



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Pedro Marcos de Almeida

**Potencial Genotóxico do Extrato Foliar e do Látex de
Pinhão-Roxo (*Jatropha gossypifolia* L.)**

Recife

2014

Pedro Marcos de Almeida

**Potencial Genotóxico do Extrato Foliar e do Látex
de Pinhão-Roxo (*Jatropha gossypifolia* L.)**

Tese apresentada ao **Programa de
Pós-Graduação em Genética** da
Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para
obtenção do grau de **Doutor em
Genética**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Ana Christina Brasileiro-Vidal

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a Maria Aparecida Marin Morales

Prof^a. Dr^a Ana Maria Benko-Iseppon

Recife

2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

ALMEIDA, PEDRO MARCOS DE

Potencial genotóxico do extrato foliar e do látex de Pinhão-roxo (*Jatropha gossypifolia* L.) / Pedro Marcos de Almeida. – Recife: O Autor, 2014.

113 folhas: il.

Orientador: Brasileiro-Vidal, Ana Christina, Maria Aparecida Marin Morales, Ana Maria Benko-Iseppon

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Genética, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Euforbiácea 2. Plantas medicinais 3. Genética vegetal I. Brasileiro-Vidal, Ana Christina (orient.) II. Morales, Maria Aparecida Marin (coorient.) III. Benko-Iseppon, Ana Maria (coorient.) IV. Título.**

583.69

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-233

PEDRO MARCOS DE ALMEIDA

Potencial Genotóxico do Extrato Foliar e do Látex de Pinhão-Roxo
(*Jatropha gossypifolia* L.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em **Genética** da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Genética**.

Aprovado em: 15/09/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Ana Christina Brasileiro-Vidal (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco / Genética

Prof^a. Dr^a Neide Santos (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco / Genética

Prof^a. Dr^a Karina Perrelli Randau (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco / Ciências Farmacêuticas

Prof^a. Dr^a Mônica Lúcia Adam (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco / Zoologia

Prof^a. Dr^a Márcia Vanusa da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco / Bioquímica

Recife

2014

AGRADECIMENTOS

À minha esposa, Francielle Alline Martins, e ao meu filho, Lucas Martins de Almeida, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo apoio para alcançar mais um degrau na minha formação e qualificação.

Aos meus pais, Celso Guimarães de Almeida (*in memoriam*) e Maria das Graças de Paiva Almeida, e aos meus queridos irmãos, que mesmo de tão longe sempre me incentivaram a lutar pelos meus objetivos e nunca desistir. A todos os meus familiares pela credibilidade em minha pessoa.

À minha orientadora, Ana Christina Brasileiro-Vidal pela oportunidade, ensinamento e compreensão, auxiliando-me em todos os momentos na elaboração da tese e formação pessoal. “Ana, obrigado pelos lenços e pelo apoio nos momentos difíceis”.

Às minhas coorientadoras, Ana Maria Benko-Iseppon e Maria Aparecida Marin Morales pelas sugestões durante o desenvolvimento do presente trabalho.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), bem como ao corpo docente, por terem contribuído para minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Genética, em especial, à D. Zizi e ao Romildo pela amizade e pelo cafezinho passados nos momentos de descontração.

Aos professores da Universidade Estadual do Piauí (UESPI), Dr Francisco Soares Filho e Dr^a Fátima Pires, pela identificação taxonômica da planta em estudo e suporte laboratorial, respectivamente, e principalmente pela amizade.

A todos os professores da UESPI/FACIME pelo apoio e incentivo durante a difícil caminhada.

A todos da equipe do LGBV que me ajudaram em “diferentes projetos”. Às meninas da FISH agradeço pela paciência e amizade nas incontáveis horas de laboratório. Obrigado Manu e Rafaella pelos ensinamentos de bancada. Vanessa, nossa técnica do laboratório, ou melhor grande amiga de todos, sou muito grato pela dedicação e carinho.

À Silvany e Ísis que me ajudaram a construir e dar os primeiros passos na mutagênese. “Meninas não tenho palavras para agradecer tudo o que vocês fizeram por mim”.

Ao Adiles, um verdadeiro irmão, que teve que suportar o meu mau humor e em todos os momentos me ajudou com sua paciência e humildade. “Obrigado amigo, aprendi

muito com você”. Aos meus amigos peruanos, Fernando e Roberto, agradeço pelos momentos prazerosos e dolorosos com as picadas de escorpião.

Às grandes amigas de curso, Renata, Regina e Amanda, que me ajudaram a suportar a distância e ausência da minha família e juntamente com Adiles tiveram muita paciência com as minhas queixas e lamentações.

A todos aqueles que, de alguma forma, auxiliaram-me na concretização de mais um sonho...

Muito Obrigado!!!

A Deus;

À minha esposa Francielle e ao meu filho Lucas que são a minha fonte de energia para
transpor todas as barreiras e desafios;

Aos meus pais, Celso Guimarães de Almeida (*in memoriam*) e Maria das Graças de Paiva
Almeida, e meus irmãos pelo incentivo na busca de mais uma conquista;

Dedico

RESUMO

Jatropha gossypifolia L. (Euphorbiaceae) é um arbusto leitoso conhecido por suas propriedades medicinais. O presente estudo visou avaliar os efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do látex e dos extratos etanólico e aquoso foliares de *J. gossypifolia*, utilizando o sistema-teste *Allium cepa* L. Sementes de *A. cepa* foram submetidas a diferentes concentrações do látex (1,25; 2,5; 5; 10 e 20 mL/L) e dos extratos foliares (0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 mg/mL), utilizando como controle negativo água destilada e como controles positivos o Metilmetanosulfonato e a trifluralina, para avaliar os parâmetros de toxicidade (crescimento radicular), citotoxicidade (índice mitótico) e de genotoxicidade (alterações cromossômicas). O látex e os extratos apresentaram reduções significativas no comprimento médio das raízes e no índice mitótico na maioria das concentrações quando comparados ao controle negativo. Alterações cromossômicas significativas, como aderências cromossômicas, C-metáfases, pontes cromossômicas foram observadas no látex e nos dois extratos. A presença de brotos nucleares e micronúcleos foram encontrados apenas nos dois extratos foliares, enquanto as perdas cromossômicas foram significativas somente no extrato etanólico. Em geral, os testes realizados indicaram toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade do látex e dos extratos foliares de *J. gossypifolia*. Possivelmente, os danos provocados foram resultantes da presença de terpenos e/ ou flavonoides no extrato etanólico e de flavonoides e/ ou saponinas no extrato aquoso. Dessa forma, sugere-se que o uso medicinal dessa espécie seja feito com cautela.

Palavras-chave: extrato etanólico ou aquoso; *Jatropha gossypifolia* L.; látex; sistema-teste *Allium cepa*.

ABSTRACT

Jatropha gossypifolia L. (Euphorbiaceae) is a milky shrub known for its medicinal properties. The present study aimed to evaluate toxic, cytotoxic and genotoxic effects of the latex and of ethanolic and aqueous leaf extracts of *J. gossypifolia* using *Allium cepa* L. as test system. Seeds of *A. cepa* were exposed to different concentrations of latex (1.25, 2.5, 5, 10 and 20 mL/L) and leaf extracts (0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 mg/mL), using distilled water as negative control and as positive control the Metilmetanosulfonato and trifluralin, to evaluate parameters of toxicity (root growth), cytotoxicity (mitotic index) and genotoxicity (chromosome alterations). The latex and the extracts showed a significant decrease in root mean growth values as well as mitotic index in most concentrations when compared to the negative control. Significant chromosome alterations, such as chromosome adherences, C-metaphases, chromosome bridges were observed in the latex and in both extracts. The presence of nuclear buds and micronuclei were observed only in the leaf extracts while chromosome losses were significant only in the ethanolic extract. In general, the tests indicated toxicity, cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity in the latex and in the leaf extracts of *J. gossypifolia*. Possibly, the damages were the result of the presence of terpenes and/or flavonoids in ethanolic extract and flavonoids and/or saponins in the aqueous extract. Thus, it is suggested that the medicinal use of this species should be done carefully.

Key words: *Allium cepa* test; ethanolic or aqueous extracts; latex; *Jatropha gossypifolia* L.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição geográfica de <i>Jatropha gossypifolia</i>	22
Figura 2. Plantas de <i>Jatropha gossypifolia</i> , mostrando seu porte arbustivo (A) e folhas, flores e frutos (B) . Fotos do autor.	22
Figure 3. Chromosome aberrations after <i>Jatropha gossypifolia</i> latex treatment of <i>Allium cepa</i> meristematic cells. (A) Chromosomal adherence (1.25 mL/L). (B) C-metaphase (5 mL/L). (C) Metaphase with chromosome loss (2.5 mL/L). (D) Multipolar anaphase with chromosome bridges (5 mL/L). (E) Multipolar telophase with chromosome bridges (5 mL/L). (F) Polyploid metaphase (10 mL/L). (G) Binucleated cell (10 mL/L). (H) Nucleus with nuclear bud (5 mL/L). (I) Lobulated nucleus (2.5 mL/L). (J) Metaphase with chromosome fragment (5 mL/L). (K) Anaphase with chromosome bridge (10 mL/L). (L) Micronucleated cell (1.25 mL/L). Arrows in (C), (J) and (L) indicate chromosome loss, chromosome fragment and micronucleus, respectively. Bar: 10 µm (for all pictures).	57
Figura 4. Alterações cromossômicas após o tratamento com os extratos foliares (EE e EA) de <i>Jatropha gossypifolia</i> nas células meristemáticas de <i>A. cepa</i> visualizado com microscopia de luz. (A) Aderência cromossômica (0,1 mg/mL). (B) C-metáfase (1 mg/mL). (C) Metáfase com perda cromossômica (1 mg/mL). (D) Anáfase com perda cromossômica (1 mg/mL). (E) Anáfase multipolar com pontes cromossômicas (10 mg/mL). (F) Metáfase poliploide (0,1 mg/mL). (G) Célula binucleada (0,1 mg/mL). (H) Núcleos lobulados (10 mg/mL). (I) Broto nuclear (10 mg/mL). (J) Fragmentos cromossômicos (1 mg/mL). (K) Anáfase com ponte cromossômica (10 mg/mL). (L) Micronúcleo (10 mg/mL). Setas em (C) , (I) e (J) e (L) indicam perdas cromossômicas, broto nuclear, fragmento cromossômico e micronúcleo, respectivamente. Bar: 10 µm (para todas as imagens).	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos biológicos dos extratos de raiz, caule, folhas, frutos, sementes, óleo e látex de <i>Jatropha gossypifolia</i>	25
Tabela 2. Principais constituintes químicos de <i>Jatropha gossypifolia</i> , com respectivos solventes extratores e partes vegetais.....	33
Table 3. Values of mean length for the root tips of <i>Allium cepa</i> and mitotic indexes in meristematic cells, observed 24 h after <i>Jatropha gossypifolia</i> latex treatment at different concentrations.	55
Table 4. Frequency of chromosome aberrations in meristematic cells of <i>Allium cepa</i> root tips, observed 24 h after <i>Jatropha gossypifolia</i> latex treatment at different concentrations.	56
Tabela 5. Sistemas cromatográficos e reveladores utilizados para o perfil fitoquímico dos extratos foliares de <i>Jatropha gossypifolia</i>	75
Tabela 6. Valores do comprimento médio das radículas e dos índices mitóticos em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , observados após exposição de 24 h aos extratos etanólico e aquoso de <i>Jatropha gossypifolia</i> em diferentes concentrações.	77
Tabela 7. Frequência das alterações cromossômicas em células meristemáticas e índices de MN em células F ₁ de radículas de <i>Allium cepa</i> , observadas após a exposição por 24 h ao extrato etanólico de <i>Jatropha gossypifolia</i> em diferentes concentrações.	80
Tabela 8. Frequência das alterações cromossômicas em células meristemáticas e índices de MN em células F ₁ de radículas de <i>Allium cepa</i> , observadas após exposição por 24 h ao extrato aquoso de <i>Jatropha gossypifolia</i> em diferentes concentrações.	81

LISTA DE ABREVIATURAS

Item	Definição
AC	Alterações Cromossômicas
AChE	Acetylcholinesterase
AN	Anormalidades Nucleares
APC	Complexo Promotor da Anáfase
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada
CaM-quinases	Quinases Dependente de Cálcio/Calmodulina
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDK2	Quinase Dependente de Ciclina 2
CDKA	Quinase Tipo A
CDKB	Quinase Tipo B
CDKD	Quinase Tipo D
CDKs	Quinases Dependentes de Ciclinas
Chang	Cultura Celular de Hepatócitos Humanos
CKI	Proteínas Inibidoras de CDKs
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
Cv	Cultivar
CYCA	Ciclina do Tipo A
CYCB	Ciclina do Tipo B
CYCD	Ciclina do Tipo D
DM-500	Microscópio Leica Convencional de Campo Claro
DSB	Quebras de Fita Dupla no DNA
EA	Extrato Aquoso das folhas de <i>Jatropha gossypifolia</i>
EE	Extrato Etanólico das folhas de <i>Jatropha gossypifolia</i>
F ₁	Células F1
FISH	Hibridização <i>In Situ</i> Fluorescente
G ₀	Período da intérfase em Repouso
G ₁	Período da intérfase antes do período de Síntese (S)
G ₂	Período da intérfase pré-mitótico, após período S

γH2AX	Histona H2AX Fosforilada
HCl	Ácido clorídrico
HeLa	Câncer de Colo Uterino Humano
HS 578T	Cultura Celular de Mama
IM	Índice Mitótico
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
IPC-298	Cultura Celular de Melanoma Humano
M	Mitose
MC	Microtúbulos Corticais
MCF-7	Câncer de Mama Humano
MCY-LR	Microcistina-LR
MDA-MB-435	Cultura Celular de Melanoma
MDA-MB-468	Cultura Celular de Mama
MMS	Metilmetanosulfonato
MN	Micronúcleos
MP	Metabólitos Primários
MS	Metabólitos Secundários
MTs	Microtúbulos
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVCAR 3	Cultura Celular de Câncer Ovariano Humano
PCi	Peptídeos Cíclicos
PKC	Proteína Quinase C
PKCδ	Proteína Quinase Delta
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PPB	Banda Pré-Profásica
ppm	Partes por Milhão
S	Síntese de DNA
SR	Cultura Celular de Leucemia
SUS	Sistema Único de Saúde
Topo II	Topoisomerase II
Vero	Cultura Celular de Rim de Macaco Africano
W7	Inibidor de Quinase Dependente de Cálcio/Calmodulina

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Plantas Medicinais.....	18
2.2 Euphorbiaceae.....	19
2.2.1 O gênero <i>Jatropha</i>	20
2.2.1.1 <i>Jatropha gossypifolia</i>	21
2.2.1.1.1 Efeitos Biológicos de <i>Jatropha gossypifolia</i>	23
2.3 Compostos Químicos e Efeitos Biológicos.....	27
2.3.1 Peptídeos Cíclicos.....	27
2.3.2 Diterpenos.....	28
2.3.3 Metabólitos Secundários.....	29
2.4 Controle do Ciclo Celular.....	38
2.4.1 Ciclinas e CDKs.....	38
2.4.2 Inibidores de CDKs.....	39
2.4.3. Inibidores de Fosfatases.....	39
2.4.4 Microtúbulos.....	40
2.5 Sistema-Teste <i>Allium cepa</i>	41
3. OBJETIVOS.....	45

3.1 Objetivo Geral.....	45
3.2 Objetivos Específicos.....	45
4. CAPÍTULO I - Genotoxic Potential of the Latex from Cotton-Leaf Physicnut (<i>Jatropha gossypifolia</i> L.).....	46
5. CAPÍTULO II - Potencial Genotóxico e Perfil Fitoquímico do Extrato Foliar de Pinhão-Roxo (<i>Jatropha gossypifolia</i> L.).....	67
6. DISCUSSÃO GERAL.....	94
7. CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS.....	98
ANEXO.....	109

1. INTRODUÇÃO

Jatropha gossypifolia L., popularmente conhecida como pinhão-roxo, é um arbusto leitoso da família Euphorbiaceae distribuída nas cinco regiões brasileiras. *Jatropha gossypifolia* é uma oleaginosa com potencial para produção de biocombustível e destaca-se por suas propriedades medicinais, presentes em todas as partes da planta, sendo utilizada, principalmente, na forma de chás, compressas ou *in natura*. No entanto, além das reconhecidas propriedades terapêuticas, apresenta substâncias químicas que podem ser prejudiciais à saúde. Dessa forma, para a utilização de *J. gossypifolia* como planta medicinal, muitos estudos ainda são necessários, a começar, pela avaliação do potencial toxicológico do extrato foliar e do látex usados de forma empírica na medicina popular.

Testes de genotoxicidade são os primeiros ensaios para a avaliação da potencialidade de aplicação clínica de um novo material para uso medicinal, tornando-se necessária a identificação de concentrações e doses que possam, eventualmente, induzir possíveis efeitos adversos. Considerando que testes de toxicidade em animais modelo levam à morte dos mesmos, alternativas para análise deste potencial devem ser consideradas. Nesse sentido, modelos vegetais têm sido utilizados, destacando-se a espécie *Allium cepa* L. (cebola) que permite avaliar: (1) o potencial tóxico da substância testada, mediante a avaliação do crescimento radicular; (2) o efeito citotóxico, mediante verificação da frequência do índice mitótico; e (3) o índice de alterações cromossômicas (genotoxicidade). O último inclui alterações resultantes de efeitos aneugênicos (C-metáfases, metáfases com aderências cromossômicas, perdas cromossômicas, anáfases multipolares, células binucleadas, metáfases poliploides, dentre outras) ou efeitos clastogênicos (fragmentos cromossômicos, pontes cromossômicas e outras alterações). Os micronúcleos podem ser resultantes tanto de efeitos aneugênicos quanto clastogênicos.

Adicionalmente, a presença ou não de micronúcleos também pode ser avaliada nas células F₁, que são derivadas da divisão mitótica de células meristemáticas, permitindo a avaliação do potencial mutagênico em nível cromossômico. Esses parâmetros são considerados como importantes ferramentas para avaliação de substâncias químicas ou naturais para uso medicinal.

Considerando que *J. gossypifolia* tem um importante potencial para a geração de produtos farmacológicos e/ou biotecnológicos e é amplamente utilizada na medicina popular de forma empírica, estudos toxicológicos, citotóxicos e genotóxicos tornam-se necessários para avaliar a eficácia e os riscos de *J. gossypifolia* na terapia medicinal. Dessa forma, o presente trabalho teve como finalidade avaliar o potencial efeito tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico da folha e do látex, bem como analisar o perfil fitoquímico das folhas de *J. gossypifolia*. O uso dos referidos testes será estratégico não só para orientar o uso ou não desses subprodutos na medicina popular, como também para o desenvolvimento futuro de drogas mais eficazes para a saúde humana subsidiando a geração de novos produtos para a indústria farmacêutica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

As plantas medicinais são utilizadas para a manutenção e recuperação da saúde, desde as formas mais simples de tratamento na medicina popular até a fabricação industrial de medicamentos (LORENZI; MATOS, 2008). As plantas medicinais representam as maiores fontes de substâncias ativas na terapêutica, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos. Na busca de novos medicamentos de origem vegetal estão envolvidos conhecimentos agrônômicos, botânicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial depende de plantas medicinais para os cuidados de atenção básica à saúde (OUEDRAOGO et al., 2012). Os fitoterápicos são utilizados em todo o mundo e encontram-se em ascensão nas nações ocidentais (JORDAN et al., 2010). Nos Estados Unidos, a comercialização de ervas medicinais aumentou cerca de 23% de 2000 a 2010 e junto com países europeus, especialmente a Alemanha, e Asiáticos, atende aos principais mercados produtores e consumidores desses medicamentos (JORDAN et al., 2010).

Nos países em desenvolvimento, a OMS incentiva o uso de medicamentos à base de plantas (ATSAMO et al., 2011) e cerca de 65-80% da população desses países depende das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA-JUNIOR, 2008). No Brasil, cerca de 82% da sua população utiliza produtos à base de plantas medicinais (RODRIGUES; SIMONI, 2010). Contudo, a carência de informações adequadas sobre aspectos como eficácia e segurança desses produtos tem dificultado o uso de plantas medicinais pela população em geral (OUEDRAOGO et al., 2012). Por outro

lado, a instituição de Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, PNPMF (Decreto nº 5.813, 22 de junho de 2006) tem como medida fortalecer o desenvolvimento industrial e tecnológico nesta área e sobretudo garantir melhor acesso aos medicamentos pelos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), mediante programas básicos de saúde de forma a valorizar o conhecimento popular e incentivar a terapia fitoterápica (BRASIL, 2006).

Dentre as várias plantas medicinais conhecidas, as espécies de *Jatropha* (família Euphorbiaceae) são bastante utilizadas na África, Ásia e América Latina para diarreias, disenterias, vômitos, náuseas, dores gástricas e no tratamento de feridas bucais (SABANDAR et al., 2013). Embora sejam catalogadas como tóxicas, existem muitos relatos de seu uso na medicina popular ao longo dos anos, com propriedades químicas e farmacológicas comprovadas (DEVAPPA et al., 2010; MARIZ et al., 2010; SABANDAR et al., 2013).

