



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Instituto Biomédico

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

PARCIAL CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E TOXICOLÓGICA DO EXTRATO
AQUOSO DAS FOLHAS MODIFICADAS DE *Euphorbia tirucalli*

Ana Carolina Pereira Milhm

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Alessandra Fortes Aiub

Coorientador: Prof. Dr. Cesar Luis Siqueira Junior

Rio de Janeiro

2020

Ana Carolina Pereira Milhm

PARCIAL CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E TOXICOLÓGICA DO EXTRATO
AQUOSO DAS FOLHAS MODIFICADAS DE *Euphorbia tirucalli*

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da
Universidade Federal do Estado do
Rio de Janeiro como parte dos
requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Genética e
Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Alessandra Fortes Aiub

Coorientador: Prof. Dr. Cesar Luis Siqueira Junior

Rio de Janeiro

2020

P637 Pereira Milhm, ANA Carolina
 Parcial caracterização bioquímica e toxicológica do
extrato aquoso das folhas modificadas de Euphorbia
tirucalli / ANA Carolina Pereira Milhm. -- Rio de
Janeiro, 2020.
 58 f.

 Orientadora: Claudia Alessandra Fortes Aiub.
 Coorientador: Cesar Luis Siqueira Junior.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Biologia Molecular e Celular, 2020.

 1. Euphorbia tirucalli. 2. Inibidores de
proteínase. 3. proteínas. I. Fortes Aiub, Claudia
Alessandra, orient. II. Siqueira Junior, Cesar
Luis, coorient. III. Título.

Ana Carolina Pereira Milhm

PARCIAL CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E TOXICOLÓGICA DO EXTRATO
AQUOSO DAS FOLHAS MODIFICADAS DE *Euphorbia tirucalli*

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós Graduação em
Genética e Biologia Molecular da
Universidade Federal do Estado do
Rio de Janeiro como parte dos
requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Genética e
Biologia Molecular.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Andrea da Silva Fernandes Campos

Prof. Dr. Cassiano Felipe Gonçalves Albuquerque

Rio de Janeiro

2020

*Dedico este trabalho a todas
as pessoas que me apoiaram,
principalmente meus pais
Adriana e Jorge, minhas irmãs
Gabriela e Giovanna e meu
sempre namorado Gustavo.*

AGRADECIMENTO

Definitivamente, não há outra opção a não ser esse como meu primeiro agradecimento. Todo suporte necessário nesses dois anos, quando requisitados (e mesmo quando não) foram essenciais para a conclusão desta etapa. Não consigo contar quantas vezes quis desistir por não dar conta de tudo que deveria fazer, e não o fiz pois sabia de todo o investimento que estava sendo feito em mim. Como nada do que eu escreva será suficiente para agradecer, deixo apenas meu muito obrigada! Amo vocês pai e mãe!

Se avaliado o nosso tempo de convivência, mais da metade dele se resume a brigas, estranhamentos e provocações. O resto desse tempo, foi só amorzinho. Apesar de cada uma de vocês demonstrar (ou não) sua preocupação, interesse ou simplesmente deboche de formas diferentes, vocês também fazem parte disso, e agradeço (de vez em quando) por ter vocês como irmãs.

Lindo, começa que sem seu incentivo, ajuda e amor, esse trabalho não teria sido terminado, isso é um fato. Além disso, você foi e ainda é a melhor parte do meu dia, todos os dias. Não existem palavras suficientes para te agradecer, por dividir comigo a minha vida e me deixar fazer parte da sua. Te amo pra sempre!

César e Cláudia, vocês são a melhor dupla de orientadores que eu poderia ter nesse mestrado. Gostaria de pedir desculpas por todas as confusões, prazos apertados (e as vezes ultrapassados), e pelos muitos incômodos. Vocês dois me ajudaram muito, compraram materiais para que eu pudesse defender minha dissertação, me deram broncas quando necessário e acreditaram em mim até o final. Muito obrigada pela confiança.

A todos os colegas dos dois laboratórios que frequentei durante esses dois anos para execução dos meus experimentos, muito obrigada por toda parceria, ajuda, pelos momentos de descontração (e de sofrimento também) compartilhados. Com certeza tudo ficou mais leve, obrigada!

Vó, gostaria de agradecer por todo crédito dado a mim, sempre com uma palavra de incentivo e toda disponibilidade e ajuda do mundo. Te amo muito.

