

PLA2: Fosfolipase A2

PLC: Fosfolipase C

PS: Fosfatidilserina

RMAX: Resposta máxima

RYR: Rianodina

TXA2: Tromboxano A2

VOC: Canal voltagem dependente

SUMÁRIO

| | |
|--|---------------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 1.1 – USO DE PLANTAS PELO HOMEM..... | 19 |
| 1.2 – CLASSIFICAÇÃO, ORIGEM E CARACTERÍSTICAS GERAIS DA <i>EUPHORBIA TIRUCALLI</i> L..... | 20 |
| 1.3 – UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA DA <i>EUPHORBIA TIRUCALLI</i> | 21 |
| 1.4 – ANVISA E <i>EUPHORBIA TIRUCALLI</i> | 22 |
| 1.5 – TERPENOS E SUAS PROPRIEDADES..... | 24 |
| 1.6 – ÉSTERES DITERPÊNICOS E FUNÇÃO VASCULAR..... | 24 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 25 |
| 3. OBJETIVOS..... | 27 |
| 3.1 – OBJETIVO GERAL | 27 |
| 3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 27 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 27 |
| 4.1 – COLETA E ANÁLISE DO LÁTEX DA <i>E. TIRUCALLI</i> | 27 |
| 4.2 – PADRONIZAÇÃO DA DOSE..... | 28 |
| 4.3 – ANIMAIS EXPERIMENTAIS..... | 29 |
| 4.4 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL..... | 29 |
| 4.4.1 – Avaliação da função vascular..... | 29 |
| 4.4.2 – Avaliação da viabilidade dos anéis e teste do endotélio..... | 30 |
| 4.4.3 – Avaliação das curvas de FE, ACh e NPS na presença do látex..... | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4.4 - Avaliação das curvas de FE. ACh e NPS na presença do látex frente a bloqueios determinados..... | 33 |
| 4.4.5– Avaliação da participação da via alfa1 adrenérgica na contração via FE..... | 34 |
| 4.4.6– Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento vascular dependente de endotélio..... | 34 |
| 4.4.7– Investigações com látex hidrolisado da <i>E. tirucalli</i> | 34 |
| 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 35 |
| 6. RESULTADOS | 35 |
| 6.1 – Análise do látex da <i>E. tirucalli</i> | 38 |
| 6.2 - Padronização da dose..... | 38 |
| 6.3 – Resposta vascular após incubação do látex da <i>E. tirucalli</i> (Aveloz)..... | 39 |
| 6.4 - Avaliação da reatividade vascular à fenilefrina..... | 39 |
| 6.5 - Avaliação da participação da via α 1 adrenérgica na contração..... | 40 |
| 6.6 - Avaliação da reatividade vascular à fenilefrina na presença do látex hidrolisado (AVH)..... | 41 |
| 6.7- Avaliação do relaxamento vascular induzido por Ach..... | 42 |
| 6.8 - Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento vascular dependente de endotélio..... | 43 |
| 6.9 - Avaliação do relaxamento vascular induzido por NPS..... | 44 |
| 7. DISCUSSÃO..... | 45 |
| 8. CONCLUSÃO | 53 |
| 9. REFERÊNCIAS | 54 |

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Uso de plantas pelo Homem

O histórico do uso de plantas pelo homem é tão antigo, que remonta as primeiras civilizações datadas em períodos a.C., no qual utilizavam destas como instrumento, alimentação, fabricação de roupas, matéria prima para diversos objetos, manifestações artísticas e religiosas, e principalmente para usos medicinais (Posse, 2007). Estas civilizações, obtiveram a prática de observar o comportamento vegetal durante as estações do ano, bem como as reações que os animais apresentavam ao consumi-las, com intuito de aprender a utilizá-las da melhor forma possível para sua manutenção de vida. E a partir de inúmeras tentativas com erros e acertos, obtendo melhoras na saúde ou evitando a morte, o conhecimento empírico acerca do uso de plantas na história da humanidade, foi se aperfeiçoando, permitindo que ao longo do tempo fosse perpetuado, consolidando o senso comum. (Braga, 2011; Posse, 2007; Tomazzoni et al., 2006)

O advento dos fármacos sintetizados não foi suficiente para que a prática de utilizar plantas para curar doenças findasse, pelo contrário, as plantas medicinais tem tomado espaço na farmácia caseira (Tomazzoni et al., 2006). Sendo assim, em 1978, a Organização mundial de Saúde (OMS) reconheceu oficialmente o uso de fitoterápicos (ANVISA, 2011). É a ciência caracterizada pelo uso de plantas medicinais nas mais variadas formas farmacêuticas, contudo, sem utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal. (Brasil, 2015). No Brasil, essa prática é bastante comum, principalmente por ser um país com a flora mais rica do mundo, totalizando cerca de 56 mil espécies de plantas, que representa aproximadamente 19% da flora mundial (Giulietti, 2005). Logo, o fácil acesso e baixo custo aos vegetais, permite um desmedido uso de chás e remédios caseiros que são utilizados em substituição ou concomitante a terapia convencional de algumas doenças. Segundo a (OMS), cerca de 85% da população de países em desenvolvimento, utilizam em seus cuidados básicos de saúde, plantas ou preparações destas (Brasil, 2006).

Com o intuito de evitar os efeitos tóxicos e negativos da utilização inadequada de plantas ditas como medicinais, e para conhecimento de novos fitoterápicos alternativos de sucesso no combate a patologias existentes, muitos pesquisadores têm se dedicado na descoberta do princípio ativo e mecanismos de ação presente nos extratos e sumos vegetais. Um exemplo de

planta que tem sido estudada com este fim, é a espécie *Euphorbia tirucalli* Linneau que tem sido popularmente difundida para diversos tipos de tratamento.

1.2 – Classificação, origem e características gerais da *Euphorbia tirucalli* L.

A espécie *E. tirucalli* L. pertence à família Euphorbiaceae, uma das maiores famílias de planta e apresenta formas de vida como ervas, subarbustos, arbustos, árvores ou lianas. Possui distribuição mundial com cerca de 307 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies (Judd *et al* 1999), sendo que 72 destes gêneros e 1.100 espécies ocorrem no Brasil (Cordeiro, 1992). Ainda sobre sua classificação, a *E. tirucalli* está inserida no gênero Euphorbia, o maior gênero da família Euphorbiaceae, e considerado o quarto maior dentre todas as angiospermas (Frodin, 2004).

Em relação a espécie *E. tirucalli* L., sabe-se que ela é nativa de duas regiões desérticas, Ásia e África, sendo neste último continente, localizada na região de Madagascar. Sua introdução no Brasil se deu por volta de 1892 com o intuito de ser usada como planta artesanal, cerca viva e proteção contra invasores. Atualmente se distribui em diversas regiões de clima tropical, e possui capacidade de se adaptar em habitats de condições limitantes (Oliveira; Nepomuceno, 2004; Caseiro *et al*, 2006).

Quando plantada em seu ambiente natural e com condições climáticas favoráveis, consegue atingir cerca de 10 metros de altura, entretanto, em habitats de climas desfavoráveis não ultrapassa 2 metros (Caseiro *et al*, 2006). É facilmente reconhecida por suas características: cor verde, ramos extremamente ramificados, verticilados e suculentos, de formato cilíndrico e aspecto duro, folhas reduzidas ou ausentes e é lactescente, ou seja, na quebra de seus ramos, libera um suco leitoso (látex) já descrito por conter substâncias bioativas (Fig. 1) (Rodrigues, 2007; César, 1956).

Segundo Grosso 2004, toda a família Euphorbiaceae apresenta como característica comum, a presença de látex em caule, galho ou folha. Devido a essas características marcantes, no Brasil a *E. tirucalli* ficou conhecida por diversos nomes como: Graveto do cão, Árvore lápis, mata verrugas, figueira-do-diabo, dedo-do-diabo, cega olho, pau-pelado, árvore de São Sebastião, entre outros, todavia o nome mais popular é aveloz ou avelós (Machado, 2007; SINITOX/CICT/FIOCRUZ, 2001; Souza, 2019)



Figura 1 – Representação da *E. tirucalli* e coleta do látex em um dos ramos. (adaptado Blanco, 1880)

1.3 – Utilização terapêutica da *E. tirucalli*

Diversos trabalhos têm revelado que o látex desta planta tem ação irritante quando em contato com a pele. Há relatos da ocorrência de reações inflamatórias na epiderme, podendo evoluir para uma necrose, gastroenterites, conjuntivites, edemas oculares e até cegueira quando em contato direto com os olhos (Bessa, 2010; Silva, 2007; Varricchio et al., 2008b). Contudo, mesmo diante destes incidentes e sendo considerada uma planta tóxica, as cascas do galho, a madeira, a raiz, o caule e principalmente o látex da *E. tirucalli*, tem sido largamente utilizado para diversos fins.

Na Malásia por exemplo, o emplastro da raiz ou do caule, é usado em úlceras nasais, hemorroidas e inchaço. Já na Índia, utilizam da planta para tratamento contra o aumento do baço, lepra, cólica, leucorreias entre outras enfermidades (Fürstenberger & Hecker, 1977; Gupta et al., 2013; Prashant, y; Shital, 2017). O látex por sua vez, tem sido mundialmente utilizado como: praguicida, inseticida, veneno de peixe, em mordida de cobras e picadas de

escorpiões, para tratamento de asma, contra parasitas intestinais, dor de ouvido, dor de dente, epilepsia, tosse, hemorroidas, reumatismo, verrugas, sífilis, impotência sexual e em até em doenças mais severas como Alzheimer e câncer (Dantas, 2007; Cataluña & Rates, 1999; Fürstenberger and Hecker 1977; Machado, 2007; Prashant & Shital, 2017).

Em 1968, o médico brasileiro Lauro Neiva, utilizou em seus pacientes, 6 gotas do látex da *E. tirucalli* diluído em 2 litros de água (consumindo em 3 dias), como um adjuvante no tratamento de enfermidades como câncer e doença de Chagas e obteve êxito. Isso o levou a realizar esta prática por diversos anos, e mais tarde registrou em seu livro “A cura do câncer pelo Aveloz” (Neiva, 1968). Desse modo, a utilização e os estudos sobre a *E. tirucalli* têm se concentrado a respeito de seu efeito benéfico na cura de tumores e certos tipos de câncer (Oliveira & Nepomuceno, 2004). Um estudo brasileiro, apontou que 40% dos pacientes oncológicos recorrem à utilização de plantas para o tratamento de câncer. E destes, 8,8% dos pacientes fazem uso da planta *E. tirucalli* (Dal Molin, 2015).

Atualmente o Brasil utiliza o látex para tratamento da gastrite, uma doença precursora do câncer gástrico, além do uso em tumores de mama, com eficiência tanto em modelos experimentais como em humanos (Souza, 2019). No Nordeste ela é considerada eficaz na remoção de verrugas, como agente laxativo e antimicrobiano, contra parasitas intestinais, tumores, asma, tosse, dor de ouvido, verrugas, reumatismo, sífilis, tumores de pele e sarcomas (Lainetti & Brito 1979; Cataluña & Rates, 1999).

1.4- ANVISA e *E. tirucalli*

A literatura apresenta que o látex da *E. tirucalli* possui inúmeras substâncias químicas, e isso pode possivelmente explicar sua ampla utilização. Entretanto, devido ao uso desenfreado do látex para diversos fins, em 6 de julho de 2011, entrou em vigor uma resolução feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a fim de proibir a distribuição, comercialização, manipulação e a fabricação de medicamentos contendo o látex da *E. tirucalli*. Essa proibição foi realizada por não existir testes de segurança com eficácia perante a agência, que comprove sua utilização para tratamento de incontáveis acometimentos, como tem sido apresentada (BRASIL, 2011).

De um modo geral, a literatura descreve que o látex da *E. tirucalli* apresenta em sua composição química hidrocarbonetos iguais os da gasolina. Atualmente a Petrobrás tem estudado para uso alternativo de combustível, possibilitando extração de óleo do látex (Sapiência, 2010; Tofanelli & Silva, 2011). Além disso, o látex possui goma tirucalli, resina, ácido cítrico, ácido elágico, euforona, glucose, hentriacontanol, isoeuforal, kaempferol, ácido málico, sapogenina-acetatos, ácido succínico, taraxasterol, taraxerina, e 12-Otetradecanoil forbol-13-acetato, 12-O- (22) (4E)-octadienol-4-deoxiforbol-13-acetato, ácido 3, 3'- di-O-metil-elágico, betasitosterol, (Franco, 1997).

Por sua vez, as substâncias de maior interesse farmacológico, são os triterpenos eufol e tirucallol e os diterpenos do tipo tigliano (4-deoxi-forbol, forbol e ésteres de forbol) e ingenano (ingenol e ésteres de ingenol) (Caseiro *et al*, 2006) (Figura 2). É importante salientar que em 1986, Fürstenberguer e Hecker ao comparar amostras do látex de duas regiões diferentes, constataram a ausência do diterpeno 4-deoxiforbol éster em uma das amostras, concluindo seus achados dizendo que existem quimiotipos de aveloz e estes são influenciados pelo solo, clima e habitat (Fürstenberger & Hecker, 1986).

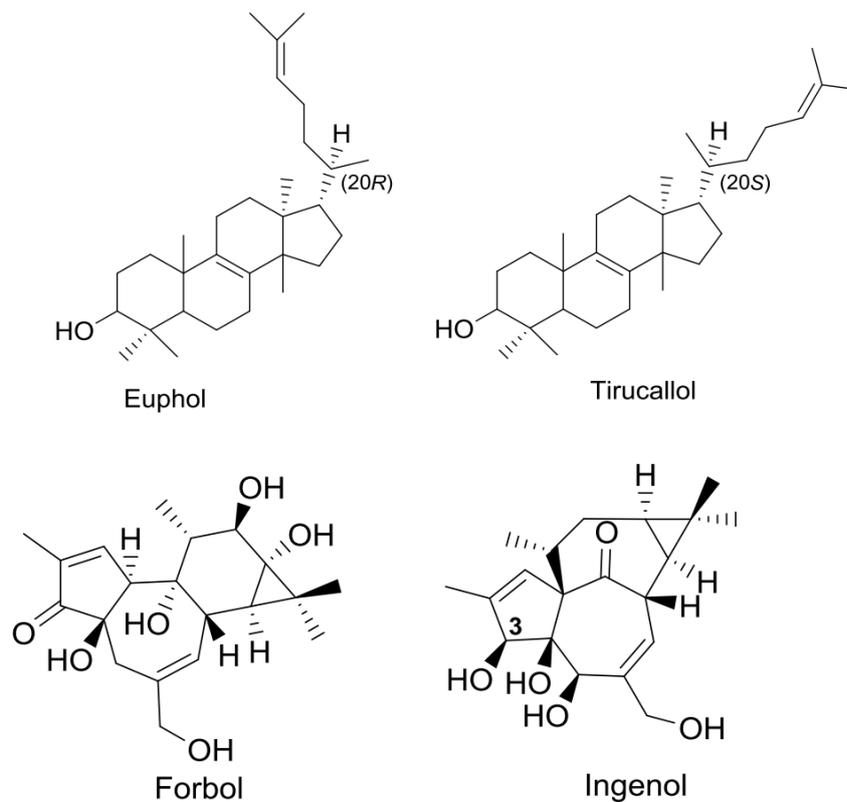


Figura 2 – Estrutura química dos triterpenos eufol e tirucallol e principais núcleos diterpenoídicos da *E. tirucalli*, forbol e ingenol (adaptado SILVA, 2019).