2.2 Euphorbiaceae

Euphorbiaceae é uma das maiores famílias das Angiospermas, composta por mais de 300 gêneros e mais de 8.000 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropical e subtropical, especialmente nos continentes americano e africano (WEBSTER, 1994). No Brasil, ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies (SOUZA; LORENZI, 2006). Os gêneros mais expressivos da família são *Euphorbia*, com 1500 espécies, *Croton* (700), *Phyllanthus* (400), *Acalypha* (400), *Macaranga* (250), *Antidesma* (150), *Drypetes* (150), *Tragia* (150), *Jatropha* (150) e *Manihot* (150) (Cronquist, 1981). Apresentam espécies de grande importância econômica como a mamona [*Ricinus communis* L. (fonte de biocombustível)], a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), a seringueira (*Hevea*

brasiliensis Willd), e várias espécies de *Jatropha* utilizadas em preparações medicinais (AYYANAR; IGNACIMUTHU, 2010).

Euphorbiaceae possui espécies muito diversificadas, incluindo árvores, arbustos e ervas monoicas ou dioicas (JOLY, 1985). Geralmente são latexcentes com folhas alternas ou opostas, estípulas livres, caducas ou persistentes. Possuem inflorescências terminais ou axilares, com flores solitárias ou em glomérulos. As flores são unissexuais, actinomorfas; com sépalas e pétalas de cores diferentes; gineceu sincárpico, ovário súpero e geralmente tricarpeal e placentação axial. O fruto é geralmente capsular com deiscência explosiva, abrindo-se em três mericarpos (WEBSTER, 1994). Os membros dessa família mostram uma grande diversidade em sua anatomia de nó, pecíolo, limbo foliar, venação, tipos de estômatos, órgãos florais, frutos e sementes. Esta divergência provavelmente está associada à diversidade de habitats encontrados na família (THAKUR; PATIL, 2012).

2.2.1 O gênero *Jatropha*

O gênero *Jatropha* possui de 165 a 175 espécies distribuídas por países de clima tropical, subtropical ou tropical seco, sendo representadas por árvores, arbustos e subarbustos. Dois subgêneros são reconhecidos, o subgênero *Jatropha*, de distribuição mais ampla, possuindo espécies na África, Índia, América do Sul, Antilhas, América Central e Caribe, e o subgênero *Curcas*, com espécies predominantemente no México, Texas e Arizona (DEHGAN, 1982). *Jatropha curcas*, por exemplo, é membro do subgênero *Curcas*, enquanto *J. gossypifolia* pertence ao subgênero *Jatropha* (DEHGAN, 1982).

Em geral, as espécies de *Jatropha* possuem folhas simples, estípulas geralmente persistentes, com reprodução monoica ou dioica, látex geralmente amarelado, estilete

bífido, estames livres ou conectados e fruto capsular com sementes carunculadas (WEBSTER, 1994). Além das semelhanças quanto à morfologia vegetal, as diferentes espécies, como *J. curcas*, *J. gossypiifolia*, *J. multifida*, *J. mollissima*, *J. elliptica*, *J. gaumeri*, *J. grossidentata*, *J. integerrima*, *J. podagrica*, *J. weddelliana*, dentre outras, são amplamente utilizadas na medicina popular. Entre elas *J. gossypiifolia* destaca-se por ser uma das mais utilizadas na terapia popular (SABANDAR et al., 2013).

2.2.1.1 *Jatropha gossypiifolia*

Jatropha gossypiifolia, popularmente conhecida como pinhão-roxo ocorre na América Latina, Caribe, Índia, África Ocidental, Oceania e nas cinco regiões brasileiras (Figura 1) (KAWANGA, 2007; CORDEIRO; SECCO, 2014). É um arbusto leitoso e perene (Figura 2A) que pode alcançar de 1,5 a 4,5 m de altura. As folhas (Figura 2B) são alternas, revestidas de pelos e possuem cera, em pelo menos uma das superfícies (abaxial ou adaxial). Os estômatos possuem bordas cuticulares grossas. Ainda na epiderme, percebe-se a presença de pelos uniseriados e glândulas alongadas (OLOWOKUDEJO, 1993). As flores (Figura 2B) são roxas, incompletas, actinomorfas, unissexuais e pentâmeras dispostas em cimeiras paniculadas. Os frutos (Figura 2B) são pequenos (cerca de 1 cm de comprimento) e capsulares contendo de uma a três sementes com cerca de 24% de óleo (SCHVARTSMAN, 1992; OLIVEIRA et al., 2009). O caule é lenhoso, ereto, cilíndrico, sólido, ramificado e com raízes relativamente curtas e pouco profundas, apresentando látex (Figura 2B) branco-amarelado quando os ramos são cortados (KUMAR; SINGH, 2012).

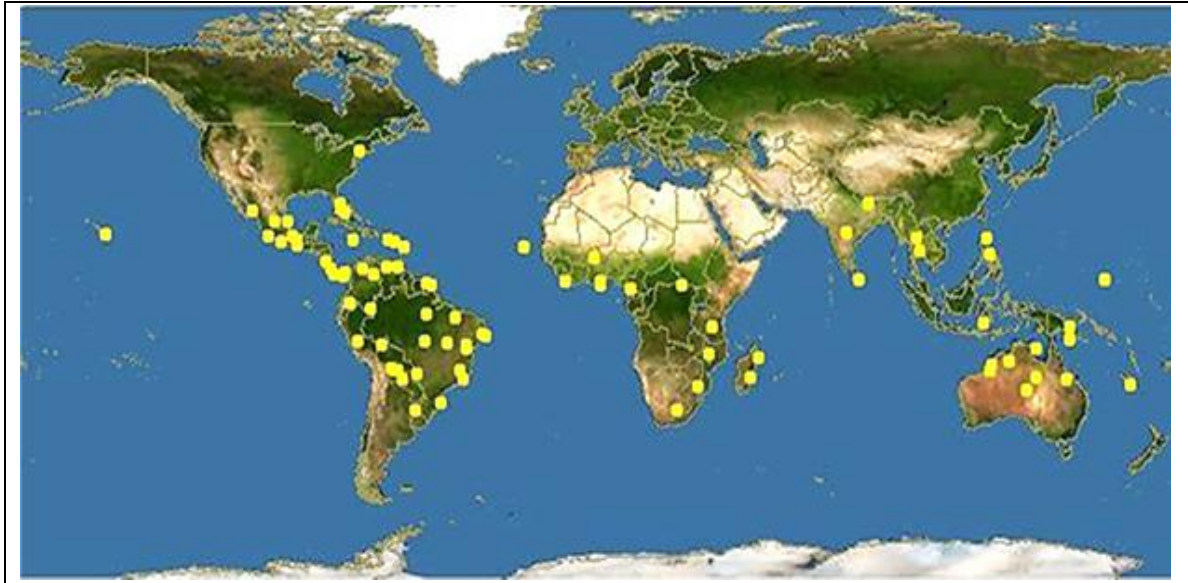


Figura 1. Distribuição geográfica de *Jatropha gossypifolia*. Fonte: [http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Jatropha gossypifolia](http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Jatropha%20gossypifolia) em 14 de julho de 2013.



Figura 2. Plantas de *Jatropha gossypifolia*, mostrando seu porte arbustivo (A) e folhas, flores e frutos (B). Fotos do autor.

2.2.1.1.1 Efeitos Biológicos de *Jatropha gossypifolia*

Jatropha gossypifolia tem sido utilizada na medicina popular com diferentes finalidades terapêuticas (Tabela 2). As folhas são usadas *in natura* ou em compressa e têm efeitos anticoagulante (ODUOLA et al., 2005), anti-inflamatório (OLIVEIRA et al., 2010), antimalárico (JANSEN et al., 2010) e antimicrobiano (KUMAR et al., 2006; DHALE; BIRARI, 2010; GAIKWAD et al., 2012). O chá das folhas é usado como antitérmico e o extrato foliar pode ser usado em banhos na cicatrização de feridas cutâneas (AMOROZO et al., 1988). Esta última atividade foi comprovada cientificamente em ratos (SANTOS et al., 2006). Além disso, em algumas regiões do Brasil as folhas são usadas de forma ritualística por ser considerada venenosa e pelas bezendeiras para tirar mal olhado (MATOS, 2004).

As folhas também são usadas para vertigem, constipação, diarreia, purgante, doenças de pele, câncer, dor de estômago, coceira; edemas, doenças venéreas (MARIZ et al., 2010; SABANDAR et al., 2013) e possuem ação inseticida (VALENCIA et al., 2006).

A raiz e o caule possuem ações anticancerígena, citotóxica (MATOS, 2004; NAZEEMA; GIRIJA, 2013), antimalárica, leishmanicida, antimicrobiana, inseticida e moluscicida (SABANDAR et al., 2013). Em camundongos, foi verificada ação anti-inflamatória das raízes (BHAGAT et al., 2013). As sementes e os frutos são usados contra gripe e como purgantes (SABANDAR et al., 2013). Adicionalmente, Apu et al. (2013b) verificaram que o extrato metanólico dos frutos em camundongos resultaram em efeitos sedativo, analgésico e antidiarreico.

O óleo em especial pode ser utilizado no combate à úlcera e micoses, além de ter efeito purgativo e laxante (SABANDAR et al., 2013). Adicionalmente, ressalta-se o seu

potencial para produção de biocombustível (OLIVEIRA et al., 2009) e para o fabrico de sabões, tintas, iluminação e como lubrificante (MATOS, 2004).

O látex é moluscicida (combate a vetores) (MATOS, 2004) e bactericida (ROCHA; DANTAS, 2009), além de ser útil contra feridas e mordidas de animais peçonhentos (SANTOS et al., 2006). No sul da Nigéria, o látex é utilizado para reduzir o sangramento nasal. Em estudos com ratos albinos, o látex não mostrou efeitos adversos sobre as funções do fígado, rim e medula óssea (ODUOLA et al., 2007). Além disso, o látex é aplicado sobre as gengivas e dentes para curar gengivite e piorreia (PUNJAJI, 2012).

Tabela 1. Efeitos biológicos dos extratos de raiz, caule, folhas, frutos, sementes, óleo e látex de *Jatropha gossypifolia*.

Efeito biológico do extrato	Parte vegetal	Referências
Anti-inflamatório	Folhas e Látex	12, 13, 14, 22
Antimalárico	Raiz, Caule, Folhas e Látex	9, 11, 12, 14, 22
Antimicrobiano	Raiz, Caule, Folhas e Látex	4, 8, 10, 12, 16, 18, 22
Antitérmico	Folhas	1
Antioxidante	Folhas	15, 20
Antitumoral	Raiz, Caule e Folhas	3, 9, 12, 14, 20, 22
Antiviral	Caule e Folhas	12
Cicatrizante	Caule, Folha e Látex	5, 12, 13
Citotóxico	Raiz, Caule, Folha e Látex	9, 12, 14, 16, 17, 19, 22
Constrição	Folha	22
Diarreia	Raiz e Folha	22
Dor dente	Toda planta	22
Gripe	Frutos e Sementes	22
Gonorréia	Raiz	14
Hipotensor	Caule e Folha	6
Inseticida	Raiz, Caule e Folha	7; 12, 14, 22
Leishmanicida	Raiz, Caule e Folha	2; 12, 14, 22
Lepra	Raiz e Óleo	12, 14, 22
Micoses	Óleo	22
Moluscicida	Raiz, Caule, Folha, Fruto, Sementes e Látex	3, 9, 12, 14, 22
Piscicida	Folha	21
Purgantes	Folha, Fruto, Sementes e Óleo	22
Sedativo	Raiz e Folha	12
Toxicidade	Caule, Folha, Fruto, Sementes e Látex	12
Tripanomicida	Raiz	2
Úlceras	Óleo	22

¹ Amorozo et al. (1988); ² Schmeda-hirschmann; Razmilic (1996); ³ Matos (2004); ⁴ Kumar et al. (2006); ⁵ Santos et al. (2006); ⁶ Servin et al. (2006); ⁷ Valencia et al. (2006); ⁸ Rocha; Dantas (2009); ^{9*} Zhang et al. (2009); ¹⁰ Dhale; Birari (2010); ¹¹ Jansen et al. (2010); ^{12*} Mariz et al. (2010); ¹³ Oliveira et al. (2010); ^{14*} Devappa et al. (2011); ¹⁵ Narayanaswamy; Balakrishnan (2011); ¹⁶ Sahidin et al. (2011); ¹⁷ Falodun et al. (2012); ¹⁸ Gaikwad et al. (2012); ¹⁹ Apu et al. (2013a); ²⁰ Nazeema; Girija (2013); ²¹ Pratap; Singh (2013); ^{22*} Sabandar et al. (2013); (*) Artigos de Revisão.

Apesar das diferentes propriedades medicinais, *J. gossypiiifolia* possui também várias desvantagens. O extrato foliar, por exemplo, provoca mobilização do cálcio intracelular, promovendo efeito hipotensor (SERVIN et al., 2006). Em ratos tratados com o extrato etanólico de partes aéreas (folhas e caules), foi demonstrada toxicidade aguda oral relativamente baixa (MARIZ et al., 2006), entretanto, uma importante toxicidade crônica foi observada por MARIZ et al. (2008).

Em ovinos, as folhas de *J. gossypiiifolia* provocaram perturbações digestivas, pulmonares, cardíacas, hepáticas e renais (OLIVEIRA et al., 2008). O extrato foliar também provocou toxicidade em *Artemia salina* (APU et al., 2013a). Adicionalmente, flavonoides como apigenina (obtidos do extrato etanólico foliar) e o látex provocaram uma redução significativa de acetilcolinesterase no tecido nervoso de peixes de água doce, como *Channa marulius* (SINGH; SINGH, 2005) e *C. punctatus* (PRATAP; SINGH, 2013).

De um modo geral, as diferentes partes de *J. gossypiiifolia* que são utilizadas na medicina popular podem ser tóxicas. Desta forma mais estudos toxicológicos dessa planta devem ser realizados para garantir maior eficácia e segurança na sua utilização terapêutica.

2.3 Compostos Químicos e Efeitos Biológicos

Diferentes fitoquímicos como peptídeos cíclicos, terpenos, alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas, cumarinas, fenóis entre outros foram obtidos a partir dos extratos de folhas, caule, raiz, óleo e látex de espécies de *Jatropha*. Esses compostos apresentam uma gama de atividades biológicas com propriedades tóxicas, citotóxicas, antitumorais, antioxidantes, anti-inflamatórias, cicatrizantes, moluscicida, entre outras comprovadas (DEVAPPA et al., 2010; SABANDAR et al., 2013).

2.3.1 Peptídeos Cíclicos

Os peptídeos cíclicos (PCi) são compostos formados principalmente por ligações peptídicas de 2-37 aminoácidos e são bastante estáveis à degradação enzimática devido à não exposição dos grupos C, N-terminal a exopeptídeos (WU et al., 2007).

A conformação cíclica dos PCi permite que os mesmos atravessem as membranas biológicas mais rapidamente do que os peptídeos lineares (SAKAI et al., 1996). Provavelmente, esse fato poderia explicar a atividade antibacteriana dos PCi, curcaciclinas A e B, obtidos do látex de *J. curcas* L., embora também tenham apresentado atividade tóxica em *Artemia salina* Leache e citotóxica em cultura celular de câncer ovariano humano (OVCAR 3) (INSANU et al., 2012). Outros PCi, como as integrinas A e B, do látex de *J. integerrima* Jacq. também apresentaram atividade citotóxica em culturas neuronais e nas células de melanoma humano (IPC-298) (MONGKOLVISUT et al., 2006).

Segundo Mongkolvisut et al. (2006), os PCi integrinas A e B poderiam interferir na montagem dos microtúbulos, consequentemente afetando a proliferação celular. Essa ação antimitótica foi previamente confirmada para três PCi, celogentinas A, B e C, extraídos de sementes de *Celosia argentea* L. (KOBAYASHI et al., 2001). Neste estudo, esses

compostos inibiram a polimerização de tubulinas como o antitumoral vinblastina. A síntese do composto celogentina C reforçou a atividade citotóxica em cultura de células tumorais, incluindo leucemia (SR), melanoma (MDA-MB-435) e mama (HS 578T e MDA-MB-468) (MA et al., 2010).

Investigações do látex de *J. chevalieri* Beille, *J. gossypiifolia* L., *J. macrorrhiza* Benth., *J. multifida* L., *J. podagrica* Hook e *J. mollissima* (Pohl) Baill também resultaram no isolamento de PCi com atividades citotóxica, antimalárica e antimicrobiana reconhecidas (SABANDAR et al., 2013).

2.3.2 Diterpenos

Os terpenos (monoterpenos, diterpenos, triterpenos e sesquiterpenos) são compostos formados por arranjos lineares de unidades de isopreno, seguida por ciclização e rearranjos do esqueleto de carbono. Entre os terpenos, os diterpenos obtidos a partir de raízes, caules, folhas e óleo das espécies de *Jatropha* apresentam atividades antimicrobiana, antitumoral, citotóxica, moluscicida e inseticida (SCHMEDA-HIRSCHMANN; RAZMILIC, 1996; DAS et al., 2009; AIYELAAGBE et al., 2011; KANTH et al., 2011; DEVAPPA et al., 2012; OSKOUETIAN et al., 2012a,b).

O diterpeno tiglane conhecido como éster de forbol, isolado de todas as partes de *J. curcas*, exceto do látex, bem como do óleo de *J. gossypiifolia*, é um análogo do diacilglicerol, que ativa a proteína quinase C (PKC). Contudo, o éster de forbol promove superexpressão da PKC, aumentando o processo de proliferação celular e a eficácia de carcinógenos (DEVAPPA et al., 2010). Em outros trabalhos, foi verificada a citotoxicidade do éster de forbol de *J. curcas* que resultou na ativação de caspases e apoptose em linhagens de hepatócitos humanos (Chang), células de rim de macaco africano (Vero),

câncer de mama humano (MCF-7) e câncer de colo uterino humano (HeLa) (OSKOEIAN et al., 2012a,b).

Diferente do éster de forbol, o diterpeno jatrofane atuou de maneira similar aos inibidores de PKC, resultando no relaxamento da musculatura lisa da veia porta e uterina em camundongos (SILVA et al., 1995). Essa atividade foi observada para extrato foliar de *J. gossypifolia*, que reduziu a concentração de cálcio e provocou o relaxamento da musculatura lisa em camundongos, justificando a sua utilização para contrações espasmódicas e cólicas uterinas na medicina popular (PAES et al., 2012). Além disso, como a PKC é dependente de cálcio para a sua ativação e proliferação celular (ALBERTS et al., 2010), a atuação de jatrofane ao diminuir a concentração de cálcio e inibir a PKC, provavelmente reduziu o índice mitótico (SILVA et al., 1995). Adicionalmente, compostos similares ao jatrofane obtidos de *Euphorbia semiperfoliata* Viv. e de *E. dendroides* L. inibiram a reorganização da rede de microtúbulos essenciais às funções celulares (MIGLIETTA et al., 2003; PEŠIĆ et al., 2011).

2.3.3 Metabólitos Secundários

Os compostos produzidos pelas plantas têm sido separados em metabólitos primários (MP) e secundários (MS). Os MP, por definição, são macromoléculas (açúcares, aminoácidos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) encontradas em todas as células vegetais e são necessárias para as funções básicas como a respiração, fotossíntese e biossíntese de aminoácidos essenciais para a vida da célula (RAVEN et al., 2007; FILHO, 2010). Os MS, ao contrário, são moléculas restritas em sua distribuição, tanto dentro quanto entre diferentes espécies de plantas e participam das interações intra e intercelular do próprio organismo ou com células de outros organismos (FILHO, 2010).

Os MS apresentam diversas funções nas plantas como: (1) sinais químicos, que permitem à planta responder a estímulos do ambiente; (2) defesa contra herbívoros, patógenos ou competidores; e (3) proteção contra a radiação solar. As três principais classes de MS são os alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos (flavonoides, taninos e ligninas), originados dos MP (RAVEN et al., 2007), principalmente, a partir do metabolismo da glicose, que resulta em diferentes vias (OOTANI et al., 2013). Segundo estes autores, a via do ácido chiquímico formará os MS como os alcaloides, ligninas, cumarinas e taninos e a via do mevalonato dará origem aos terpenoides e esteroides. A combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades do acetato ou derivados destes, poderá resultar na produção de antraquinonas, flavonoides e dos taninos (OOTANI et al., 2013).

Em *Jatropha*, os MS resultaram em atividade antioxidante nos extratos de raízes, caules, folhas e sementes de *J. curcas*, *J. gossypiiifolia*, *J. multifida* e *J. podagrica* a partir de diferentes solventes (aquoso, etanólico, metanólico, éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila e de metanol/n-butanol) (SHAHWAR et al., 2010; NARAYANASWAMY; BALAKRISHNAN, 2011; NWOKOCHA et al., 2011; JAIN et al., 2013; NAZEEMA; GIRIJA, 2013). Entre os antioxidantes, os taninos são os mais abundantes nas raízes, caule, folhas e sementes das espécies citadas de *Jatropha*, seguido pelas saponinas, alcaloides, flavonoides e fenóis (NWOKOCHA et al., 2011; JAIN et al., 2013).