Não há como negar que todos os encontros familiares foram no mínimo inusitados, e que sempre aquela pergunta, as brincadeiras e o "vai dar tudo certo"

foram muito importantes. Obrigada a todos vocês, os de perto e os de longe que se fazem presente por mensagens, vídeos, áudios etc. Muito obrigada!

Agradeço ao Incra pelo ano de bolsa concedido.

Agradeço a todos os amigos que estiveram presentes durante todo esse tempo, e entenderam as faltas, ausências e correrias. Muito obrigada!

Agradeço aos membros do colegiado do Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular e Celular por todo suporte dado durante esses dois anos.

Agradeço a disponibilidade da banca, composta pelas professoras Andreia e Joelma, que foi também minha revisora. Além dos suplentes, professor Cassiano e Juliana. Muito obrigada!

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Funções proteicas com atividade biológica.....	13
1.1.1. Proteinases.....	13
1.1.2. Inibidores de Proteinases.....	14
1.2. Aveloz (<i>Euphorbia tirucalli</i>) e seus usos tradicionais.....	15
1.3. Potencial biotecnológico da aveloz.....	17
1.4. Importância das análises toxicológicas para a saúde, biotecnologia e farmacologia.....	17
1.5. Avaliação do potencial mutagênico e citotóxico.....	18
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. METODOLOGIA.....	20
3.1. Material vegetal e Extração de proteínas.....	20
3.2. Extração de proteínas de folhas modificadas de aveloz.....	20
3.3. Purificação parcial da cistatina de aveloz.....	22
3.4. Quantificação de proteínas.....	22
3.5. Avaliação da atividade inibitória do extrato aquoso de aveloz.....	22
3.6. Avaliação da atividade proteolítica do extrato aquoso de aveloz.....	23
3.7. Análise de proteínas via SDS-PAGE.....	24
3.8. Análise de amostras em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	24
3.9. Ensaio de Mutagenicidade <i>in vitro</i> (Teste de Ames).....	24
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Detecção da atividade de cistatinas no extrato de aveloz.....	27
4.2. Análise das proteínas extraídas via SDS-PAGE 10% do Tampão 2.....	30
4.3. Análise das proteínas extraídas via CLAE.....	31
4.4. Purificação parcial da cistatina de aveloz.....	32
4.5. Avaliação da atividade proteolítica do extrato bruto e frações purificadas.....	33
4.6. Avaliação da indução de mutagenicidade e de citotoxicidade pelo extrato bruto de Aveloz.....	34
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÃO.....	43
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	44

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
-------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de cistatinas (modelo estrutural). A- Stafostatina A de <i>Staphylococcus aureus</i> . B – Orizocistatina de arroz.	15
Figura 2 – <i>Euphorbia tirucalli</i> . A – Ilustração. B – Registro fotográfico.....	16
Figura 3 – Esquematização do fluxo de trabalho para obtenção dos extratos de <i>Euphorbia tirucalli</i>	21
Figura 4 - Detecção de atividade de cistatinas utilizando Tampão 1 e variação de aditivos no processo de extração.....	28
Figura 5 - Detecção de atividade de cistatinas utilizando Tampão 2 e variação de aditivos no processo de extração.....	29
Figura 6 –Perfil eletroforético das extrações realizadas com Tampão 2 e variações de aditivos.	30
Figura 7 – Perfil cromatográfico do extrato bruto de aveloz a 280nm em HPLC.....	31
Figura 8 – Atividade de cistatinas do extrato bruto e frações parcialmente purificadas.	32
Figura 9 – Atividade proteolítica do extrato bruto e frações purificadas.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação da indução de respostas mutagênicas e citotóxicas (Teste de Ames) em modelo procarioto.	35
---	----

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BANA	<i>N</i> -benzoil-arginina-naftilamida
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
EB	Extrato bruto
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
h	hora
HCl	Ácido Clorídrico
IM	Índice de Mutagenicidade
LB	Louria-Bertani
min	minuto
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	mililitro
mL/min	mililitros por minuto
mM	milimolar
MP	Marcador de Peso molecular
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	nanômetro
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PVP	Polivinilpirrolidona
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RJ	Rio de Janeiro
rpm	rotações por minuto
ufc	unidades formadoras de colônias

ufc/mL	unidades formadoras de colônias por mililitro
V	Voltz
v/v	volume por volume
µg	micrograma
µg/placa	micrograma por placa
µL	microlitro
µM	micrometro
% Sobrev	Percentual de sobrevivência
°C	graus celsius