1.5 – Terpenos e suas propriedades

Com o objetivo de garantir a sobrevivência da espécie, todos os seres vivos possuem um metabolismo geral chamado de metabolismo primário, que faz a síntese de compostos essenciais a vida (Santos, 2001). Todavia, as plantas possuem como complemento aos metabólitos primários, os metabólitos secundários, que permite a elas responderem aos fatores externos de acordo com sua necessidade física: seja para interagir com outras plantas, ou defesa de predadores (Maraschin e Vepoorte, 1999; Savithramma *et al.*, 2011). Os metabólitos secundários são divididos em 3 grupos: os compostos fenólicos, compostos nitrogenados e terpenos, sendo este último grupo, o maior e classificado em: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos (Martins, 2012).

Já é descrito que a *E. tirucalli* possui triterpenos como composto majoritário no látex, sendo eufol o mais abundante (McDonald *et al.*, 1949; Yasukawa *et al.*, 2000). A literatura mostrou que esta substância possui caráter terapêutico, atuando como anti-inflamatório em doenças intestinais, e em doenças autoimunes do sistema nervoso central, quando administrado oralmente em ratos (Dutra, 2012), atuou também como antiproliferativo em tumores gástricos mostrando seletividade apoptótica em células cancerosas (Lin, 2012) e apresenta ter efeitos antitumoral e antiangiogênico em experimentos *in vivo*, com membranas corioalantóides de frango (Silva, *et al.*, 2018).

Além do eufol, outros triterpenos como o tirucallol, lupeol e escaleno são encontrados em quimiotipos da planta. E além do látex apresentar atividade anti-inflamatória, antiproliferativa, antitumoral e antiangiogênico, já é comprovado que este também possui propriedade antimicrobiana, fungicida, anti-helmíntico, expectorante e antioxidante (Lirio *et al.*, 1998; Passos, *et al.*, 2012; Franco-Salla *et al.*, 2016; Choene & Motadi, 2016). Esses achados podem favorecer resultados positivos se utilizados e investigados em doenças com outros órgãos alvo.

Entretanto, os efeitos tóxicos, irritantes e promotores de tumor, estão relacionados com outra classe de terpenos encontrados em menores quantidades na *E. tirucalli*: os diterpenos e ésteres diterpênicos. Em 1991 Aya e colaboradores, determinaram que o éster diterpeno 4- deoxiforbol poderia ser o princípio ativo que influencia a translocação entre os cromossomos 8 e 14, levando a uma maior permeabilidade dos linfócitos B ao vírus *Epstein Barr*, causador do

linfoma de *Burkiit*. Os ésteres diterpênicos do tipo tigliano são apontados como causadores de tumores e reações inflamatórias nos sistemas biológicos. Esses ésteres de forbol, possuem insaturações presente em sua estrutura química, que o permite interagir com a proteína quinase C (PKC), uma enzima importante envolvida na transdução de sinal e processos intracelulares relacionados ao desenvolvimento da maioria das células e tecidos. Logo, a interação entre o éster de forbol mais a PKC, se constante, pode ser carcinogênico por afetar o crescimento e a diferenciação celular. (Hickey *et al*, 1981; Seip *et al*, 1983; Furstenberger & Hecker, 1986; Souza *et al*, 2019; Hecker & Schmidt, 1974; Baloch & Baloch, 2010).

1.6 - Ésteres diterpênicos e função vascular

Além dos efeitos carcinogênicos, os ésteres diterpênicos poderiam estar interferindo na motricidade vascular. Em 1991, Savinaeu demonstrou em aortas pulmonares de humanos e ratos, que em baixas concentrações, os ésteres podem promover vasoconstrição. É importante ressaltar, que o funcionamento normal dos vasos, (contrações e relaxamentos) é extremamente importante para a manutenção de vários processos fisiológicos, desde regulação da pressão sanguínea a correta distribuição do fluxo sanguíneo. Dentre os vasos sanguíneos, a aorta é uma artéria que constantemente está submetida a grandes pressões, (Mello, 1999) pois a cada sístole ventricular esquerda, recebe um aporte de fluxo sanguíneo turbulento (Melbin e Detweiler, 1996). Um desequilíbrio nesses processos fisiológicos, geralmente está associado a várias doenças, sendo a aterosclerose a mais conhecida (Dart *et al.*, 1991). Além disso, a disfunção vascular pode desencadear o desenvolvimento de várias doenças como hipertensão (Dzau & Safar, 1988) diabetes (Liu & Fung, 1992), e hiperlipidemia (Lehmann *et al.*, 1992).

2 – JUSTIFICATIVA

O interesse em usar plantas medicinais no combate a doenças tem crescido nos últimos tempos. Isso se deve ao fato da população procurar por alternativas mais naturais, pela facilidade ao acesso às plantas, e porque as plantas são um recurso de baixo custo quando comparado ao valor alto de algumas medicações. A *Euphorbia tirucalli* L. como apresentado anteriormente, tem sido utilizada em inúmeras situações de doenças, e os trabalhos divergem sobre seus efeitos serem benéficos e/ou maléficis. Contudo, mesmo diante de poucas informações sobre seu real potencial terapêutico e a proibição realizada pela ANVISA, o uso da *E. tirucalli* continua sendo praticado pela população em geral. Anteriormente foi abordado que os componentes da *E.*

tirucalli podem provocar contrações sustentadas nos vasos e essas modulações podem interferir no funcionamento fisiológico do sistema cardiovascular. Portanto, mediante a escassez de estudos que atestem a real eficácia terapêutica desta planta e a total falta de informações sobre como esta planta afeta as funções vasculares, estudos que forneçam informações sobre os efeitos do látex da *E. tirucalli* no sistema cardiovascular são necessários.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

- ✓ Avaliar os efeitos da administração in vitro do látex da *Euphorbia tirucalli* sobre a função vascular da aorta em ratos normotensos.

3.2 - Objetivos Específicos

Em segmentos de aorta incubados com o látex da *E. tirucalli*:

- ✓ Estabelecer a menor dose do látex que promove resposta vascular;
- ✓ Avaliar possíveis modificações da resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina;
- ✓ Testar a via α_1 adrenérgica como possível mecanismo da ação vasoconstritora;
- ✓ Determinar a ação do látex sobre a resposta vasodilatadora dependente de endotélio;
- ✓ Observar a ação do látex sobre a resposta vasodilatadora independente de endotélio;
- ✓ Verificar se o látex modula a produção de óxido nítrico.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Coleta e análise do látex da *E. tirucalli*

O látex bruto da *E. Tirucalli* foi coletado no dia 11 de março de 2019 no período da manhã (09:00) na praia de Itaparica – Vila Velha-ES. Foram utilizados *ependorffs* que continham 500 μ l de água para diluir as 6 gotas do látex coletado. Por meio das quebras nos pecíolos da planta foi obtido o látex. As alíquotas foram armazenadas na geladeira até o momento do uso. (Nº de registro exsicata RFA31675). Parte das amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Cromatografia, localizado no Núcleo de Competências em Química do Petróleo-UFES Campus Goiabeiras/Vitória-ES, do prof. Ricardo M. Kuster, para realização de estudos de análise química do látex da *E. tirucalli*. As amostras foram analisadas por meio de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) a fim de revelar a composição química presente no látex.

Nosso estudo também buscou investigar quais seriam os efeitos do látex da *E. tirucalli* na forma hidrolisada, e para isso o Laboratório de Cromatografia colocou cerca de 100g do látex coletado em soluções de HCl 0,5M e KOH metanólico 0,5M, submetendo a hidrólise ácida e básica conforme protocolo a seguir: Cada solução foi deixada em refluxo durante 6 horas e, logo após, foram acidificadas e extraída três vezes com CH₂Cl₂ :CH₃OH (5:1). As amostras hidrolisadas

foram injetadas em Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e analisadas em Condições de análise da Espectrometria de Massas de Altíssima Resolução (ESI (-) FT-ICR MS). Os resultados foram gentilmente cedidos pelo prof. Ricardo Kuster, para compor os resultados e a discussão deste trabalho.



Figura 3 - Coleta do látex bruto da *E. tirucalli*

4.2 – Padronização da dose

A dose adotada neste estudo, foi baseada na posologia usual do senso comum, no qual utilizam 6 gotas do látex em 2 litros de água. Em síntese, 6 gotas do látex da *E. tirucalli*, equivalem em média 13,06mg/ml. Ao administrar essa quantidade nos anéis aórticos, observamos uma contração lenta, porém constante, a partir deste resultado, nossa investigação se concentrou em determinar qual menor dose do látex da planta capaz de provocar a mesma resposta vascular observada acima. Evitando a possibilidade de causar dano ao vaso, uma vez que o látex é citotóxico. Para tanto, fizemos diluições do látex até alcançar o objetivo descrito acima.

4.3 - Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos com aproximadamente três meses e pesando entre 250g-350g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo e mantidos em gaiolas coletivas, recebendo água e ração (Labina®, Purina) livremente, sendo controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, a temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e a umidade ($60\pm 5\%$) do local. O uso e cuidado destes animais experimentais foi de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pela prévia aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais Experimentais (CEUA) CEUA-UFES, protocolo n. 19/2019.

4.4 - Protocolo Experimental

4.4.1 – Avaliação da função vascular

Completadas as doze semanas de idade, os animais foram eutanasiados com Tiopental (200 mg/Kg i.p), submetidos a toracotomia para exposição do coração e aorta, que foram cuidadosamente removidos e imersos em uma placa de Petri contendo solução nutritora tampão de Krebs gelado (composição em mM: NaCl 127; KCl 4,7; NaHCO_3 18; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; KH_2PO_4 1,17; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; glicose 11 e EDTA 0,01), pH 7.4. Em seguida a aorta foi delicadamente dissecada para isolar do tecido perivascular, e então dividida em segmentos (anéis) com 3 a 4 mm de comprimento (Figura 7).

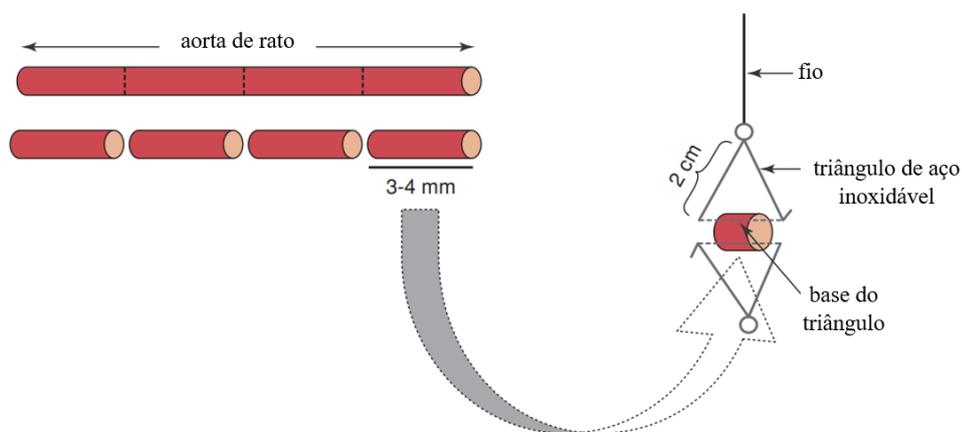


Figura 4 – Esquema demonstrativo da preparação e isolamento da artéria aorta de ratos. Após o isolamento e limpeza da aorta, ela foi seccionada em anéis com cerca de 3-4 mm. Os anéis

foram delicadamente colocados em um sistema de registro para verificação da alteração na vasomotricidade da artéria (adaptado MUSTAFA *et al.*, 2009)

Cada anel de artéria, foi montado entre dois triângulos de aço inoxidável suspensos e imersos em cubas contendo 5 mL de solução de Krebs aquecida a $36 \pm 0,5$ °C. Os anéis foram continuamente gaseificados com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), mantendo o pH estável em 7,4. Um sistema de aquisição de dados (MP100, BIOPAC Systems, Santa Barbara, EUA) foi acoplado a um transdutor de força, que registrava a tensão dos anéis em resposta aos agentes vasoativos (Figura 8).

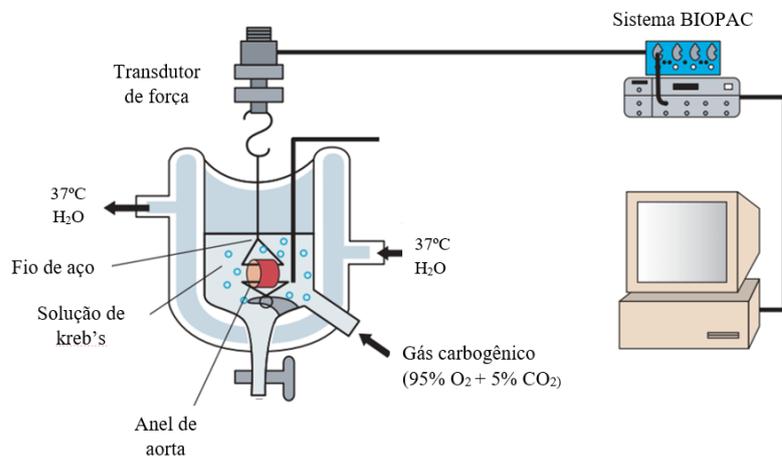


Figura 5 – Aortas acopladas ao sistema de banho de órgãos para avaliação da reatividade vascular *in vitro* (adaptado MUSTAFA *et al.*, 2009).

4.4.2 – Avaliação da viabilidade dos anéis e teste do endotélio

Após o período de estabilização de 60 minutos, foi administrado ao banho Cloreto de Potássio (KCl 125 mM) para verificar a viabilidade do músculo liso vascular por meio da atividade contrátil induzida por despolarização, onde aguardou-se um tempo de aproximadamente cinco minutos, para que os anéis atingissem uma variação de um grama de força a partir do valor basal (1,0g). Em seguida, os anéis foram lavados, ou seja, a solução de Krebs de cada cuba foi trocada por cerca de quatro vezes, até retornarem a tensão basal de repouso. Assim, os anéis que não obtivessem tal contração eram descartados.

