

Congresso
Internacional da
Agroindústria
10 e 11 de junho



Inovação,
Gestão e
Sustentabilidade
na Agroindústria

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO* DO EXTRATO ENZIMÁTICO DO LÁTEX DA *EUPHORBIA MILII* PARA PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD *IN VITRO* DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE *EUPHORBIA MILII* LÁTEX PARA EL PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS

***IN VITRO* TOXICITY ASSESSMENT OF *EUPHORBIA MILII* LATEX ENZYMATIC EXTRACT FOR FOOD PROCESSING**

Iris Barbosa de Souza¹; Graziela Domingues Almeida Lima²; Erika Valente de Medeiros³; Keila Aparecida Moreira⁴; Ana Lucia Porto Figueiredo⁵

DOI: <https://doi.org/10.31692/IICIAGRO.0181>

RESUMO

A importância das plantas tóxicas não está somente nos riscos que possam causar, mas também dos benefícios que podem proporcionar. Entre essas, o látex de *E. milii* que apresenta atividade moluscicida, mas também potencial para uso farmacológico e no processamento de alimentos. Incentivando assim a avaliação da sua toxicidade através de ensaios que são necessários principalmente quando se trata de investigações toxicológicas preliminares em atendimento aos princípios éticos e econômicos. Nesse sentido, o presente estudo objetivou avaliar a toxicidade *in vitro* do látex de *E. milii* usando como modelo a *Artemia salina* e a avaliação de citotoxicidade com eritrócitos humanos, linhagem Vero e macrófagos. O látex de *E. milii* foi extraído e diluído (1/1) em solução tampão fosfato de sódio 1M, pH 7,0 foi centrifugado (5000 g, 4 °C por 30 min.) e o produto final passou por processo de liofilização. No ensaio de toxicidade frente a *A. salina* foram testadas o látex liofilizado nas concentrações de 3,5; 7,0; 10,5; 14; 21; 28 e 35 mg/mL de água do mar esterilizada. No teste de citotoxicidade o látex foi dialisado antes da liofilização e diluído nas mesmas concentrações em soro fisiológico. A toxicidade do látex no ensaio com *A. salina* foi estimada pela CL₅₀ usando o Probit e o percentual de viabilidade celular foi determinado para os resultados de citotoxicidade e avaliado pelo teste de Dunnett. Após 24 horas de exposição ao látex, a CL₅₀ das larvas de *A. salina* foi estimada em 64,22 mg/mL. O látex de *E. milii* manteve a viabilidade das células sem causar hemólise dos eritrócitos, teve ligeira diminuição das células da linhagem Vero (10,33%) na concentração de 35mg/mL e reduziu a viabilidade de macrófagos (26,34 - 45,53%) nas concentrações usadas no ensaio. Os testes preliminares *in vitro* revelaram que o látex de *E. milii* não apresenta risco de toxicidade, mas investigações complementares são necessárias principalmente para uso na área da saúde e em alimentos.

¹ Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE), iris.barbosa@ufape.edu.br

² Entomologia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), graziela.gdal@gmail.com

³ Agronomia, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE), erika.valente@ufape.edu.br

⁴ Veterinária, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE), keila.moreira@ufape.edu.br

⁵ Pós Doutora, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), analuporto@yahoo.com.br

UMA PARTE DO TÍTULO EM PORTUGUÊS, NEGRITO, CAIXA ALTA

Palavras-Chave: citotoxicidade, toxicidade, viabilidade celular, *Euphorbia milii*, *Artemia salina*.

RESUMEN

La importancia de las plantas tóxicas no está solamente en los riesgos que éstas pueden ocasionar, sino también en los beneficios que pueden brindar. Entre estos, el látex de *E. milii* que presenta actividad molusquicida, además de potencial para el uso farmacológico y en el procesamiento de alimentos. Incentivando, por lo tanto, la evaluación de su toxicidad a través de ensayos que son necesarios principalmente cuando se trata de investigaciones toxicológicas preliminares en cumplimiento de principios éticos y económicos. En este sentido, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la toxicidad in vitro del látex de *E. milii* utilizando *Artemia salina* como modelo, y la evaluación de la citotoxicidad con eritrocitos humanos, linaje Vero y macrófagos. Se extrajo látex de *E. milii* y se diluyó (1/1) en una solución tampón de fosfato de sodio 1 M, se centrifugó a pH 7,0 (5000 g, 4°C durante 30 min) y el producto final se sometió a un proceso de liofilización. En el ensayo de toxicidad ante *A. salina*, se probó látex liofilizado a concentraciones de 3,5; 7,0; 10,5; 14; 21; 28 y 35 mg/mL de agua marina estéril. En la prueba de citotoxicidad, el látex se dializó antes de la liofilización y se diluyó a las mismas concentraciones en suero fisiológico. La toxicidad del látex en el ensayo con *A. salina* se estimó mediante la CL50 usando Probit y el porcentaje de viabilidad celular se determinó para los resultados de citotoxicidad y se evaluó mediante la prueba de Dunnett. Después de 24 horas de exposición al látex, la CL50 de las larvas de *A. salina* se estimó en 64,22 mg / ml. El látex de *E. milii* mantuvo la viabilidad celular sin causar hemólisis de eritrocitos, presentó una ligera disminución en las células del linaje Vero (10,33%) en la concentración de 35 mg/mL y redujo la viabilidad de los macrófagos (26,34 - 45, 53%) en las concentraciones utilizadas en el ensayo. Las pruebas preliminares in vitro revelaron que el látex de *E. mili* no presenta riesgo de toxicidad, pero se necesitan investigaciones complementares principalmente para su uso en las áreas de la salud y de los alimentos.

