

EFEITOS TOXICOLÓGICOS CRÔNICOS DO LÁTEX BRUTO DE *E. TIRUCALLI* (AVELOZ) SOBRE PESO DE FÍGADO E BAÇO CONFORME USO TRADICIONAL: UM ESTUDO PRELIMINAR

Varricchio, Márcia C.B.N¹; Sales, F.²; Silva, Simone da.³; Kuster, Ricardo Machado.⁴; Pyrrho, A.S.⁵; Castelo Branco, M.L.T.⁶

RESUMO

O látex de *Euphorbia tirucalli* (aveloz) é empregado em medicina tradicional com diferentes objetivos, dentre os quais a regressão de tumores. Devido à hepatotoxicidade do látex e a sua capacidade de induzir tumores e imunossupressão, neste trabalho analisamos o efeito toxicológico crônico de soluções do látex bruto diluído em água destilada via oral, *ad libitum*, preparadas a partir da correspondência estimada da concentração de gotas do látex conforme uso em medicina tradicional, sobre o desenvolvimento de camundongos saudáveis, ao longo de 18 semanas. Não ocorreu modificação comportamental nos grupos testados. Verificamos que não ocorreu variação significativa de peso de fígado para os grupos administrados com látex. Entretanto, para o grupo administrado com 1 gota do látex foi verificado o incremento significativo do peso do baço ($P < 0,05$). Estes resultados preliminares serão acrescidos de análises bioquímicas séricas e anatomo-patológicas de fígado e baço.

UNITERMOS: *Euphorbia tirucalli*, Aveloz, toxicologia crônica, uso tradicional, látex, peso de fígado e de baço.

TOXICOLOGICS CHRONICS EFFECTS OF *E. TIRUCALLI* (AVELOZ) RAW LATEX UPON LIVER AND SPLEEN WEIGHT AS TRADITIONAL USE: A PRELIMINAR STUDY

ABSTRACT

Euphorbia tirucalli latex is employed in Traditional Medicine with several uses, amongst which tumor regression. Based on latex ability to promote hepatotoxicity, tumor and immune suppression, we decided for chronically toxicological observation of the biological effects upon healthy mice development. The mice were treated with solutions obtained from raw latex diluted in distilled water via oral *ad libitum*, over 18 weeks. There was no behavior change at tested groups. It was observed that it didn't exist significant variation of liver weight to all groups administered with latex. However, to the group administered with 1 drop of latex, it was verified significant increment of spleen weight ($P < 0, 05$). These preliminary results will be added to serical biochemical analysis and anatomopathologies of liver and spleen.

¹ Faculdade de Medicina de Petrópolis (FMP); Instituto Hahnemanniano do Brasil (IHB); Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal/UFRJ (*varichio@compuland.com.br);

² Laboratório de Imunologia Celular/UFRJ (fesales@click21.com.br);

³ Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais / Centro de Biotecnologia da Amazônia (simone.cba@suframa.gov.br);

⁴ Laboratório de Fitoquímica do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, CCS/UFRJ (kuster@nppn.ufrj.br);

⁵ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia/UFRJ (pyrrho@pharma.ufrj.br);

⁶ Laboratório de Imunologia Celular, Departamento de Histologia e Embriologia do ICB/CCS/UFRJ (morgcb@gmail.com)

UNITERMS: *Euphorbia tirucalli*, Aveloz, toxicology, traditional use, latex, liver and spleen weight.