Após trinta minutos de estabilização uma nova dose de KCl (125 mM) foi adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima vascular, desta vez sendo aferida após 30 minutos da adição. Esta contração máxima, foi determinada para conferir a viabilidade do músculo. Logo, anéis que não alcançassem tensão de força maior que 2g eram descartados. Este rigor de descarte foi importante, pois as curvas de contração foram padronizadas pela alteração de força medida em gramas. Ao atingir o platô, os anéis foram novamente lavados, aproximadamente quatro vezes, para que retornassem o valor basal de repouso e depois de 30 minutos, obedecendo o intervalo de estabilização dos anéis, foi testada a integridade do endotélio vascular, realizando uma pré-contracção à fenilefrina (FE 10 μ M) e verificado o relaxamento frente a acetilcolina (ACh 10 μ M). Considerou-se viável o anel que obteve contração a fenilefrina maior que 60% da contração máxima do KCl e relaxamento de pelo menos 80% da resposta contrátil a fenilefrina (Figura 9).

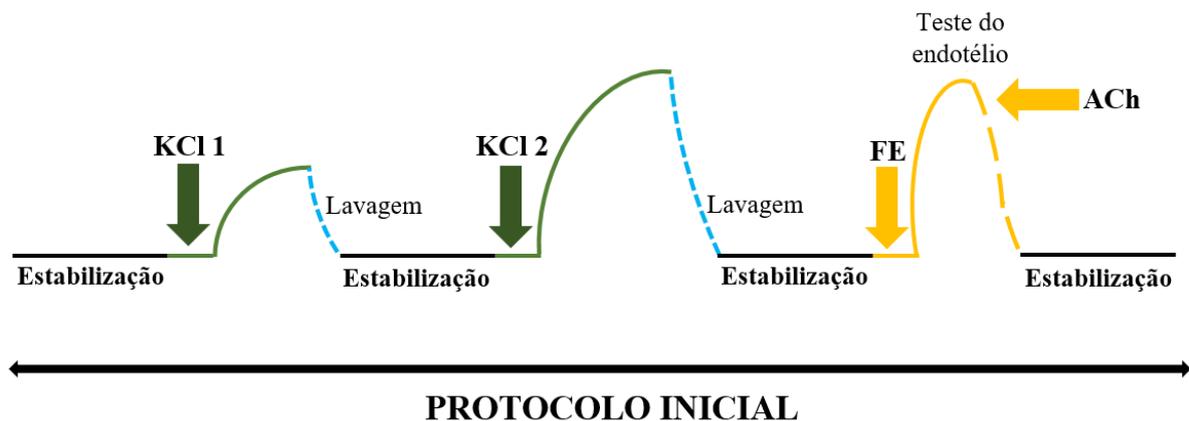


Figura 6 - Representação esquemática do protocolo inicial de reatividade vascular

4.4.3 - Avaliação das curvas de FE, ACh e NPS na presença do látex

Após a avaliação do endotélio, os anéis foram lavados para retorno ao basal e após 30 minutos obedecendo novamente ao intervalo de estabilização, três grupos de animais randomizados, foram usados para idealização de 3 protocolos diferentes. Um grupo designado para curvas de FE (10^{-10} a 10^{-5} M) (Figura 10 A), outro grupo para curvas de ACh (10^{-10} a 10^{-5} M) (Figura 10 B) e por fim, um para curva de Nitroprussiato de sódio (NPS) (10^{-11} a 10^{-5} M) (Figura 10 C). Todas as curvas foram realizadas na ausência de aveloz, sendo então nomeadas como curva controle (CT) e na presença de aveloz, nomeada como (AV), e essas curvas (antes e depois de

aveloz) foram idealizadas no mesmo anel, a fim de realizar uma comparação pareada. Sendo assim, para uma análise mais fiel dos dados obtidos, um controle temporal foi realizado. (Fig 7).

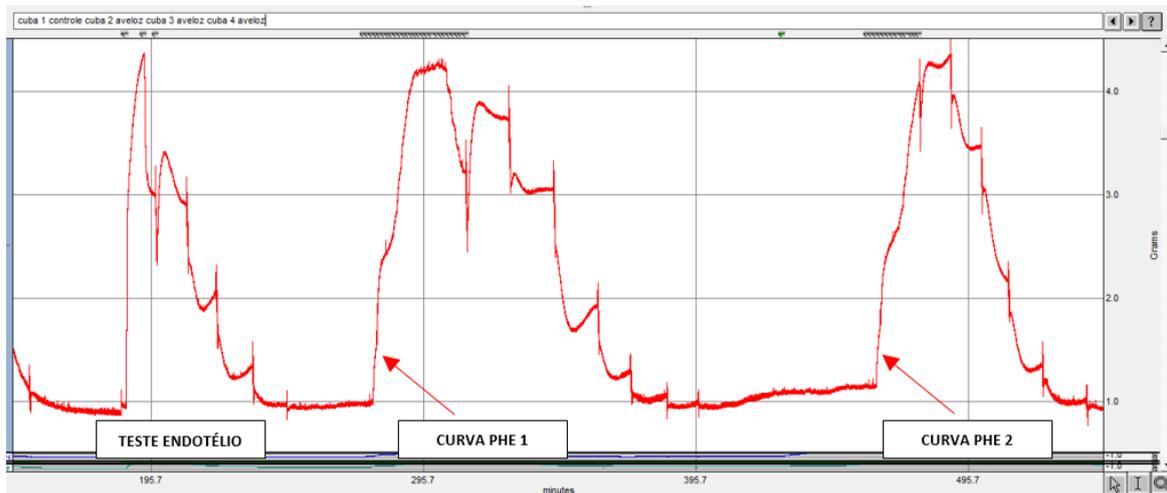
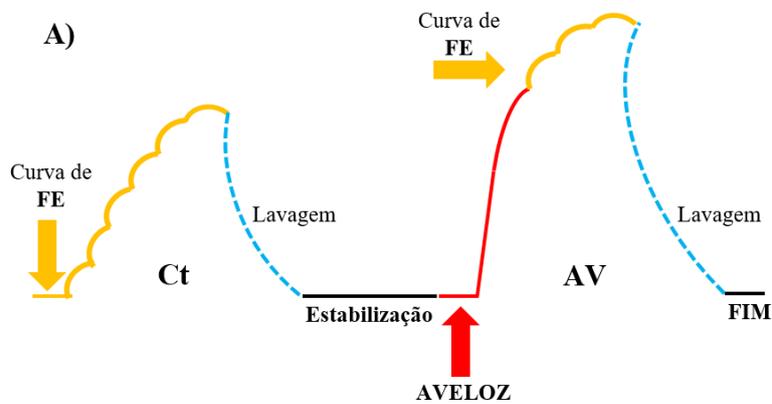


Figura 7 – Registro típico de duas curvas controle de contração a fenilefrina (apontados na seta) a fim de comparação temporal.

Uma dose de 500 ng (132µl) do extrato bruto da *E. tirucalli* em meio aquoso, foi administrada ao banho, com os anéis em seu estado basal (1,0g) e após 30 minutos as curvas de FE, ACh e NPS, foram novamente realizadas na presença do látex. O esquema abaixo, representa a idealização deste protocolo:



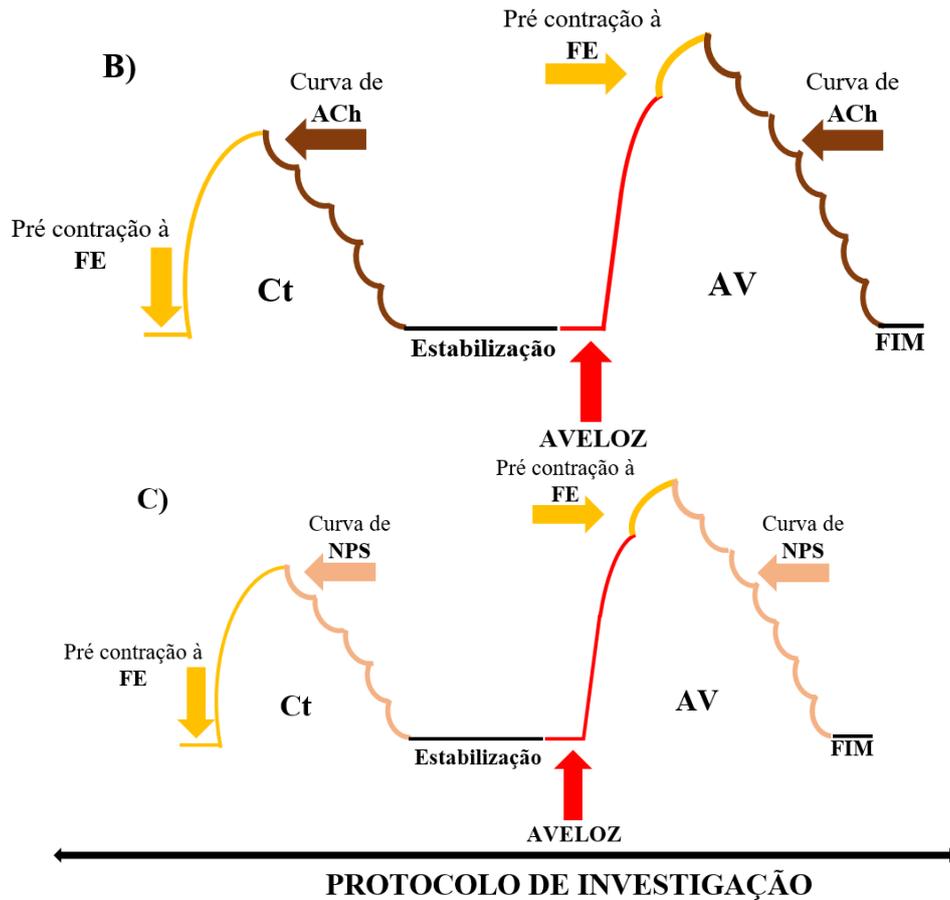


Figura 8 - Representação esquemática do protocolo de investigação dos efeitos do látex da *E. tirucalli* em curvas de FE (A), ACh (B) e NPS (C).

4.4.4 - Avaliação das curvas de FE, ACh e NPS na presença do látex frente a bloqueios determinados

A fim de avaliar alguns possíveis mecanismos da *E. tirucalli* envolvidos nas respostas de relaxamento e contração, foi idealizado 2 bloqueios farmacológicos. Esses bloqueios foram realizados após a estabilização da curva CT. Logo, 20 minutos antes da administração do látex, a incubação do bloqueio foi realizada (Figura 11).

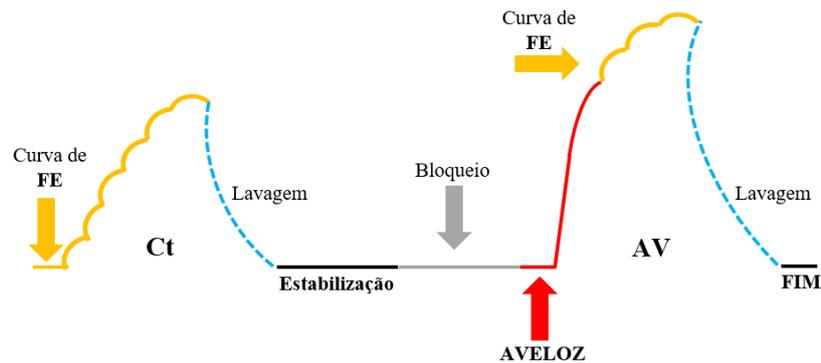


Figura 9 - Representação esquemática do protocolo de investigação dos efeitos do látex da *E. tirucalli* em curvas de FE, ACh e na presença de bloqueio farmacológico.

4.4.5 - Avaliação da participação da via $\alpha 1$ adrenérgica na contração via FE

Para avaliar a via $\alpha 1$ -adrenérgica na curva concentração resposta à FE, utilizou-se 10 nM de prazosina, um antagonista dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgico, 20 minutos antes da curva de FE.

4.4.6 - Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento vascular dependente de endotélio

Para avaliar a via de relaxamento do óxido nítrico no relaxamento vascular dependente de endotélio, foi utilizado um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS), N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME 100 μ M), 20 minutos antes da curva de ACh.

4.4.7 - Investigações com látex hidrolisado da *E. tirucalli*

A fim de aumentar os conhecimentos sobre a *E. tirucalli*, idealizamos os protocolos citados acima na presença do látex da *E. tirucalli* na forma hidrolisada. A hidrólise teve por objetivo, quebrar a esterificação do éster de forbol. O éster de forbol é capaz de mimetizar a cadeia de ácido graxo de DAG e se ligar na PKC. Por sua vez, a inativação dos ésteres de forbol impede que suas ações intra-celulares sejam realizadas. O látex hidrolisado foi fornecido pelo Prof. Ricardo Kuster, responsável pelos estudos químicos sobre Aveloz, no Laboratório de Cromatografia, localizado no Núcleo de Competências em Química do Petróleo-UFES campus Goiabeiras/Vitória-ES.

5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As curvas dose-resposta foram calculadas por regressão não linear (Prism 8.0.2, Graphpad, Inc., San Diego, CA, EUA). As respostas vasoconstritoras à fenilefrina foram expressas como % em relação ao basal e em tensão em gramas. Utilizou-se (ANOVA) duas vias para medidas repetidas, a análise inferencial foi realizada por teste t de Student pareado para comparação entre duas médias ou ANOVA de 1 via, quando apresentado diferença significativa, esta análise foi seguida de *post hoc* de Bonferroni e Tukey. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

6 – RESULTADOS

6.1 – Análise do látex da *E. tirucalli*

A figura 12 abaixo, apresenta os triterpenos majoritários presentes no látex da *E. tirucalli*. Os espectros de massas de ambas as estruturas (euphol: 23.279) e (tirucallol: 23.810) são iguais, pois as estruturas são estereoisoméricas. Estes dois triterpenos são apontados pela literatura por serem os principais responsáveis por diferentes efeitos farmacológicos. Os demais picos pequenos que aparecem no cromatograma, são triterpenos minoritários.