RESUMO

Diversas proteínas realizam funções biológicas, em especial, as proteinases, também chamadas de enzimas, desempenham papel crucial em muitos mecanismos dos seres vivos, incluindo plantas, animais e microrganismos. Entretanto, quando mal reguladas, podem gerar consequências, como a não produção de determinadas substâncias, ou até a multiplicação anormal de células, que leva a tumores. Em contrapartida, realizando a regulação dessas proteinases, os inibidores de proteinases específicos ou não, atuam reduzindo a atividade das proteinases, impedindo assim, seu mal funcionamento. Tanto as proteinases, quanto os inibidores de proteinases são agrupados em classes, que dizem respeito às suas características relativas aos seus mecanismos de atuação ou estrutura química, por exemplo. Tais moléculas vêm sendo cada vez mais buscadas dentre os vegetais devido aos seus efeitos tradicionalmente reportados, mas não comprovados, sendo a planta *Euphorbia tirucalli* um exemplo, onde anteriormente um inibidor de proteinases cisteínicas foi isolado. *E. tirucalli* também conhecida como aveloz, é nativa do continente africano e apesar de ser reconhecidamente tóxica, é utilizada na medicina tradicional contra diversas doenças, como o câncer, gonorreia, artrite, e outras. Entretanto, tanto as moléculas envolvidas, quanto os efeitos descritos, não são conhecidos, sendo necessários estudos que busquem assegurar a saúde da população que utiliza de forma tradicional essa planta. Sendo assim, este estudo tem como objetivo caracterizar bioquimicamente o extrato aquoso das folhas modificadas de aveloz, avaliando sua citotoxicidade e mutagenicidade através do Teste de Ames. Como resultado dos métodos de extrações testados, a fitocistatina de aveloz parcialmente purificada foi extraída, e após precipitação encontrada na fração 0-30. Além disso, no perfil eletroforético relativo ao extrato bruto de aveloz, duas bandas nítidas são visualizadas, resultado corroborado pela avaliação através do método de troca iônica no CLAE. Adicionalmente, quando avaliada a atividade proteolítica de aveloz, uma protease foi extraída, estando localizada na fração 30-60, após fracionamento por Sulfato de Amônio. A avaliação sobre a toxicidade do extrato bruto de aveloz, revelou que apenas a cepa TA102 apresentou citotoxicidade induzida na maior concentração testada. Os resultados encontrados neste estudo indicam que a planta *E. tirucalli* possui potencial biotecnológico ainda a ser explorado, podendo ser associada a diversas áreas, como a farmacologia e a indústria alimentícia, por exemplo.

Palavras-chave: proteinases. Inibidores de proteinase. *Euphorbia tirucalli*.

ABSTRACT

Several proteins perform biological functions, in particular, proteinases, also called enzymes, play a crucial role in many mechanisms of living beings, including plants, animals and microorganisms. However, when poorly regulated, they can generate consequences, such as the non-production of certain substances, or even the abnormal multiplication of cells, which leads to tumors. On the other hand, by carrying out the regulation of these proteinases, specific or not specific proteinase inhibitors work by reducing the activity of proteinases, thus preventing their malfunction. Both proteinases and proteinase inhibitors are grouped into classes, according to their characteristics related to their mechanisms of action or chemical structure, for example. Such molecules have been increasingly investigated among plants due to their traditionally reported, but unproven effects, such as the *Euphorbia tirucalli* plant, where previously a cysteine proteinase inhibitor was isolated. *E. tirucalli*, also known as aveloz, is native to the African continent and despite being known to be toxic, it is used in traditional medicine against many diseases, such as cancer, gonorrhea, arthritis, and others. However, both the molecules involved, and the effects described are unknown, requiring studies that seek to ensure the health of the population that traditionally uses this plant. Thus, this study aims to biochemically characterize the aqueous extract of modified leaves of aveloz, evaluating its cytotoxicity and mutagenicity through the Ames Test. As a result of the tested extraction methods, partially purified aveloz phytocystatin was extracted, and after the salting-out method detected in the fraction 0-30. Also, the electrophoretic profile of the crude aveloz extract shows two clear bands, a result corroborated by the evaluation through the ion exchange method in the HPLC. Additionally, when the proteolytic activity of aveloz was evaluated, a protease was extracted, being detected in the 30-60 fraction, after Ammonium Sulfate salting-out. The toxicity evaluation of the aveloz crude extract revealed that only the strain TA100 presented cytotoxicity induced in the highest tested concentration. The results found in this study indicate that the *E. tirucalli* plant has biotechnological potential to be explored, and can be used in several areas, such as pharmacology and the food industry.