Atividade bactericida também foi evidenciada a partir dos extratos foliares e caules em diferentes solventes (aquoso, etanólico, metanólico, éter de petróleo e clorofórmio) de *J. gossypiiifolia*, *J. curcas* e *J. variegata* (DABUR et al., 2007; IGBINOSA et al., 2009; DHALE; BIRARI, 2010; SETH; SARIN, 2010; PUROHIT; REENA, 2011). Essa atividade foi analisada pela ação dos taninos, que precipitam proteínas da parede celular e

impedem a síntese proteica, e das saponinas que alteram a permeabilidade da parede celular, facilitando a entrada de substâncias tóxicas (IGBINOSA et al., 2009).

Outros MS, como alcaloides e cumarinas, podem danificar o DNA apresentando propriedades citotóxicas e antiparasitárias. Esses compostos podem atuar de maneira similar aos agentes alquilantes, que realizam ligações covalentes com o DNA e provocam mutações. Alcaloides atuam também como agentes intercalantes do DNA, que estabilizam a dupla hélice e prejudicam o processo de replicação, levando à morte celular. Esses compostos podem inibir a Topoisomerase I ou II essencial para o processo de replicação, impedindo a divisão celular (WINK, 2012).

Adicionalmente, alcaloides como a vincristina e vimblastina interferem com o processo de polimerização dos microtúbulos (SILVESTRI, 2013). Em *Jatropha*, os alcaloides apresentaram atividades antibroncoconstritora, antiarrítmica; antitumoral (ZHANG et al., 2009); antimalárica (INBANESON et al., 2012); antimicrobiana e citotóxica (DEMISSIE; LELE, 2013). O efeito citotóxico também foi avaliado em células tumorais pela atividade do flavonoide apigenina, que é encontrado nas folhas de *J. gossypifolia*. Apigenina promove quebras de fita dupla no DNA (DSB), que foram confirmadas pela ativação de enzimas de reparo de DSB, como Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM) e Histona H2AX Fosforilada (γ H2AX) dependentes da proteína quinase delta (PKC δ) (ARANGO et al., 2012).

Substâncias de diversos grupos foram identificadas nas diferentes partes de *J. gossypifolia* com vários tipos de solventes, sendo o etanol o principal extrator (Tabela 1). Nas sementes, foram encontrados ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, ésteres de forbol, peptídeos cíclicos, óleos, saponinas e diterpenos; no látex, alcaloides, fenóis, terpenos e peptídeos cíclicos; nos caules, folhas e raízes foram evidenciados esteroides,

fenóis, taninos, óleos, monoterpenos, diterpenos, triterpenos e sesquiterpenos (PERTINO et al., 2007; DEVAPPA et al., 2010; MARIZ et al., 2010; SABANDAR et al., 2013).

Os principais constituintes ativos de *J. gossypiiifolia* são os diferentes tipos de diterpenos como tiglane (óleo das sementes), jatrolona A e B (raiz e folhas), latiane (raiz) e jatrolane (toda planta) (FALODUN et al., 2012; SABANDAR et al., 2013).

Tabela 2. Principais constituintes químicos de *Jatropha gossypifolia*, com respectivos solventes extratores e partes vegetais.

(“continua”)

Grupo	Substância	Parte vegetal	Solvente Extrator	Referências
Ácidos Graxos	Ácido araquídico	Sementes	-	6, 15
	Ácido araquidônico		Éter de petróleo	6
	Ácido beênico		-	6
	Ácido caprílico		Éter de petróleo	6
	Ácido esteárico		-	6
	Ácido lignocérico		-	6
	Ácido linoleico		Éter de petróleo	6
	Ácido mirístico		-	6
	Ácido oleico		Éter de petróleo	6
	Ácido palmítico		-	6
	Ácido palmitoleico		-	6
	Ácido ricinoleico		-	6
	Ácido vernólico		Éter de petróleo	6
Açúcares	Arabinose	Sementes	-	6
	Ramnose		-	6
	Xilose		-	6
Alcaloides	Jatrofina	Folhas e Raizes	Água	6
	-	Folhas	Etanol Metanol	12
	-	Folhas	Água Clorofórmio e metanol	6
	-	Sementes	Éter de petróleo	6
	-	Látex	-	6
	-	Caule	Etanol Metanol	13
	Alcaloides A, B e C	-	-	5
Aminoácidos	Ácido aspártico	Sementes	-	6
	Ácido glutâmico			
	Alanina			
	Arginina			
	Cistina			
	Glicina			
	Isoleucina			
	Leucina			
	Metionina			
	Prolina			
	Treonina			
	Valina			
Cumarinas	Cleomiscosina A	Caule	Hexano-Etanol	6
	Cumarina (7,8-dihidróxi-6-metóxi-cumarina)	Raiz	Acetato de etila	6
	Fraxetina	Raiz	Acetato de etila	5, 6

^{5*} Zhang et al. (2009); ^{6*} Mariz et al. (2010); ¹² Nazeema; Girija (2012); ¹³ Nazeema; Girija (2013); ^{15*} Sabandar et al. (2013). (-) Não-informado; (*) Artigos de Revisão.

Tabela 2. Principais constituintes químicos de *Jatropha gossypifolia*, com respectivos solventes extratores e partes vegetais.

(“Continuação”)

Grupo	Substância	Parte vegetal	Solvente Extrator	Referências
Cumarinas	Propacina	Toda a planta	Clorofórmio e Metanol	6
		-	-	5
		Toda a planta	-	15
Diterpenos	Jatrofenona	Toda planta	Clorofórmio e metanol	6
	-	Toda planta	-	5
		-	Diclorometano:metanol	10
		Toda planta	-	15
	Jatrofolona A	Raiz e folhas	Etanol	6
		Raiz	-	6
			-	15
			-	4
	Jatrofolona B	Raiz e Folhas	Etanol	6
		Raiz	Acetato de etila	6
			-	15
	Jatrofona	Raiz	-	4
			Etanol	6
			-	15
			-	5
			-	10
		Raiz	-	2
			Éter de petróleo Clorofórmio	6
			-	5
		2 α -OH-Jatrofona	Raiz	-
-				15
-				5
2 β -OH- Jatrofona		Raiz	-	10
			-	15

² Schmeda-Hirschmann; Razmilic (1996); ⁴ Pertino et al. (2007); ^{5*} Zhang et al. (2009); ^{6*} Mariz et al. (2010); ^{10*} Devappa et al. (2011); ^{15*} Sabandar et al. (2013). (-) Não-informado; (*) Artigos de Revisão.

Tabela 2. Principais constituintes químicos de *Jatropha gossypifolia*, com respectivos solventes extratores e partes vegetais.

(“Continuação”)

Grupo	Substância	Parte vegetal	Solvente Extrator	Referências
Diterpenos	Latriane	Raiz	-	5, 11
	Latriane	Raiz	-	10
	Curcusone B e jatrofane	Caule e folhas	-	10
	Curcusone B e jatrofane	Toda planta	-	10
	-		Metanol	9
	Jatrofane	-	-	10
	-	Folha	Etanol, Metanol e Água	7
		Raiz	-	15
		Folha	Etanol, Metanol e Água	7
		Caules	Etanol	6
		Folhas		
Triterpenos	-	Caules e Folhas	Etanol Metanol	6, 12
	Estigmasterol	Caule	Metanol	9
Terpenoides	-	Caules e Folhas	Etanol	12
		Caules e Folhas	Metanol	12
		Folha	Água	7
		Caule	Água	13
		Folha	Etanol	7
	-	Folha	Metanol	7
		Caules e Folhas	Etanol	
		Látex	-	
		Caules e Folhas	Etanol e metanol	6
		Folhas	Etanol e aquoso	
Esteroides	-	Folhas e Caule	Aquoso, Etanol e Metanol	12
		Latex	-	12
		Caules e Folhas	Aquoso, Etanol e Metanol	8
		Látex	-	8
Fenóis	-	Caules, Folhas Sementes	Aquoso, Etanol, Metanol, Éter de petróleo	6
		Látex	-	6

^{5*} Zhang et al. (2009); ^{6*} Mariz et al. (2010); ⁷ Seth; Sarin (2010); ⁸ Narayanaswamy; Balakrishnan (2011); ⁹ Sahidin et al. (2011); ^{10*} Devappa et al. (2011); ¹¹ Falodun et al. (2012); ¹² Nazeema; Girija (2012); ¹³ Nazeema; Girija (2013); ^{15*} Sabandar et al. (2013). (-) Não-informado; (*) Artigos de Revisão.

Tabela 2. Principais constituintes químicos de *Jatropha gossypifolia*, com respectivos solventes extratores e partes vegetais.

(“Continuação”)

Grupo	Substância	Parte vegetal	Solvente extrator	Referências
Fitotoxinas	-	Folhas	Água	6
		Folhas	Etanol	6
		Folhas	Etanol	14
	Apigenina	Folhas	-	5
		Folhas	-	15
	-	Folha	Água, Etanol e Metanol	7
	-	Caules	Etanol	6
	-	Folhas	Etanol	6
	Ácido ferúlico	Raízes	Acetato de Etila	6
	Diidroprasantalina	Toda a planta	-	6
Flavonoides	Gadaína	Raízes, Caules e Sementes	Éter de petróleo	6
	Gossipidieno	Caule	Hexano	6
	Gossipifana	Partes aéreas	Éter de petróleo	6
	Isogadaína	Caule	Éter de petróleo	6
	-	Caule	Água Etanol Metanol	13
		Folhas	Etanol	6
	Isovitexina	Folhas	-	5
	Vitexina	Folhas	-	15
	Glossipidieno	Caule	-	5
	Jatrodieno			
Ligninas	Jatrofana	Caule	-	5
	Jatrodieno	Caule, Raiz e Sementes	Éter de petróleo	6
	Jatrofana	Caule, Raiz e Sementes	Éter de petróleo Etanol	5
	Jatrofana	Caule, Raiz e Sementes	Éter de petróleo Etanol	6
	2-Piperonilideno-3-veritril-3R-ybutirolactona	Toda a planta	-	6
	Prasantalina	Partes aéreas	Éter de petróleo	6
	Tetradecil ferrulato	Raízes	Etanol	6
	Jatrorinas A e B	Toda planta	-	5
	-	Raiz e folhas	Água e Etanol	6
		Sementes	Éter de petróleo	

^{5*} Zhang et al. (2009); ^{6*} Mariz et al. (2010); ⁷ Seth; Sarin (2010); ¹³ Nazeema; Girija (2013); ¹⁴ Pratap; Singh (2013); ^{15*} Sabandar et al. (2013). (-) Não-informado;

(*) Artigos de Revisão.

Tabela 2. Principais constituintes químicos de *Jatropha gossypifolia*, com respectivos solventes extratores e partes vegetais.

				(“Conclusão”)
Grupo	Substância	Parte vegetal	Solvente extrator	Referência
Outros	Ácido ascórbico	Látex	-	6
	Amirina	Sementes	-	6
	Forbol (12-dióxi, 16hidróxiforbol)	Sementes	Água	6
	Sitosterol (β -Sitosterol)	Sementes	-	6
	Cicloglossina A	Látex	Água, Etanol e Acetato de Etila	6
Peptídeos Cíclicos	Cicloglossina A	Látex	-	1 15
	Cicloglossina A	Látex	-	5
	Cicloglossina B	Látex	-	6 3
	Cicloglossina B	Látex	-	15
	Cicloglossina B	Látex	-	5
	Cicloglossina B	Látex	-	5
Saponinas	-	Sementes	Éter de petróleo Etanol e Butanol-	6
	-	Folha	Água, Etanol e Metanol	7
Taninos	-	Raiz e folhas	Etanol	6
	-	Folhas	Água	
	-	Caules e Folhas	Etanol	
	-	Caules	Metanol	
	-	Folha	Etanol, Metanol e Água	7

¹ Horsten et al. (1996); ³ Auvin-Guette et al. (1997); ^{5*} Zhang et al. (2009); ^{6*} Mariz et al. (2010); ⁷ Seth; Sarin (2010); ^{15*} Sabandar et al. (2013). (-) Não-informado; (*) Artigos de Revisão.

2.4 Controle do Ciclo Celular

O ciclo celular é dividido em quatro fases: G1, S, G2 e M. G1 (do inglês, *gap*) correspondendo ao intervalo na qual as células se preparam para o processo de replicação do DNA. A fase S (Síntese) é definida como aquela em que ocorre a síntese do DNA enquanto G2 é a fase durante a qual a célula se prepara para o processo de divisão celular. Por sua vez, a fase M compreende dois eventos principais: a divisão nuclear, ou mitose, durante a qual os microtúbulos ligam-se ao cinetócoro das cromátides-irmãs, segregando-as em dois núcleos-filhos; enquanto a divisão citoplasmática, ou citocinese, quando a própria célula se divide em duas. Para que estes eventos ocorram de forma correta, o ciclo celular é submetido ao sistema de controle que envolve, principalmente, a interação entre ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs); proteínas inibidoras de CDKs (CKI) e a desfosforilação pelas fosfatases (ALBERTS et al., 2010; TANK; THAKER, 2011).

2.4.1 Ciclinas e CDKs

O ciclo celular é regulado por complexos proteicos compostos de duas subunidades: uma ciclina e uma quinase dependente de ciclina (CDK). As ciclinas correspondem a uma família de proteínas que são sintetizadas e degradadas em pontos específicos do ciclo celular e que regulam a progressão do mesmo por suas interações com CDKs específicas. As CDKs correspondem a uma família de quinases proteicas que quando ativadas por ciclinas, fosforilam fatores de transcrição cuja atividade é necessária para um estágio específico do ciclo celular (TANK; THAKER, 2011).

Em plantas, existem três principais classes de ciclinas envolvidas na regulação do ciclo celular. Ciclina do tipo A (CYCA), tipo B (CYCB) e Tipo D (CYCD). O complexo CYCD/CDK controla a transição de G1/S, resultando na transcrição de genes envolvidos

na replicação do DNA. CYCB/CDK controla a transição G2/M, enquanto CYCA/CDK provavelmente auxilia também na manutenção da fase S e na transição de G2/M. Além das ciclinas, os principais tipos de CDKs nas células vegetais são: (1) CDKD promove a transição de G0 para G1; (2) CDKA promove a transição de G1/S e G2/M; e (3) CDKB, transição de G2/M (VEYLDER et al., 2007; TANK; THAKER, 2011).

2.4.2 Inibidores de CDKs

Os complexos ciclina-CDK podem ser regulados pela ligação de proteínas inibidoras de CDKs (CKIs) que provocam rearranjos na estrutura do sítio ativo da CDK, tornando-o inativo. As células usam as CKIs primordialmente para auxiliá-las na regulação das atividades entre as ciclinas de G1 e S com as CDKs no início do ciclo celular (ALBERTS et al., 2010). Contudo, vários CKI foram descritos na literatura impedindo a transição das fases G1/S e G2/M, como observado com a olomoucina em células animais (VESELY et al., 1994) e vegetais (BINAROVÁ et al., 1998).

Resultados similares a olomoucina foram observados com o inibidor W7 de proteína quinases dependente de cálcio/calmodulina (CaM-quinases) em raízes de *A. thaliana* (SHEREMET et al., 2010). Adicionalmente, distúrbios na progressão da mitose e redução do índice mitótico foram observados com a ligação de W7 aos domínios da calmodulina em *Nicotiana tabacum* (SHEREMET et al., 2012) e com a inibição da PKC com o inibidor estaurosporina em *Arabidopsis thaliana* (SHEREMET et al., 2010) e em *N. tabacum* (SHEREMET et al., 2012).

2.4.3 Inibidores de Fosfatases

O processo de fosforilação realizado pelas CDKs ocorre durante as fases G1, S, G2 até a metáfase, enquanto a transição da metáfase para anáfase é realizada pelo complexo promotor da anáfase (APC), que promove a proteólise de ciclinas e inativam as CDKs na célula. O resultado é que muitas proteínas que foram fosforiladas serão desfosforiladas por várias fosfatases presentes na anáfase, que são necessárias para a conclusão da fase M e da citocinese (ALBERTS et al., 2010). Inibidores de fosfatases, como a Microcistina-LR (MCY-LR) de cianobactérias, por exemplo, provocaram hipercondensação dos cromossomos mitóticos e alterações nas fibras do fuso mitótico, gerando perdas cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas de *Vicia faba* (BEYER et al., 2012). Segundo estes autores, o mesmo inibidor de fosfatase (MCY-LR) alterou também a formação dos microtúbulos do fragmoplasto, retardando a divisão celular de *V. faba*.

Em outro estudo, foi relatado que a formação de microtúbulos do fragmoplasto e a citocinese estão associadas com a fosforilação (CDKs) e a desfosforilação (fosfatases) de proteínas como observados na mitose de *N. tabacum*. Desta forma, falhas na fosforilação ou desfosforilação podem interferir com a citocinese causando mitoses incompletas (SASABE et al., 2011).

2.4.4 Microtúbulos

Os microtúbulos (MTs) são formados a partir da polimerização das subunidades $\alpha\beta$ -tubulinas e entre outras funções desempenham um papel fundamental no ciclo mitótico durante a fase M, permitindo a correta separação das cromátides-irmãs e a formação de duas células filhas idênticas (ALBERTS et al., 2010). No entanto, interferências no equilíbrio entre a polimerização e despolimerização das tubulinas impedem a função adequada dos MTs e podem conduzir à morte celular (SILVESTRI, 2013).

Em plantas, além dos MTs mitóticos, existem os microtúbulos corticais (MC) que são formados na intérfase e posicionados ao longo da superfície interna da membrana plasmática e controlam a morfologia celular. Após a transição da intérfase para prófase, os MC e filamentos de actina são remodelados para a banda pré-profásica (PPB), que define o local onde a placa celular será montada. A montagem da placa celular começa no final da anáfase e é orientada por uma estrutura denominada fragmoplasto, que contém MTs derivados do fuso mitótico, formando os núcleos filhos (RAVEN et al., 2007).

Devido à sua importância na mitose e divisão celular, agentes antimitóticos que interferem com a função dos MTs continuam a ser um alvo para o desenvolvimento de novas drogas anticancerígenas. Os antimitóticos podem ser classificados em dois principais grupos: (1) desestabilizadores de MTs que se ligam às tubulinas, inibindo a sua polimerização, e (2) estabilizadores, que inibem a despolimerização das tubulinas (JORDAN; WILSON, 2004).

Entre os desestabilizadores, destacam-se os alcaloides da vinca, vincristina e vimblastina (SILVESTRI, 2013), a colchicina (BRANDÃO et al., 2010) e a 8-hidroxiquinoleína (GUERRA; SOUZA, 2002). Na classe dos estabilizadores destacam-se os taxanos, paclitaxel e derivados, que se ligam com bastante afinidade às β -tubulinas que fazem parte dos MTs (SILVESTRI, 2013).

Adicionalmente, outras substâncias químicas sintéticas ou naturais podem apresentar funções similares aos antimitóticos citados e alterar a montagem das fibras do fuso, podendo ainda atuar como agentes genotóxicos. Estas interferências podem ser avaliadas por diferentes ensaios, como o sistema-teste *Allium cepa* L. (PING et al., 2012).

2.5 Sistema-Teste *Allium cepa*

Considerando que os testes de toxicidade em animais levam à morte dos mesmos, alternativas para análise deste potencial devem ser consideradas. Neste sentido, testes de genotoxicidade utilizando o sistema-teste *A. cepa* mostraram correlação com o sistema-teste de mamíferos (RANK; NIELSEN, 1994), indicando o seu uso como uma alternativa para o monitoramento do potencial genotóxico de compostos químicos (FACHINETTO et al., 2007).

Allium cepa destaca-se entre outras plantas por apresentar cromossomos maiores e número reduzido ($2n = 16$) (FISKESJO, 1985) e alta sensibilidade em detectar agentes químicos e ambientais (LEME; MARIM-MORALES, 2009). O sistema-teste *A. cepa* é de fácil manuseio e apresenta-se como um bioindicador para o primeiro *screening* da genotoxicidade, devido ao seu baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade, auxiliando em estudos de prevenção de danos à saúde humana (BAGATINI et al., 2007).

Esse sistema-teste permite avaliar os potenciais tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico da substância testada (LEME; MARIM-MORALES, 2009). O potencial tóxico pode ser estimado mediante avaliação do crescimento radicular (PAWLOWSKI et al., 2012), enquanto o efeito citotóxico mediante verificação do índice mitótico. A genotoxicidade, por sua vez, é avaliada mediante análise de células meristemáticas com alterações cromossômicas (AC). Estas alterações podem ser resultantes de efeitos aneugênicos (C-metáfases, metáfase com aderências cromossômicas, perdas cromossômicas, anáfases multipolares, células binucleadas, metáfases poliploides, dentre outras) ou de efeitos clastogênicos (fragmentos cromossômicos e pontes cromossômicas). A mutagenicidade é avaliada mediante análise de micronúcleos (MN) que podem ser resultantes de efeitos aneugênicos ou clastogênicos (MAZZEO et al., 2011).