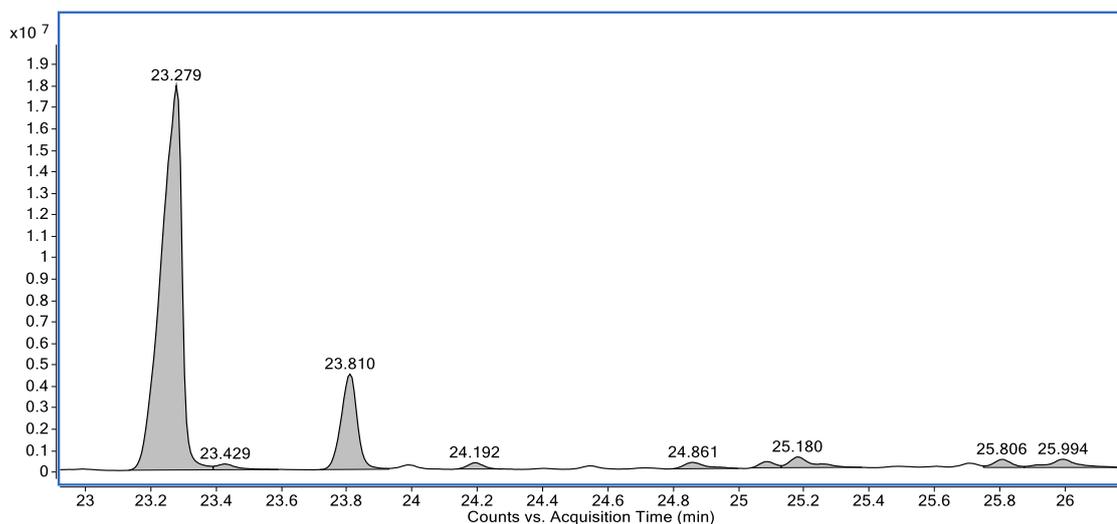


Figure 10 - Cromatograma GC-MS apresentando triterpenos presentes no látex de *E. tirucalli* respectivamente os majoritários: euphol: 23.279; tirucallol, e minoritários: 23.810; 24.192; 24.861; 25.180; 25.806; 25.994

Os álcoois diterpênicos ingenol, forbol e 4-deoxiforbol são descritos para *E. tirucalli* que, por esterificação natural, originam os ésteres diterpênicos. No látex foram detectados dois diterpenos principais: ingenol e 4-deoxiforbol e a tabela abaixo apresenta os ésteres derivados destes diterpenos.

Tabela 1 - Ésteres diterpênicos obtidos por ESI (-) do extrato bruto do látex de *E. tirucalli*

| [M-H] ⁻ | Fórmula Molecular | Intensidade (%) | Erro (ppm) | DB E | Proposta de substância |
|--------------------|--|-----------------|------------|------|--|
| 495,27586 | C ₃₀ H ₃₉ O ₆ | 1,6 | -1,31 | 11,0 | 3-(2,4,6-decatrienoato) de Ingenol |
| 497,29151 | C ₃₀ H ₄₁ O ₆ | 0,58 | -1,31 | 10,0 | 3-(2,4-decadienoato) de Ingenol |
| 511,27072 | C ₃₀ H ₃₉ O ₇ | 33,94 | -1,2 | 11,0 | 12-octa-2,4-dienoato, 13- acetato-4-deoxiforbol |
| 531,25258 | C ₃₀ H ₄₀ ClO ₆ | 9,71 | -1,3 | 11,0 | Aduto de cloro ingenol 3-(2,4-6)-decadienoato |
| 547,24743 | C ₃₀ H ₄₀ ClO ₇ | 100 | -1,15 | 11,0 | Aduto de 12-octa-2,4-dienoato, 13- acetato-4-deoxiforbol |
| 557,26832 | C ₃₂ H ₄₂ ClO ₆ | 3,41 | -1,4 | 12,0 | Aduto de cloro ingenol 3-(2,4-6-8)-dodecatetraenoato |
| 559,28411 | C ₃₂ H ₄₄ ClO ₆ | 2,43 | -1,64 | 10,0 | Aduto de cloro ingenol 3-(2,4-6)-dodecadienoato |
| 583,28411 | C ₃₄ H ₄₄ ClO ₆ | 0,96 | -1,57 | 13,0 | Aduto de cloro ingenol 3-(2,4-6-8-10)-tetradecapentaenoato |

Se tratando de moléculas hidrolisáveis, esses ésteres foram submetidos as reações de hidrólises ácida e alcalina com o intuito de obter somente os diterpenos, através da clivagem da ligação entre o ácido graxo e o álcool diterpênico. A translocação da PKC para a membrana, provém da hidrofobicidade da cadeia lateral do éster de forbol, e de sua capacidade de incorporar na membrana (Bertolini, 2003). Logo, ao realizar uma hidrólise, a cadeia hidrofóbica é desfeita e interrompe a ligação deste diterpeno a PKC. A figura 13 abaixo, compara os picos intensos das duas reações de hidrólise ácida e básica, com os picos do extrato bruto do látex.

Os sinais correspondentes de ésteres diterpênicos estavam praticamente ausentes nos espectros hidrolisados, apresentando somente sinais como m/z 511,27049 e m/z 537,28594 com intensidades de 0,76% e 0,51%, respectivamente, nomeados como 12-octa-2,4-dienoato,13-acetato-4-deoxiforbol e 12-deca-2,4,6-trienoato,13-acetato-4-deoxiforbol. Importante salientar que a figura ainda apresenta sinais intensos do íon m/z 511,27082 também representado pelo seu aduto de cloro em m/z 547,24743 sendo este, o sinal mais intenso. Esses sinais estavam praticamente ausentes nos espectros onde as amostras foram hidrolisadas. Logo, pode-se inferir que ocorreu a hidrólise nas duas condições.

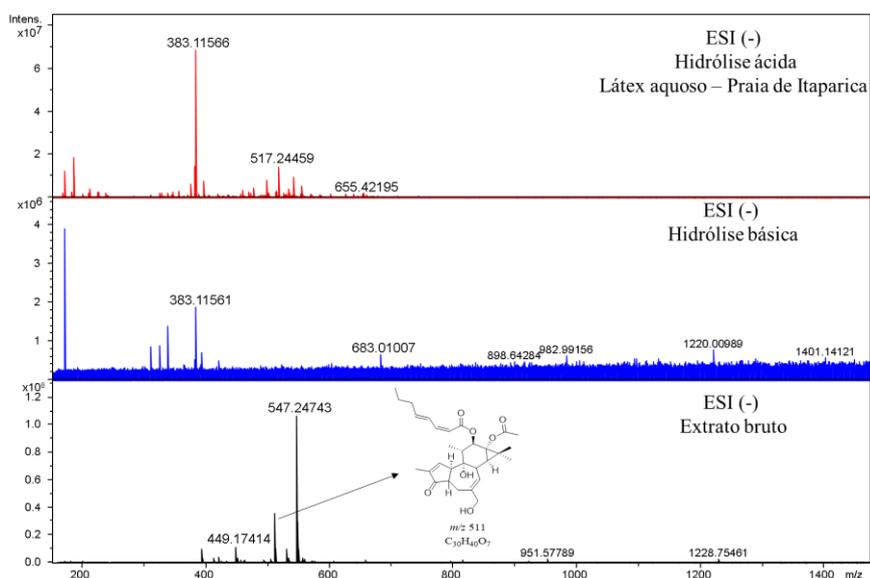


Figura 11- ESI (-) FT-ICR MS das hidrólises realizada no látex aquoso da *E. tirucalli*. De baixo para cima: (em preto), látex bruto com picos evidenciando a presença de éster de forbol (449.17414) e seu aduto de cloro (547.24743); (em azul), látex com hidrólise básica evidenciando picos com presença de forbóis (383.11561, 683.01007, 898.64284, 982.99156); (em vermelho), látex com hidrólise ácida evidenciando picos com presença de forbóis (383.11566, 517.24459, 655.42195).

A reação de hidrólise ocorre com a adição do nucleófilo à carbonila do grupo éster formando um intermediário tetraédrico. Assim, os elétrons do par solitário no oxigênio carregado negativamente reestabelecem a ligação dupla da carbonila e o íon diterpênico é liberado restaurando a energia de estabilização carboxílica (I). Em (II) sugere-se que o íon diterpênico reage com uma molécula de água para fornecer o álcool diterpênico e o íon hidróxido, que por sua vez remove um próton do ácido graxo formado para gerar o ânion de acetato de ácido graxo ainda mais estabilizado, onde a carga negativa é deslocalizada igualmente em seus dois átomos de oxigênio.

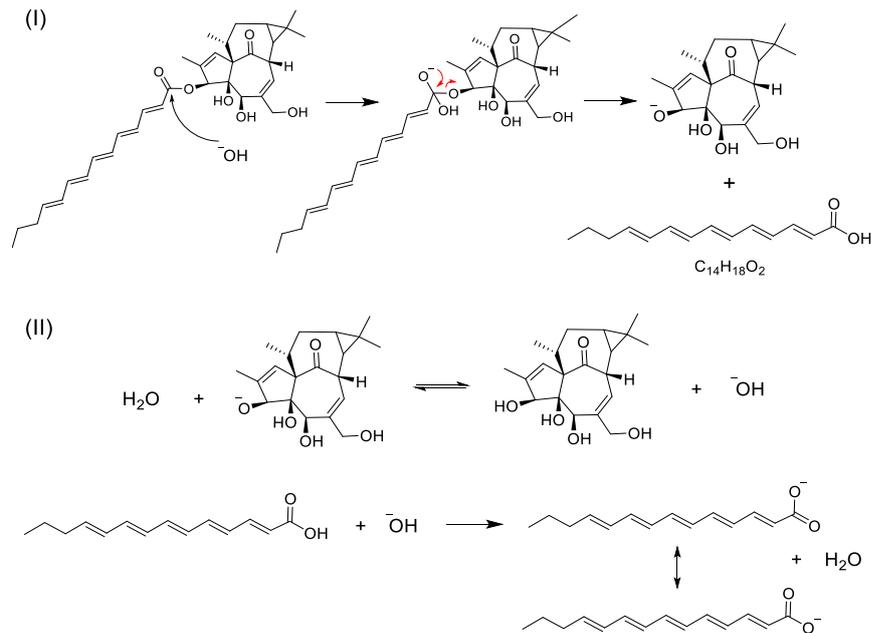


Figura 12- Esquema representando o mecanismo de hidrólise básica dos ésteres diterpênicos

6.2 - Padronização da dose

Para determinar a dose a ser utilizada no ensaio da função vascular, diferentes concentrações do látex da *E. tirucalli* foram adicionadas ao banho. A tabela 2 apresenta as concentrações administradas bem como a resposta vascular. A menor concentração do látex, que provocou resposta vascular sustentada, foi a de 500 nanogramas (ng) no qual equivale a 132 μ l/ml do látex bruto da *E. tirucalli*.

Tabela 2- Doses do látex da *E. tirucalli*, investigadas para obter a menor concentração capaz de desenvolver resposta vascular.

| (ng) | Unidade de volume (μ l) | Resposta vascular tensão de força (g) |
|------------|------------------------------|---|
| 1000 | 264 | $\geq 5,10$ g platonizou |
| 900 | 237 | $\geq 4,80$ g platonizou |
| 800 | 210,5 | $\geq 4,40$ g platonizou |
| 700 | 184,2 | $\geq 4,21$ g platonizou |
| 600 | 157,9 | $\geq 4,09$ g platonizou |
| 500 | 132 | $\geq 4,03$g platonizou |
| 400 | 105,26 | $\leq 3,07$ não sustentou |
| 300 | 79 | $\leq 2,90$ não sustentou |

| | | |
|-----|-------|-----------------------|
| 200 | 52,63 | ≤ 2,20g não sustentou |
| 100 | 26,31 | ≤ 1,61g não sustentou |
| 10 | 2,63 | ≤ 1,24g não sustentou |
| 1 | 0,26 | Sem resposta vascular |

6.3 – Resposta vascular após incubação do látex da *E. tirucalli* (Aveloz)

Para a realização das curvas de FE, ACh e NPS na presença da *E. tirucalli*, os anéis de aorta foram submetidos a exposição aguda do látex 30 minutos antes. Como podemos observar na figura 15, os anéis de aorta apresentaram uma notável contração na presença do látex (R_{máx} Ct 1.018±0.03g vs. AV 4.35±0.38g, teste *t* Student).

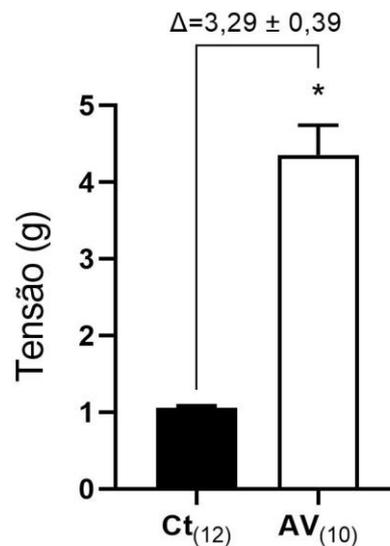


Figure 13 - Gráfico representando a mudança no basal dos anéis de aorta após 30 minutos na presença de 500ng (132 µl/ml) do látex da *E. tirucalli* (barra em branco), comparado ao basal do controle (barra em preto). Os resultados são expressos como média ± EPM. **p*<0,05 Ct vs. AV, usou-se teste *t* de Student.

6.4 – Avaliação da reatividade vascular à fenilefrina

Para avaliar a resposta contrátil dos anéis de aorta após a administração do látex da *E. tirucalli*, foram feitas curvas de concentração resposta a fenilefrina, um agonista α1- adrenérgico (Figura 14A). Conforme demonstrado na figura 14B, após a administração do látex, o grupo AV não foi capaz de responder a curva de fenilefrina com eficiência, quando comparamos ao controle.

Este resultado fica muito evidente e significativo a partir da dose de 10^{-8} a 10^{-2} de Fenilefrina. (R_{máx} Ct $141.9 \pm 3.06\%$ vs. AV $107.9 \pm 0.94\%$, teste *t de Student*).