Palabras Clave: citotoxicidad, toxicidad, viabilidad celular, *Euphorbia milii*, *Artemia salina*.

ABSTRACT

The importance of toxic plants is not only on the risks they can cause, but also on the benefits they can provide. Among these, the latex of *E. milii* has molluscicidal activity, but also potential for pharmacological use and in food processing. Thus encouraging the assessment of its toxicity through essays that are necessary mainly when it comes to preliminary toxicological investigations in compliance with ethical and economic principles. In this sense, the present study aimed to evaluate the *in vitro* toxicity of *E. milii*' latex using *Artemia salina* as a model, and the evaluation of cytotoxicity with human erythrocytes, Vero lineage and macrophages. *E. milii*' latex was extracted and diluted (1/1) in 1M sodium phosphate buffer solution, pH 7.0 was centrifuged (5000 g, 4 °C for 30 min.) and the final product underwent a freeze-drying process. In the toxicity essay against *A. salina*, lyophilized latex was tested at concentrations of 3.5; 7.0; 10.5; 14; 21; 28 and 35 mg/mL of sterile seawater. In the cytotoxicity test, the latex was dialysed before lyophilization and diluted to the same concentrations in saline. The toxicity of the latex in the assay with *A. salina* was estimated by the LC50 using Probit and the percentage of cell viability was determined for the results of cytotoxicity and evaluated by the Dunnett test. After 24 hours of exposure to latex, the LC50 of *A. salina* larvae was estimated at 64.22 mg / mL. The latex of *E. milii* maintained the viability of the cells without causing hemolysis of the erythrocytes, and presented a slight decrease in the cells of the Vero lineage (10.33%) at a concentration of 35mg/mL and reduced the viability of macrophages (26.34 - 45, 53%) at the concentrations used in the essay. Preliminary *in vitro* tests revealed that *E. mili*' latex does not present a risk of toxicity, but further investigations are needed mainly for its use in the health and food fields.

Keywords: cytotoxicity, toxicity, cell viability, *Euphorbia milii*, *Artemia salina*.

INTRODUÇÃO

O látex de *Euphorbia milii*, assim como outros compostos considerados “naturais”, vêm sendo estudado quanto a sua composição química e toxicidade (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1988; SOUZA et al., 1997; OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000; OLIVEIRA-FILHO et al., 2012; SHAH; PARAY, 2014; PRINSLOO; STREET, 2018). Esse interesse visa atender a expectativa de buscar na natureza e nos conhecimentos populares tradicionais uma maior aplicabilidade para o uso de extratos de plantas e seus princípios ativo devido a sua disponibilidade e aceitabilidade (BERLINCK et al., 2017; FARNSWORTH et al., 1985; KAUR et al., 2005; DUTRA et al., 2016; KHALIL et al., 2014; OMOYENI et al., 2016; LIMA JUNIOR; ABREU, 2018).

E. milii também conhecida como "Coroa-de-Cristo" ou "Coroa-de-Espinhos" é facilmente cultivada em estacas, bem adaptada a solos pobres em nutrientes e resistente à escassez de água. A planta é nativa de Madagascar e seu látex é usado no controle de moluscos e na medicina tradicional no tratamento de fígado e esquistossomose em animais, (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011; KHALIL et al., 2014), mas na China foi usado para tratamento de hepatite e edema abdominal (SOUZA et al., 1997; YADAV; PANDE; JAGANNADHAM, 2006). No Brasil há relatos do uso de seu látex no *peeling* de pele (DELGADO et al., 2003; MORO et al., 2008).

Dentre os testes *in vitro*, a *Artemia salina* é usada como referência e mantém uma boa correlação com ensaios de toxicidade em geral e anti-tumorais (MEYER et al., 1982; OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000; SANTOS et al., 2010; ARCANJO et al., 2012; RAUF, KHAN; UDDIN, 2013). Nesse sentido, o presente estudo objetivou avaliar a toxicidade *in vitro* do látex de *E. milii*, utilizando para tal modelos de estudos de referência e alternativos.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A *E. milii* é identificada na natureza como um arbusto perene com ramos contorcidos e numerosos espinhos, mas rico em látex. Este látex é um líquido que contém uma mistura de soro, borracha, materiais de baixa densidade (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1988) e várias enzimas, dentre as quais três: miliin (serino protease), milin e eumiliin (cisteína protease) que já foram caracterizadas, quanto aos efeitos do pH, temperatura e sua atividade proteolítica (YADAV; PANDE; JAGANNADHAM, 2006; MORO et al., 2008; FONSECA et al., 2010). Devido a estabilidade dessas macromoléculas, elas podem despertar o interesse da indústria farmacêutica, biotecnológica e alimentícia (YADAV; PANDE; JAGANNADHAM, 2006).