Key-words: proteinases.proteinase inhibitors. *Euphorbia tirucalli*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Funções proteicas com atividade biológica

As proteínas são moléculas que desempenham diversas funções essenciais para a manutenção da vida. Determinadas proteínas apresentam características que as conferem atividade biológica, como é o caso de proteinases e inibidores de proteinases. Nos vegetais, as proteinases e os inibidores de proteinases são participantes de diversos processos como germinação, desenvolvimento e defesa vegetal (SIQUEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2002; GRUDKOWSKA; ZAGDAŃSKA, 2004; SCHALLER, 2004; GARCIA-LORENZO, 2007; BALAKIREVA; ZAMYATNIN, 2018).

1.1.1. Proteinases

As proteinases são enzimas especializadas na clivagem de peptídeos, mais especificamente responsáveis pela hidrólise das ligações peptídicas. Podem ser classificadas de acordo com suas características, como a estrutura, o mecanismo de atividade, a reação catalisada e resíduos presentes no sítio ativo (HOOPER, 2002; TREMACOLDI, 2009). De forma geral podem ser classificadas em seis grupos: aspárticas, cisteínicas, glutâmicas, metaloproteases, serínicas e de treonina (RAWLINGS *et al.*, 2018). As proteinases cisteínicas e serínicas, por exemplo, são de grande interesse para estudos biotecnológicos, especialmente os que envolvem defesa vegetal (MELLO, 2001; SIQUEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2002; OLIVEIRA; XAVIER-FILHO; SALES, 2003); efeitos terapêuticos (SALAS *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2011) e potencial industrial (AHMED *et al.*, 2009). Um exemplo de protease cisteínica de origem vegetal é a papaína, obtida do mamão (*Carica papaya*), amplamente utilizada na indústria ou como modelo para estudos (MONTI *et al.*, 2000).

Em diversas áreas as proteinases vêm sendo utilizadas, na indústria alimentícia por exemplo, existe a busca pela substituição do complexo Rennet (enzimas digestivas de bovinos), que realiza a coagulação do leite, por enzimas de origem vegetal. Farias e colaboradores (2020) e Tito e colaboradores (2020), analisaram uma proteinase cisteínica extraída da fruta noni, e de batatas, respectivamente, que apresentou coagulação semelhante àquela produzida pelo complexo Rennet, se tornando uma alternativa à produção de queijos artesanais.

No âmbito farmacêutico, as proteinases vêm sendo descritas por diversos efeitos. Zaqueo e colaboradores (2014) extraíram do veneno de uma jararaca uma proteinase com capacidade coagulante, estimulando a ativação do fator XIII de coagulação humana. Já Kulkarni e colaboradores (2020), verificaram que uma protease produzida no látex de *Maclura spinosa* tem capacidade cicatrização de feridas subcutâneas. Entretanto, apesar de imprescindíveis, quando super expressas ou em altas concentrações podem causar danos aos organismos, sendo necessária sua regulação (RAWLINGS; BARRETT, 1993). Essa regulação é realizada pelos inibidores de proteinases, moléculas responsáveis por reduzir a atividade proteolítica.

1.1.2. Inibidores de Proteinases

Assim como as proteinases, os inibidores de proteinases também participam de diversos processos nos vegetais, seja exercendo sua atividade biológica diretamente ou atuando na regulação das próprias proteinases. Dentre os processos dos quais participam, destaca-se os relacionados a defesa vegetal, especialmente aqueles envolvidos com a inibição de proteinases de insetos herbívoros e outros patógenos vegetais (KOIWA; BRESSAN; HASEGAWA, 1997; VALUEVA; MOSOLOV, 2004). Devido ao grande interesse da comunidade científica, o número de grupos nos quais pode-se classificar os inibidores de proteinase vem crescendo, fato que potencializa a complexidade de classificar os mesmos (LASKOWSKI; QASIM, 2000; RAWLINGS *et al.*, 2018). Apesar disso, os inibidores são, inicialmente, classificados de acordo com sua especificidade: os não-específicos, capazes de inibir mais de uma classe de proteases; e os classe-específicos, capazes de inibir somente uma determinada classe de proteases, sendo nomeados de acordo com a mesma (JOANITTI; FREITAS; SILVA, 2006).