Alguns autores têm recentemente incluído outras alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa*. Tais alterações são referidas como anormalidades nucleares (AN), que são caracterizadas por alterações morfológicas nos núcleos interfásicos, como resultado da ação dos agentes testados. Geralmente, estas alterações são observadas como núcleos lobulados, ameboides, células polinucleares, minicélulas, entre outras (FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008; 2009). Segundo Leme e Marin-Morales (2008), a presença de núcleos lobulados e células polimorfonucleares podem indicar um processo de morte celular, pois essas anormalidades não são observadas nas células F₁ de *A. cepa* (células derivadas da divisão mitótica de células meristemáticas) (MA et al., 1995).

Alterações cromossômicas e MN em células meristemáticas e MN nas células F₁ de *A. cepa* têm sido reportados na literatura como eficientes indicadores da ação direta na estrutura ou no número de cromossomos (LEME; MARIM-MORALES, 2009). Os MN são resultantes de quebras cromossômicas acêntricas ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Assim, os MN representam perdas de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (ação clastogênica) ou dano no aparelho mitótico (ação aneugênica) (FENECH et al., 2011).

Por outro lado, o tamanho do MN pode também ser utilizado para determinar se a sua origem é clastogênica ou aneugênica. Esse método foi proposto por Yamamoto e Kikuchi (1980), e mostrou-se eficaz para o sistema-teste *A. cepa*, por apresentar cariótipo simétrico, que é homogêneo em relação ao tamanho cromossômico. Esse método foi aplicado com sucesso nos estudos de Leme e Marin-Morales (2008) e Fernandes et al. (2007; 2009) quanto à origem dos MNs. No entanto, outras técnicas citogenéticas, tais como bandeamentos cromossômicos e hibridização *in situ* fluorescente (FISH), podem ser aplicadas na caracterização dos MNs (LEME; MARIM-MORALES, 2009; FENECH et al.,

2011). Além disso, os MN podem ainda ser derivados da poliploidização, situação na qual eles originam-se a partir da eliminação do excesso DNA do núcleo principal na tentativa de restaurar as condições normais de ploidia (FERNANDES et al., 2007; 2009) e a partir de brotos nucleares (FENECH et al., 2011).

Além das células meristemáticas, Ma et al. (1995) indicaram também uma alta eficiência na utilização de células F_1 , para contagem de MN, que quando comparadas às células meristemáticas, apresentam um alto grau de sincronia em intérfase. Após o término da divisão mitótica das células meristemáticas, os possíveis danos no DNA dessas células seriam visualizados na forma de MN em suas células filhas, que nesse caso, correspondem às células F_1 (MA et al., 1995).

Ensaio com *A. cepa* têm sido utilizados no monitoramento de contaminantes de água e do solo, os quais representam riscos diretos ou indiretos para a população humana (MAZZEO et al., 2011), assim como nos estudos dos efeitos de extratos vegetais e infusões de plantas medicinais visando à detecção da citogenotoxicidade (AKINBORO et al., 2011; PING et al., 2012). Contudo, trabalhos com esse modelo em *Jatropha* (Euphorbiaceae) ainda são insipientes, restringindo-se principalmente ao óleo de *J. curcas* (BOTELHO et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico do látex e dos extratos foliares etanólico e aquoso com o sistema-teste *Allium cepa* e analisar o perfil fitoquímico dos extratos foliares de *J. gossypifolia*.

3.2 Específicos

1. Investigar a potencialidade tóxica (tamanho médio de crescimento das raízes), citotóxica (análise do índice mitótico), genotóxica (análise de alterações cromossômicas) e mutagênica de cinco diferentes concentrações do látex e dos extratos foliares, etanólico e aquoso, de *J. gossypifolia* sobre células meristemáticas do sistema-teste de *A. cepa*.
2. Avaliar a mutagenicidade (presença de micronúcleos) nas diferentes concentrações do látex e dos extratos foliares de *J. gossypifolia* sobre as células F₁ do sistema-teste de *A. cepa*.
3. Avaliar o perfil fitoquímico dos extratos foliares de *J. gossypifolia* e associá-los com os possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos sobre células meristemáticas do sistema-teste de *A. cepa*.

4. CAPÍTULO I

Genotoxic Potential of the Latex From Cotton-Leaf Physicnut

(*Jatropha gossypifolia* L.)

Artigo aceito pela revista Genetics and Molecular Biology.

1. Introduction

For thousands of years, several plants have been used in popular medicine. Despite being considered the main source of antimutagenics and antioxidants (Çelik and Aslantürk, 2010) some of their phytochemicals may cause adverse reactions or have potential of interacting with other medications, generating toxic, cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects (Pawlowski *et al.*, 2012; Ping *et al.*, 2012; Ray *et al.*, 2013). However, for many of them there is little information available regarding the potential health risks at short, mid- or long term (Nunes *et al.*, 2012).

Jatropha gossypifolia L. (Euphorbiaceae), commonly known as bellyache bush, black physicnut or cotton-leaf physicnut, is a shrub that contains a characteristic latex largely used for medicinal purposes, though in an empirical way (Cordeiro and Secco, 2014). The leaves are used *in natura* or in compresses, and are considered to have anti-malarian (Jansen *et al.*, 2010), insecticidal (Valencia *et al.*, 2006), anti-inflammatory (Oliveira *et al.*, 2010) and antimicrobial (Dhale and Birari, 2010; Gaikwad *et al.*, 2012) properties. The root and stem have cytotoxic (Nazeema and Girija, 2013) anti-malarian, leishmanicidal, antimicrobial, insecticidal, molluscicidal (Sabandar *et al.*, 2013) and anti-inflammatory (Bhagat *et al.*, 2013) properties. The seeds and fruits are used against influenza, and also as laxative (Sabandar *et al.*, 2013), sedative, analgesic or anti-diarrheal agents (Apu *et al.*, 2013). The latex, in turn, is bactericidal (Gaikwad *et al.*, 2012) and molluscicidal (Matos, 2004). In Brazil, the topical application of latex *in natura* is employed against wounds and bites of venomous animals (Stasi and Hiruma-Lima, 2002), and its ingestion in diluted form is used for treatment of diarrhea by indigenous peoples (Curto, 1993). In India, the solution of latex with mustard oil (*Brassica campestris*) and clove oil (*Syzygium aromaticum*) is applied onto painful gum or teeth (Punjaji, 2012),

whereas in the south of Nigeria it is used to reduce nosebleed and wounded skin (Oduola *et al.*, 2007).

Despite its medicinal properties, the latex of *J. gossypifolia in natura*, in direct contact with the skin, may produce caustic and irritating effects (Parente and Rosa, 2001). Moreover, the aqueous extract of latex was shown to be toxic for fish as well as upon intraperitoneal administration to house mice, presenting significant reduction of acetylcholinesterase (AChE) inhibition in the first (Singh and Singh, 2012; Pratap and Singh, 2013) and seizures in the latter (Singh and Singh, 2012). The inhibition of AChE prevents the degradation of choline neurotransmitters, such as acetylcholine, and prolongs the signal transmission through synapses. Consequently, it may lead to lethal paralysis by hyperstimulation of the nervous system (Stansley, 1993). The toxic effect may be mainly associated to cyclic peptides of the latex (Horsten *et al.*, 1996; Auvin-Guette *et al.*, 1997; Pratap and Singh, 2013), which show cytotoxic activity, as related for other *Jatropha* species (Sabandar *et al.*, 2013). Therefore, complementary studies are still necessary for the latex of *J. gossypifolia* to be safely employed for medicinal purposes, starting with the evaluation of its toxic potential.

Whereas the toxicity tests in animals lead to their death, alternative analysis should be considered. In this sense, genotoxicity tests using the *Allium cepa* test system showed a good correlation with the test system of mammals (Rank and Nielsen, 1994), indicating its use as an alternative for monitoring the genotoxic potential of chemical compounds (Fachinetto *et al.*, 2007). Additionally, *A. cepa* stands out among other plants due to presenting large chromosomes and in few number ($2n = 16$) in its cells (Fiskesjo, 1985). Moreover, the *A. cepa* test system has high sensitivity in detecting chemical and environmental agents (Leme and Marin-Morales, 2009). This system is easy to use and presents itself as a suitable bioindicator for the first screening of genotoxicity, thanks to its

low cost, reliability and concordance with other genotoxicity tests. This way it contributes in the preliminary genotoxicity assessment of compounds for medicinal purposes (Bagatini *et al.*, 2007). Thus, the present work aimed at analyzing the toxic, cytotoxic and genotoxic effects of the latex from *J. gossypifolia* by means of the test system *Allium cepa* L.

2. Material and Methods

2.1 Biological Material

Latex of *J. gossypiiifolia* was collected from an adult plant in Recife (PE, Brazil) in January 2013. Herbarium specimens containing leaves, flowers and fruits were stored in the Afrânio Fernandes at the State University of Piauí Herbarium (UESPI – Teresina, Brazil); voucher specimen number: HAF 03111. The seeds of *A. cepa* (cv. Vale Ouro IPA – 11) used in the bioassays were kindly provided by the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA, Recife, Brazil).

The latex of *J. gossypiiifolia* was extracted following removal of the leaf petioles using pruning shears, at 8 to 9 am. The latex was immediately stored in Falcon tubes wrapped in aluminum foil in order to reduce the oxidation process. The latex was then transported, in cooling box containing ice, to the Laboratory of Plant Genetics and Biotechnology (Genetics Department, UFPE) where it was diluted in distilled water to yield five different latex concentrations (1.25; 2.5; 5; 10 and 20 mL/L) to be used at *A. cepa* assay.

2.2 *Allium cepa* Assay

One hundred seeds of *A. cepa* (cv. Vale Ouro IPA – 11) were germinated in Petri dishes containing filter paper moistened with distilled water, at room temperature. When the rootlets reached about 1 cm in length, they were transferred to the five cited latex concentrations (one dish for each concentration) for 24 h. Distilled water was used as negative control (NC); MMS (methyl methanesulfonate 4×10^{-4} M), a drug with

clastogenic activity, and the herbicide Trifluralin (0.84 ppm of the active agent), a substance with aneugenic activity (Fernandes *et al.*, 2007), were used as positive controls. When rootlets reached about 1.5 cm length, the material was fixed in Carnoy (ethanol:acetic acid 3:1, v/v) for 6-8 h, at room temperature, and stored at -20°C until slide preparation.

For slide preparation, the root tips were washed three times in distilled water, for 5 min each time, and hydrolyzed at 60°C for 10 min in HCl 1N. After hydrolysis, the root tips were again washed in distilled water and transferred to amber glass bottles containing Schiff's reagent, in which they remained for 2 h in the dark. After this time, the root tips were washed until complete removal of the reagent, transferred onto slides, squashed with one drop of 2% acetic carmine, and mounted with Entellan®.

Latex toxicity was evaluated according to the mean root length variation (in centimeters) of 30 roots per treatment. The experimental unit consisted of one individual root (one root per specimen). Cytotoxicity and genotoxicity were evaluated by scoring 5,000 meristematic cells (experimental unit: slide with 500 cells, with a total of 10 analyzed slides per treatment) under light microscope (400 x). The assessed aspects were: (1) mitotic index (cytotoxicity) and (2) chromosome aberration index (genotoxicity). The last one includes aberrations resulting from aneugenic effects (e.g. C-metaphases, metaphase with chromosome adherences, loss chromosomes, multipolar anaphases, binucleate cells, polyploid metaphases, and other aberrations) or clastogenic effects (e.g. chromosome fragments in metaphase or anaphase, chromosome bridges and other aberrations). Micronuclei can be result from either aneugenic or clastogenic effects.

Photographs of the best cells were taken in a Leica conventional microscope (DM 500) (1000 x), using a digital camera (Nikon 14.0 Megapixels). Images were adjusted for brightness and contrast, in gray tones using Adobe Photoshop CS6.

2.3 Statistical Analysis

The toxicity values were expressed as averages, whereas the values of cytotoxicity and genotoxicity were expressed as frequencies. Statistical analysis to evaluate data distribution with regard to normality was carried out by Lilliefors test (D) in the program Assistat 7.7 (Silva and Azevedo, 2002), while homogeneity of variance was evaluated by the Cochran test in the program BioEstat 5.3 (Ayres *et al.*, 2007). Data which did neither present normal distribution nor homogeneity were analyzed by the non-parametric test of Kruskal-Wallis, followed by the *a posteriori* Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$) in the program BioEstat 5.3 (Ayres *et al.*, 2007). The data on cytotoxicity were the only presenting normal distribution and homogeneity of variance, and were analyzed by the parametric test of Scott-Knott ($p < 0,05$) in the program Assistat 7.7 (Silva and Azevedo, 2002).

3. Results

The tests of toxicity and cytotoxicity carried out with seeds of *A. cepa* exposed to the different concentrations of latex from *J. gossypifolia* showed a significant reduction in root mean growth and in mitotic index (MI) values of all tested latex concentrations, when compared to NC, except for 1.25 mL/L. In these analyses, the reduction was partially or entirely dose-dependent for root mean growth and in mitotic index, respectively (Table 1).

With regards to chromosome aberrations (CA), the increase in the total indexes (Table 2; Figure 1) was highly significant when compared with NC results, except for the 10 and 20 mL/L concentrations. From these results, we may infer that *J. gossypifolia* latex has a genotoxic action. On the other hand, the non-significant CA frequencies found for the higher latex concentrations (10 and 20 mL/L) may result from MI reduction with these treatments.

When the chromosome aberrations were analyzed separately, metaphases with chromosome adherences (Figure 1A) have been found in all the treatments carried out with the latex; nevertheless significant NC related results were only recorded for the three lower concentrations (1.25; 2.5 and 5 mL/L). The presence of C-metaphases (Figure 1B) was significant only for 2.5 and 5 mL/L concentrations (Table 2). Both chromosome adherences and C-metaphases are result from aneugenic mechanisms.

Other non-significant alterations in chromosome segregation during anaphase and telophase were registered, such as chromosome losses (Figure 1C) and multipolarities (Figure 1D-E; Table 2). Additionally, polyploid (Figure 1F) and binucleated cells (Figure 1G), nuclear buds (Figure 1H) and lobulated nuclei (Figure 1I) have been found in all analyzed treatments, although no significant alterations have been observed for any concentration (Table 2).

Chromosome fragments (Figure 1J) and chromosome bridges (Figure 1K; Table 2), arising from clastogenic effects, were also registered, but only the presence of chromosome bridges was significant for concentrations 1.25, 5 and 10 mL/L. Non-significant micronucleus (Figure 1L) frequencies were also observed. This last type of aberration can be due to either aneugenic or clastogenic effects.

Table 3. Values of mean length for the root tips of *Allium cepa* and mitotic indexes in meristematic cells, observed 24 h after *Jatropha gossypifolia* latex treatment at different concentrations.

Latex Treatment (mL/L)	Mean Root Length (cm)	Mitotic Index (%)
Distilled Water (NC)¹	3.32 ± 0.90	51.57 ± 2.69a ⁵
1.25	3.21 ± 0.89	51.77 ± 6.63a
2.5	2.43 ± 0.64** ⁴	44.33 ± 5.53b
5	2.11 ± 0.64**	36.70 ± 5.27c
10	2.28 ± 0.85**	36.32 ± 5.43c
20	1.87 ± 0.62**	22.02 ± 8.00d
MMS (4 x 10⁻⁴ M)²	2.78 ± 0.63	36.67 ± 7.11c
Trifluralin (0.84 ppm)³	2.38 ± 0.69**	23.00 ± 2.76d

¹NC: negative control. ²MMS (Methyl methanesulfonate): positive control. ³Trifluralin: positive control. ⁴Significant in the Kruskal-Wallis test with *a posteriori* Student-Newman-Keuls test (* *p* < 0.05; ** *p* < 0.01). ⁵Scott-Knott test (*p* < 0,05; averages followed by the same lowercase letter are not significantly different). The results refer to analysis of 5,000 cells per treatment.

Table 4. Frequency of chromosome aberrations in meristematic cells of *Allium cepa* root tips, observed 24 h after *Jatropha gossypifolia* latex treatment at different concentrations.

Chromosome Aberration	Negative Control	Latex Treatment (mL/L)					Positive Control	
	Distilled Water	1.25	2.5	5	10	20	MMS ¹ (4 x 10 ⁻⁴ M)	Trifluralin (0.84 ppm)
Metaphases with Chromosome Adherences	0.66 ± 0.32	1.46 ± 0.47** ²	1.29 ± 0.68*	1.28 ± 0.24**	0.86 ± 0.35	0.76 ± 0.34	0.11 ± 0.18	3.25 ± 1.86**
C-metaphases	0.02 ± 0.06	0.11 ± 0.15	0.19 ± 0.18*	0.37 ± 0.25**	0.11 ± 0.15	0.09 ± 0.16	0.07 ± 0.10	0.39 ± 0.55*
Chromosome losses	0.02 ± 0.06	0.15 ± 0.17	0.15 ± 0.19	0.06 ± 0.12	0.14 ± 0.11	0.13 ± 0.17	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.10
Binucleated Cells	0.07 ± 0.10	0.04 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.14	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.94 ± 1.29
Polyploid Cells	0.04 ± 0.12	0.04 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.10	0.02 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.30 ± 0.39
Multipolar Anaphases	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.30 ± 0.44
Lobulated Nucleus	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.18	0.02 ± 0.06	0.02 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.06	5.28 ± 3.85**
Nuclear Buds	0.07 ± 0.13	0.22 ± 0.14	0.11 ± 0.24	0.31 ± 0.27	0.14 ± 0.19	0.17 ± 0.24	0.13 ± 0.15	1.24 ± 0.64**
Micronucleus	0.35 ± 0.31	0.66 ± 0.53	0.77 ± 0.56	0.93 ± 0.93	0.57 ± 0.32	0.46 ± 0.58	4.55 ± 2.55**	2.18 ± 1.27**
Chromosome Fragments	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.06	0.02 ± 0.06	0.07 ± 0.17	0.02 ± 0.06	0.02 ± 0.06	0.17 ± 0.06**	0.04 ± 0.08
Chromosome Bridges	0.00 ± 0.00	0.27 ± 0.20**	0.09 ± 0.13	0.22 ± 0.24*	0.27 ± 0.26**	0.04 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.19 ± 0.22**
Total	1.25 ± 0.62	2.99 ± 1.03**	2.68 ± 1.15*	3.28 ± 1.35**	2.26 ± 0.58	1.69 ± 1.10	5.05 ± 2.26**	14.19 ± 7.10**

¹MMS (Methyl methanesulfonate). ²Significant in the Kruskal-Wallis test with *a posteriori* Student-Newman-Keuls test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). The results refer to analysis of 5,000 cells per treatment.