UMA PARTE DO TÍTULO EM PORTUGUÊS, NEGRITO, CAIXA ALTA

Nessa potencial aplicação industrial, se faz necessária pesquisar o látex de *E. milii* e suas enzimas para o desenvolvimento de novos produtos e emprego nos diferentes segmentos industriais.

Sufiate et al. (2017) mostraram a eficiência das proteases do látex de *E. milii in vitro* na mortalidade de larvas de nematoides (*Panagrellus redivivus*).

Recentes estudos apresentado por Okonkwo e Ohaeri (2018) utilizaram os óleos essenciais obtidos das folhas de *E. milii*, para testes em larvas de insetos e encontraram fortes evidências para mostrar que os extratos podem exercer ação como inseticida classificado como organoclorados em função da sua ação fisiológica

Em camundongos fêmeas, Sreenika et al. (2015) induziram linhagens de células cancerígenas, trataram os animais com o extrato da flor de *E. milii* em acetato de etila e depois avaliaram parâmetros bioquímicos, parâmetros específicos de câncer (antígeno embrionário Ferritina e Carcino - CEA) e laudos histopatológicos para revelar a sua ação eficaz como antioxidante e quimiopreventivo.

Assim como relevantes pesquisas envolvendo a toxicidade das enzimas sobre moluscos e embriões de *Biomphalaria glabrata* no sentido de combater os caramujos vetores da esquistossomose. (VASCONCELLOS et al., 1986; MENDES et al., 1997; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; SANTOS et al., 2010; OLIVEIRA-FILHO et al., 2012; AUGUSTO et al., 2017). *E. milii* é considerada o recurso natural mais promissor apresentado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como estratégia de controle da esquistossomose (FARNSWORTH et al., 1985; AUGUSTO et al., 2017; AUGUSTO; MELO SILVA, 2018).

No trabalho desenvolvido por Fonseca et al. (2010) uma dessas enzimas, cisteína protease (eumiliin) induziu edema, mionecrose com leucócitos infiltrados e danificou as fibras musculares na pata do camundongo após injeção intraplantar. Delgado et al. (2003) estudaram compostos fitoquímicos de *E. milli* e identificaram a presença de β -sitosterol, cicloartenol, acetato de β -amirina, lupeol, eufol, triterpenos e flavonóides.

Por outro lado, Venkatesha e Vishwanath (2016) relataram que não tem sido observado nenhum efeito tóxico para serino proteases isoladas de látex de plantas e que esses efeitos são principalmente devidos a outras substâncias presentes nos mesmos. Entre essas, os diterpenos, que causam efeitos adversos como irritação da pele com formação de bolhas, inflamação e alterações carcinogênicas. (MOREIRA et al., 2014; PRINSLOO; NOGEMANE; STREET, 2018).

Diante do exposto, fica claro a necessidade de conhecer não somente os potenciais usos industriais, mas em princípio, os possíveis efeitos tóxicos do látex de *E. milli*. Considerando as

razões éticas e econômicas o uso de animais deve ser evitado quando se trata de investigações toxicológicas preliminares, dando assim ênfase à utilização de modelos experimentais *in vitro* de referência ou alternativos. O uso de células humanas e de animais é um sistema alternativo para testes toxicológicos de diferentes classes de produtos sintéticos e naturais (KRISTEN, 1997; LIMA et al., 2018).

Os testes *in vitro* podem ser realizados com bactérias, fungos, algas e crustáceos, além de frações subcelulares presentes no sistema biológico como suspensões celulares, cultivo de tecidos, cultivos celulares, enzimas e proteínas. Contudo, os estudos com cultura de células vêm se destacando dentre os demais (FRAZIER, 1992; BEDNARCZUK et al, 2010).

METODOLOGIA

A pesquisa é quantitativa com ensaio experimental no campo das ciências biológicas envolvendo material coletado da flora do Brasil e seguindo protocolos de testes *in vitro* de toxicidade.

Coleta do material vegetal

As plantas de *Euphorbia milii* Des Moulins foram localizadas em Garanhuns Pernambuco (GPS 08°53'26''S e 36°29'47''W) para a coleta do látex no período de maio a julho de 2017. Amostra representativa da planta foi encaminhada para classificação e depositado no herbário Dárdano de Andrade Lima, sob o número 91595, do Instituto Pernambucano de Agronomia (IPA).

A coleta do látex de *E. mili* foi realizada higienicamente protegido com luvas descartáveis e material cortante em inox e pinça para remoção das sujidades. A coleta foi realizada diretamente em tubos plásticos tipo *Falcon* de 15 mL com identificação de volume até atingir 4 mL e em seguida completados com 4 mL de solução tampão fosfato de sódio 1M, pH 7,0. O látex adicionado do tampão foi homogeneizado e acondicionado em caixa isotérmica mantendo a temperatura de 8 °C para transporte até o laboratório. Os tubos com o látex homogeneizados foram identificados e congelados em *freezer* da Bosch® a temperatura de (-20 °C) até o desenvolvimento do experimento.