Mais especificamente, os inibidores de proteinases cisteínicas são denominados cistatinas, podendo ser divididas em famílias de acordo com os resíduos de cisteína (Figura 1A) e estruturação das ligações dissulfeto, quando presentes, na molécula. Dentre estas famílias, destacam-se as fitocistatinas (Figura 1B), que são encontradas exclusivamente em vegetais e participantes de diversos processos fisiológicos, especialmente defesa vegetal (HABIB; FAZILI, 2007). Diversos estudos já demonstram o potencial biotecnológico na agricultura (JACINTO *et al.*, 1998;

SIQUEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2002; AHMED; SHAMSI; BANO, 2016) e terapêutico (GOMES *et al.*, 2011; SRIKANTH; CHEN, 2016) destas moléculas.

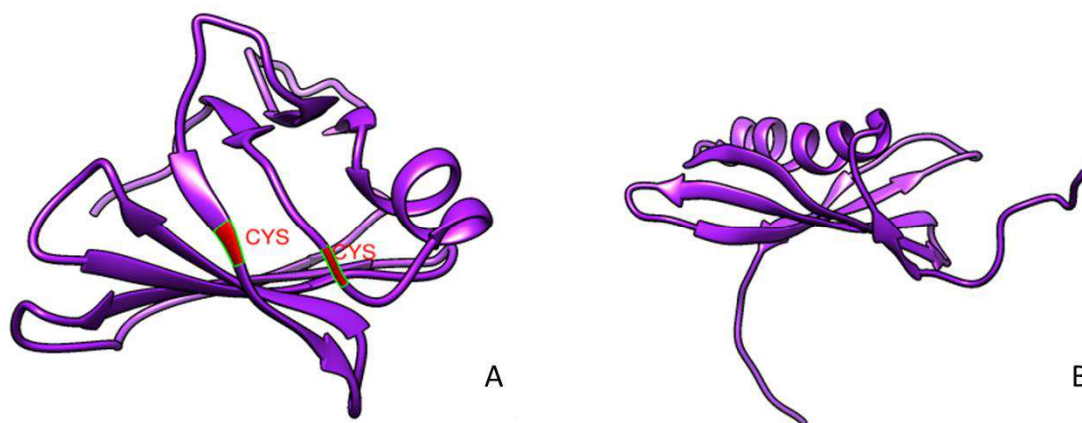


Figura 1 – Exemplos de cistatinas (modelo estrutural). A- Stafostatina A de *Staphylococcus aureus*. B – Orizocistatina de arroz.

Considerando o grande potencial de moléculas encontradas em vegetais, um estudo realizado por Milhm (2017), purificou parcialmente um composto a partir de folhas modificadas de *Euphorbia tirucalli*, conhecida como aveloz. Tal composto apresentou atividade de inibição de proteinases cisteínicas, demonstrando sua estabilidade em condições extremas de temperatura e pH. Tendo em vista a grande variedade de usos tradicionais e efeitos biológicos registrados para o vegetal, novas moléculas com atividade biológica devem ser investigadas, pois podem estar relacionadas com um ou mais efeitos dos usos tradicionais registrados (AL AKEEL *et al.*, 2014). Em especial, inibidores de proteinases de origem vegetal já vem sendo estudados tanto no campo da medicina (GOMES *et al.*, 2011; BRITO *et al.*, 2016; SRIKANTH; CHEN, 2016) e agricultura (SIQUEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2002; OLIVEIRA; XAVIER-FILHO; SALES, 2003) e poderiam estar potencialmente envolvidos com os efeitos biológicos dos usos dos extratos vegetais de aveloz.