INTRODUÇÃO

Euphorbia tirucalli Lineu (aveloz) é uma planta suculenta, de distribuição cosmopolita. O látex é um poderoso indutor de estresse oxidativo (Datta *et al.*, 1999). A intoxicação aguda por via oral leva a vômitos, diarreia, sensação de queimação das mucosas. Em peixes, leva a interrupção abrupta da cadeia respiratória mitocondrial, matando de forma semelhante ao cianeto (Betancur-Galvis *et al.*, 2002). É vasoconstritora além de nefro e hepatotóxica, além do uso crônico poder desencadear imunossupressão e co-promoção tumoral devido à presença de ésteres diterpênicos de forbol, que são hidrossolúveis e ativos em concentração nanomolar (Ito *et al.*, 1981; Bosch, 2004). Entretanto, milenar é o emprego em medicina tradicional da administração oral do seu látex diluído em água frente a doenças crônico-degenerativas como neoplasias malignas e SIDA (Varricchio *et al.*, 2005). Possivelmente estas observações estejam relacionadas à presença do constituinte majoritário do látex, o triterpeno tirucalol, com atividades antiinflamatória e antiviral (Brito & Thomas, 1980; LIN *et al.*, 2006), além dos efeitos anabolizantes e antioxidantes descritos para o gênero (Hayat *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2002). Diterpenóides presentes no látex modificam-se por diversos processos químicos e físicos trazendo este perfil dual para as atividades biológicas, ora co-promotor tumoral e ora antitumoral (Mcgarvey & Croteau, 1995; Furstenberger & Hecker, 1986; Varricchio, 2005), além de poderem sofrer biotransformações em seres vivos através da digestão por esterases digestivas (Nelson & Cox, 2002). O levantamento a partir de registros oficiais do período de janeiro de 2000 a outubro de 2004 sobre intoxicações por plantas em humanos e em animais no Estado do Rio de Janeiro não identificou intoxicações por *E. tirucalli* por via oral, a despeito do uso corrente popular (Varricchio, 2005). Além disso, a análise qualitativa por cromatografia líquida de alta eficiência com o canal focado para ésteres diterpênicos de forbol sugeriu que a espécie do Rio de Janeiro por nós estudada (jardim do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro - NPPN/UFRJ) possuía uma produção anual constante de diterpenóides polihidroxilados (Varricchio, 2005) e à exposição do látex bruto a ácido clorídrico na concentração 2,5 molar durante 2 horas não foram detectadas variações na química vegetal (Varricchio, 2007 – dados não publicados). Não há informações precisas se soluções preparadas a partir da diluição do látex de aveloz conforme descrito para o uso tradicional podem exercer efeito toxicológico em camundongos saudáveis. Este trabalho teve como objetivo analisar o efeito toxicológico crônico da administração oral *ad libitum* do látex de *Euphorbia tirucalli* (aveloz) em doses ponderais sobre o peso de fígado e baço de camundongos saudáveis, durante 18 semanas.

MATERIAL E MÉTODO

Para este estudo foi obtida a autorização da Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio de Janeiro (CAUAP – CCS – UFRJ) sob o número de registro DAHEICB001. Os testes foram conduzidos dentro de condições que garantiram os cuidados e o bem-estar animal, segundo os princípios de racionalidade 3R para a experimentação animal (Ms/Anvisa, 2005).

Procedeu-se à certificação botânica por especialista com depósito no Museu Nacional/UFRJ e à análise cromatográfica qualitativa por CLAE/UV sob condições estabelecidas (Varricchio, 2005). A partir do número de gotas utilizado em medicina tradicional, por 06 gotas de látex diluídas em 2 litros de água ingeridas por via oral com colheres de sopa ao longo de dois dias, podendo variar, porém de 1 a 10 gotas de acordo com o relato oral (Hecker & Furstenberger, 1986), calculou-se a concentração existente em uma gota do látex da *E. tirucalli* do jardim do NPPN para ensaios toxicológicos. A média de 5 frascos com o látex coletado resultou no peso médio de uma gota equivalente a 13 mg. 6 gotas

representam 78 mg de látex diluídos em 2 litros de água. Existem cerca de 0,8 mg para 20mL. Obteve-se a relação volume e concentração (Quadro 1).

Volume	Concentração do Látex
Peso Médio de 1 gota em 5 frascos 1 colher de sopa	13mg 20mL
6 gotas em 2.000mL	6 gotas em 2.000mL
Em 20,0mL	0,8mg
Em 1,0mL	0,04mg (40 µg)
1 gota em 500mL	13mg/500mL (0,03mg/ml)
10 gotas em 500mL	130mg/500mL (0,3mg/ml)

Quadro 1: Relação entre volume e concentração de látex de *E. tirucalli*.

O uso popular foi estimado em 80mg de látex bruto, por 48 horas. Sabe-se que a atividade biológica dos ésteres de forbol isolados ocorre mesmo em concentração nanomolar (Evans & Soper, 1978). Os látices utilizados para os testes de uso crônico, via oral, foram analisados qualitativamente através de CLAE/UV (Varricchio, 2005).

O efeito de doses ponderais do látex foi avaliado (1 gota e 10 gotas do látex) e água destilada foi utilizada como controle. Todas as gotas do látex bruto foram diluídas na água de beber dos animais (500 mL), tendo sido oferecidas por via oral *ad libitum* por um período de 18 semanas. Os animais, todas fêmeas e saudáveis, com idade a partir da quinta semana de vida, foram distribuídos em grupos de cinco camundongos suíços, perfazendo um total de 15 camundongos, todas colocadas em gaiolas próprias com piso quadriculado, em ambiente próprio. A cada grupo administrou-se água destilada (grupo controle), 1 gota de látex e 10 gotas de látex (efeito da dose ponderal).