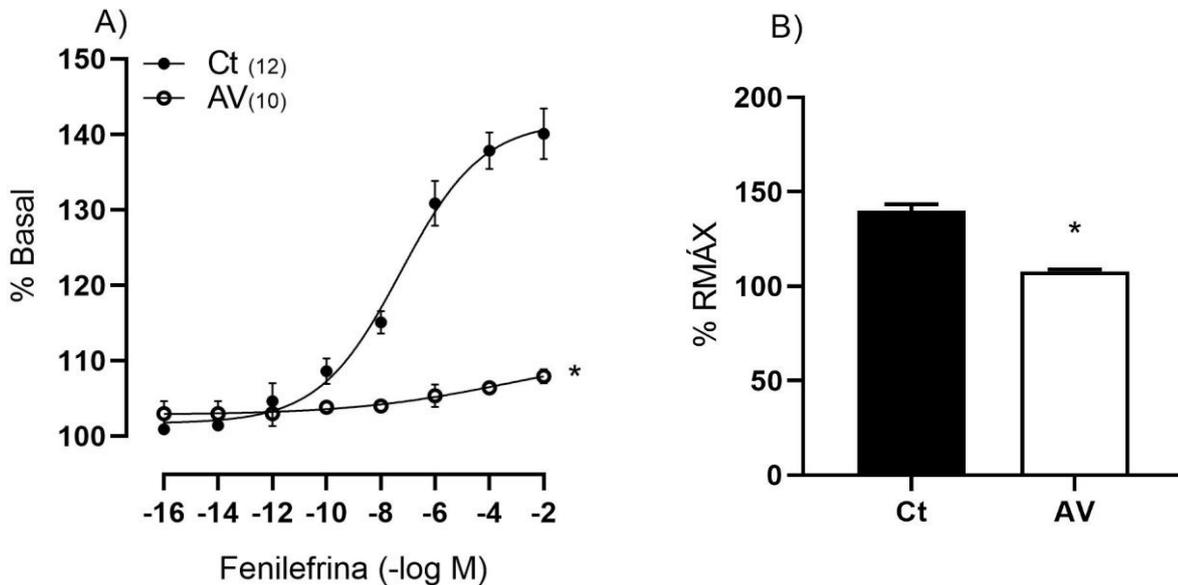
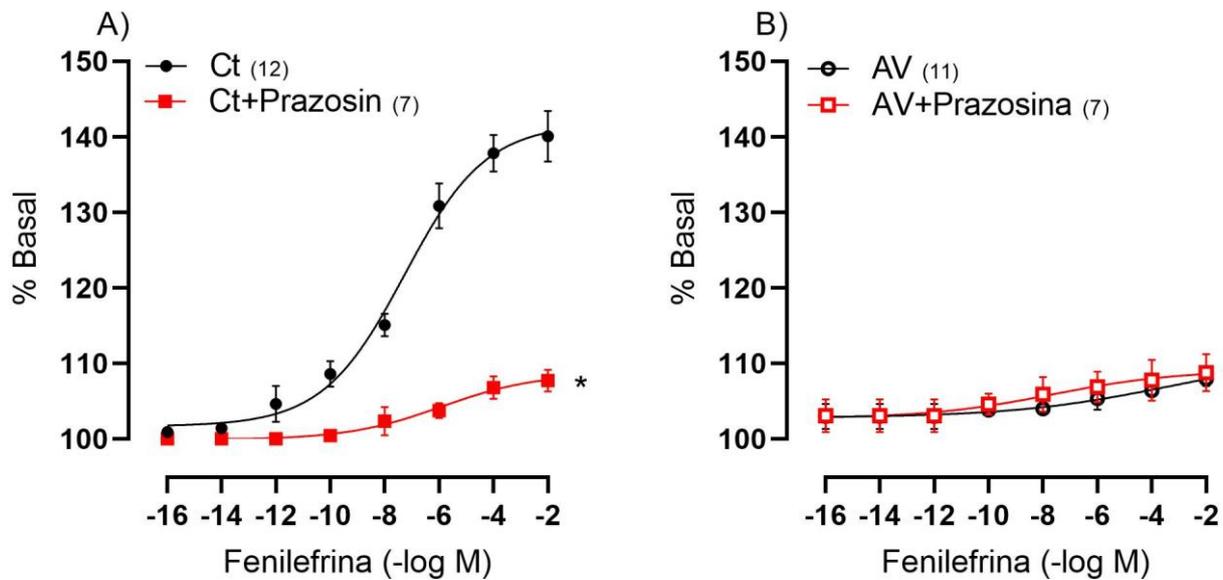


Figure 14 - Curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos Wistar (A). Em (B) resposta máxima. O N° de animais está na legenda. Abreviações: Controle (CT); Aveloz (AV). Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ CT vs. Aveloz usando ANOVA duas vias e *post hoc* de Bonferroni entre as curvas do gráfico A, em B teste *t de Student*.

6.5- Avaliação da participação da via $\alpha 1$ adrenérgica na contração

A participação da via $\alpha 1$ adrenérgica na contração, foi determinada pela incubação com prazosina, um inibidor lentamente reversível. É possível notar que nos animais controle (Figura 15A) houve diferença significativa na resposta máxima (R_{máx}. Ct $142.7 \pm 4.92\%$ vs. Ct+prazosina $107.7 \pm 1.42\%$, ANOVA uma via). Contudo, na presença do látex, o bloqueio não apresentou diferença significativa (R_{máx} AV $107.9 \pm 0.94\%$ vs. AV+Prazosina. $108.8 \pm 2.46\%$, ANOVA uma via) figura 15B.



C)

| Parâmetros | CT | CT+prazosina | AV | AV+prazosina |
|---------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| R_{max} (%) | 142.7±4.92% | 107.7±1.42%* | 107.9±0.94%* | 108.8±2.46* |
| AUC (a.u.) | 1631±10.49 | 1434±6.0* | 1462±8.59* | 1477±23.47* |

Figure 15 - Participação da via α_1 adrenérgica na contração do músculo liso vascular. Em (A) curva de contração CT vs. CT+prazosina, em (B) curva de contração AV vs. AV+Prazosina. Em (C) Representação da diferença entre as áreas abaixo da curva (AUC) e R_{max} . O N° de animais está na legenda. Abreviações: Controle (CT); Aveloz (AV). Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ CT vs. Aveloz, usando ANOVA duas vias e *post hoc* de Bonferroni, em C, ANOVA uma via e *post hoc* de Tukey.

6.6 – Avaliação da reatividade vascular à fenilefrina na presença do látex hidrolisado (AVH)

A fim de verificar se as contrações obtidas em nossas investigações, estão relacionadas com ésteres de forbol contidos no látex, nosso grupo de estudos, em parceria com o professor Ricardo Kuster, buscou inativar os ésteres de forbol por meio de hidrólise. Ao adicionar o látex nas cubas, não foi verificado aumento do tônus basal como nas análises anteriores (Figura 16B).

Após o período de exposição ao látex hidrolisado, foram feitas curvas de concentração resposta à fenilefrina, um agonista $\alpha 1$ - adrenérgico para avaliar a resposta contrátil dos anéis de aorta. Conforme demonstrado na figura 16A, após a administração do látex, o grupo AVH apresentou redução significativa na contração, modificando a resposta máxima, quando comparado ao grupo AV ($R_{m\acute{a}x}$ AV $5.68 \pm 0.75g$ vs. AVH $2.03 \pm 0.29g$, ANOVA 1 via), Figura 18B).

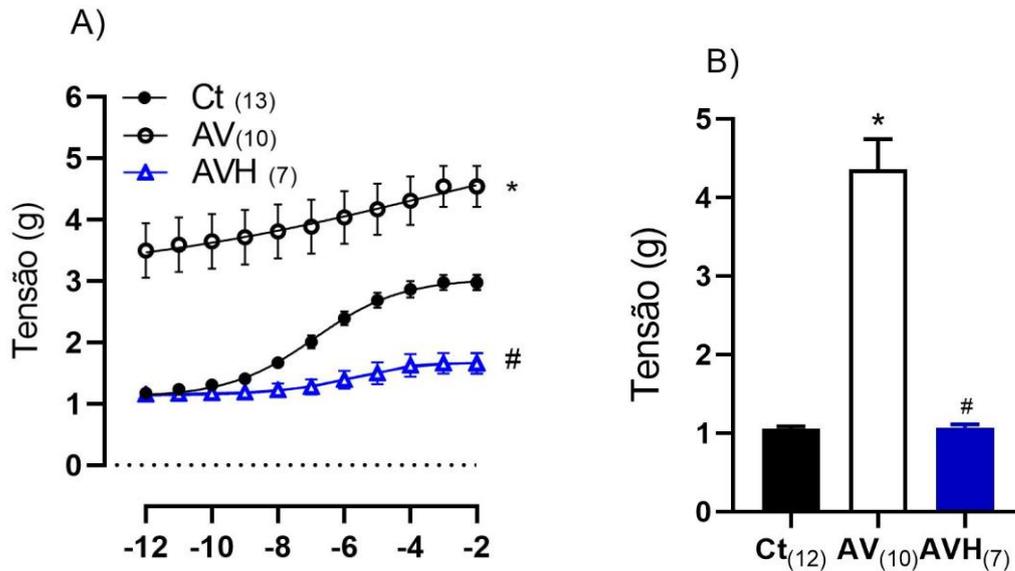


Figure 16 - Curva concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos Wistar (A). Em (B) basal dos anéis de aorta após 30 minutos na presença de 500ng (132 μ l/ml) do látex não hidrolisado (barra branca) e do látex hidrolisado (barra azul) da *E. tirucalli*, comparado ao basal do controle (barra em preto). O N° de animais está na legenda. Abreviações: Controle (CT); Aveloz (AV); Aveloz hidrolisado (AVH). Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ CT vs. Aveloz; # $p < 0,05$ AV vs. AVH, usando ANOVA duas vias e *post hoc* de Bonferroni, em B ANOVA 1 via *post hoc* de Tukey.

6.7- Avaliação do relaxamento vascular induzido por ACh

Para avaliar a função endotelial após a administração do látex da *E. tirucalli*, foram feitas curvas de relaxamento à ACh, um agonista de receptores muscarínicos (Figura 17A). Na figura 17B, podemos observar que o relaxamento vascular dependente de endotélio do grupo Aveloz, teve prejuízo de função quando comparado ao controle ($R_{m\acute{a}x}$. Ct $85.23 \pm 1.77\%$ vs. AV $51 \pm 10.45\%$ teste *t Student*).

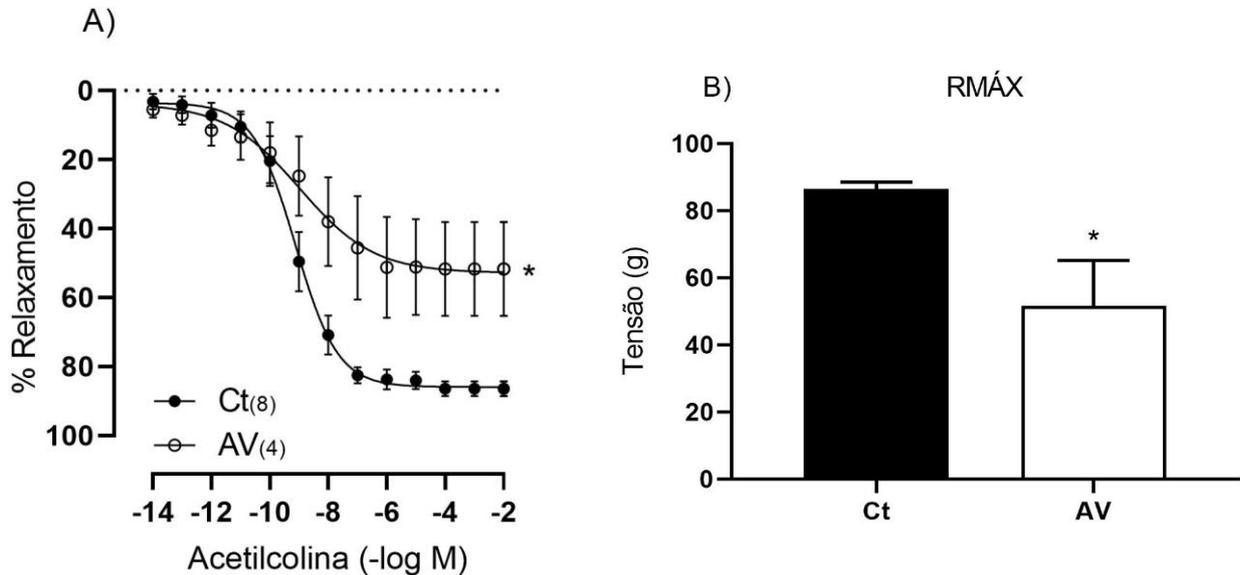
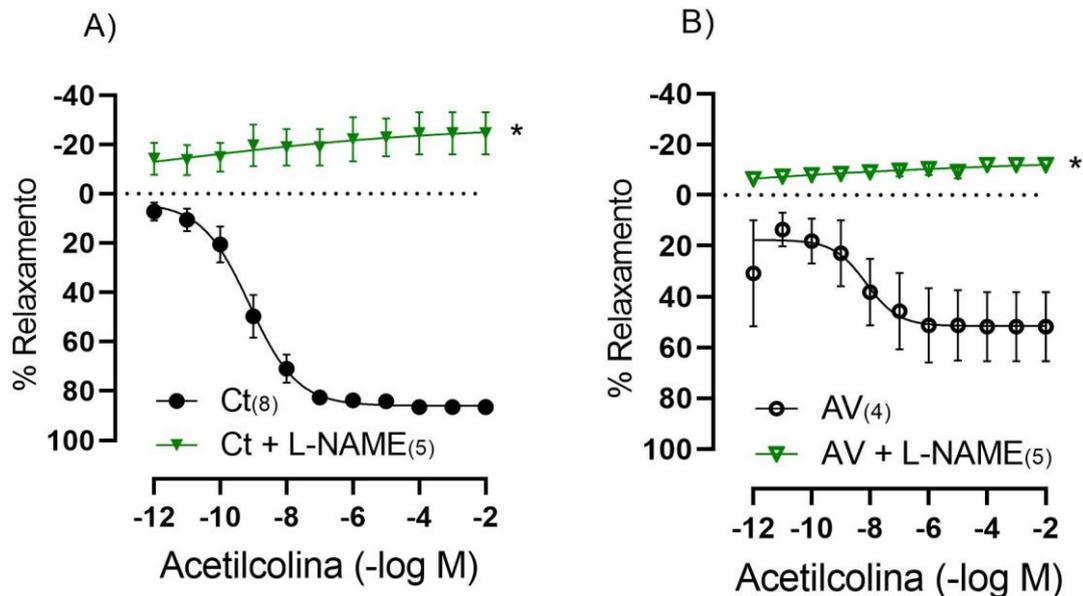


Figure 17 - Curva de relaxamento concentração-resposta à acetilcolina em segmentos de artéria aorta torácica de ratos Wistar (A). (B) resposta máxima. Abreviações: Controle (Ct), Aveloz (AV). Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ CT vs. Aveloz, usando ANOVA duas vias e post hoc de Bonferroni em B teste t de Student.

6.8 - Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento vascular dependente de endotélio

A participação da via do óxido nítrico no relaxamento vascular via ACh, foi determinada pela incubação com L-NAME, um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Conforme a figura 18A, o bloqueio aboliu toda a resposta vasodilatadora de ambos os grupos Rmáx (Ct $85.84 \pm 1.86\%$ vs. Ct+L-NAME $-6.11 \pm 4.91\%$, ANOVA uma via) e Rmáx. (AV 51.69 ± 13.49 vs. AV+L-NAME $-11.30 \pm 2.43\%$, ANOVA uma via). A diminuição do relaxamento provocado pelo L-NAME representa a participação do NO na vasodilatação. Reforçamos portanto, que o NO é o principal vasodilatador em anéis de aorta, como amplamente descrito na literatura, e que em nossos achados ele se encontra em menor biodisponibilidade no grupo AV.