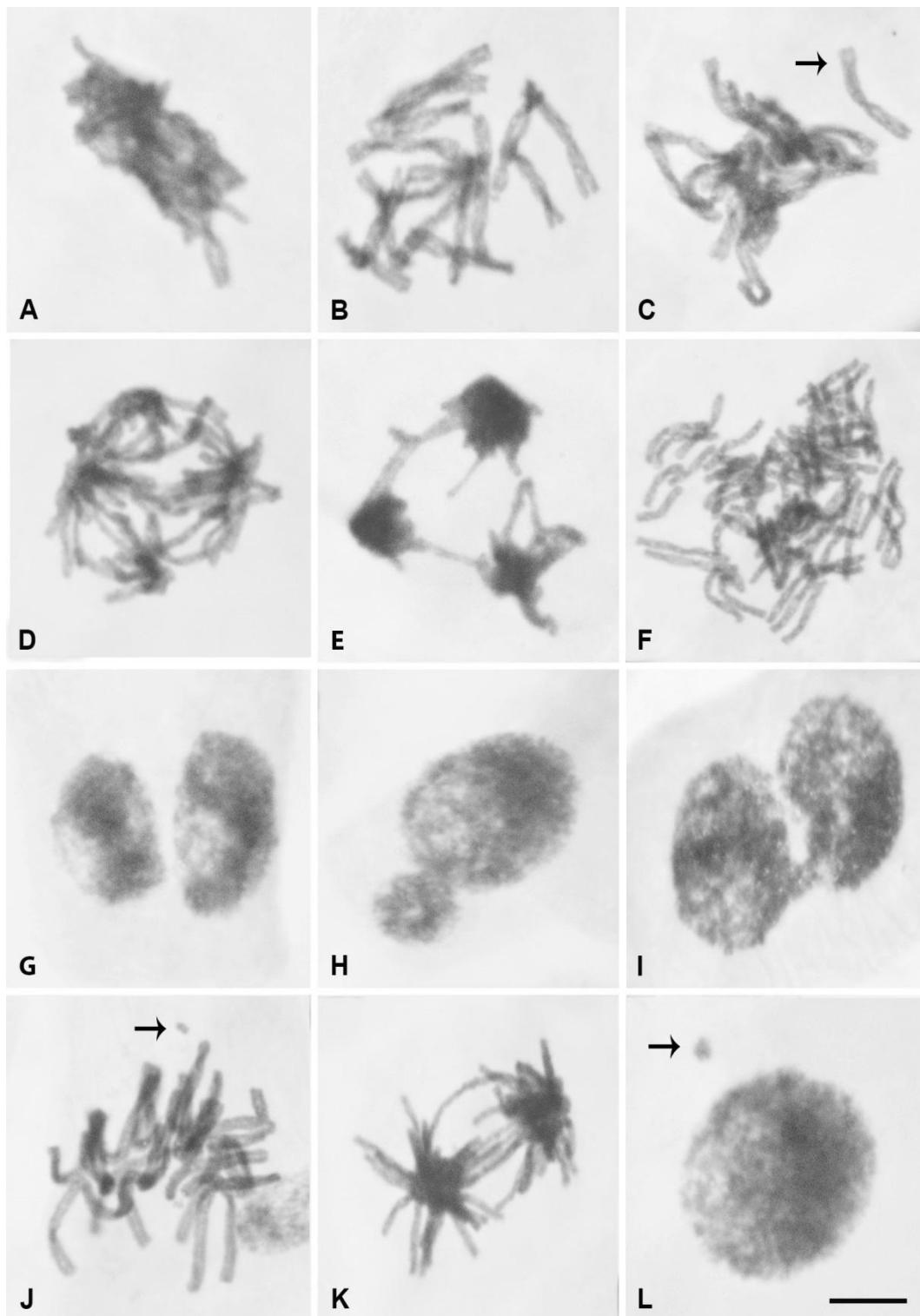


Figure 3. Chromosome aberrations after *Jatropha gossypifolia* latex treatment of *Allium cepa* meristematic cells. **(A)** Chromosomal adherence (1.25 mL/L). **(B)** C-metaphase (5 mL/L). **(C)** Metaphase with chromosome loss (2.5 mL/L). **(D)** Multipolar anaphase with chromosome bridges (5 mL/L). **(E)** Multipolar telophase with chromosome bridges (5 mL/L). **(F)** Polyploid metaphase (10 mL/L). **(G)** Binucleated cell (10 mL/L). **(H)** Nucleus with nuclear bud (5 mL/L). **(I)** Lobulated nucleus (2.5 mL/L). **(J)** Metaphase with chromosome fragment (5 mL/L). **(K)** Anaphase with chromosome bridge (10 mL/L). **(L)** Micronucleated cell (1.25 mL/L). Arrows in (C), (J) and (L) indicate chromosome loss, chromosome fragment and micronucleus, respectively. Bar: 10 μ m (for all pictures).

4. Discussion

The latex of *J. gossypifolia* is broadly used in popular medicine in many countries. However, this plant has phytochemicals in its composition such as alkaloids and cyclic peptides, which may be toxic to users (Singh and Singh, 2012; Pratap and Singh, 2013). In the present study, the test system *A. cepa* was used to evaluate the toxic, cytotoxic and genotoxic effects of different concentrations (1.25; 2.5; 5; 10 and 20 mL/L) of latex from *J. gossypifolia*. The concentrations tested were selected based on a usage concentration recommended in popular medicine (approximately 10 mL/L, corresponding to one tablespoon in one liter of water). Apart from the recommended concentration, others were also tested based on results of latex toxicity in fish, which varied from 10 to 21.5 mL/L (Singh and Singh, 2012; Pratap and Singh, 2013), but mainly on antimicrobial activity data, which varied from 1.9 to 4.4 mL/L (Patil *et al.*, 2012) for the latex of *J. gossypifolia* and from 0.5 to 10 mL/L for the latex of *J. curcas* (Arekemase *et al.*, 2011).

The bioassays carried out here revealed dose-dependent toxicity (mean root growth) and cytotoxicity (mitotic index) for all analyzed treatments except for the lowest concentration (1.25 mL/L). These effects may be attributed to various chemical substances present in the latex of *J. gossypifolia*, mainly cyclic peptides (CPi), such as cyclogossines A (Horsten *et al.*, 1996) and B (Auvin-Guette *et al.*, 1997), terpenes (Patil *et al.*, 2012) and alkaloids that have cytotoxic activity (Sabandar *et al.*, 2013). Peptides present in other species of the genus *Jatropha* have also been reported as cytotoxic, such as integerrimides A and B of *J. integerrima* (Mongkolvisut *et al.*, 2006) and the curcacyclins A and B of *J. curcas* (Insanu *et al.*, 2012).

Cyclic peptides have a cyclical conformation (Sakai *et al.*, 1996), which facilitates their passing through cell membranes, as well as absent exposure of the C- and N-terminal

groups to exopeptidases (Wu *et al.*, 2007). These characteristics may be related to the ease with which these peptides enter and remain inside cells of *A. cepa*, causing toxic effects, as observed here and in previous studies with latex of *J. curcas* in *Artemia salina* as well as in cell culture of human ovarian cancer (Insanu *et al.*, 2012). On the other hand, terpenes, such as diterpenes, are some of the most toxic compounds in *Jatropha* (Devappa *et al.*, 2011), whereas lipophilic nature (Wink, 2012) facilitates their entry and remaining inside cells of *A. cepa*, causing toxic effects. Additionally, terpenes in latex may be associated with a reduction in calcium concentration, thus inhibiting protein kinase C (PKC), as observed in leaf ethanol extract of *J. gossypifolia* (Silva *et al.*, 1995; Paes *et al.*, 2012), decreasing cell proliferation (Alberts *et al.*, 2010). Similar results were observed with inhibitors of PKC in *A. cepa* (Blume *et al.*, 2008), *Arabidopsis thaliana* (Sheremet *et al.*, 2010) and *Nicotiana tabacum* (Sheremet *et al.*, 2012).

In the current study, most chromosome aberrations (CA), such as chromosome adherences and C-metaphases, were considered a result of genotoxic effects, since they represent damage to the genetic material which is not necessarily fixed in the organism (Leme and Marin-Morales, 2009; Mazzeo *et al.*, 2011). When these alterations can be repaired, they are not transmitted to descendant cells (Ventura-Camargo *et al.*, 2011). The presence of chromosome adherences and C-metaphases confirms the interference of phytochemicals of *J. gossypifolia* latex in the assembly, stabilization and/or inactivation of spindle fibers, characterizing an aneugenic activity of the latex.

Aneugenic activities in metaphase may generate other types of cell abnormalities such as multipolar anaphases, nuclear buds, lobulated nuclei, and polyploid cells (Fernandes *et al.*, 2009). However, these alterations were not significant in the present study, what indicates that chromosome adherences and C-metaphases did not contribute to further alterations, and suggests a reversible mechanism for them (Odeigah *et al.*, 1997).

Chromosome bridges, chromosome fragments and part of micronucleus formation are related to clastogenic activity (Fenech *et al.*, 2011). Chromosome bridges and fragments, for instance, could be the result of chromosome breakage-fusion-bridge cycles, elucidated for the first time by Barbara McClintock in the 1930s in maize chromosomes (reviewed by Jones, 2005). However, chromosome fragments could also be induced by several factors involved in DNA breaks (Fenech, 2000). On the other hand, micronuclei formation could be induced by both aneugenic and clastogenic activities, related to entire chromosomes or chromosome fragments (respectively) not incorporated into the main nucleus during the cell cycle (Fenech *et al.*, 2011). In the present results, from these three clastogenic alterations, only chromosome bridges had a significant increase.

The clastogenic alterations triggered by its latex indicate a chromosome mutagenic potential. This type of alteration represents damage to the genetic material at chromosome level that could not be repaired by the cell, being possibly transmitted to descendant cells (Grant, 1978). Furthermore, *J. gossypiiifolia* latex caused toxicity and cytotoxicity at the tested concentrations, except for 1.25 mL/L. It also generated significant alterations in the assembly and stabilization of the mitotic spindle fibers, resulting in disturbance of the cell cycle and chromosome aberrations for all concentrations. Based on these last results, it can be inferred that the mechanism of action of the latex also has aneugenic nature.

Although *J. gossypiiifolia* is considered an important potential plant for the generation of pharmacological and/or biotechnological products (Félix-Silva *et al.*, 2014), overall, the tests performed indicated toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of *J. gossypiiifolia* latex, including the concentrations acknowledged as antimicrobial (1.9 and 4.4 mL/L) (Patil *et al.*, 2012). Considering that the latex of *J. gossypiiifolia* is employed empirically in the popular medicine of many countries, and that the test system *A. cepa* presents good correlation with the tests carried out in mammals (Rank and Nielsen, 1994),

it should be pointed out that it may potentially harm the human health especially if ingested. In addition, other studies with this plant material are necessary in order to elucidate the mechanisms of action of its bioactive compounds, and to reduce its toxicity while keeping its therapeutic action, for further use of isolated latex compounds in the pharmaceutical industry.

Acknowledgements

We are grateful to the Federal University of Pernambuco (UFPE) and the State University of Piauí (UESPI) for providing the installations and infrastructure for realization of the present study; to Dr. Francisco Soares Filho, for taxonomic identification of the botanic material (*J. gossypiiifolia*); and to Dr^a. Fátima de Oliveira Pires for technical help with microscopy. This work was supported by fellowship within the Post-Graduation Promotion Program (PROF) from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil), and research grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco).

Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

5. References

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD (2010) *Biologia Molecular da Célula*. 5ª Ed. São Paulo: Artes Médicas Sul LTDA.
- Apu AS, Hossain F, Rizwan F, Bhuyan SH, Matin M and Jamaluddin ATM (2013) Study of pharmacological activities of metanol extract of *Jatropha gossypifolia* fruits. *J Basic Clin Pharm* 4:20-24.
- Arekemase MO, Kayode RMO and Ajiboye AE (2011) Antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Jatropha Curcas* plant against some selected microorganisms. *Int J Biol* 3:52-59.
- Auvin-Guette C, Baraguey C, Blond A, Pousset JL and Bodo B (1997) Cyclogossine B, a cyclic octapeptide from *Jatropha gossypifolia*. *J Nat Prod* 60:1155-1157.
- Ayres M, Ayres JRM, Ayres DL and Santos AS (2007) *BioEstat 5.3 – aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 364p.
- Bagatini DM, Silva ACF and Tedesco SB (2007) Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn* 17:444-447.
- Bhagat R, Misar AV, Ambavade SD and Kulkarni DK (2013) HPTLC analysis and anti-inflammatory activity of *Jatropha gossypifolia* L. root in mice and wistar rats. *IJPR* 3:13-17.
- Blume Y, Yemets A, Sulimenko V, Sulimenko T, Chan J, Lloyd C and Draber P (2008) Evidence of tyrosine phosphorylation of plant tubulin. *Planta* 229:143-150.
- Çelik TA and Aslantürk OS (2010) Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Inula viscosa* leaf extracts with *Allium* test. *J Biomed Biotechnol* 2010:1-8.
- Cordeiro I and Secco R (2014) *Jatropha* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17581>. (Accessed on March 20, 2014).
- Curto LA (1993) *Índio: manual de saúde*. Canzo: Aldo Lo Curto, 208p.
- Devappa RK, Makkar HPS and Becker K (2011) *Jatropha* diterpenes: a review. *J Am Oil Chem Soc* 88:301-322.
- Dhale DA and Birari R (2010) Preliminary screening of antimicrobial and phytochemical studies of *Jatropha gossypifolia* L. *Rec Res Sci Tech* 2:24-28.
- Fachinetto JM, Bagatini MD, Durigon J, Silva ACF and Tedesco SB (2007) Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Rev Bras Farmacogn* 17:49-54.
- Félix-Silva J, Giordani RB, Silva-Jr AA, Zucolotto SM and Pedrosa MFF (2014) *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): A review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of this medicinal plant. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014:1-32.
- Fenech M (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res* 455: 81-95.
- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surrallés J, Crott JW, Parry J, Norppa YH, Eastmond DA, Tucker JD and Thomas P (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26:125-132.
- Fernandes TCC, Mazzeo DEC and Marin-Morales MA (2007) Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pestic Biochem Physiol* 88:252-259.

- Fernandes TCC, Mazzeo DEC and Marin-Morales MA (2009) Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent Trifluralin herbicide. *Ecotox Environ Safe* 72:1680-1686.
- Fiskesjo G (1985) The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102:99-112.
- Gaikwad RS, Kakde RB, Kulkarni AU, Gaikwad DR and Panchal VH (2012) *In vitro* antimicrobial activity of crude extracts of *Jatropha* species. *Curr Bot* 3:09-15.
- Grant WF (1978) Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. *Environ Health Persp* 27:37-43.
- Horsten SF, Berg AJVD, Bosch JJKVD, Leeftang BR and Labadie RP (1996) Cyclogossine A: a novel cyclic heptapeptide isolated from the latex of *Jatropha gossypifolia*. *Planta Med* 62:46-50.
- Insanu M, Anggadiredja J and Kayser O (2012) Curcacycline A and B – new pharmacological insights to an old drug. *IJARNP* 5:26-34.
- Jansen O, Angenot L, Tits M, Nicolas JP, Mol DP, Nikiema JB and Frederich M (2010) Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiparasmodial properties. *J Ethnopharmacol* 130:143-150.
- Jones RN (2005) McClintock's controlling elements: the full story. *Cytogenet Genome Res* 109:90-103.
- Leme DM and Marin-Morales MA (2008) Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. *Mutat Res* 650:80-86.
- Leme DM and Marin-Morales MA (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat Res* 793:1-11.
- Matos FJA (2004) Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras. Editora UFC, Fortaleza, 448p.
- Mazzeo DEC, Fernandes TCC and Marin-Morales MA (2011) Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. *Chemosphere* 85:13-18.
- Mongkolvisut W, Sutthivaiyakit S, Leutbecher H, Mika S, Klaiber I, Moller W, Rosner H, Beifuss U and Conrad J (2006) Integerrimides A and B, cyclic heptapeptides from the latex of *Jatropha integerrima*. *J Nat Prod* 69:1435-1441.
- Nazeema TH and Giriya S (2013) Characterisation of the active antiproliferative principles of *Jatropha curcus* and *Jatropha gossypifolia* on Hela cell lines. *Int J Pharm Pharm Sci* 5:346-355.
- Nunes LG, Gontijo DC, Souza CJA, Fietto LG, Carvalho AF and Leite JPV (2012) The mutagenic, DNA-damaging and antioxidative properties of bark and leaf extracts from *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum. *Environ Toxicol Pharmacol* 3:297-303.
- Odeigah PGC, Nurudeen O and Amund OO (1997) Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. *Hereditas* 126:161-167.
- Oduola T, Popoola GB, Avwioro OG, Oduola TA, Ademosun AA and Lawal MO (2007) Use of *Jatropha gossypifolia* latex as a haemostatic agent: how safe is it? *J Med Plants Res* 1:14-17.
- Oliveira FCS, Barros RFM and Neto MJM (2010) Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. *Ver Bras Pl Med* 12:282-301.
- Paes AMA, Camara AL, Freire SMF and Borges MOR (2012) Relaxant effect of *Jatropha gossypifolia* L. on uterine smooth muscle. *International Journal of phytomedicine* 4:310-313.
- Parente CET and Rosa MMT (2001) Plantas comercializadas como medicinais no Município de Barra do Piraí, RJ. *Rodriguésia* 52:47-59.

- Patil SV, Borase HP, Patil CD and Salunke BK (2012) Biosynthesis of silver nanoparticles using latex from few Euphorbian plants and their antimicrobial potential. *Appl Biochem Biotechnol* 167:776-790.
- Pawlowski Â, Kaltchuk-Santos E, Zini CA, Caramão EB, Sudhakar GLGS, Gowda R and Venu NG (2012) Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. *S Afr J Bot* 80:96-103.
- Ping KY, Darah I, Yusuf UK, Yeng C and Sasidharan S (2012) Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* Assay. *Molecules* 17:7782-7791.
- Pratap B and Singh A (2013) Piscicidal and anti AChE activity of medicinal plant *Jatropha gossypifolia* (Family-Euphorbiaceae). *World J Fish and Marine Sci* 5:367-372.
- Punjaji SA (2012) Traditional oral healthcare practices in pathardi areas of Ahmednagar district, Maharashtra, India. *Environ Pharmacol Life Sci* 1:84-88.
- Rank J and Nielsen MH (1994) Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutat Res* 312:17-24.
- Ray S, Kundu LM, Goswami S, Roy GC, Chatterjee S, Dutta S, Chaudhuri A and Chakrabarti CS (2013) Metaphase arrest and delay in cell cycle kinetics of root apical meristems and mouse bone marrow cells treated with leaf aqueous extract of *Clerodendrum viscosum* Vent. *Cell Prolif* 46:109-117.
- Sabandar CW, Ahmat N, Jaafar FM and Sahidin I (2013) Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. *Phytochemistry* 85:7-29.
- Sakai R, Rinehart KL, Kishore V, Kundu B, Faircloth G, Gloer JB, Carney JR, Namikoshi M, Sun F, Hughes RG, *et al.* (1996) Structure and activity relationships of the didemnins 1,2. *J Med Chem* 39:2819-2834.
- Sheremet YA, Emets AI, Azmib A, Vissenberg K, Verbelen JP and Blume YB (2012) Effect of serine/threonine protein kinases and protein phosphatases inhibitors on mitosis progression in a synchronized tobacco BY-2 culture. *Cytol Genet* 46:89-95.
- Sheremet YA, Yemets AI, Vissenberg K, Verbelen JP and Blume YB (2010) Effects of inhibitors of serine/threonine protein kinases on *Arabidopsis thaliana* root morphology and microtubule organization in its cells. *Cell Tissue Biol* 4:399-409.
- Silva AM, Brum RL and Calixto JB (1995) The relaxant action of jatrophone in rat portal vein. A comparison with protein kinase C inhibitors. *Life Sci* 57:863-871.
- Silva FAZ and Azevedo CAV (2002) Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais* 4:71-78.
- Singh P and Singh A (2012) Acute toxic effects of medicinal plant *Jatropha gossypifolia* on non- target fish and mice. *Wudpecker J Agric Res* 1:433-438.
- Stansley W (1993) Field results using cholinesterase reactivation techniques to diagnose acute anticholinesterase poisoning in birds and fish. *Arch Environ Com Tox* 25:315-321.
- Stasi DLC and Hiruma-Lima CA (2002) Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2.ed. São Paulo: UNESP, 604p.
- Valencia A, Frérot B, Guénego H, Múnera DF, Sá MFGD and Calatayud PA (2006) Effect of *Jatropha gossypifolia* leaf extracts on three lepidoptera species. *Rev Colomb Entomol* 32:45-48.
- Ventura-Camargo BC, Maltempi PPP and Marin-Morales MA (2011) The use of the cytogenetic to identify mechanisms of action of an azo dye in *Allium Cepa* meristematic cells. *J Environment Analytic Toxicol* 1:1-12.

- Wink M (2012) Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. *Molecules* 17:12771-12791.
- Wu L, Lu Y, Zheng QT, Tan NH, Li CM and Zhou J (2007) Study on the spatial structure of anomuricatin A, a cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. *J Mol Struct* 827:145-148.

5. CAPÍTULO II

Potencial Genotóxico e Perfil Fitoquímico do Extrato Foliar de Pinhão- Roxo (*Jatropha gossypifolia* L.)

Artigo a ser submetido à revista **Genetics and Molecular Biology**.

1. Introdução

As plantas medicinais são utilizadas para a manutenção e recuperação da saúde, desde as formas mais simples de tratamento local até a fabricação industrial de medicamentos (Lorenzi e Matos, 2008). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial ainda depende de plantas medicinais para os cuidados de atenção básica à saúde (Ouedraogo *et al.*, 2012), sendo utilizadas em todo o mundo, e cada vez mais em nações ocidentais (Jordan *et al.*, 2010). Além disso, nos países em desenvolvimento, a OMS incentiva o uso de medicamentos a base de plantas (Atsamo *et al.*, 2011). Entretanto, a falta de informações sobre a eficácia e utilização das plantas medicinais e seus efeitos adversos à saúde dificultam o uso das mesmas pela população em geral (Brandão *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2012).

Jatropha gossypifolia L. (Euphorbiaceae), conhecida popularmente como pinhão-roxo, é um arbusto leitoso distribuído na América Latina, Caribe, Índia, África Ocidental, Oceania, sendo amplamente utilizada para fins medicinais (Kawanga, 2007; Cordeiro e Secco, 2014). A raiz e o caule possuem atividade citotóxica (Nazeema e Girija, 2013), antimalárica, leishmanicida, antimicrobiana, inseticida, moluscicida (Sabandar *et al.*, 2013) e anti-inflamatória (Bhagat *et al.*, 2013). As sementes e os frutos são usados contra gripe, como purgante (Sabandar *et al.*, 2013), sedativo, analgésico e antidiarreico (Apu *et al.*, 2013a). Por sua vez, o látex é bactericida (Gaikwad *et al.*, 2012), moluscicida (Matos, 2004), cicatrizante (Oliveira *et al.*, 2010), além de ser útil no tratamento de gengivite e piorreia (Punjaji, 2012), bem como na redução de sangramento nasal (Oduola *et al.*, 2007).