1.2. Aveloz (*Euphorbia tirucalli*) e seus usos tradicionais

Conhecida popularmente como “aveloz”, a planta *Euphorbia tirucalli* L. pertence à família Euphorbiaceae, é originária da região leste do Continente Africano, e

endêmica de alguns países como Uganda, Etiópia e Angola (VAN DAMME, 1989; SHMELZER; GURIB-FAKIM, 2008; MWINE *et al.*, 2013). É uma planta suculenta, com folhas e flores diminutas, estas últimas raramente observadas, e reconhecidamente laticífera, sendo essa uma característica fundamental de sua família (DUKE, 1983). A espécie pode apresentar hábito arbustivo ou de pequenas árvores, atingindo aproximadamente 10 metros de altura, e de 15 a 20 centímetros de diâmetro (MWINE *et al.*, 2013). Além disso, a planta aveloz é bem adaptada aos locais áridos, climas secos e determinadas condições de *stress*, podendo se desenvolver em locais com pouca incidência de chuva, em solos salinos e erodidos, e em altitude (VAN DAMME, 1989).

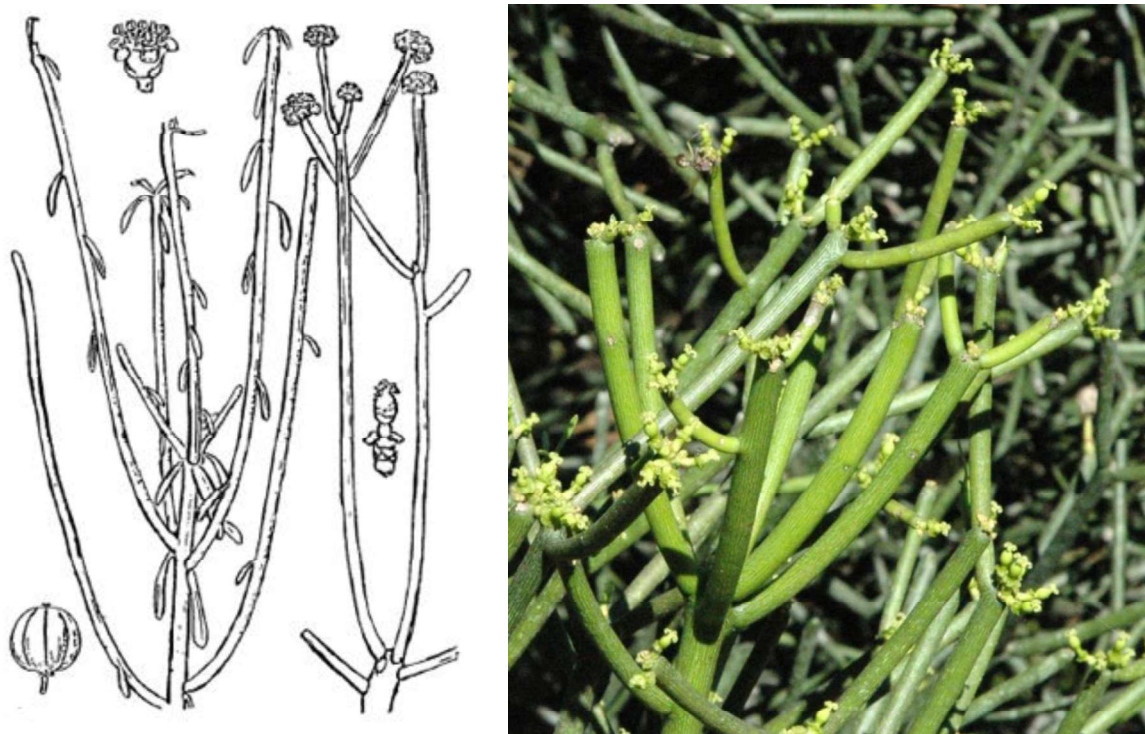


Figura 2 – *Euphorbia tirucalli*. A – Ilustração, Van Damme, 1989. B – Registro fotográfico, Royal Botanic Gardens Kew.

Adicionalmente, a planta apresenta grande potencial e viabilidade no Brasil, tendo facilidade de cultivo nas mesmas condições que a cana-de-açúcar se desenvolve, por exemplo (CALVIN, 1980). Apesar disso, atualmente, no Brasil, a planta tem sua exploração comercial mais expressiva voltada para a área de paisagismo, tendo seus usos tradicionais, ainda estudados.