C)

| Parâmetros | CT | CT+L-NAME | AV | AV+L-NAME |
|---------------|-------------|--------------|--------------|---------------|
| R_{max} (%) | 75.67±3.865 | -6.15±19.69* | 51.69±13.49* | -11.30±2.43*# |
| AUC (a.u.c) | 556.4±35.35 | 221.7±86.05* | 411.2±93.79 | 100.1±18.40*# |

Figure 18 - Participação da via da enzima óxido nítrico sintase no relaxamento dependente de endotélio. Em (A) curva de contração CT vs. CT+L-NAME, em (B) curva de contração AV vs. AV+L-NAME. Em (C) Representação da diferença entre as áreas abaixo da curva (AUC's) e R_{max} . O N° de animais está na legenda. Abreviações: Controle (CT); Aveloz (AV). Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ CT vs. Aveloz, # $p < 0,05$ AV vs. Aveloz+L-NAME. Em A e B, usando ANOVA duas vias e *post hoc* de Bonferroni, em C, ANOVA uma via e *post hoc* de tukey.

6.9 - Avaliação do relaxamento vascular induzido por NPS

Para avaliar o desempenho do músculo liso vascular na vasodilatação após a administração do látex da *E. tirucalli*, foram feitas curvas de relaxamento a NPS, um doador de NO (Figura 19A). Na figura 19B, podemos observar que a resposta máxima no grupo AV não apresentou diferença significativa, quando comparado ao Ct (Rmáx 100.0±0.00% vs. AV 87.77±8.50%), contudo houve uma redução de efeito nas doses intermediárias.

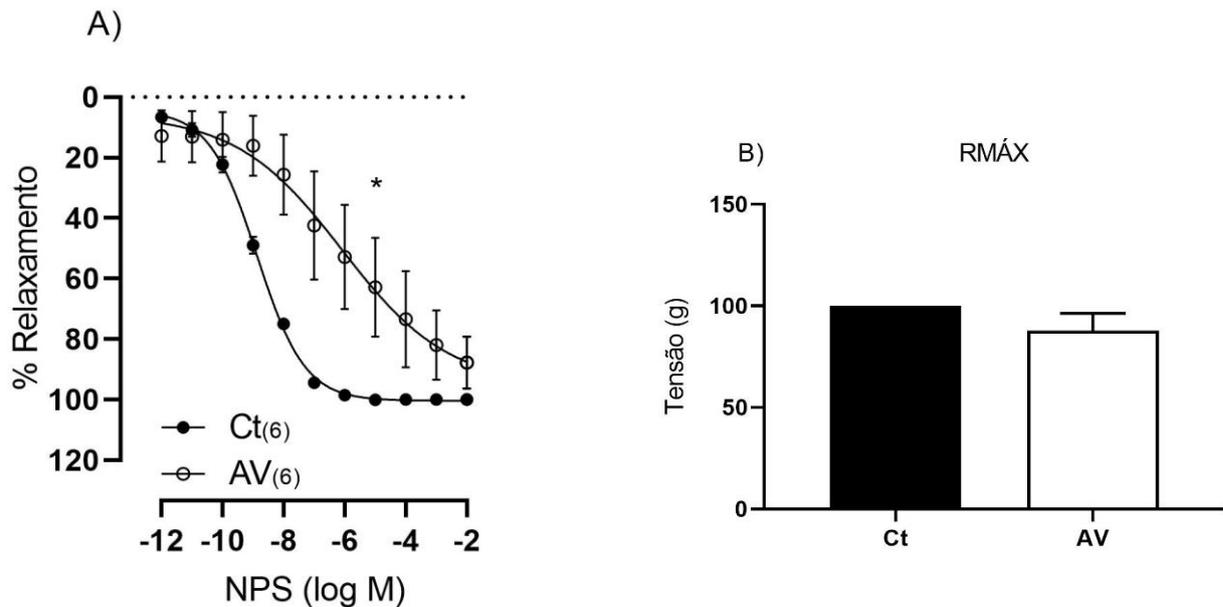


Figure 19 - Curva de relaxamento concentração-resposta à nitroprussiato de sódio em segmentos de artéria aorta torácica de ratos Wistar (A). (B) resposta máxima. Abreviações: Controle (CT); Aveloz (AV). O N° de animais está na legenda. Os resultados são expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$ CT vs. Aveloz usando ANOVA duas vias e *post hoc* de Bonferroni em B teste t de Student.

7- DISCUSSÃO

Este estudo caracterizou os efeitos agudos do látex aquoso da *E. tirucalli* em aorta de ratos normotensos. Apresentou evidências de que o látex exerce uma potente vasoconstrição possivelmente devido a ação dos ésteres diterpênicos presentes em sua composição. Além deste resultado, o látex ainda demonstra causar prejuízo no relaxamento induzido por ACh.

Varrichio em 2008, apresentou um estudo sobre cicatrização de feridas, onde em altas doses o látex aquoso da *E. tirucalli* poderia causar vasoconstrição, além de hipóxia tecidual e alterações na coagulação sanguínea, conduzindo futuramente a um quadro de dano hepático. Nosso estudo, é o primeiro a demonstrar que em nanogramas, o látex da *E. tirucalli* provoca vasoconstrição sustentada em aortas de rato.

Atualmente, sabe-se que existem duas formas de obter resposta contrátil no músculo liso vascular, por meio do acoplamento eletromecânico ou acoplamento farmacomecânico. Todavia, em qualquer uma das formas, o Ca^{+2} está presente como segundo mensageiro, sendo essencial na via de sinalização e na proliferação celular do músculo liso (Hill-Eubanks et al., 2011). O cálcio atua na contração, vindo da principal reserva intracelular chamada de retículo sarcoplasmático, ou por influxo do meio extracelular através dos canais de cálcio da membrana.

No acoplamento eletromecânico, a contração se dá devido a uma mudança de potencial da membrana, ou seja, uma despolarização da membrana em consequência a um aumento de K^{+} no meio externo ou pela ligação indireta de algum agonista ao seu receptor e consequente abertura de canais voltagem dependentes (VOCs) (Rembold, 1996). Já no acoplamento farmacomecânico, a contração se dá através do aumento de dois segundos mensageiros: 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). Estes, são formados quando um agonista se liga ao receptor da proteína Gq que por sua vez ativa a clivagem da fosfolipase C (PLC), resultando nos dois produtos citados anteriormente. IP3 se liga ao seu receptor de IP3 localizado no retículo sarcoplasmático, liberando cálcio para a contração e o aumento de cálcio faz a PKC se translocar do citosol até a membrana e ligar-se em DAG. (Garret & Grisham, 1995).

A elevação na quantidade de cálcio intracelular, favorece sua ligação na calmodulina (CaM) citosólica, formando o complexo cálcio-calmodulina $[(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}]$ que por sua vez, ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) (Guyton & Hall, 2011). O complexo $[(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM-MLCK}]$ constitui a forma ativa da MLCK, que consequentemente fosforila a cadeia leve da miosina (MLC), e esta adição do grupo fosfato permite a interação com os filamentos de actina desencadeando o mecanismo de ciclicização das pontes cruzadas entre os filamentos de actina resultando na contração (Somlyo & Somlyo, 1994; Guyton & Hall, 2011).

Neste trabalho, nós observamos que ao administrar uma determinada concentração (13mg/ml) do látex aquoso em segmentos de aorta, uma contração crescente e sustentada ocorria. E curiosamente, notamos que após a platonização da contração, ao se administrar ao banho concentrações maiores de látex, a resposta vascular não alterava. Logo, nosso objetivo foi investigar a partir de que dose, ou seja, qual seria a menor dose, capaz de provocar respostas vasculares, e encontramos que esta dose seria a de 500ng (132 μ l/ml). A exposição por 30 minutos ao látex aquoso, provocou nas aortas um delta de contração igual a $\Delta = 3,29 \pm 0,39$ g de força (Figura 13). Todavia, após esse tempo, quando os anéis foram submetidos a curva de concentração resposta a fenilefrina, não foram capazes de responder com eficiência as doses crescentes deste fármaco (Figura 14A).

Trabalhos anteriores, vem demonstrando que os ésteres diterpênicos seriam o princípio ativo capaz de desenvolver reações biológicas nestas concentrações. Em 1978, Hecker observou que 100% dos camundongos em que ele administrou éster de forbol em concentrações nanomolares, desenvolveram papilomas. Savineau e colaboradores em 1991, quando também usaram doses nanomolares, apresentaram pela primeira vez, que artérias pulmonares de ratos e de humanos, são sensíveis aos ésteres de forbol na concentração nanomolar. Ele notou que os ésteres provocaram potente vasoconstrição, obtendo o dobro de eficácia na resposta contrátil, quando comparado a uma contração em solução rica de potássio ou noradrenalina. Isso reforça nossas evidências de que o possível composto que estaria causando vasoconstrição em nossas aortas estudadas, seria, portanto, os ésteres diterpênicos.

O látex da *E. tirucalli* utilizado neste trabalho, apresentou em sua composição química, alguns tipos de ésteres diterpênicos como: 3-(2,4,6-decatienoato) de Ingenol, 3-(2,4-decadienoato) de Ingenol, 12-octa-2,4-dienoato 13- acetato-4-deoxiforbol, Aduto de cloro ingenol 3-(2,4-6)-decadienoato, Aduto de 12-octa-2,4-dienoato 13- acetato-4-deoxiforbol, Aduto de cloro ingenol 3-(2,4-6-8)-dodecatetraenoato, Aduto de cloro ingenol 3-(2,4-6)-dodecadienoato, e Aduto de cloro ingenol 3-(2,4-6-8-10)-tetradecapentaenoato.

A literatura vem mostrando ainda, que os responsáveis pelos efeitos diversos no sistema, seriam os ésteres do núcleo tigliano, sendo estes, os ésteres de forbol (Aya et al., 1991; Fürstenberger & Hecker, 1977; Goel et al., 2007). Isso estreita nossa investigação, a acreditar que os possíveis compostos que poderiam estar causando as respostas aqui discutidas, seriam os: 12-octa-2,4-dienoato 13- acetato-4-deoxiforbol, ou Aduto de 12-octa-2,4-dienoato 13- acetato-4-

deoxiforbol, encontrados na análise química deste trabalho. Contudo, não podemos afirmar tais análises, pois é necessário um estudo mais aprofundado com estes compostos isolados.

Uma segunda observação que tivemos, foi constatar que a via $\alpha 1$ adrenérgica não parece estar envolvida na contração promovida pelos ésteres de forbol contidos no látex. Quando incubamos prazosina nos anéis controle, percebemos que grande parte da contração induzida pela fenilefrina, envolve de fato receptores alfa-1, pois a resposta ao bloqueio foi quase inteiramente abolida (Fig. 15A). Já nos anéis incubados com aveloz, mesmo diante do bloqueio de prazosina houve marcada vasoconstrição mediada pelo látex, que acentuou a mudança no tônus basal. Todavia, quando iniciamos a curva de fenilefrina, não houve diferença significativa quando comparado ao grupo aveloz. (Fig. 15B). Gleason, em 1986, obteve o mesmo padrão de resposta, ao incubar $1.0\mu\text{M}$ de prazosina em aortas de coelho com éster de forbol, e verificou que nem a reatividade a norepinefrina, nem o influxo de cálcio (bloqueando com nifedipina), foram alterados. Ele afirma portanto, que a concentração de prazosina e nifedipina usada, já apresentou bloquear totalmente o influxo de cálcio em outros trabalhos com coelho. E que o que poderia estar acontecendo, seria o fato dos ésteres de forbol, terem a capacidade de não utilizar canais de Ca já descritos em aorta torácica de coelhos, mas, de abrir um tipo diferente de canal de cálcio. A concentração de prazosina (100 nM) usada neste trabalho, também já apresentou bloquear totalmente a via alfa 1 adrenérgica em outro trabalho (Doggrell, 1992).

Os receptores alfa adrenérgicos, são extremamente importantes na regulação do tônus vascular, pois mesmo em repouso o tônus simpático mantém um estado de contração ativado e quando esta atividade se encontra inibida, há queda significativa da PA (Simões, 2011). Inúmeros agonistas são capazes de ligar-se a este receptor e sua ativação, estimula a PLC, a transformar PIP2 em IP3 e DAG. IP3 por sua vez, atua na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático e DAG se liga à PKC promovendo o influxo de cálcio do meio extracelular. A combinação destes eventos, resultam em contração. (Garret & Grisham, 1995).

Possivelmente, as respostas encontradas na presença do látex da *E. tirucalli* não está diretamente relacionada a via da PLC. Isto porque os ésteres de forbol são moléculas anfifílicas e atravessam a membrana lipídica, ligando-se diretamente a PKC e conseqüentemente mimetizando DAG (Figura 20). Em 1982 Castagna e colaboradores, descobriram que os ésteres de forbol eram capazes de se ligar diretamente a PKC. E uma vez que o éster de forbol esteja acoplado a PKC, ela é convertida numa forma ativa constitutiva e se torna irreversivelmente

inserida na membrana. Curiosamente, a regulação de PKC+DAG e PKC+éster de forbol é a mesma, o que difere é a força e o tempo de interação (Mosior & Newton, 1995). Diferentemente de DAG, o éster de forbol dificilmente é metabolizado pela célula (Segal et al, 1975) e acaba por hiperativar a PKC disparando proliferação celular e amplificando a eficácia dos carcinogênicos, afetando a biossíntese de proteínas, a atividade de várias enzimas, o DNA, poliaminas, a diferenciação celular e expressão gênica (Goel et al., 2007). Além desses efeitos, quando acoplada ao éster de forbol, demonstra causar sustentadas contrações no músculo liso vascular (MLV) visto que a PKC está presente em altas concentrações no músculo liso (Savineau et al., 1991).