As folhas têm efeito inseticida (Valencia *et al.*, 2006), cicatrizante (Santos *et al.*, 2006), antimalárico (Jansen *et al.*, 2010), antimicrobiano (Dhale e Birari, 2010; Gaikwad *et al.*, 2012), citotóxico e antitumoral (Devappa *et al.*, 2011; Sabandar *et al.*, 2013). A

população utiliza as folhas na forma de chás (decocção ou infusão) para inflamações em geral e dor nos olhos (Oliveira *et al.*, 2010), enquanto as folhas *in natura* ou em compressa são usadas na cicatrização de feridas cutâneas, dores de cabeça (Amorozo *et al.*, 1988; Oliveira *et al.*, 2010) e têm efeito anticoagulante (Oduola *et al.*, 2005). Também são utilizadas para contrações espasmódicas e cólicas uterinas (Paes *et al.*, 2012).

Em relação ao perfil fitoquímico das diferentes partes de *J. gossypifolia*, o principal extrator utilizado é o etanol (Mariz *et al.*, 2010). Nos caules, folhas e raízes foram evidenciados esteroides, fenóis, taninos, saponinas, óleos, monoterpenos, diterpenos, triterpenos e sesquiterpenos (Pertino *et al.*, 2007; Devappa *et al.*, 2010; Mariz *et al.*, 2010; Seth e Sarin, 2010; Nwokocha *et al.* 2011; Jain *et al.*, 2013; Sabandar *et al.*, 2013). No entanto, estudos fitoquímicos utilizando a água como solvente ainda são insipientes na literatura, embora o seu uso popular ocorra com mais frequência com a infusão ou decocção (Félix-Silva *et al.*, 2014).

Apesar das vantagens terapêuticas, as substâncias químicas presentes nas folhas de *J. gossypifolia* podem gerar toxicidade, como foi visto em camundongos (Mariz *et al.*, 2008; Singh e Singh, 2012), ovinos (Oliveira *et al.*, 2008), crustáceos (Apu *et al.*, 2013a) e peixes (Singh e Singh, 2005; Pratap e Singh, 2013), principalmente devido à presença de diterpenos. Pelo fato das folhas de *J. gossypifolia* serem utilizadas pela população de forma empírica e por apresentar substâncias químicas que podem ser prejudiciais à saúde, tornam-se necessários mais estudos sobre o seu potencial toxicológico, assim como análise do perfil fitoquímico tanto do extrato etanólico quanto do extrato aquoso.

Os testes de toxicidade e genotoxicidade, utilizando o bioensaio *Allium cepa* L., mostram uma boa correlação com o sistema teste de mamíferos (Rank e Nielsen, 1994), indicando a sua utilização na avaliação do potencial genotóxico de compostos fitoquímicos (Fachinetto *et al.*, 2007). A espécie *A. cepa* destaca-se entre outras plantas, devido à

apresentação de cromossomos grandes e em número reduzido ($2n = 16$) em suas células (Fiskesjo, 1985). Este sistema é de fácil utilização e apresenta baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade, contribuindo assim na avaliação de genotoxicidade preliminar de compostos para fins medicinais (Bagatini *et al.*, 2007). Em vista do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, utilizando o sistema-teste *A. cepa*, e analisar o perfil fitoquímico dos extratos etanólico e aquoso foliares de *J. gossypiiifolia*.

2. Material e Métodos

2.1 Material Biológico

Folhas de *J. gossypiiifolia* foram coletadas em populações subespontâneas ocorrentes em Teresina (Brasil) em julho de 2012 e em junho de 2013 a partir de várias plantas adultas. Os exemplares foram identificados e depositados testemunhas no Herbário Afrânio Fernandes da Universidade Estadual do Piauí (UESPI, Teresina, Brasil), sob o número de voucher HAF 03111. As sementes de cebola cv. Vale Ouro IPA – 11, por sua vez, foram cedidas pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA, Recife, Brasil).

2.2 Preparo dos Extratos Etanólico e Aquoso Foliares de *J. gossypiiifolia*

As folhas coletadas em julho de 2012 e em junho de 2013 foram colocadas em estufa para secagem na temperatura de 45-50 °C por cinco dias no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (Departamento de Genética, UFPE). O material seco foi macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino para o preparo dos extratos.

O extrato etanólico (EE) foi preparado com as folhas coletadas em 2012. Cem gramas do pó foram adicionadas em 1 L de álcool etílico absoluto, permanecendo sob agitação por 24 h a 300 rpm. Em seguida, o extrato foi filtrado em papel filtro e armazenado a 4 °C. O extrato foi evaporado utilizando um evaporador rotativo, e posteriormente, foi seco com o auxílio de *Speed Vacuum* a 45 °C. O extrato seco foi diluído em água destilada em cinco concentrações (0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 mg/mL).

Devido à utilização das folhas principalmente na forma de decocção e infusão, foi realizado posteriormente o preparo do extrato aquoso (EA). O EA foi obtido com a infusão

de 100 g do pó das folhas coletadas em 2013 adicionados em 1 L de água destilada, durante 10 min, e em seguida foi filtrado em papel filtro e diluído em água destilada nas mesmas concentrações do EE. Ambos os extratos foram utilizados no ensaio com *A. cepa*.

As concentrações (0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 mg/mL) utilizadas foram selecionadas a partir de atividades antimicrobianas nas concentrações de 0,1 e 1 mg/mL (Kumar *et al.*, 2006; Gaikwad *et al.*, 2012) e tóxicas em *Artemia salina* em 0,01 e 0,1 mg/mL (Apu *et al.*, 2013a) para ambos os extratos.

2.3 Ensaio *Allium cepa*

Cem sementes de *A. cepa* foram germinadas em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada. Após germinação, foram transferidas para as cinco concentrações citadas dos extratos foliares (EE e EA), uma placa por concentração, por um período de exposição de 24 h. Como controle negativo (CN) foi utilizada água destilada, e como controles positivos (CP) o MMS (Metilmetanosulfonato, 4×10^{-4} M), uma droga de ação clastogênica, e o herbicida trifluralina (0,84 ppm), uma substância de ação aneugênica (Fernandes *et al.*, 2007). As pontas de raízes (uma raiz por espécime) foram fixadas em Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético; v:v) por 6-8 h, à temperatura ambiente, e estocadas a -20° C, até o momento de confecção das lâminas.

Para a confecção das lâminas, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada de 5 min cada e hidrolisadas a 60 °C por 10 min em HCl 1N. Após a hidrólise, as raízes foram novamente lavadas em água destilada e transferidas para frascos de vidro âmbar, contendo o Reativo de Schiff, onde permaneceram em local escuro, por 2 h. Após esse período, as raízes foram lavadas, até a total retirada do reativo, transferidas para lâminas, onde foram esmagadas em uma gota de carmim acético 2% e montadas com Entellan®.

A toxicidade dos extratos foliares (EE e EA) foi avaliada a partir da variação do comprimento médio (em centímetros) de raízes (unidade experimental: uma raiz individual; total de 30 raízes por tratamento). A citotoxicidade e genotoxicidade foram avaliadas pela contagem de 5.000 células meristemáticas (unidade experimental: 500 células/ lâmina; total de 10 lâminas por tratamento) em microscópio de luz. Os parâmetros avaliados foram: (1) índice mitótico (citotoxicidade) e (2) índice de alterações cromossômicas (genotoxicidade). O último inclui alterações resultantes de efeitos aneugênicos (C-metáfases, metáfase com aderências cromossômicas, perdas cromossômicas, anáfases multipolares, células binucleadas, metáfases poliploides, e outras alterações) ou efeitos clastogênicos (fragmentos cromossômicos, pontes cromossômicas e outras alterações).

Adicionalmente, a presença ou não de micronúcleos, os quais podem ser resultantes de efeitos aneugênicos ou clastogênicos, também foi avaliada nas células F₁ (derivadas da divisão mitótica de células meristemáticas) (MA *et al.*, 1995), dos extratos foliares. Cinco mil células da geração F₁ (unidade experimental: 500 células/ lâmina; total de 10 lâminas por tratamento) foram avaliadas. Para a confecção das lâminas de células F₁, foram cortadas as regiões das raízes correspondentes a 1 mm acima da região meristemática. A análise de células micronucleadas seguiu o mesmo procedimento da análise da região meristemática.

Imagens das melhores células meristemáticas foram analisadas em microscópio convencional (DM 500) (aumento de 1000 x) e fotografadas com uma máquina digital (Nikon 14.0 Megapixels). As imagens foram otimizadas para melhor brilho e contraste com o Adobe Photoshop CS6.

2.4 Análise Fitoquímica dos Extratos Etanólico e Aquoso Foliares de *J. gossypifolia*

A prospecção fitoquímica foi realizada a partir do EE e EA foliares de *J. gossypifolia*. Para a realização da CCD (Cromatografia em Camada Delgada), alíquotas dos extratos foram aplicadas com capilar de vidro em placas cromatográficas de gel de sílica. Posteriormente, foram inseridas em cubas cromatográficas e submetidas à eluição por sistemas de solventes adequados para cada tipo de metabólito testado empregando-se diversas fases móveis e reveladores adequados, de acordo com a metodologia descrita na Tabela 1.

Para saponinas, também foi realizado o teste de afrogenicidade onde o extrato aquoso foi colocado em tubo de ensaio, submetido à agitação manual por 30 s, e posteriormente mantido em repouso por um período de 15 min (Costa, 2001).

2.5 Análise Estatística

Os valores da toxicidade foram expressos em média, enquanto os valores da citotoxicidade e genotoxicidade foram expressos em frequência, os quais foram analisados em um delineamento experimental inteiramente casualizado. A análise estatística para avaliar a distribuição dos dados quanto à normalidade foi realizada pelo teste de Lilliefors (D), no programa Assistat 7.7 (Silva e Azevedo, 2002), enquanto a homogeneidade de variâncias foi realizada pelo teste de Cochran, no programa BioEstat 5.3 (Ayres *et al.*, 2007). Os dados que não apresentaram distribuição normal e não homogêneos foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste *a posteriori* de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$), no programa BioEstat 5.3. Os dados de citotoxicidade de ambos os extratos foram os únicos que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias e foram analisados mediante o teste paramétrico de Scott-Knott ($p < 0,05$), no programa Assistat 7.7 (Silva e Azevedo, 2002).

Tabela 5. Sistemas cromatográficos e reveladores utilizados para o perfil fitoquímico dos extratos foliares de *Jatropha gossypifolia*.

Metabólito Testado	Fase Móvel	Padrão	Revelador	Referências
Triterpenos e Esteroides	Tolueno:AcOEt 90:10	β -sitosterol, Ácido ursólico e β -amirina	Liebermann/Burchard + Δ (visível)	5
Monoterpenos, Diterpenos e Sesquiterpenos	Tolueno:AcOEt 97:3	Timol	Vanilinasulfúrica + Δ (visível)	4
Alcaloides	AcOEt:ÁcidoAcético:Ácido Fórmico:H ₂ O 100:11:11:27	Pilocarpina	Dragendorff (visível)	4
Cumarinas	Et ₂ O:Tolueno:AcOH 10% (50:50:50:50)	Umbeliferona	KOH 5% EtOH + UV	4
Fenilpropanoglicosídeos	AcOEt:ÁcidoAcético:Ácido Fórmico:H ₂ O 100:3:3:3	Verbacosídeo	NEU + UV	2, 4
Flavonoides	AcOEt:ÁcidoAcético:Ácido Fórmico:H ₂ O 100:3:3:3	Quercetina e Rutina	NEU + UV	2
Derivados cinâmicos	AcOEt:ÁcidoAcético:Ácido Fórmico:H ₂ O 100:3:3:3	Ácido clorogênico	NEU + UV	2, 4
Taninos hidrolisáveis	AcOEt:ÁcidoAcético:Ácido Fórmico:H ₂ O 100:3:3:3	Ácido gálico e Ácido elágico	NEU + UV	1
Taninos condensados (Proantocianidinas e Leucoantocianidinas)	AcOEt:ÁcidoAcético:Ácido Fórmico:H ₂ O 100:3:3:3	Catequina	Vanilinaclorídrica (visível)	3
Antraquinonas	AcOEt:Álcool n propílico:H ₂ O: Ácido Acético 40:40:30:1	Senosídeo A e B	Ácido Nítrico 25% (aquoso) + Δ (Se surgirem bandas escuras add KOH 10% EtOH)	6
Saponinas	AcOEt:ÁcidoAcético:Ácido Fórmico:H ₂ O 100:11:11:27	Saponina	Vanilinasulfúrica + Δ (visível)	4

¹ Stiasny; 1912; ² Neu, 1956; ³ Roberts *et al.*, 1957; ⁴ Wagner e Bladt, 1996; ⁵ Harbone, 1998; ⁶ FBRAS V, 2010. +: até 2 bandas; ++: 3 a 5 bandas; +++: mais de 5 bandas; -: ausência de bandas.

3. Resultados

3.1. Avaliação da Toxicidade e da Citotoxicidade

Nos testes de toxicidade, houve uma diminuição dose-dependente significativa na média de crescimento das raízes tanto para o extrato etanólico (EE), nas concentrações de 0,01; 0,1; 1 e 10 mg/mL, quanto para o extrato aquoso (EA), nas concentrações de 0,1; 1 e 10 mg/mL, quando comparadas ao controle negativo (CN) (Tabela 2). Nos ensaios de citotoxicidade, os valores de índice mitótico (IM) em células meristemáticas de radículas tratadas em todas as concentrações testadas do EE e nas concentrações de 0,1; 1 e 10 mg/mL do EA também apresentaram reduções dose-dependente estatisticamente significativas (Tabela 2).

Tabela 6. Valores do comprimento médio das radículas e dos índices mitóticos em células meristemáticas de *Allium cepa*, observados após exposição de 24 h aos extratos etanólico e aquoso de *Jatropha gossypifolia* em diferentes concentrações.

Extrato	Concentrações (mg/mL)	Comprimento Médio da Raiz (cm)	Índice Mitótico (%)
Etanólico	Água Destilada (CN) ¹	1,32 ± 0,29	57,69 ± 13,69a ⁵
	0,001	1,26 ± 0,30	46,00 ± 2,90b
	0,01	1,19 ± 0,73** ⁴	42,27 ± 7,91b
	0,1	1,18 ± 0,24*	35,49 ± 6,40c
	1	1,16 ± 0,34*	34,94 ± 4,84c
	10	0,61 ± 0,10**	17,79 ± 8,03d
	MMS (4 x 10 ⁻⁴ M) ²	1,16 ± 0,23*	36,88 ± 7,17c
	Trifluralina (0,84 ppm) ³	1,06 ± 0,21**	42,47 ± 5,49b
Aquoso	Água Destilada (CN) ¹	4,22 ± 1,29	43,44 ± 10,12a
	0,001	3,89 ± 1,28	39,91 ± 5,92a
	0,01	3,47 ± 1,02	36,33 ± 5,39a
	0,1	2,92 ± 0,91**	34,96 ± 8,16b
	1	2,61 ± 1,00**	32,57 ± 7,22b
	10	2,03 ± 0,93**	29,97 ± 10,24b
	MMS (4 x 10 ⁻⁴ M) ²	2,07 ± 0,53**	32,80 ± 3,89b
	Trifluralina (0,84 ppm) ³	1,73 ± 0,43**	26,63 ± 4,13b

¹CN: controle negativo. ²MMS (Metilmetanosulfonato): controle positivo. ³Trifluralina: controle positivo. ⁴Significativo no teste de Kruskal-Wallis com teste de Student-Newman-Keuls a posteriori (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). ⁵Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$; médias seguidas pela mesma letra minúscula não são significativamente diferentes). Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.

3.2. Avaliação da Genotoxicidade e da Mutagenicidade

Em relação às alterações cromossômicas (AC), o aumento nos índices totais (Tabelas 3 e 4; Figura 1) foi dose-dependente e significativo tanto para EE quanto para EA, quando comparados com os resultados do CN, exceto para as concentrações de 0,001 e 0,01 mg/mL do EE e 0,001 mg/mL do EA, indicando uma ação genotóxica para ambos os extratos de *J. gossypifolia*.

Quando às alterações cromossômicas foram analisadas separadamente, metáfases com aderências cromossômicas (Figura 1A) significativas encontradas nas concentrações de 0,001; 0,1 e 1 mg/mL do EE e em 0,001; 0,01; 0,1 e 10 mg/mL do EA. A presença de C-metáfases (Figura 1B) foi significativa apenas nas concentrações de 1 e 10 mg/mL do EE e do EA, respectivamente (Tabelas 3 e 4). Ambas as aderências cromossômicas e C-metáfases são resultados de mecanismos aneugênicos.

Outras alterações na segregação cromossômica durante a anáfase e telófase foram registradas, tais como perdas cromossômicas (Figura 1C-D) e multipolaridades (Figura 1E; Tabelas 3 e 4). Dentre as alterações observadas, foi significativa a presença de perdas cromossômicas apenas no EE nas concentrações de 1 e 10 mg/mL. Além disso, metáfases poliploides (Figura 1F), células binucleadas (Figura 1G), núcleos lobulados (Figura 1H) e brotos nucleares (Figura 1I) foram encontrados na maioria das concentrações analisadas para os dois extratos. Contudo, apenas brotos nucleares foram significativos nas concentrações de 1 e 10 mg/mL de ambos os extratos (Tabelas 3 e 4).

Fragmentos cromossômicos (Figura 1J) e pontes cromossômicas (Figura 1K; Tabelas 3 e 4), decorrentes de efeitos clastogênicos, também foram registrados, mas apenas a presença de pontes cromossômicas foi significativa nas concentrações de 10 mg/mL do EE e em 0,001; 0,01; 0,1 e 10 mg/mL do EA. Frequências de micronúcleos significativas

(Figura 1L) foram observadas em células meristemáticas nas concentrações de 0,001; 0,1; 1 e 10 mg/mL do EE e na concentração de 10 mg/mL do EA. Resultados similares foram observados nas células F₁ nas concentrações de 0,01; 0,1; 1 e 10 mg/mL com relação à frequência de MN nos dois extratos (Tabelas 3 e 4). Este último tipo de aberração pode ser devido tanto a efeitos aneugênicos ou clastogênicos, indicando um potencial mutagênico em nível cromossômico.

Com relação ao efeito comparativo da genotoxicidade e da mutagenicidade em relação ao controle negativo, os resultados da frequência do total de alterações cromossômicas nas células meristemáticas (Tabelas 3 e 4, Figura 2A) e dos micronúcleos nas células F₁ (Tabelas 3 e 4, Figura 2B) evidenciaram maior frequência dessas alterações no EE do que no EA quando comparados aos seus respectivos CN.

3.3. Análise do Perfil Fitoquímico dos Extratos Foliares de *J. gossypifolia*

O perfil fitoquímico do EE evidenciou a presença de monoterpenos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, esteroides e flavonoides; enquanto no perfil do EA, foi observada a presença de flavonoides e saponinas.

Tabela 7. Frequência das alterações cromossômicas em células meristemáticas e índices de MN em células F₁ de radículas de *Allium cepa*, observadas após a exposição por 24 h ao extrato etanólico de *Jatropha gossypifolia* em diferentes concentrações.

Alteração Cromossômica	Controle Negativo (%)	Tratamentos do Extrato Etanólico (mg/mL) (%)					Controles Positivos (%)	
	Água Destilada	0,001	0,01	0,1	1	10	MMS ² (4 x 10 ⁻⁴ M)	Trifluralina (0,84 ppm)
Metáfases com Aderências Cromossômicas	0,04 ± 0,08	0,36 ± 0,33** ¹	0,07 ± 0,16	0,57 ± 0,26**	0,36 ± 0,44*	0,24 ± 0,32	0,20 ± 0,14	0,59 ± 0,12**
C-metáfases	0,04 ± 0,08	0,19 ± 0,17	0,05 ± 0,09	0,35 ± 0,45	1,24 ± 0,90**	0,07 ± 0,12	0,19 ± 0,28	0,38 ± 0,12**
Perdas Cromossômicas	0,02 ± 0,05	0,19 ± 0,24	0,10 ± 0,14	0,03 ± 0,07	0,22 ± 0,22**	0,20 ± 0,22*	0,19 ± 0,16**	0,21 ± 0,07**
Células Binucleadas	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,44	0,04 ± 0,13	0,39 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,11 ± 0,09
Células Poliploides	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,06	0,06 ± 0,13	0,02 ± 0,06	0,02 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,21 ± 0,09**
Anáfases Multipolares	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,07	0,02 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,11**
Núcleos Lobulados	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,53	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,10**
Broto Nucleares	0,05 ± 0,09	0,10 ± 0,19	0,39 ± 0,49	0,24 ± 0,24	0,55 ± 0,55*	1,28 ± 0,68**	0,26 ± 0,35	0,31 ± 0,28
Micronúcleos	0,04 ± 0,08	0,45 ± 0,35*	0,40 ± 0,40	0,51 ± 0,31*	0,80 ± 0,77**	4,11 ± 3,69**	1,69 ± 0,85**	0,52 ± 0,36*
Fragmentos Cromossômicos	0,11 ± 0,15	0,02 ± 0,06	0,11 ± 0,15	0,06 ± 0,09	0,15 ± 0,30	0,37 ± 0,52	0,40 ± 0,31*	0,28 ± 0,20
Pontes Cromossômicas	0,02 ± 0,05	0,04 ± 0,08	0,02 ± 0,06	0,04 ± 0,08	0,09 ± 0,24	0,38 ± 0,22**	0,02 ± 0,06	0,19 ± 0,11**
Total	0,32 ± 0,16	1,35 ± 0,98	1,16 ± 0,55	2,04 ± 0,95**	3,51 ± 1,63**	7,31 ± 0,91**	2,95 ± 1,02**	3,28 ± 0,71**
Células F₁	0,13 ± 0,09	0,50 ± 0,40	0,75 ± 0,41**	1,01 ± 0,32**	1,37 ± 0,34**	2,71 ± 0,73**	0,96 ± 0,31**	0,52 ± 0,28

¹Significativo no teste de Kruskal-Wallis com teste de Student-Newman-Keuls a posteriori (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). ²MMS (Metilmetanosulfonato): controle positivo. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.