Preparação do látex de *Euphorbia milii*

O látex homogeneizado passou por duas etapas de centrifugação a 5000 . g e 4 °C por 30 minutos para remover partículas maiores e concentrar as enzimas. Em seguida, o líquido sobrenadante límpido contendo as enzimas foi separado e transportado para um novo tubo de

UMA PARTE DO TÍTULO EM PORTUGUÊS, NEGRITO, CAIXA ALTA

plástico tipo *Falcon* de 15 mL e repetida a mesma centrifugação e as partículas sedimentadas foram removidas e descartadas. Em seguida, o látex de *E. mili* foi pipetado (1mL), distribuído em microtubos *eppendorf* e armazenados em ultra-congelador Eletrolux® (-70 °C) por 24 horas para liofilização.

No teste de toxicidade *in vitro* com *A. salina* foi utilizado o látex liofilizado e no ensaio de citotoxicidade o látex passou também pelo processo de diálise em água pdeionizada por 24 horas sob refrigeração na geladeira da Bosch® (8 °C) antes da etapa de liofilização realizada em Liofilizador Terroni®. Após essa etapa as amostras liofilizados/dialisadas foram armazenadas sob congelamento em *freezer* da Bosch® (-20 °C) para posterior realização dos ensaios.

Toxicidade do látex de *Euphorbia milii* *in vitro*

Nos testes de toxicidade *in vitro*, inicialmente foi preparada uma solução padrão resuspendendo 70 mg de látex liofilizado/dialisado em 1 mL de água do mar esterilizada para exposição das *A. salina* ou 1 mL de soro fisiológico para avaliação de viabilidade dos eritrócitos humanos e das células de linhagens Vero e de macrófagos. Na realização dos ensaios a solução foi preparada nas concentrações de 3,5 mg/mL (5%); 7 mg/mL (10%); 10,5 mg/mL (15%), 14 mg/mL (20%); 21 mg/mL (30%); 28 mg/mL (40%) e 35 mg/mL (50%) para os testes com *A. salina* e citotoxicidade.

Primeiro teste: Obtenção e ensaio de sobrevivência da *Artemia salina*

A. salina em forma de cistos (embalagem de 5g) foi adquirida em casa de alimentação animal e ativada na proporção de 25 mg em 500 mL de água do mar com pH 8,44 e temperatura de 25-30 °C. A água do mar foi coletada no litoral de Recife-Pernambuco e esterilizada a (121/15°C). A eclosão da *A. salina* ocorreu com aeração por 48 horas e em ambiente adaptado com foto-controle.

Após a eclosão, as larvas viáveis foram divididas em microplaca para cultura celular em nove grupos, sendo sete para testar as concentrações do látex de *E. milii*, um controle positivo que foi feito com um sal de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) diluído a 20 ppm em água do mar e um controle negativo apenas água marinha. Em cada grupo continha 24 a 37 unidades de *A. salina* para exposição nas concentrações do ensaio. (MEYER, et al, 1982). As larvas foram expostas ao látex de *E. milii* nas concentrações de 3,5 mg/mL até 35 mg/mL (50%).

Na avaliação de sobrevivência e mortalidade os animais vivos ou em óbitos foram contados e os resultados analisados no programa Probit usando o software SPSS®19.0 (IBM®

Corp., NY, EUA), obtendo-se o valor de CL₅₀ com um intervalo de confiança de 95% (SANTOS et al., 2010)

Segundo teste: Ensaio de hemólise

Este ensaio foi realizado para determinar a compatibilidade de eritrócitos humanos com o látex de *E. milii*. O sangue humano fresco foi coletado, centrifugado a 700. g por 10 min., lavado três vezes com tampão fosfato-salino (PBS 10 mM; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,4) e ressuspensão no mesmo tampão para preparar a suspensão de glóbulos vermelhos a 2% (XU et al., 2017). Posteriormente, 3,5 até 35 mg/mL (50%) do látex foram incubadas com a suspensão de hemácias a 37 °C.

As hemácias também foram incubadas com tampão fosfato-salino e Triton X-100 (1% v/v) como controle negativo e positivo, respectivamente. Após 24 h, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 700g (XU et al., 2017) e determinou-se a liberação de hemoglobina com auxílio de um leitor de microplaca (SpectraMax M5, Molecular Devices) a 540 nm.

O percentual de hemólise foi determinado pela seguinte equação:

$$\% \text{ de hemólise} = \frac{\text{absorbância da amostra} \times 100}{\text{absorbância do controle positivo}}$$

Os procedimentos descritos acima estão de acordo com os princípios éticos de pesquisa (protocolo número 108/2012/CEPH/wmt).