Para a determinação de doses tóxicas durante todo o período (do momento zero até completar 18 semanas), os animais foram observados qualitativamente, clinicamente em relação à motilidade e ao comportamento, observando-se variações como mobilidade, agitação psicomotora, euforia, comportamento estereotipado (como andar em marcha, por exemplo) e outros aspectos físicos (contorções abdominais, vômitos, convulsões, dispnéia, parada respiratória, entre outros). A ração e a água foram oferecidas diariamente em semelhante quantidade para todos os grupos durante as semanas de observação (Ms/Anvisa, 2004).

O peso, o consumo de ração e o de água de cada grupo de animais foram avaliados na primeira semana (tempo zero) e a cada semana, através de gravimetria (peso e consumo de ração) e volumetria (consumo de água). A motilidade foi avaliada através da escala semiotécnica neurológica padrão (Wolfensohn & Lloyd, 1994).

Após o período de 18 semanas os animais foram sacrificados de forma humanitária, com uso de anestésico geral Thionembuthal (30mg/mL) variando a aplicação intra-peritoneal entre 0,1 a 0,2mL por camundongo de acordo com o peso de cada um, e foram realizadas necrópsias. Na ocasião, foram recolhidos e pesados fígado e baço em balança semi-analítica com duas casas decimais. Os achados morfológicos anatômicos macroscópicos foram anotados e adicionados às manifestações comportamentais, na tentativa de se estabelecer a toxidez do medicamento com relação a estes aspectos (Ms/Anvisa, 2004).

Ao final do experimento obteve-se a média e os desvios padrão de cada situação experimental, sendo realizada a análise de variância através do programa Graph Pad Instat, versão 2000, com nível de significância de 95%.

RESULTADOS

A análise qualitativa do látex de plantas coletadas no inverno de 2005 detectou ingenanos e tiglianos (Dagang *et al.*, 1994; Bicchi *et al.*, 2001).

Não foram observadas modificações comportamentais, neurológicas, imunológicas (infecções e sangramentos), nem quanto ao crescimento e desenvolvimento. Não ocorreu variação significativa para os pesos do fígado para todos os testes ($P > 0,05$), enquanto ocorreu aumento significativo para o peso do baço através do uso de 1 gota do látex de *E. tirucalli* em relação ao controle ($P < 0,05$), conforme mostrado no Quadro 2 abaixo:

Grupos	Dosagens/ Via	Média dos Pesos do Fígado (mg)	Pesos de Baço (mg)
CT Água Destilada (n = 4)	500mL <i>ad libitum</i>	1.818,5	139.5
Látex (n = 4)	1 gota <i>ad libitum</i>	1.672,25	182.5
Látex (n = 5)	10 gota <i>ad libitum</i>	1.892,2	127.6

Quadro 2: Médias de pesos de fígado e de baço de camundongos suíços submetidos à administração oral de látex bruto de *E. tirucalli* no período de 18 semanas.

DISCUSSÃO

Diversas maneiras de utilização de *Euphorbia tirucalli* como: informações por relato oral do uso popular continuado ao longo de cinco anos, com o extrato etanólico 70% por pessoas desenganadas; o relato do uso de 3 gotas de látex em água por dia, ambos em média durante cinco anos (Neiva, 1978) levaram à realização de experimentos para a análise dos efeitos toxicológicos sob uso crônico de preparos ponderais similares em modelo animal.

Grupos de camundongos sadios foram submetidos ao uso via oral *ad libitum* de 1 e 10 gotas do látex bruto diluído em água destilada, ao longo de 18 semanas. Foram acompanhados: o desenvolvimento, o metabolismo, o comportamento, a variação de leucócitos em sangue periférico, a análise da bioquímica do sangue, o peso de fígado e baço e a análise histopatológica de fígado e baço.

Preliminarmente quanto ao crescimento e o desenvolvimento animal, verificou-se que à comparação dos grupos não houve diferença significativa para motilidade e peso. Os animais que receberam uma gota de látex puro em água apresentaram consumo de ração e de água significativamente aumentado ($P < 0,05$). O grupo de 10 gotas tendeu ao aumento de peso nas últimas semanas de experimento, não significativo, porém sugerindo comprometimento da metabolização hepática de gorduras (Varricchio *et al.*, 2008 – submetido).