Tabela 8. Frequência das alterações cromossômicas em células meristemáticas e índices de MN em células F₁ de radículas de *Allium cepa*, observadas após exposição por 24 h ao extrato aquoso de *Jatropha gossypifolia* em diferentes concentrações.

Alteração Cromossômica	Controle Negativo (%)	Tratamentos do Extrato Aquoso (mg/mL) (%)					Controle Positivo (%)	
	Água Destilada	0,001	0,01	0,1	1	10	MMS ² (4 x 10 ⁻⁴ M)	Trifluralina (0,84 ppm)
Metáfases com Aderências Cromossômicas	0,44 ± 0,53	1,20 ± 0,56* ¹	1,08 ± 0,51*	1,17 ± 0,54*	1,12 ± 0,51	1,60 ± 0,97**	0,29 ± 0,22	2,35 ± 1,62**
C-metáfases	0,04 ± 0,12	0,11 ± 0,15	0,22 ± 0,30	0,27 ± 0,38	0,28 ± 0,34	0,35 ± 0,38*	0,18 ± 0,17	0,79 ± 0,58**
Perdas Cromossômicas	0,10 ± 0,10	0,15 ± 0,17	0,18 ± 0,12	0,22 ± 0,22	0,14 ± 0,21	0,20 ± 0,16	0,04 ± 0,08	0,49 ± 0,58
Células Binucleadas	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,12	0,04 ± 0,12	0,16 ± 0,40	0,07 ± 0,15	0,09 ± 0,16	0,00 ± 0,00	0,92 ± 1,25
Células Poliploides	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,47 ± 0,48
Anáfases Multipolares	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,45
Núcleos Lobulados	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,08	0,00 ± 0,00	3,74 ± 3,19**
Brotos Nucleares	0,08 ± 0,10	0,22 ± 0,14	0,24 ± 0,31	0,16 ± 0,22	0,58 ± 0,47*	0,33 ± 0,31*	0,24 ± 0,23	1,32 ± 0,52**
Micronúcleos	0,20 ± 0,19	0,32 ± 0,60	0,66 ± 0,51	0,72 ± 0,29	0,81 ± 0,57	0,94 ± 0,70*	3,54 ± 2,30**	1,71 ± 1,09**
Fragmentos Cromossômicos	0,02 ± 0,06	0,06 ± 0,17	0,07 ± 0,13	0,07 ± 0,09	0,10 ± 0,15	0,07 ± 0,16	0,44 ± 0,38	0,11 ± 0,24
Pontes Cromossômicas	0,00 ± 0,00	0,27 ± 0,20**	0,26 ± 0,25**	0,24 ± 0,23**	0,24 ± 0,34	0,24 ± 0,23**	0,22 ± 0,19**	0,47 ± 0,58**
Total	0,88 ± 0,79	2,43 ± 1,15	2,75 ± 0,82**	3,05 ± 0,95**	3,34 ± 1,69**	3,86 ± 1,51**	4,95 ± 2,20**	12,67 ± 6,32**
Células F₁	0,62 ± 0,46	0,96 ± 0,82	1,32 ± 0,74*	1,38 ± 0,44*	1,47 ± 0,48**	1,54 ± 0,83**	3,16 ± 1,59**	1,57 ± 0,73**

¹ Significativo no teste de Kruskal-Wallis com teste de Student-Newman-Keuls a posteriori (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). ² MMS (Metilmetanosulfonato): controle positivo. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.

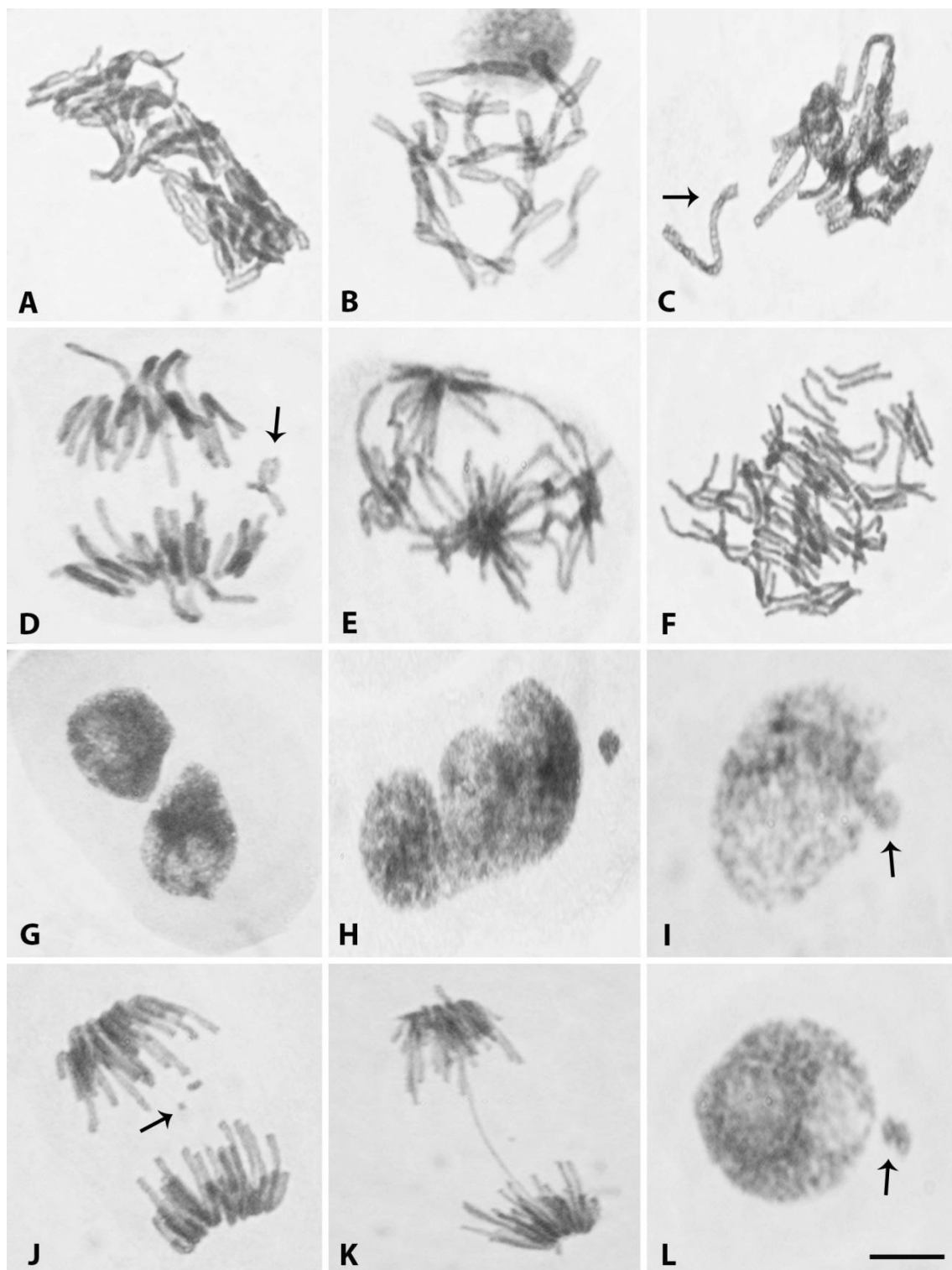


Figura 4. Alterações cromossômicas após o tratamento com os extratos foliares (EE e EA) de *Jatropha gossypifolia* nas células meristemáticas de *A. cepa* visualizado com microscopia de luz. **(A)** Aderência cromossômica (0,1 mg/mL). **(B)** C-metáfase (1 mg/mL). **(C)** Metáfase com perda cromossômica (1 mg/mL). **(D)** Anáfase com perda cromossômica (1 mg/mL). **(E)** Anáfase multipolar com pontes cromossômicas (10 mg/mL). **(F)** Metáfase poliploide (0,1 mg/mL). **(G)** Célula binucleada (0,1 mg/mL). **(H)** Núcleos lobulados (10 mg/mL). **(I)** Broto nuclear (10 mg/mL). **(J)** Fragmentos cromossômicos (1 mg/mL). **(K)** Anáfase com ponte cromossômica (10 mg/mL). **(L)** Micronúcleo (10 mg/mL). Setas em (C), (I) e (J) e (L) indicam perdas cromossômicas, broto nuclear, fragmento cromossômico e micronúcleo, respectivamente. Bar: 10 μ m (para todas as imagens).

4. Discussão

As folhas de *J. gossypifolia* apresentam várias finalidades medicinais, entretanto a presença de diferentes fitoquímicos, podem estar associados com as reduções do crescimento médio da raiz e do índice mitótico do EE em *A. cepa*, indicativos de toxicidade e citotoxicidade, respectivamente. Estes efeitos podem ser atribuídos aos diferentes terpenos observados no presente estudo, principalmente aos diterpenos, por serem um dos compostos mais tóxicos e citotóxicos em *Jatropha* (Devappa *et al.*, 2011; Sahidin *et al.*, 2011). O caráter lipofílico dos diterpenos (Wink, 2012) facilita a sua passagem para o meio intracelular e permanência nas células de *A. cepa*, auxiliando na geração do efeito tóxico. Resultados similares quanto à toxicidade dos diterpenos e demais terpenos foram observados em estudos antiparasitários (Wink, 2012).

A redução do índice mitótico (IM) pode estar relacionada à ação dos diterpenos na redução na concentração de cálcio, inibindo a proteína quinase C (PKC) (Silva *et al.*, 1995; Paes *et al.*, 2012) e diminuindo a proliferação celular (Alberts *et al.*, 2010). Resultados similares foram observados com os inibidores da PKC em *A. cepa* (Blume *et al.*, 2008), *Arabidopsis thaliana* (Sheremet *et al.*, 2010) e *Nicotiana tabacum* (Sheremet *et al.*, 2012). Tal redução do índice mitótico (IM) no EE também pode estar associada à atuação dos diterpenos na diminuição dos níveis de ciclina B (CYC B), que controlam a transição G2/M (Lin *et al.*, 2003). Os flavonoides observados no EE também podem estar associados a esses efeitos adversos. No EA, as reduções do crescimento médio da raiz e do índice mitótico também foram dose-dependentes e parecem ter sido resultantes do sinergismo de flavonoides e/ou saponinas, como observado em *Myristica fragrans* (Akinboro *et al.*, 2011) e em *Loranthus micranthus* (Iwalokun *et al.*, 2011).

Além disso, os diferentes fitoquímicos identificados também podem ter reduzido o IM por atuarem, possivelmente, como inibidores da Topoisomerase II (Topo II), alterando processos de replicação, condensação e segregação dos cromossomos (Cortés *et al.*, 2003; Zabka *et al.*, 2013). Estudos quanto à citotoxicidade e à inibição da Topo II foram previamente relatados para diterpenos de *Euphorbia kansui* (Miyata *et al.*, 2006), triterpenos, flavonoides e ligninas de *Ulmus davidiana* var. *japonica* (Zheng *et al.*, 2010), e saponinas de *Quercus resinosa* (Sánchez-Burgos *et al.*, 2013) e para outros reconhecidos inibidores da Topo II, como a doxorubicina, o bisdioxopiperazine-ICF193 (Zabka *et al.*, 2013) e o resveratrol (Basso *et al.*, 2013). Diterpenos, triterpenos, flavonoides e saponinas também foram encontrados nos extratos do presente estudo, sendo os dois primeiros apenas no extrato etanólico. A provável atuação inibitória da Topo II pelos diferentes fitoquímicos dos extratos pode ter induzido alterações na condensação (aderências cromossômicas) e, conseqüentemente, na segregação mitótica (perdas cromossômicas).

A maioria das alterações cromossômicas, como aderências cromossômicas e C-metáfases observadas nos dois extratos foi considerada como resultante de efeitos genotóxicos, pois representam dano ao material genético que não é necessariamente fixado no organismo (Leme e Marin-Morales; 2009; Mazzeo *et al.*, 2011). A presença de aderências cromossômicas e C-metáfases confirma a interferência de fitoquímicos dos extratos (EE e EA) foliares de *J. gossypiiifolia* na montagem, estabilização e ou inativação das fibras do fuso, caracterizando uma ação aneugênica. Essa interferência, provavelmente, está associada aos diterpenos presentes no EE, como evidenciados para diterpenos de *Euphorbia semiperfoliata* (Miglietta *et al.*, 2003) e *E. dendroides* (Pešić *et al.*, 2011).

Atividades aneugênicas em metáfases podem gerar outros tipos de alterações celulares como anáfases multipolares, núcleos lobulados e células poliploides (Fernandes *et al.*, 2009). No entanto, estas alterações não foram significativas no presente estudo para

nenhum dos extratos avaliados, o que indica que as C-metáfases não contribuíram para alterações posteriores, sugerindo um mecanismo reversível das mesmas (Odeigah *et al.*, 1997).

Pontes cromossômicas, fragmentos cromossômicos e parte da formação de micronúcleos (MN) estão relacionados com a atividade clastogênica (Fenech *et al.*, 2011). No entanto, nos resultados apresentados, os fragmentos cromossômicos não foram significativos em nenhuma das concentrações testadas do EE e do EA. A formação de pontes, por sua vez, foi significativa para a maioria das concentrações de EA e não significativa para todas as concentrações de EE, com exceção de 10 mg/mL. Desta forma, a ação clastogênica encontrada para EA parece ter sido resultante da ação sinérgica de flavonoides e/ou saponinas. Por outro lado, os terpenos não parecem ter esse tipo de ação. Apenas a concentração de 10 mg/mL do EE mostrou número significativo de pontes cromossômicas, possivelmente resultates da ação de flavonoides (na ausência de saponinas) ou de terpenos, apenas em altas concentrações em qualquer dos casos.

A formação não significativa de fragmentos cromossômicos (para todas as concentrações) e de pontes cromossômicas (para as quatro concentrações mais baixas) no EE indica que possivelmente os MN formados em duas concentrações de EE (1 e 10 mg/mL) não foram originados a partir de fragmentos cromossômicos, mas de uma ação aneugênica envolvendo um ou mais cromossomos inteiros não incorporados no núcleo principal durante o ciclo celular (Fenech *et al.*, 2011) ou ainda a partir de brotos nucleares (Fernandes *et al.*, 2007). Tal proposição reforça a associação dos terpenos e/ ou flavonoides (na ausência de saponinas) ao potencial aneugênico.

Os resultados apresentados também mostraram frequências significativas de MN nas células F₁, que são derivadas da divisão mitótica de células meristemáticas (Ma *et al.*, 1995), em ambos os extratos para as concentrações de 0,01 mg/mL ou acima (Leme e

Marin-Morales, 2008). Os MN observados nas células F₁ podem ter sido originados a partir de danos não reparados ou incompletamente reparados em células parentais (Ribeiro, 2003), indicando uma atividade mutagênica em nível cromossômico (estrutural ou numérico).

Adicionalmente, deve-se ressaltar que o resultado negativo do presente estudo para outros compostos como alcaloides, cumarinas, taninos e saponinas no EE (Seth e Sarin, 2010; Nwokocha *et al.*, 2011; Jain *et al.*, 2013), assim como esteroides, alcaloides e taninos no EA (Jain *et al.*, 2013), podem estar associados com a metodologia de extração. Deve-se levar em consideração que esses compostos poderiam também ter contribuído para as alterações genotóxicas do presente estudo.

Embora *J. gossypifolia* seja considerada uma importante planta com potencial para a geração de produtos farmacológicos e/ou biotecnológicos (Félix-Silva *et al.*, 2014), de modo geral, os testes realizados indicaram toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em nível cromossômico para os extratos foliares (EE e EA) de *J. gossypifolia*. Desta forma, como *A. cepa* apresenta boa correlação com testes realizados em mamíferos, alertamos para a eventual possibilidade dos extratos foliares apresentarem potencialidade para causar problemas à saúde humana, mesmo apresentando várias finalidades medicinais.

No EA, a ação clastogênica parece ser o principal agente causador dos efeitos negativos às células de *A. cepa*, como consequência provavelmente de uma ação sinérgica de flavonoides e/ou saponinas. Por outro lado, no EE a aneugenicidade parece ser a principal atividade, decorrente provavelmente da ação de terpenos e/ ou flavonoides (na ausência de saponinas). Dessa forma, estudos complementares são necessários para a determinação, isolamento e análise de seus compostos bioativos, a fim de reduzir sua

toxicidade, mantendo sua ação terapêutica, para sua posterior utilização na indústria farmacêutica.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Francisco Soares Filho, pela identificação taxonômica do material botânico (*J. gossypifolia*) e à Dra. Fátima de Oliveira Pires pelo auxílio técnico na microscopia. Este trabalho foi financiado pelo Programa de Fomento à Pós-Graduação (PROF) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brasil), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

Declaração de Conflito de Interesses

Os autores declaram que não há conflitos de interesses.

5. Referências Bibliográficas

- Akinboro A, Mohamed KB, Asmawi MZ, Sulaiman SF and Sofiman OA (2011) Antioxidants in aqueous extract of *Myristica fragrans* (Houtt.) suppress mitosis and cyclophosphamide-induced chromosomal aberrations in *Allium cepa* L. cells. *Biomed and Biotechnol* 12:915-922.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD (2010) *Biologia Molecular da Célula*. 5ª Ed. São Paulo: Artes Médicas Sul LTDA.
- Amorozo MCM and Gély A (1988) Uso de plantas medicinais por caboclos do Baixo Amazonas. *Bol Mus Para Emílio Goeldi* 4:47-131.
- Apu AS, Bhuyan SH, Khatun F, Liza MS, Matin M and Hossain MF (2013b) Assessment of cytotoxic activity of two medicinal plants using Brine Shrimp (*Artemia salina*) as an experimental tool. *IJPSR* 4:1125-1130.
- Apu AS, Hossain F, Rizwan F, Bhuyan SH, Matin M and Jamaluddin ATM (2013a) Study of pharmacological activities of metanol extract of *Jatropha gossypifolia* fruits. *J Basic Clin Pharm* 4:20-24.
- Atsamo AD, Nguelefack TB, Datté JY and Kamanyi A (2011) Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. *J Ethnopharmacol* 134:697-702.
- Ayres M, Ayres JRM, Ayres DL and Santos AS (2007) *BioEstat 5.3 – aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 364p.
- Basso E, Fiore M, Leone S, Degrassi F and Cozzi R (2013) Effects of resveratrol on topoisomerase II- α activity: induction of micronuclei and inhibition of chromosome segregation in CHO-K1 cells. *Mutagenesis* 28:243-248.
- Bagatini DM, Silva ACF and Tedesco SB (2007) Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn* 17:444-447.
- Bhagat R, Misar AV, Ambavade SD and Kulkarni DK (2013) HPTLC analysis and anti-inflammatory activity of *Jatropha gossypifolia* L. root in mice and wistar rats. *IJPR* 3:13-17.
- Blume Y, Yemets A, Sulimenko V, Sulimenko T, Chan J, Lloyd C and Draber P (2008) Evidence of Tyrosine phosphorylation of plant tubulin. *Planta* 229:143-150.
- Brandão H, David JP, Couto RD, Nascimento JAP and David JM (2010) Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Quim Nova* 33:1359-1369.
- Cordeiro I and Secco R 2014 *Jatropha* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17581>).
- Cortés F, Pastor N, Mateos S and Domínguez I (2003) Roles of DNA topoisomerases in chromosome segregation and mitosis. *Mutat Res* 543:59-66.
- Costa AF (2001) *Farmacognosia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 3 ed.
- Devappa RK, Makkar HPS and Becker K (2010) *Jatropha* Toxicity- A review. *J Toxicol Environ Health B* 13:476-507.
- Devappa RK, Makkar HPS and Becker K (2011) *Jatropha* diterpenes: a review. *J Am Oil Chem Soc* 88:301-322.
- Dhale DA and Birari R (2010) Preliminary screening of antimicrobial and phytochemical studies of *Jatropha gossypifolia* L. *Rec Res Sci Tech* 2:24-28.
- Farmacopeia Brasileira (2010) Rio de Janeiro: Fiocruz, 5. ed.