Terceiro teste: Viabilidade celular em dois tipos de linhagens celulares e cultivo celular

Células das linhagens Vero (rim de macaco) e de macrófago (RAW 264.7) foram gentilmente cedidas pela Prof^a Dra. Juliana Lopes Rangel Fietto (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil), as mesmas foram cultivadas, mantidas em meio RPMI 1640, pH 7,2 (Gibco, Invitrogen, CA, USA) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (10% SFB), penicilina (1%), estreptomicina (1%) a 37 °C, sob tensão de 5% de CO₂. Antes de cada experimento, as células foram removidas das garrafas de cultivo com auxílio de tripsina (0,25%), centrifugadas (1500 rpm; 5 minutos) e ressuspensas em meio RPMI 1640, sendo suplementadas com SFB. Em seguida, essas células foram contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de 96 poços, respeitando-se as concentrações celulares adequadas para cada ensaio (LIMA et al., 2018).

A viabilidade celular de duas linhagens celulares frente ao látex de *E. milii* foi determinada pelo ensaio de MTT (brometo de (3- (4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; Sigma) previamente descrito (PIETRASZEK et al., 2013). As linhagens Vero (3x10⁴

UMA PARTE DO TÍTULO EM PORTUGUÊS, NEGRITO, CAIXA ALTA

células/poço) e macrófago (5×10^4 células/poço) foram incubadas em placas de 96 poços, por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Cada poço continha 100 μL de meio RPMI completo e 100 μL do látex de *E. milii* nas concentrações de 3,5 mg/mL (5%) até 35 mg/mL (50%) diluídos em meio RPMI com 10% de SFB.

Após 48 de incubação, MTT (5 mg/mL, Sigma) foi adicionado em cada poço. Após 4h a 37°C , a solução de MTT foi removida e 100 μL de DMSO foi adicionado em cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância foi lida a 540 nm em um leitor de microplaca (SpectraMax M5, Molecular Devices).

Os resultados foram normalizados considerando os poços tratados com meio RPMI (controle). Para os cálculos da viabilidade celular foi utilizada a seguinte equação: % de viabilidade = (absorbância da amostra x 100)/absorbância do controle (RPMI)).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio com *A. salina* foi realizado como triagem para medir o grau de toxicidade do látex de *E. mili* e serviu de parâmetro na busca dos testes de citotoxicidade para dar continuidade na avaliação da sua segurança. Os resultados do bioensaio com *A. salina*, um microcrustáceo usado no teste de toxicidade do látex liofilizado de *E. milii* estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados de sobrevivência de *Artemia salina* expostas ao látex liofilizado de *Euphorbia milii* após 24 h de exposição.

Látex [mg/mL]	<i>Artemia Salina</i> (n)	Sobrevivência após 24 horas		
		Vivos	Mortos	Sobrevivência (%)
3,5	37	35	2	94,60
7,0	28	26	2	92,86
10,5	30	27	3	90,00
14,0	33	29	4	87,88
21,0	33	28	5	84,84
28,0	30	20	10	66,66
35,0	30	17	13	56,66
Controle +	24	2	22	8,33
Controle -	24	24	0	100

Fonte: Própria (2019)

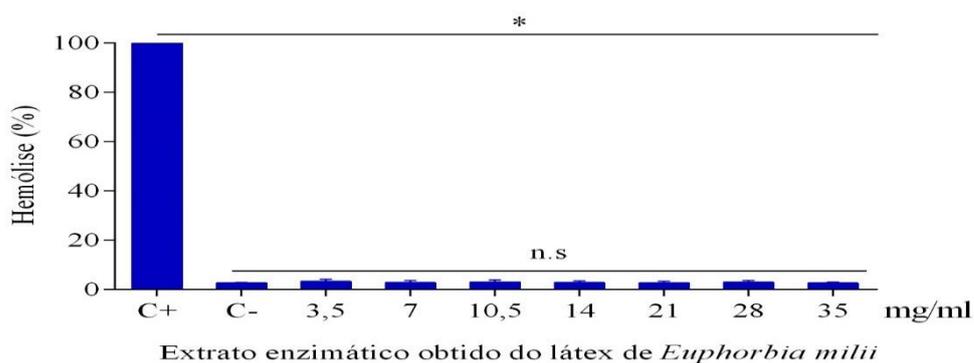
Após 24 horas de exposição da *A. salina* ao látex de *E. mili* nas concentrações de 3,5 até 21 mg/mL as larvas sobreviveram com leve redução de 94,60% até 84,84%, respectivamente. Mas nas concentrações maiores 28 mg/mL (40%) e 35 mg/mL (50%) o meio ficou turvo com formação de uma pequena película na superfície e foram observadas as maiores reduções na

sobrevivência das larvas de 66,66% e 56,66%, respectivamente. Esse resultado encontrado pode ser interpretado pela exposição das larvas a alta concentração do látex, ou outros compostos ativos presentes no látex ou até mesmo resíduos das larvas mortas que não sobreviveram e que permaneceram no mesmo local. O índice de mortalidade das larvas após 24 horas no bioensaio de toxicidade do látex de *E. milii* sobre *A. salina* foi estimado por meio do cálculo da CL_{50} , obtendo-se o valor de 64,22mg/mL ou 64220 $\mu\text{g/mL}$. Esse resultado pode considerar o látex de *E. milii* como composto não tóxico segundo Meyer et al. (1982). Na metodologia proposta (MEYER et al., 1982) foi estabelecido uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL_{50} , de extratos de plantas sobre microcrustáceos *A. salina*, considerando que quando verificados valores acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e não havendo morte acima de 50%, estes, são considerados atóxicos.