A observação toxicológica preliminar sérica de látex de *E. tirucalli* sugeriu que mesmo 1 gota foi capaz de desencadear vasoconstrição e hipóxia em nível tecidual, uma vez que a TGO, um marcador bioquímico também para isquemia tecidual associada à lise por estresse oxidativo, apresentou-se aumentada em torno de dez vezes para ambas dosagens. O aumento significativo do peso do baço associado ao aumento percentual de neutrófilos para o grupo administrado com 1 gota de látex sugere o desencadeamento de resposta inflamatória (Varricchio, 2006 - dados não publicados).

As observações de ausência de efeito do látex em dose ponderal sobre o peso de fígado e baço dos animais foram distintas daquelas descritas por Nawito e colaboradores, em estudo toxicológico feito com filhotes de cabras tratados com dose ponderal do látex de *E. peplus*, onde os animais apresentaram redução aumento significativo de peso com concomitante formação de edema generalizado por insuficiência hepática associada à insuficiência renal. Em paralelo, ainda foi verificada redução do peso de baço e o desenvolvimento de ascite, relacionados à hipertensão porta secundária à cirrose (Nawito *et al.*, 1998). Estes resultados preliminares serão complementados das

análises bioquímicas séricas e histopatológicas de fígado e baço, em andamento, para a compreensão do efeito biológico e toxicológico secundário ao uso crônico do látex de *E. tirucalli* do Rio de Janeiro.

CONCLUSÃO

Poucos são os experimentos toxicológicos realizados com látex de Aveloz do Estado do Rio de Janeiro, apesar de seu uso corriqueiro como auto-medicação para pacientes humanos e animais com neoplasias malignas, sendo este ensaio preliminar, objeto de grande interesse para pesquisa básica sobre o potencial biotecnológico com o emprego de *E. tirucalli* com finalidade medicinal. O presente estudo está sendo complementado com a análise histopatológica dos órgãos dos animais necropsiados utilizados nesse experimento.

REFERÊNCIAS

Brito, A.R.S. & Thomas, G. (1980). Propriedades antiinflamatórias do extrato aquoso de *Euphorbia tirucalli*. **Ciência e Cultura**, SP, 33: 87 – 90.

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

Hayat, S.; Rahman, A; Iqbal Choudary, M.; Khan, K.M.; Latif, H.; Bayer, E. (2002). Two new triterpenes from fern *Adiantum incisum*. **Verlag der Zettschrift für Naturforschung**, 57b: 233 – 238.

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

Lin, C.C.; Cheng, H.Y.; Yang, C.M.; Lin, T.C. (2002). Antioxidant and Antiviral activities of *Euphorbia thymifolia*. **Journal of Biomedicine Science**, USA, 9 (6): 656 – 64, Nov-Dec.

Lin, S.J.; Yeh, C.H.; Yang, L.M.; Liu, P.C. & Hsu, F.L. (2006). Phenolic compounds from Formosan *Euphorbia tirucalli*. **Journal of the Chinese Chemical Society**. China, 48: 105 – 108.

Megarvey, D.J. & Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. **The Plant Cell**, v.7: 1015 – 1026, july.

Ministério da Saúde, ANVISA, (2004). <http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1380/2004>, acesso em 2005.

Nawito, M.; Nawito M. Ahmed Yf, Zayed Sm, Hecker E. (1998). Dietary cancer risk conditional cancerogens in produce of livestock fed on species of spurge (*Euphorbiaceae*). II. Pathophysiological investigations in lactating goats fed on the skin irritant herb *Euphorbia peplus* and in their milk-raised kids. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 124:179- 185.

Neiva, L. (1968). **A cura do Câncer pelo Aveloz**. RJ: Arte Nova S.A, 1ª ed., 54p.

Nelson D.L. & Cox M.M. (2002). **Princípios de Bioquímica**. SP: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda.

Varricchio, M.C.B.N. (2005). “Estudos Integrados: Biotecnologia, Toxicologia, Metabólitos Especiais e Atividade Antitumoral de *Euphorbia tirucalli* L “ **Dissertação de Mestrado** sob a orientação de Celso Lage e Co-orientação de Ricardo Machado Kuster 2003/2004. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Varricchio, M.C.B.N.; Sales, F.; Nagamatsu, D.; Hobaica, P.E.M.; Silva, S.; Holandino, C.; Kuster, R.M.; Gomes, N.B.N.; Pyrrho, A.S.; Castelo Branco, M.L.T. Toxicological Chronic Effects of Latex of *E. Tirucalli* (Aveloz) Upon Healthy Mice as Traditional Use: Preliminary Observations. Submetido **Biology Plantarum** em 25/08/2008.

Wolfensohn, S. & Lloyd, M. (1994). **Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare**. Oxford University Press.