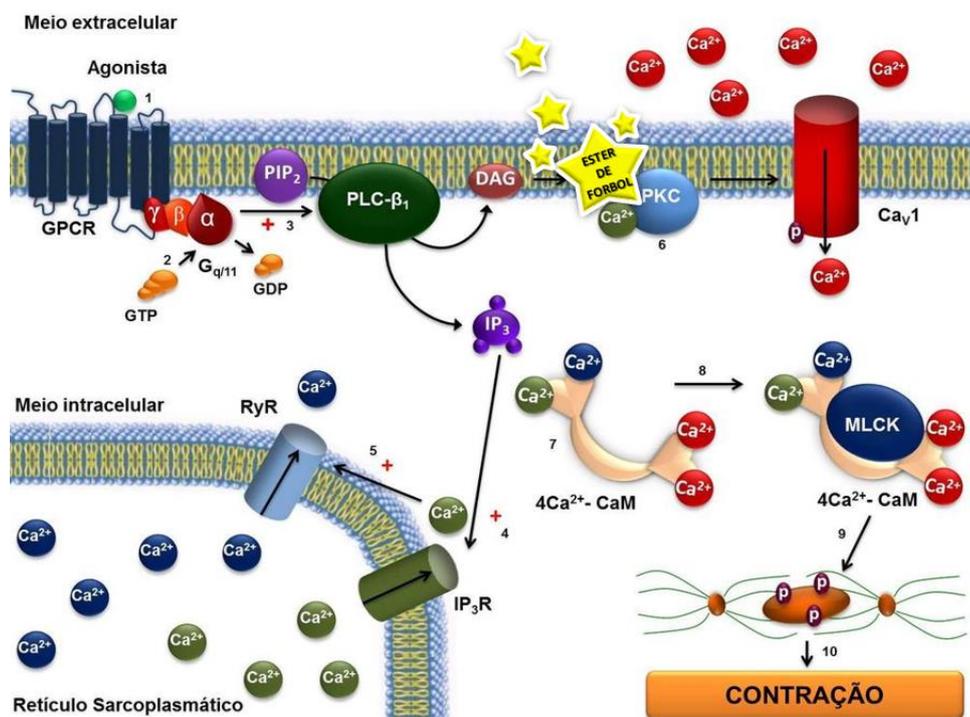


Figura 20 – Proposta de ação dos ésteres de forbol. As estrelas representam as moléculas de éster de forbol que são capazes de atravessar a membrana lipídica e ligar-se diretamente a PKC (adaptado Travassos, 2010).

Entretanto, ainda que os ésteres não pareçam utilizar desta via diretamente, ele parece influenciá-la indiretamente. A ativação de PLC também acaba por ativar a Fosfolipase A2 (PLA2), e esta ativação produz prostaglandinas (PGI2) e tromboxanos (TXA2). TXA2 mesmo produzidos em menores quantidades que PGI2, são capazes de agir sobre receptores da membrana e ativar a fosfolipase C, que vai gerar DAG e IP3 e manter desse modo, a contração do músculo liso (Waib & Burini, 1991). A degradação de DAG também permite a formação de

Ácido Araquidônico (AA) via mono ou diacilglicerol-lipase reforçando o ciclo da via de contração (Defilippo, 2009).

A literatura ainda apresenta que os ésteres conseguem ligar-se diretamente aos receptores da membrana fosfolipídica, e desenvolver: indução de ácido araquidônico, indução de respostas inflamatórias, liberação de prostaglandina, modificando as atividades dos receptores celulares, aumentando o transporte de 2-desoxiglicose, promove adesão celular alterada, inibição da ligação de fator de crescimento epidérmico para receptores de superfície celular e alteração do metabolismo lipídico (Weinstein et al., 1979).

Este trabalho apresenta limitação no esclarecimento deste mecanismo de contração, visto que não houve experimentos realizados diretamente com a PKC, todavia, trabalhos anteriores sugerem, que uma das possibilidades da ocorrência de contração via éster de forbol+PKC seria pela abertura dos canais de cálcio voltagem dependentes (Abdel-Latif, 1986; Rasmussen *et al.*, 1987). Ainda é importante ressaltar que a literatura também apresenta, que os ésteres de forbol são capazes de se ligar diretamente ao retículo sarcoplasmático, em miofilamentos, aumentando sua sensibilidade ao cálcio e ainda fosforilar a cadeia leve da miosina (Savineau et al., 1991)

Nossa terceira observação, foi notar que ao incubar os anéis com o látex hidrolisado, não houve contração igual aos anéis que foram incubados com o látex não hidrolisado. Embora a incubação dos vasos com o látex hidrolisado não tenha alterado o tônus basal dos anéis, a resposta vasoconstritora destes anéis as diferentes doses de Fenilefrina foram significativamente reduzidas quando comparadas ao grupo controle (Figura 16).

Nós ainda investigamos os efeitos do látex no relaxamento endotelial e nossa quarta observação foi um notório prejuízo do relaxamento (em torno de 28%, Figura 17). Diferentemente dos eventos da contração, o relaxamento do músculo é iniciado quando há diminuição na concentração intracelular de cálcio (Somlyo & Somlyo, 1994). Essa queda na concentração de cálcio dissocia o complexo cálcio calmodulina e a fosfatase entra em ação, desfosforilando a cadeia leve da miosina (Horowitz et al., 1996). Como na contração, o relaxamento também ocorre por eventos eletromecânicos, iniciando com aberturas de canais de K^+ causando hiperpolarização e regulando o potencial de repouso da membrana e a excitabilidade da célula lisa (Knot; Brayden; Nelson, 1996).

Os eventos farmacomecânicos do relaxamento, envolvem o aumento citosólico de dois segundos mensageiros: Adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e guanosina monofosfato cíclica (GMPc). A cAMP é produzida pela atividade da adenilil ciclase que converte adenosina trifosfato (ATP) em cAMP e GMPc é produzida em resposta a geração do óxido nítrico (NO) via endotélio, que estimula a guanilil ciclase solúvel (sGC) a transformar guanosina trifosfato (GTP) em GMPc (Murthy, 2006).

Em 2018, Palit e colaboradores mostraram que o látex possui efeito antiinflamatório ao demonstrar, em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS), diminuição da concentração de NO em concentrações de (-10, 25, 50 a 100 µg/mL). Mais tarde, Souza e colaboradores (2019) mostraram também com LPS, que o látex em baixas concentrações é capaz de inibir a produção de NO, e em altas concentrações (200 µg/mL) conseguiu assemelhar-se a inibição do L-NAME, exercendo assim atividade imunomoduladora.

Poucos trabalhos parecem relacionar os efeitos do látex da *E. tirucalli* com níveis de NO no sistema. Nosso trabalho, portanto, é o primeiro a demonstrar em aortas de rato que a redução de NO causada pelo aveloz, ocasionou prejuízo de relaxamento à ACh.

Em condições normais, o endotélio vascular é visto como um balanço entre agentes vasoconstritores e vasodilatadores, moléculas pró oxidantes, pró e anti-inflamatórias (Donato et al., 2009). O relaxamento provocado na célula muscular lisa via NO – GMPc é um dos mecanismos mais estudados. Furchgott e Zawadzki em 1980, afirmavam ter descoberto a existência de uma substância capaz de promover o relaxamento da musculatura lisa, e deram o nome de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Mais tarde, determinaram que essa substância era o (NO). O NO é um gás, produzido pela transformação de L-arginina a L-citrulina e NO, através da enzima NO sintase (Palmer *et al.*, 1987; Marin & Rodriguez-Martinez, 1995).

Após a produção de NO pelo endotélio, rapidamente ele se difunde para a musculatura lisa e estimula a guanilil ciclase a transformar guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), desencadeando o relaxamento. (Felizzola *et al*, 1996). É importante ressaltar, que o NO, não é o único vasodilatador produzido no endotélio e estimulado pela ACh. A prostaciclina (PGI₂), e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), também possuem sua participação importante na vasodilatação endotelial (Rubanyi, 1991). Uma

disfunção neste endotélio, desencadeia o aparecimento de moléculas pró aterogênicas, que promovem inflamação, conduzindo a um quadro de doenças cardiovasculares (DCV's), como aterosclerose (Dart *et al.*, 1991) e vários fatores de risco como hipertensão (Dzau & Safar, 1988).

Não se sabe exatamente o motivo pelo qual ocorre diminuição de relaxamento na presença do látex da *E. tirucalli*. Contudo, Ohara e colaboradores em 1995, mostraram que a PKC regula a ecNOS e em suas investigações, ao inibir a PKC, os resultados mostraram aumento da liberação de óxido nítrico. A literatura mostra que quando a PKC é estimulada por ésteres de forbol, ocorre inibição de vasodilatadores dependente do endotélio, induzidos por acetilcolina (Morrison & Pollock, 1990) mas este mecanismo ainda não está bem estabelecido.

Ao usar um antagonista não seletivo da eNOS (L-NAME), notamos abolição do relaxamento endotelial na presença e na ausência do látex da *E. tirucalli* (Figura 20), reforçando que o relaxamento endotelial aórtico, é devido a total participação do NO. Este fármaco, inibe a NOS, impedindo a síntese de NO e, conseqüentemente, a indução da formação de GMPc que conduz ao relaxamento da célula muscular lisa.

Os ésteres, ainda, poderiam estar atuando na produção de radicais livres, causando inativação em NO. Estudos em nosso laboratório, em que ratos estão sendo tratados com o látex aquoso da *E. tirucalli*, tem mostrado aumento de estresse oxidativo. Mastubara e Ziff mostraram essa possibilidade em 1986, quando viram em células endoteliais cultivadas, que o éster de forbol PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) aumentou a liberação de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), e estes são capazes de inativar os fatores hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF).

Os nitrovasodilatadores também são capazes de estimular a GMPc, através da doação de NO contido em sua molécula. Em nossas análises, observamos que o relaxamento independente do endotélio com NPS, não apresentou diferença significativa na resposta máxima frente ao látex, porém, apresentou diferença significativa em doses intermediárias (Figura 19). Isso nos mostra que dependente ou não do endotélio, a resposta vasorelaxante é alterada na presença de aveloz.

Como abordado anteriormente, cerca de 8,8% da população brasileira, utiliza a *E. tirucalli* como coadjuvante no tratamento de câncer e tumores. O câncer de mama por exemplo, é um dos mais frequentes na população, e pessoas nestas condições, apresentam risco aumentado para ocorrência de DCV's. Segundo um estudo feito no ano de 2021, no qual analisou 201 pacientes, cerca de 82,1% ou seja 165 pacientes, apresentaram algum fator de risco

cardiovascular no momento do diagnóstico (Carvalho, 2021). Logo, os resultados encontrados por este trabalho, no qual evidenciam uma alteração na função vascular ao usar de forma aguda o látex da planta, salientam que possivelmente o uso do látex por pacientes oncológicos, seria deletério a seu sistema cardiovascular, levando em consideração que normalmente o uso disseminado ao senso comum seria durante 3 dias seguidos.

Analisando os resultados encontrados nesse trabalho, podemos sumarizar que a aumentada vasoconstrição e o relaxamento prejudicado na função endotelial, vistos na administração do látex da *E. tirucalli*, estão diretamente relacionados com os efeitos dos ésteres de forbol presentes na planta.

8 – CONCLUSÃO

Em suma, nossos resultados mostram que a incubação *in vitro* de concentrações nanomolares do látex aquoso da *E. tirucalli*, apresenta potente vasoconstrição possivelmente mediada pela ação de ésteres de forbol no sistema, e prejuízo de relaxamento dependente e independente do endotélio, na aorta de ratos normotensos. Nosso estudo evidencia os efeitos lesivos de baixas concentrações do látex da *E. tirucalli* na aorta *in vitro*, e enfatiza a importância da realização de mais estudos afim de esclarecer e alargar os efeitos desse látex no sistema cardiovascular.

9 – REFERÊNCIAS

ABDEL-LATIF, A. A. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. **Pharmacol Rev.** v.38(3), p.72-227, Sep 1986

ABRIAL, E. *et al.* A role for the PKC signaling system in the pathophysiology and treatment of mood disorders: involvement of a functional imbalance? **Molecular Neurobiology.** v.44(3), p.19-407, 2011

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da diretoria colegiada-** RDC nº 2, 917, de 6 de julho de 2011. Disponível em:<
https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res2917_06_07_2011.html> Acesso em: 10 fev. 2021.

AYA, T. *et al.* Chromosome translocation and c-MYC activation by Epstein-Barr virus and *Euphorbia tirucalli* in B lymphocytes. **Lancet.** 1991 May v.18;337(8751), 1991

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

BERTOLINI, T. M., J. GIORGIONE, D. F. HARVEY, A. C. Newton, 2003. Protein kinase C translocation by modified phorbol esters with functionalized lipophilic regions. **J. Org. Chem.** 68:5028–5036.

BESSA, G O. **Avaliação da atividade angiogênica e do potencial de cicatrização do látex de Euphorbia tirucalli (Aveloz)**. 2010, f.50, Dissertação (Mestrado em Ciências ambientais e Saúde). Pontífica Universidade Católica de Goiás. Goiânia, 2010

BLANCO, M. F. Flora de Filipinas. Disponível em <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6000733> Acesso em 03 de novembro de 2021

BRAGA, Morais Carla. **Histórico de utilização de plantas medicinais**. 2011. 24 f. Monografia. (Licenciatura em Biologia) Consórcio parcial Setentrional de Educação a Distância, Universidade de Brasília/Universidade Estadual de Goiás, 2011.

BRASIL. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Ministério da Saúde, 146f, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2011. 126p. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/14/Formulario-de-Fitoterapicos-da-Farmacopeia-Brasileira-sem-marca.pdf>. Acessado em: 05 de outubro 2021.

BRASIL. PNPIC. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS; Atitude de ampliação de acesso**. Ministério da Saúde, 72f, 2015.

CARVALHO, F.S.C. **prevalência de eventos cardiovasculares tardios após radioterapia para câncer de mama em pacientes acima de 65 anos**. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Fundação Antônio Prudente, São Paulo 2021

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

CASTAGNA, M. *et al.* Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. **J Biol Chem.** v.10;257(13), p.51-7847, jul, 1982.

CATALUÑA, P.; RATES, S.M.K. The traditional use of the latex from *Euphorbia tirucalli linneaus* (euphorbiaceae) in the treatment of cancer is south Brazil. **Acta Hort.** (RSHS). v.501:289-296, 1999

CÉSAR, G. Aveloz. Curiosidades de nossa flora. Recife: **Oficinas gráficas da imprensa oficial**, p.23-27, 1956.

CHOENE, M.; MOTADI, L.; Validation of the Antiproliferative Effects of Euphorbia Tirucalli Extracts in Breast Cancer Cell Lines. **Molecular Biology**, v. 50, n. 1, p. 115-27, Jan/Feb.2016

CORDEIRO, I. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Euphorbiaceae. **Bolm Botânica.** São Paulo. Universidade de São Paulo, v, 13, 169-127, 1992.

DAL MOLIN, G. T.; CAVINATTO, A. W.; COLET C. F. Utilização de plantas medicinais e fitoterápicos por pacientes submetidos a quimioterapia de um centro de oncologia de Ijuí/RS. **O mundo da saúde.** São Paulo, v.39 (3), p. 287-298, 2015

DANTAS, I, C. **Avelós. O Raizeiro.** ed.1 Campina Grande: EDUEP, 2007.