O resultado encontrado nesse trabalho de $CL_{50} = 64,22\text{mg/mL}$ difere dos dados encontrados por Oliveira-Filho e Paumgarten, (2000), que analisaram o látex bruto de *E. milii* e encontraram $CL_{50} = 24,23 \text{ mg/L}$ (0,024mg/mL) em 24 horas para o tempo de exposição de larvas de *Artemia* sp nauplii. A diferença nos resultados pode estar na forma de preparo do látex para realizar os ensaios. Nesse trabalho o látex foi coletado e misturado na mesma proporção com solução tampão fosfato de sódio 1M, pH 7,0 e após duplo processo de centrifugação foi usado somente a parte aquosa sobrenadante com descarte de todo material tipo borracha decantado no tubo de plástico. No processo de centrifugação e diálise, segundo Ramos et al. (2006) as principais proteínas solúveis são facilmente separadas da borracha e compostos de baixo peso molecular que podem causar maior toxicidade. No caso de Oliveira-Filho e Paumgarten, (2000) foi utilizado o látex bruto, da forma que foi coletado e liofilizado para uso no ensaio.

No ensaio de citotoxicidade o látex de *E. milii* foi dialisado seguindo metodologia de Fonseca et al., (2010) antes de ser liofilizado. Inicialmente foi realizado o ensaio do látex de *E. milii* frente a eritrócitos primários humanos (Figura 1) e duas diferentes linhagens de células de mamífero (Figura 2 e 3).

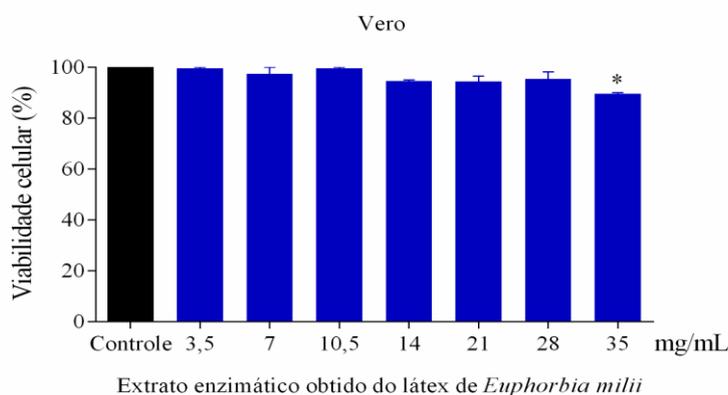
Figura 1- Gráfico representativo do teste de hemólise do efeito do extrato enzimático de *Euphorbia milii* sobre eritrócitos primários. Valores expressos como média \pm S.E.M. * $P < 0,05$ pelo teste de Dunnett. n.s: não significativo. Controle positivo (C+): Triton X-100, indicando hemólise total. Controle negativo (C-): tampão fosfato-salino, hemólise basal.



Fonte: Própria (2019)

O ensaio de hemólise mostrou que o látex de *E. milii* nas concentrações e condições experimentais utilizadas não causou hemólise, visto que não houve diferença significativa entre as concentrações do látex e o controle negativo.

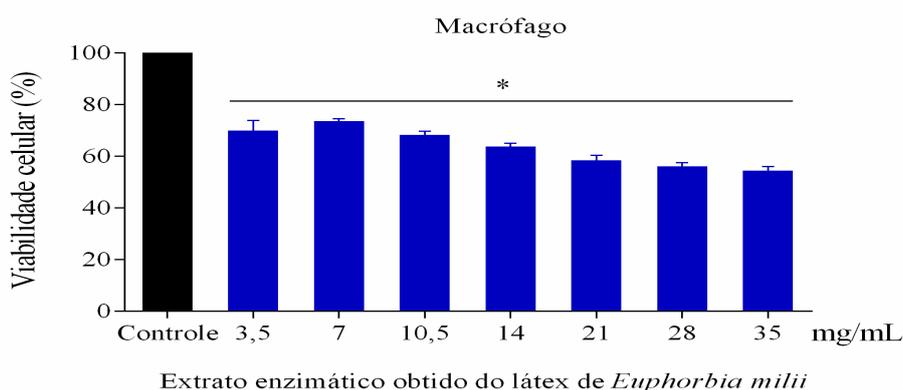
Figura 2- Gráfico representativo do teste de MTT do efeito do extrato enzimático de *Euphorbia milii* sobre a linhagem Vero. Dados expressos como média \pm S.E.M. * $P < 0,05$: concentrações do látex versus controle (RPMI) pelo teste de Dunnett.