1.3. Potencial biotecnológico da aveloz

A partir dos usos tradicionais reportados, diversos estudos buscam verificar e elucidar os efeitos associados ao uso dos extratos de aveloz. O extrato de folhas modificadas de *E. tirucalli*, apresenta efeitos moluscicida (JURBERG; CABRAL NETO; SCHALL, 1985), anti-herpético (BETANCUR-GALVIS *et al.*, 2002), antimutagênico (REZENDE *et al.*, 2004) e antibacteriano (LIRIO; HERMANO; FONTANILLA, 1998). Além disso, também foram descritas propriedades anticarcinogênica (HECKER, 1968; AVELAR *et al.*, 2011) e co-carcinogênica (IMAI *et al.*, 1994). Estudos na área de biotecnologia aplicada à agricultura registram seu potencial uso contra lagartas, cupins e afídios em pequenas plantações, assim como efeito larvícida (YADAV *et al.*, 2002). Adicionalmente, alguns estudos sugerem que o látex da planta poderia ser transformado em biocombustível (CALVIN, 1980; KHALEGHIAN; NAKAYA; NAZARI, 2011).

A aveloz é reconhecidamente tóxica, especialmente seu látex, que quando em contato com os olhos, pele ou mucosas pode causar irritação (LORENZI; MATOS, 2008). Apesar de sua toxicidade, a planta é largamente utilizada tradicionalmente, inclusive de forma terapêutica (VARRICCHIO *et al.*, 2008). Estudos registram o uso tradicional e o potencial terapêutico desta planta em diversos países, como Brasil, Índia, Indonésia e Malásia (GARG; KUMAR, 1989). Dentre os usos registrados e estudados, destacam-se os contra verrugas, câncer, dores de dente, asma e tosse (GARG; KUMAR, 1989), além do uso do látex como tratamento para gonorreia, artrite e hanseníase (NADKARNI, 1976).

1.4. Importância das análises toxicológicas para a saúde, biotecnologia e farmacologia

Diversas populações fazem uso de extratos vegetais para fins terapêuticos como uma forma de prevenção ou cura de enfermidades, seja por questões tradicionais ou, até mesmo por questões relacionadas à falta de acesso aos tratamentos convencionais (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005; SOUZA *et al.*, 2013). Nesse sentido, tanto a comprovação dos efeitos registrados, quanto uma análise toxicológica são necessárias, a fim de assegurar a saúde da população nos eventos de uso dos extratos vegetais. No entanto, não restrito à essa situação, um

procedimento essencial para manutenção do uso dos extratos como medicamento, ou na sua aplicação em pesquisas voltadas para o desenvolvimento de fármacos, é a realização de testes toxicológicos que avaliem o potencial mutagênico e citotóxico. Esses testes seguem as recomendações de diretrizes estabelecidas pela OCDE (2015) e são utilizados como parâmetro para avaliar possíveis danos celulares e genéticos de um determinado composto. Assim, com a relação entre exposição e carcinogênese já bem estabelecida (ICH, 2011), moléculas com efeitos biológicos e com potencial uso farmacológico, industrial e biotecnológico, devem ser submetidas a análises que avaliem concentrações de segurança para utilização do produto, em que não sejam detectados potenciais mutagênico e citotóxico às células, bem como utilizar estas informações para fins regulatórios (*Guideline 471*) (OECD, 2015).

1.5. Avaliação do potencial mutagênico e citotóxico

Tendo em vista a necessidade de se analisar estes compostos, o Teste de Ames se apresenta como uma solução de baixo custo e alta eficiência, além da rápida obtenção de resultados e ampla difusão e aceitação (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Este teste é a primeira análise toxicológica a ser realizada para avaliar determinada substância ou composto e apresenta alta correlação com modelos *in vitro* que fazem uso de células de mamíferos. O teste faz usos de diversas linhagens de *Salmonella enterica sorovar typhimurium* com mutações induzidas em *loci* específicos, tornando-as auxotróficas para histidina (*His-*), que quando em contato com um agente mutagênico, reverterem para o fenótipo selvagem, isto é, tornam-se prototróficas para histidina (*His+*). Por esse motivo, é conhecido como “Ensaio de Mutação Reversa Bacteriana”.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar bioquimicamente o extrato aquoso e a fitocistatina de *Euphorbia tirucalli* nele contida, avaliando seu potencial citotóxico e mutagênico.

2.2. Objetivos específicos

- (I) Determinar o melhor método de extração para a fitocistatina de *Euphorbia tirucalli*;
- (II) Purificar parcialmente a fitocistatina de *Euphorbia tirucalli*;
- (III) Caracterizar o extrato aquoso e a fitocistatina de *Euphorbia tirucalli*;
- (IV) Avaliar a atividade mutagênica e citotóxica através do Teste de Ames.