DART, A. M. *et al.* Aortic distensibility in patients with isolated hypercholesterolemia, coronary heart disease or cardiac transplant. **Lancet**, v.338, p.207-273, 1991

DEFILIPPO, P. P. Atividade enzimática dos subtipos de fosfolipase A2 (PLA2) em cultura primária de neurônios. 2009, 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

DONATO, A. J. *et al.* Vascular endothelial dysfunction with aging: endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v.297(1), p.32-425, Jul, 2009

DUTRA, R. C. *et al.* Euphol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: evidence for the underlying mechanisms. **Biochemical pharmacology**, v. 83, n. 4, p. 531-542, 2012

DZAU, V. J.; SAFAR, M. E. Large conduit arteries in hypertension: role of the vascular renin-angiotensin system. **Circulation**. v.77 (5), p. 947-954, 1988

FELIZZOLA, L.R *et al.* The role of the endothelium in circulatory physiology. **Cir. vasc. Angiol.** v.12(3), p.36-129, 1996

FÖRSTERMANN & SESSA. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**. v.33(7), p.37-829, Apr, 2012

FRANCO SALLA, B. G.; PRATES, J. *et al.* Euphorbia Tirucalli Modulates Gene Expression in Larynx Squamous Cell Carcinoma. **BMC Complement Altern Med**. v. 16, p. 136, mai, 2016.

FRANCO, L. L. **As 50 sensacionais plantas medicinais campeãs de poder curativo**. 2.ed. O Naturalista, Curitiba, 1997

FRODIN, D.G. History and concepts of big plant genera. **Taxon**, v.53 (3), p. 753-776, 2004.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. v.27(288),(5789), p.6-373, Nov, 1980

FÜRSTENBERGER, G.; HECKER, E. New highly irritant euphorbia factors from latex of *Euphorbia tirucalli* L. **Experientia**. 1977, v. 15;33(8):986-8. Aug 1977

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

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Molecular Aspects of Cell Biology. **New York: Saunders College Publishing**, 1995.

GIULIETTI, A. M. *et al.* Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Mega Diversidade**, Bahia, v.1, p.1-10, jun. 2005.

GLEASON, M. M, FLAIM, S. F. Phorbol ester contracts rabbit thoracic aorta by increasing intracellular calcium and by activating calcium influx. **Biochem Biophys Res Commun**. 1986 Aug 14;138(3):1362-9.

GOEL, G. *et al.* Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals. **International Journal of Toxicology**. v.26, p. 279-288, 2007

GROSSO, G. S. La familia euforbiaceae como condición promisoría para la obtención de metabolitos secundarios. **Docplayer**. Disponível em <<https://docplayer.es/75475495-La-familia-euforbiaceae-como-condicion-promisoría-para-la-obtencion-de-metabolitos-sekundarios.html>>. Acesso em: 05 de nov. 2021.

GUPTA, N. VISHNOI, G. WAL, ANKITA, WAL, P. Medicinal Value of **Euphorbia tirucalli**: A Review. **Research and Reviews**. V.1, Jul-Sept 2013

GUYTON & HALL. **Tratado de Fisiologia Médica**. ed.12, Elsevier, 2011

HECKER, E. Cocarcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other Euphorbiaceae. **Cancer Res**. v.28 p.2238, 1978.

HECKER, E.; SCHMIDT, R. Phorbol esters, the irritants and cocarcinogens of *Croton tiglium* L. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. v. 31, p.377-467, 1974.

HICKEY, T. A.; WOROBEK, S. M.; WEST, D. P.; KINGHORN, A. D. Irritant contact dermatitis in humans from forbol and related esters. **Toxicon**, v.19, p.841 –850, 1981

HILL-EUBANKS, D. C. *et al.* Calcium signaling in smooth muscle. Cold Spring Harb **Perspect Biol**. v.1;3(9), Sep, 2011

HOROWITZ, A. *et al.* Mechanism of Smooth Muscle Contraction. **Physiological Reviews**. v.76 (4), oct, 1996

JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A. & STEVENS, P. F. Plant Systematic: A Phylogenetic Approach. Ed. **Sinauer Associates**. 464p, Inc.1999.

KIKKAWA, U. *et al.* Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor- promoting phorbol esters. **J Biol Chem**. v.258, p. 11442-11445, 1983

KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In BÁRÁNY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**, San Diego, Academic Press, p. 203-219, 1996.

LAINETTI, R;BRITO, S. R. N. A cura pelas ervas e plantas medicinais brasileiras. São Paulo: **Ediouro**, 1979

LEHMANN, E. D. *et al.* Aortic compliance in young patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. **Clin Sci (Lond)**, v.83(6), p.21-717, 1992

LIN, M..W. *et al.* Euphol from *Euphorbia tirucalli* selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis. **Food Chem. Toxicol**. v. 50, p. 4333–4339, 2012

LIRIO, L.G., et al. Antibacterial activity of medicinal plant from the Philippines. **Pharmaceutical Biology**, nº 36, pp. 357-359, 1998

LIU, S. Q.; FUNG, Y. Influence of STZ-Induced Diabetes on Zero- States of Rat Pulmonary and Systemic Arteries. American Diabetes Association. v.41 (2), p.136-146, Feb, 1992

MACHADO, M. M. **Perfil fitoquímico e avaliação dos principais efeitos biológicos e imunológicos in vitro da *Euphorbia tirucalli* L.** 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

MARASCHIN, M. E VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário: otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 2(10), pp. 24-28, 1999

MARÍN, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M. A. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. **J Auton Pharmacol**. v.15(4), p.279-307. Aug, 1995

MARTINS, M. C. **estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie kielmeyera coriacea mart. & zucc (pau-santo) do cerrado**. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

MATSUBARA , T.; ZIFF, M. Superoxide anion release by human endothelial cells: synergism between a phorbol ester and a calcium ionophore. **J Cell Physiol**. v.127(2), p.10-207. May, 1986

MCDONALD, A. D., WARREN, F. L. & WILLIAMS, J. M. S 33. The Euphorbia resins. Part I. Eufol. **J. Chem. Soc**. S155, 1949

MELBIN, J.; DETWEILER, D. K. Sistema cardiovascular e fluxo sanguíneo. In: SWENSON, M.J.; REECE, W. (Ed.) Dukes: **fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: cap. 2, p. 13-34, Guanabara Koogan, 1996.

MELLO, J. M. **Estrutura da aorta e da artéria ilíaca externa de cobaia: aspectos comparativos com o rato albino e ave doméstica**. 1999. 83 f. (Doutorado em Anatomia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.

MORRISON, K. J.; POLLOCK, D. Impairment of relaxations to acetylcholine and nitric oxide by a phorbol ester in rat isolated aorta. **Br J Pharmacol**. v.101(2), p.6-432. Oct, 1990

MOSIOR, M.; NEWTON, A. C.; Mechanism of Interaction of Protein Kinase C with Phorbol Esters. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 270, p. 25526-25533, Jun 1995

MUSTAFA, S. J. *et al.* P1 (Adenosine) Purinoceptor Assays. **Current Protocols in Pharmacology**. v.1 (45), p. 1-13, 2009

NEIVA, L. **A cura do Câncer pelo Aveloz**. 1. Ed. RJ: Arte Nova S.A. 1968

NISHIZUKA, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. **Science**. New York, NY. v. 258(5082), p.14-607, 1992

OHARA, Y. *et al.* Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase by protein kinase C. **Hypertension**. v.25(3), p.20-415. Mar, 1995

OLIVEIRA, A. P. de; NAPOMUCENO, J. C. Avaliação dos efeitos genotóxicos e antigenotóxicos do Aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.) em *Drosophila melanogaster*. **Biosci Jornauro**. Uberlândia, v. 20, n. 2, p. 179-186, Maio/Agosto. 2004

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAUDE (OPAS). **Câncer de mama é a 2ª principal causa de morte entre mulheres nas Américas; diagnóstico precoce e tratamento podem salvar vidas** – 2016. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5273:cancer-de-mama-e-a-2a-principal-causa-de-morte-entre-mulheres-nas-americas;-diagnostico-precoce-e-tratamento-podem-salvar-vidas&Itemid=839. Acesso em: 18 março 2020

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAUDE (OPAS). **Doenças cardiovasculares – 2017**. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096. Acesso em: 18 março 2020

PALIT, P. *et al.* Attenuation of nociceptive pain and inflammatory disorders by total steroid and terpenoid fraction of *Euphorbia tirucalli* Linn root in experimental in vitro and in vivo model. **Inflammopharmacology**. v.26(1), p.235-250, Feb, 2018

PALMER, R. M; FERRIGE, A. G, MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 6122, n. 327, p. 6-524. Jun, 1987.

PASSOS, G. F. *et al.* The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.698(1-3), p. 413–420, 2012

POSSE, Costa Juliana. **Plantas medicinais utilizadas pelos usuários do SUS nos bairros de Paquetá e Santa Teresa: uma abordagem etnobotânica.** 2007. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

PRASHANT, Y. M; SHITAL, S. P. *Euphorbia tirucalli* L.: Review on morphology, medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.** v.7(7): 603-613, 2017

RASMUSSEN, J. C. A.; SUTKO, J. L.; BARRY, W. H. Effects of ryanodine and caffeine on contractility, membrane voltage, and calcium exchange in cultured heart cells. **Circulation Research.** v. 60, p. 495-504, 1987

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; M. **Biochemistry of Smooth Contraction.** San Diego, Academic Press, p. 227-239, 1996.

RODRIGUES, Andresa Soares. **As tribos Dalechampiae Müll. Arg. e Manihoteae Melchior (Euphorbiaceae) no Distrito Federal, Brasil.** 2007. 104 f, Dissertação (Mestrado em Botânica) -Universidade de Brasília, Brasília, 2007

RUBAYI, G.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **J Cell Biochem.** 1991 May;46(1):27-36.

SALAMANCA, D.A.; KHALIL, R.A. Protein Kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function um hypertension. **Biochem.Pharmacol.** v. 70, n.11, p.1537-1547, 2005.

SANTOS, R. I. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários.** In: SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** (2001). 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 2001

SAPIÊNCIA -**Informativo científico da FAPEPI** (2010). [Online]. N. 23, Ano VI, p. 04-09, Teresina-PI <<http://www.fapepi.pi.gov.br/nova/sapiencia/pdf/sapiencia23.pdf>> acesso em 19 de outubro de 2021.

SAVINEAU, J. P. *et al.* Contraction of vascular smooth muscle induced by phorbol 12,13 dibutyrate in human and rat pulmonary arteries. **Br. J. Pharmacol.** v.10, p. 639-644, 1991

SAVITHRAMMA, N. *et. al.* Screening of medicinal plants for secondary metabolites. (2011). **Middle-East J. Sci. Res.** v.8, pp. 579-584, 2011

SEGAL, A. B. L; DUUREN, V.; MATE, U. The identification of phorbol myristate acetate as a new metabolite of phorbol myristate acetate in mouse skin. **Cancer Res.** v.35, p.2154–2159, 1975

SEIP, E. H.; OTT, H. H.; HECKER, E. Skin irritant and tumor promoting diterpene esters of the tiglyane type from the Chinese tallow tree (*Sapium sebiferum*). **Planta Med.** v. 49 (4), p. 199–203, 1983

SILINSKY, E. M.; SEARL, T. J. Phorbol esters and neurotransmitter release: more than just protein kinase C? **Br J Pharmacol.** v.138(7), p.201-1191, Apr., 2003

SILVA A.C.; FARIA D.E. *et al.* Toxicological screening of *Euphorbia tirucalli* L.: Developmental toxicity studies in rats. **J Ethnopharmacol** v.110, n.1, p.154-159, 2007

SILVA, V. A. O *et al.* Euphol, a tetracyclic triterpene, from *Euphorbia tirucalli* induces autophagy and sensitizes temozolomide cytotoxicity on glioblastoma cells. **Invest New Drugs**. 2019 v.37(2):223-237.

SILVA, V. A. O. *et al.* Eufol, a tetracyclic triterpene, from *Euphorbia tirucalli* induces autophagy and sensitizes temozolomide cytotoxicity on glioblastoma cells. **Invest. New Drugs** p. 1–15, 2018

SIMÕES, G. M. S. **Avaliação do polimorfismo de receptores adrenérgicos na hiperreatividade cardiovascular aos testes estressores**. 65 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UFES, Espírito Santo, 2011.

SINITOX/CICT/FIOCRUZ. **Plantas Tóxicas no Brasil**. Belém; CIAVE/BA, Salvador; São Paulo; Campinas; Cuiabá; Porto Alegre. Julho, 2001

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**. 1994 Nov, v.17;372(6503):231-6. Nature 1994

SOPHOCLEOUS, G.; OWEN, D.; MOTT, H. The structure and function of protein kinase C-related kinases (PRKs). **Biochemical Society Transactions**. v.49, p.217-235, Jan, 2021

SOUZA, L. S. **Metodologias analíticas para determinação do perfil químico, atividade imunomoduladora e citotóxica do látex de *Euphorbia tirucalli* L.** 2019. 89 f. Dissertação (Mestrado em Química) –Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2019.

TOFANELLI, E. J.; SILVA, F. A. Propriedades fitoterápicas de *Euphorbia tirucalli* L.: da etnobotânica a farmacognosia. **BIOFAR**. Cuiabá. V. 06, Número 01, 2011

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto Enfermagem**, Florianópolis, v. 15, n. 1, p. 115-121, fev. 2006.

TRAVASSOS, R. A. **Envolvimento de canais para potássio e de nucleotídeos cíclicos no mecanismo de ação tocolítico do ácido 8(17),12e,14-labdatrieno-18-óico (labdano-302) em**

útero isolado de rata. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, UFPB, João Pessoa, 2010.

VARRICCHIO, M.C.B.N.; ORMELEZ, E.G, *et al.* Cultivo *in vitro* de *Euphorbia tirucalli* (Aveloz), avaliação da constituição química do látex, em diferentes condições de cultivo, e teste de atividade larvicida e juvenilizante em *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Biologia e Farmácia-BIOFAR** (on line). Volume 02. N. 01, 2008.

VARRICCHIO, M.C.B.N.; ORMELEZ, E.G, *et al.* Efeitos toxicológicos crônicos do latex bruto de *Euphorbia tirucalli* (Aveloz) sobre peso de fígado e baço conforme uso tradicional: Um estudo preliminar. **Revista Brasileira de Biologia e Farmácia-BIOFAR** (on line). Volume 02. n. 6-11, 2008b.

WAIB, P. H.; BURINI, R. C. Fundamentos bioquímicos da modulação do tono vascular. **Arq Bras Cardiol.** v.56(5), p. 407-412, 1991

WEINSTEIN, I. B. L. S.; *et al* 1979. Action of phorbol esters in cell culture: mimicry of transformation, altered differentiation, and effects on cell membranes. **J. Supramol. Struct.** v.12 (195), p. 208, 1979

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; YOSHIDA, Z. Y.; TAKIDO, M. Inhibitory effect of euphol, a triterpene alcohol from the roots of *Euphorbia kansui*, on tumour promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **J Pharm Pharmacol.** Jan, v.52(1), p.24-119, 2000