Fonte: Própria (2019)

No que se refere à viabilidade celular, a linhagem Vero foi ligeiramente sensível ao látex de *E. milii* apenas na concentração de 35 mg/mL (10,33%; Figura 2). Esse resultado pode indicar que o látex de *E. milii* não cause resposta direta sobre linhagens celulares menos reativas (*i.e.*, menos sensíveis ou susceptíveis).

Figura 3- Gráfico representativo do teste de MTT do efeito do extrato enzimático de *Euphorbia milii* sobre macrófagos. Gráfico representativo do teste de MTT. Dados expressos como média \pm S.E.M. * $P < 0,05$: concentrações do látex versus controle (RPMI) pelo teste de Dunnett.



Fonte: Própria (2019)

No entanto é importante notar que o látex de *E. milii* pode causar significativa resposta em células mais reativas (*i.e.*, relacionados à resposta inflamatória) como macrófagos (Figura 3). Todas as concentrações do látex foram capazes de reduzir a viabilidade celular da linhagem de macrófago de 26,34% na concentração de 7 mg/mL mas atingindo o máximo de 45,53% na concentração de 35 mg/mL. Esse resultado indica que componentes presentes no látex de *E. milii* podem modular respostas fisiológicas relacionada com a sensibilidade. Resposta similar observada por Fonseca et al., (2010), que em estudo *in vivo* usaram o látex de *E. milii* liofilizado e também dialisado para extrair a eumiliin (cisteína protease) para avaliar e caracterizar os efeitos da enzima ao aplicarem injeção intraplantar na pata de camundongos. Eles realizaram análises histopatológicas e observaram a formação de edema com infiltrado leucocitário visível e a alta presença de macrófagos sugerindo que a eumiliin presente no látex de *E. milii* pode causar perturbações teciduais em camundongos, mas não sem evidências de lesões vasculares ou hemorrágicas. Estes autores também ressaltaram que existe pouca informação disponível sobre as atividades bioquímicas presentes no látex de *E. milii*, mostrando a importância de pesquisar esses efeitos, tanto pelo seu uso na medicina tradicional como possíveis aplicação na indústria farmacêutica e de alimentos. No resultado de citotoxicidade em relação aos macrófagos evidencia a presença da eumiliin como uma das proteases presentes no látex de *E. milii* e com atividade sobre a caseína, evidenciada na patente de processo de obtenção de um novo coagulante de leite a partir do látex da “Coroa de Cristo” para processamento de queijos (Souza et al., 2018).

CONCLUSÕES

O látex de *E. milii* analisado *in vitro* mantém a viabilidade das larvas de *A. salina* e das células nas concentrações e condições experimentais utilizadas nos ensaios. As larvas de *A.*

UMA PARTE DO TÍTULO EM PORTUGUÊS, NEGRITO, CAIXA ALTA

salina apresentam baixa mortalidade após 24 horas de exposição ao látex de *E. milii* e o índice de mortalidade das larvas no bioensaio de toxicidade é estimado em $CL_{50} = 64,22$ mg/mL. O látex de *E. milii* não causa hemólise frente a eritrócitos primários humanos, a linhagem Vero apresenta ser ligeiramente sensível apenas na concentração de 35 mg/mL (10,33%) e na linhagem de macrófago a viabilidade é reduzida em todas as concentrações usadas no ensaio atingindo o máximo de 45,53% na maior concentração de 35 mg/mL. Os testes preliminares *in vitro* revelam que o látex de *E. milii* não apresenta risco de toxicidade mas são recomendados dados farmacocinéticos para substâncias isoladas ou concentradas cujo metabolismo não é conhecido.

REFERÊNCIAS

- ARCANJO, D.D.R., et al. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal Biology**, v. 72, n. 3, p. 505–509, 2012.
- ANVISA. Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes. **Brasil Anvisa**, p. 45, 2013. Disponível em: <<http://nutrimalimentos.com.br/guia.pdf>>.
- AUGUSTO, R.C. et al. Double impact: natural molluscicide for schistosomiasis vector control also impedes development of *Schistosoma mansoni* cercariae into adult parasites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–19, 2017.
- AUGUSTO, R. C. & MELLO SILVA, C. C. Phytochemical molluscicides and schistosomiasis: What We Know and What We Still Need to Learn. **Veterinary Sciences**, v. 5, n. 4, p. 94-102, 2018.
- BEDNARCZUK, V.O. et al. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p.43-50, 2010.
- BERLINCK, R. G. S. et al. A química de produtos naturais do Brasil do Século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.
- DELGADO, I. F. et al. Absence of tumor promoting activity of *Euphorbia milii* latex on the mouse back skin. **Toxicology Letters**, v. 145, n. 2, p. 175–180, 2003.
- DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.
- FARNSWORTH, N. R. et al. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 6, p. 965–981, 1985.
- FONSECA, K. C. et al. Purification and biochemical characterization of eumiliin from *Euphorbia milii* var. *hislopilii* latex. **Phytochemistry**, v. 71, n. 7, p. 708–715, 2010.

FRAZIER, J. M. In vitro toxicity testing. Applications to safety evaluation. New York, **Marcel Dekker**, Inc., 1992. p. 300.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N. et al. Production of plant proteases *in vivo* and *in vitro* - A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 983–996, 2011.

LIMA JUNIOR, R.N.; ABREU, F.O.M.S. Produtos naturais utilizados como coagulantes e floculantes para tratamento de águas : uma revisão sobre benefícios e potencialidades. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 3, p.1-27, 2018.

KAUR, S. et al. The in vitro cytotoxic and apoptotic activity of Triphala - An Indian herbal drug. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 1, p. 15–20, 2005.

KHALIL, A. T. et al. Phyto-therapeutic claims about Euphorbeaceous plants belonging to Pakistan; an ethnomedicinal review. **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, n. 3, p. 1137–1144, 2014.

KRISTEN, U. Use of higher plants as screens for toxicity assessment. Toxicology in vitro, **United Kingdom**, v.11, p.181-191, 1997.

LIMA et al. Synthesis and antimetastatic activity evaluation of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions. **Toxicology in Vitro**, v. 53, p 1-9, 2018.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Proteases of euphorbiaceae. **Phytochemistry**, v. 27, n. 1, p. 45–50, 1988.

MENDES, N. M. et al. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) Latex: Experimental test in an endemic area in the state of Minas Gerais, Brazil. **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 5, p. 719–724, 1997.

MEYER, B. N. et al. Convenient general bioassay for active plant constituents. **Medicinal Plant Research**, v.45p.31-34, 1982.

MOREIRA, D. D. L. et al. Traditional use and safety of herbal medicines. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 2, p. 248–257, 2014.

MORO, L. P. et al. Purification, biochemical and functional characterization of miliin, a new Thiol-Dependent serine protease isolated from the latex of *Euphorbia milii*. **Protein & Peptide Letters**, v. 15, n. 7, p. 724–730, 2008.

OKONKWO, C. O.; OHAERI, O. C. Essential oils from the leaves of *Euphorbia Milieu* exert insecticidal activity through disruption in ionic composition. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 13, n. 4, p. 46–53, 2018.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. et al. Absence of antimicrobial activity of *Euphorbia milii* molluscicidal latex. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v. 3, n. 1, p. 13, 2012.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. et al. Chemosphere comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. **Chemosphere**, v. 81, n. 2, p. 218–227, 2010.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, n. 3, p. 342–350, 2000.

OMOYENI, O. A. et al. A review of the ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the *Pleiocarpa* genus. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, n. 1, p. 1–19, 2016.

PIETRASZEK et al. Lumican – Derived peptides inhibit melanoma cell growth and migration. **Plos One**, v.8, n.13, p.1-11, 2013.

PRINSLOO, G.; NOGEMANE, N.; STREET, R. The use of plants containing genotoxic carcinogens as foods and medicine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 116, n. March, p. 27–39, 2018.

RAUF, A.; KHAN, A.; UDDIN, N. Cytotoxic study of aerial parts of *Euphorbia Milli* and *Euphorbia pulcherrima*. **Topclass Journal of Herbal Medicine**, v.2, n. 12, p. 266-269, 2013.

SANTOS, A. F. DOS et al. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 794–798, 2010.

SCHALL, V.T. et al. Evaluation of the genotoxic activity and acute toxicity of *Euphorbia splendens* latex, a molluscicide for the control of schistosomiasis. **Brazilian Journal Medicinal Biology**, n.24, p.573-582, 1991.

SHAH, M. A.; MIR, S. A.; PARAY, M. A. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. **Dairy Science and Technology**, v. 94, n. 1, p. 5–16, 2014.

SOUZA, C. A. M. et al. Study of the embryofeto-toxicity of Crown-of-Thorns (*Euphorbia milii*) latex, a natural molluscicide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 11, p. 1325–1332, 1997.

REENIKA, G. et al. Antioxidant and antitumor activity of *Euphorbia milii* flower extract against in vivo breast cancer and colon cancer in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 06, p. 912–934, 2015.

SUFIAE, B. L. et al. Nematicidal activity of proteases from *Euphorbia milii*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, n. 12, p. 239–241, 2017.

VASCONCELLOS, M, C. & S. Latex of “Coroa de Cristo” (*Euphorbia splendens*) an effective molluscicide. **Mem. Insti. Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 475–476, 1986.

VENKATESHA, S. H.; VISHWANATH, R. R.; BANNIKUPPE, S. V. Hemostatic interference of plant latex. **Journal of Clinical Pathology**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2016.

XU, T. et al. Novel electrochemical immune sensor based on Hep-PGA-PPy nanoparticles for detection of α -Fetoprotein in whole blood. Manuscripty. **Analytica Chimica Acta**, p. 1-40, 2017.

YADAV, S. C.; PANDE, M.; JAGANNADHAM, M. V. Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 14, p. 1414–1426, 2006.

ZAMITH, H. P.S.; PAUMGARTTEN, F. J. R.; SPEIT, G. Evaluation of the mutagenicity of the molluscicidal latex of Christ's Crown (*Euphorbia milii* var. hislopii) in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Mutation Research**, v. 368, p.15-20, 1996.