- Fachinetto JM, Bagatini MD, Durigon J, Silva ACF and Tedesco SB (2007) Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. Rev Bras Farmacogn 17:49-54.
- Félix-Silva J, Giordani RB, Silva-Jr AA, Zucolotto SM and Pedrosa MFF (2014) *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): A review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of this medicinal plant. Evid Based Complement Alternat Med 2014:1-32.
- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surrallés J, Crott JW, Parry J, Norppa YH, Eastmond DA, Tucker JD and Thomas P (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. Mutagenesis 26:125-132.
- Fernandes TCC, Mazzeo DEC and Marin-Morales MA (2007) Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. Pestic Biochem Physiol 88:252-259.
- Fernandes TCC, Mazzeo DEC and Marin-Morales MA (2009) Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent-Trifluralin herbicide. Ecotox Environ Safe 72:1680-1686.
- Fiskesjo G (1985) The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. Hereditas 102:99-112.
- Gaikwad RS, Kakde RB, Kulkarni AU, Gaikwad DR and Panchal VH (2012) *In vitro* antimicrobial activity of crude extracts of *Jatropha* species. Curr Bot 3:09-15.
- Harbone JB (1988) Phytochemical methods. 3. ed. London: Chapman & Hall, KR. Techniques of Flavonoid Identification. London: Academic Press, 1982.
- Iwalokun BA, Oyenuga AO, Saibu GM and Ayorinde J (2011) Analyses of Cytotoxic and Genotoxic Potentials of *Loranthus micranthus* using the *Allium cepa* Test. Curr Res J Biol Sci 3:459-467.
- Jain S, Choudhary GP and Jaina DK (2013) *In vitro* free radical scavenging activity of *Jatropha gossypifolia* L. containing phenolic compounds. J Med Plants Res 7:1424-1428.
- Jansen O, Angenot L, Tits M, Nicolas JP, Mol DP, Nikiema JB and Frederich M (2010) Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiparasmodial properties. J Ethnopharmacol 130:143-150.
- Jordan SA, Cunningham DG and Marles RJ (2010) Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. Toxicol Appl Pharm 243:198-216.
- Kawanga V (2007) *Jatropha gossypifolia* L. In: Schmelzer, G.H. & Gurib-Fakim, A. (Editors). Prota 11(1): Medicinal plants/Plantes médicinales 1. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen, Netherlands.
- Kumar VP, Chauhan NS, Padh H and Rajani M (2006) Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. J Ethnopharmacol 107:182-188.
- Leme DM and Marin-Morales MA (2008) Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. Mutat Res 650:80-86.
- Leme DM and Marin-Morales MA (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. Mutat Res 7934:1-11.
- Lin SB, Li CH, Lee SS and Kan LS (2003) Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. Life Sci 72:2381-2390.

- Lorenzi H and Matos FJA (2008) Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. 2ª Ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Ma TH, Xu Z, Xu C, McConnell H, Rabago EV, Arreola GA and Zhang H (1995) The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat Res* 334:185-195.
- Marcano L, Carruyo I, Del Campo A and Montiel X (2004) Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. *Environ Res* 94:221-226.
- Mariz SR, Araújo MST, Cerqueira GS, Araújo WC, Duarte JC, Diniz MFFM and Medeiros IA (2008) Avaliação histopatológica em ratos após tratamento agudo com o extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. *Rev Bras Farmacogn* 18:213-216.
- Mariz SR, Borges ACR, Melo-Diniz, MFF and Medeiros IA (2010) Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão narrativa. *Rev Bras Pl Med* 12:346-357.
- Matos FJA (2004) Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras. Editora UFC, Fortaleza, 448p.
- Mazzeo DEC, Fernandes TCC and Marin-Morales MA (2011) Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. *Chemosphere* 85:13-18.
- Miglietta AL, Appendino GG and Bocca C (2003) Biological properties of jatrophone polyesters, new microtubule-interacting agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 51:67-74.
- Miyata S, Wang LY, Yoshida C and Kitanaka S (2006) Inhibition of cellular proliferation by diterpenes, topoisomerase II inhibitor. *Bioorg Med Chem* 14:2048-2051.
- Nazeema TH and Girija S (2013) Characterisation of the active antiproliferative principles of *Jatropha curcus* and *Jatropha gossypifolia* on Hela cell lines. *Int J Pharm Pharm Sci* 5:346-355.
- Neu R (1956) A new reagent for differentiating and determining flavones of paper chromatograms. *Naturwissenschaften* 43:82.
- Nunes LG, Gontijo DC, Souza CJA, Fietto LG, Carvalho AF and Leite JPV (2012) The mutagenic, DNA-damaging and antioxidative properties of bark and leaf extracts from *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum. *Environ Toxicol Pharmacol* 3:297-303.
- Nwokocha A, Blessing IO, Agbagwa and Okoli BE (2011) Comparative phytochemical screening of *Jatropha* L. species in the Niger Delta. *Res J Phytochem* 1:1-8.
- Odeigah PGC, Nurudeen O and Amund OO (1997) Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. *Hereditas* 126:161-167.
- Oduola T, Avwioro OG and Ayanniyi TB (2005) Suitability of the leaf extract of *Jatropha gossypifolia* as an anticoagulant for biochemical and haematological analyses. *Afr J Biotechnol* 4:679-681.
- Oduola T, Popoola GB, Avwioro OG, Oduola TA, Ademosun AA and Lawal MO (2007) Use of *Jatropha gossypifolia* latex as a haemostatic agent: how safe is it? *J Med Plants Res* 1:14-17.
- Oliveira FCS, Barros RFM and Neto MJM (2010) Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. *Rev Bras Pl Med* 12:282-301.
- Oliveira LI, Jabour FF, Nogueira VA and Yamasaki EM (2008) Intoxicação experimental com as folhas de *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) em ovinos. *Pesq Vet Bras* 28:275-278.
- Ouedraogo M, Baudoux T, Stévigny C, Nortierc J, Colet JM, Efferthe T, Qu F, Zhoug J, Chan K, Shaw D, *et al.* (2012) Review of current and “omics” methods for assessing

- the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. *J Ethnopharmacol* 140:492– 512
- Paes AMA, Camara AL, Freire SMF and Borges MOR (2012) Relaxant effect of *Jatropha gossypifolia* L. on uterine smooth muscle. *International Journal of phytomedicine* 4:310-313.
- Pertino M, Schmeda-Hirschmann G, Rodriguez JA and Theoduloz C (2007) Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug “yagua rova” (*Jatropha isabelli*). *J Ethnopharmacol* 111:553-559.
- Pešić M, Banković J, Aljancić IS, Todorović NM, Jadranin M, Vajs VE, Tešević VV, Vuc'ković I, Momč'ilović M, Marković ID, *et al.* (2011) New anti-cancer characteristics of jatrophone diterpenes from *Euphorbia dendroides*. *Food Chem Toxicol* 49:3165-3173.
- Pratap B and Singh A (2013) Piscicidal and anti AChE activity of medicinal plant *Jatropha gossypifolia* (Family-Euphorbiaceae). *World J Fish Marine Sci* 5:367-372.
- Punjaji SA (2012) Traditional oral healthcare practices in pathardi areas of Ahmednagar district, Maharashtra, India. *Environ Pharmacol Life Sci* 1:84-88.
- Rank J and Nielsen MH (1994) Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutat Res* 312:17-24.
- Ribeiro LR (2003) Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo, in: L.R. Ribeiro, D.M. Salvadori, E.K. Marques (Eds.), *Mutagênese Ambiental*, Canoas, Ulbra, 201-219.
- Roberts EAH, Cartwright RA and Oldschool M (1957) Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. *J Sci Food Agric* 8:72-80.
- Sabandar CW, Ahmat N, Jaafar FM and Sahidin I (2013) Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. *Phytochemistry* 85:7-29.
- Sahidin A, Muhammad T and Marianti M (2011) Terpenoids from the stem bark of *Jatropha* plants and their biological activities. *Makara Sains* 15:106-110.
- Sánchez-Burgos JA, Ramirez-Mares MV, Larrosa MM, Gallegos-Infante JA, Gonzalez-Laredo RF, Medina-Torres L and Rocha-Guzman NE (2013) Antioxidant, antimicrobial, antitopoisomerase and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species. *Ind Crop Prod* 42:57-62.
- Santos MFS, Czczko NG, Nassif PAN, Ribas-Filho JM, Alencar BLF, Malafaia O, Ribas CAPM, Trautwein VM, Henriques GS, Maia JMA, *et al.* (2006) Avaliação do uso do extrato bruto de *jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Acta Cir Bras* 21:2-7.
- Seth R and Sarin R (2010) Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Jatropha gossypifolia* L. *Arch Appl Sci Res* 2:285-291.
- Sheremet YA, Emets AI, Azmib A, Vissenberg K, Verbelen JP and Blume YB (2012) Effect of serine/threonine protein kinases and protein phosphatases inhibitors on mitosis progression in a synchronized tobacco BY-2 culture. *Cytol Genet* 46:89-95.
- Sheremet YA, Yemets AI, Vissenberg K, Verbelen JP and Blume YB (2010) Effects of inhibitors of serine/threonine protein kinases on *Arabidopsis thaliana* root morphology and microtubule organization in its cells. *Cell Tissue Biol* 4: 399-409.
- Silva AM, Brum RL and Calixto JB (1995) The relaxant action of jatrophone in rat portal vein. A comparison with protein kinase C inhibitors. *Life Sci* 57:863-871.
- Silva FAS and Azevedo CAV (2002) Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. Campina Grande 4:71-78.

- Singh D and Singh A (2005) The toxicity of four native Indian plants effect on AChE and acid/alkaline phosphatase level in fish *Channa marulius*. Chemosphere 60:135-140.
- Singh P and Singh A (2012) Acute toxic effects of medicinal plant *Jatropha gossypifolia* on non- target fish and mice. Wudpecker J Agric Res 1:433-438.
- Stiasny E and Wilkinson CD (1912) Qualitative Reactions of Vegetable Tannins. Collegium, 483-499.
- Valencia A, Frérot B, Guénego H, Múnera DF, Sá MFGD and Calatayud PA (2006) Effect of *Jatropha gossypifolia* leaf extracts on three lepidoptera species. Revista Colombiana de Entomología 32:45-48.
- Wagner H and Bladt S (1996) Plant Drug Analysis - A thin layer chromatography atlas. 2 ed. Berlim: Spinger-Verlag.
- Wink M (2012) Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. Molecules 17:12771-12791.
- Zabka A, Polit JT, Bernasinska J and Maszewski J (2013) DNA topoisomerase II-dependent control of the cell cycle progression in root meristems of *Allium cepa*. Cell Biol Int 1-13.
- Zheng MS, Lee YK, Li Y, Hwangbo K, Lee CS, Kim JR, Lee SKS, Chang HW and Son JK (2010) Inhibition of DNA Topoisomerases I and II and Cytotoxicity of Compounds from *Ulmus davidiana* var. *japonica*. Arch Pharm Res 33:1307-1315.

6. DISCUSSÃO GERAL

O látex e as folhas de *J. gossypifolia* apresentam várias finalidades medicinais, entretanto diferentes fitoquímicos, principalmente os peptídeos cíclicos no látex e os terpenos nas folhas podem estar associados com o potencial toxicológico em animais (MARIZ et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008; SINGH; SINGH, 2012; APU et al., 2013a; PRATAP; SINGH, 2013). No presente estudo foi utilizado o sistema-teste *A. cepa* para avaliar os efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do látex e dos extratos (EE e EA) foliares de *J. gossypifolia*. As concentrações utilizadas para o látex e para os extratos foliares foram selecionadas a partir de atividades antimicrobianas (KUMAR et al., 2006; GAIKWAD et al., 2012; PATIL et al., 2012) e tóxicas em *Artemia salina* e em peixes (SINGH; SINGH, 2012; APU et al., 2013a; PRATAP; SINGH, 2013).

A redução significativa do crescimento médio da raiz (toxicidade) e do índice mitótico (citotoxicidade) foi evidenciada em células de *A. cepa* com o látex e com os extratos (EE e EA) foliares de *J. gossypifolia*. Estes efeitos provocados pelo látex podem ser resultantes da atuação dos peptídeos cíclicos (PCi), como ciclogossines A (HORSTEN et al., 1996) e B (AUVIN-GUETTE et al., 1997), terpenos (PATIL et al., 2012) e alcaloides que têm atividades citotóxicas (SABANDAR et al., 2013).

Em relação aos extratos foliares, os efeitos citados podem ser atribuídos aos diferentes terpenos, principalmente, aos diterpenos no EE, que possuem atividade citotóxica (SAHIDIN et al., 2011), são lipofílicos (WINK, 2012) e podem estar associados com a redução na concentração de cálcio, inibindo a proteína quinase C (PKC) (SILVA et al., 1995; PAES et al., 2012) e diminuindo a proliferação celular (ALBERTS et al., 2010). Os flavonoides observados no EE também podem estar associados a esses efeitos adversos.

No EA, esses parâmetros avaliados em *A. cepa* podem ser resultantes do sinergismo de flavonoides e/ou saponinas,

Além disso, os diferentes fitoquímicos (diterpenos, triterpenos, flavonoides e saponinas) identificados nos extratos foliares também podem ter reduzido o IM por atuarem, possivelmente, como inibidores da Topoisomerase II (Topo II) (CORTÉS et al., 2003; ZABKA et al., 2013) como os diterpenos (MIYATA et al., 2006), triterpenos, flavonoides, ligninas (ZHENG et al., 2010) e saponinas (SÁNCHEZ-BURGOS et al., 2013). A provável atuação inibitória da Topo II pelos diferentes fitoquímicos dos extratos pode ter induzido alterações na condensação (aderências cromossômicas) e, conseqüentemente, na segregação mitótica (perdas cromossômicas).

A maioria das alterações cromossômicas, como aderências cromossômicas e C-metáfases confirma a interferência de fitoquímicos do látex e dos extratos (EE e EA) foliares e de *J. gossypifolia* na montagem, estabilização e ou inativação das fibras do fuso, caracterizando uma ação aneugênica. Atividades aneugênicas em metáfases podem gerar outros tipos de alterações celulares como anáfases multipolares, núcleos lobulados e células poliploides (FERNANDES et al., 2009). No entanto, estas alterações não foram significativas para o látex e para os extratos foliares, o que indicam que as C-metáfases não contribuíram para alterações posteriores, e sugerem um mecanismo reversível das mesmas (ODEGAH et al., 1997).

Nos resultados apresentados, os fragmentos cromossômicos não foram significativos em nenhuma das concentrações testadas do látex, EE e do EA. A formação de pontes, por sua vez, foi significativa para a maioria das concentrações do látex e do EA e não significativa para todas as concentrações do EE, com exceção de 10 mg/mL. Desta forma, a ação clastogênica encontrada no látex, provavelmente, pode estar associada principalmente com os peptídeos cíclicos. Enquanto, no EA esta ação parece ter sido

resultante da ação sinérgica de flavonoides e/ou saponinas. Por outro lado, os terpenos não parecem ter esse tipo de ação. Apenas a concentração de 10 mg/mL do EE mostrou pontes cromossômicas significativas, que podem ser resultado da ação de flavonoides (na ausência de saponinas) ou de terpenos, apenas em altas concentrações em qualquer dos casos.

Os MN não foram significativos no látex, enquanto no EE (1 e 10 mg/mL), os MN, possivelmente, foram originados de uma ação aneugênica envolvendo um ou mais cromossomos inteiros não incorporados no núcleo principal durante o ciclo celular (FENECH et al., 2011) ou a partir de brotos nucleares (FERNANDES et al., 2007). Isto reforça a associação dos terpenos e/ ou flavonoides ao potencial aneugênico. Os resultados apresentados também mostraram frequências significativas de MN nas células F₁, somente nos extratos foliares, indicando uma atividade mutagênica em nível cromossômico (estrutural ou numérico).

Embora *J. gossypifolia* seja considerada uma importante planta com potencial para a geração de produtos farmacológicos e/ou biotecnológicos (FÉLIX-SILVA et al., 2014), em geral, os testes realizados indicaram toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em nível cromossômico do látex e dos extratos foliares (EE e EA) de *J. gossypifolia*. Desta forma, como *A. cepa* apresenta boa correlação com testes realizados em mamíferos alertamos para a eventual possibilidade do látex e dos extratos foliares apresentarem potencialidade para causar problemas à saúde humana, mesmo apresentando várias finalidades medicinais.

7. CONCLUSÕES

1. O látex e os extratos foliares (EE e EA) de *J. gossypiiifolia* possuem potencial tóxico, citotóxico e genotóxico, indicando principalmente uma ação aneugênica observada mediante diferentes tipos de alterações cromossômicas (AC), como C-metáfases e aderências cromossômicas.
2. O látex e os extratos foliares apresentam potencial mutagênico em nível cromossômico, indicado pela frequência significativa de alterações clastogênicas, como pontes cromossômicas (nos extratos foliares e no látex) e MN nas células meristemáticas e nas células F₁ (apenas nos extratos foliares).
3. No EE, a aneugenicidade parece ser a principal atividade decorrente provavelmente da ação de terpenos e/ou flavonoides. Por outro lado, no EA, a ação clastogênica parece ser o principal agente causador dos efeitos negativos às células de *A. cepa*, como consequência provavelmente de uma ação sinérgica de flavonoides e/ou saponinas.
4. De forma geral, os testes realizados indicaram toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico em nível cromossômico do látex e dos extratos foliares de *J. gossypiiifolia*. Considerando que os mesmos são utilizados de forma empírica na medicina popular de vários países e que o sistema-teste *A. cepa* apresenta uma boa correlação com testes realizados em mamíferos, alerta-se para a eventual possibilidade do látex e dos extratos foliares terem potencialidade para causar problemas à saúde humana.

REFERÊNCIAS

- AIYELAAGBE, O. O. et al. Cytotoxic activity of crude extracts as well as of pure components from *Jatropha* species, plants used extensively in African traditional medicine. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, p. 1-7, 2011.
- AKINBORO, A. et al. A. Antioxidants in aqueous extract of *Myristica fragrans* (Houtt.) suppress mitosis and cyclophosphamide-induced chromosomal aberrations in *Allium cepa* L. cells. **Biomed and Biotechnol**, v. 12, p. 915-922, 2011.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª Ed. São Paulo: Artes Médicas Sul LTDA, 2010.
- AMOROZO, M. C. M.; GÉLY, A. Uso de plantas medicinais por caboclos do Baixo Amazonas. **Bol Mus Para Emílio Goeldi**, v. 4, p. 47-131, 1988.
- APU, A. S. et al. Assessment of cytotoxic activity of two medicinal plants using Brine Shrimp (*Artemia salina*) as an experimental tool. **IJPSR**, v. 4, p. 1125-1130, 2013a.
- APU, A. S. et al. Study of pharmacological activities of metanol extract of *Jatropha gossypifolia* fruits. **J Basic Clin Pharm**, v. 4, p. 20-24, 2013b.
- ARANGO, D. et al. Apigenin induces DNA damage through the PKC δ -dependent activation of ATM and H2AX causing down-regulation of genes involved in cell cycle control and DNA repair. **Biochem Pharm**, v. 84, p. 1571-1580, 2012.
- ATSAMO, A. D. et al. Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. **J Ethnopharmacol**, v. 134, p. 697-702, 2011.
- AUVIN-GUETTE, C. et al. Cyclogossine B, a cyclic octapeptide from *Jatropha gossypifolia*. **J Nat Prod**, v. 60, p. 1155-1157, 1997.
- AYYANAR, M.; IGNACIMUTHU, S. Diversity, conservation status and medicinal plants of the family Euphorbiaceae in Tirunelveli Hills, Southern India. **J Exp Sci**, v. 1, p. 12-16, 2010.

BAGATINI, D. M.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, p. 444-447, 2007.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sci**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BEYER, D. et al. Microcystin-LR, a protein phosphatase inhibitor, induces alterations in mitotic chromatin and microtubule organization leading to the formation of micronuclei in *Vicia faba*. **Ann Botany**, v. 110, p. 797-808, 2012.

BHAGAT, R. et al. HPTLC analysis and anti-inflammatory activity of *Jatropha gossypifolia* L. root in mice and wistar rats. **IJPR**, v. 3, p. 13-17, 2013.

BINAROVÁ, P. et al. Treatment of *Vicia faba* root tip cells with specific inhibitors to cyclin-dependent kinases leads to abnormal spindle formation. **Plant J**, v. 16, p. 697-707, 1998.

BOTELHO, C. M. et al. Toxicidade do óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas*) em células meristemáticas de *Lactuca sativa*. In: **XI Encontro Latino Americano de Pós-graduação, XV INIC, V INIC Jr.** As contribuições da Ciência para a Sustentabilidade do Planeta. São José dos Campos –SP, 2011.

BRANDÃO, H. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim Nova**, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. **Ministério da saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Departamento de Assistência farmacêutica - Brasília, 60 p. 2006.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722-725, 2008.

CORDEIRO, I.; SECCO, R. ***Jatropha* in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, (2014) (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17581>).

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** New York: Columbia University Press, 1981.

DABUR, R. et al. Antimicrobial activity of some indian medicinal plants. **Afr J Trad**, v. 3, p. 313-318, 2007.

DAS, B. et al. Multifidone: a novel cytotoxic lathyrane-type diterpene having an unusual six-membered a ring from *Jatropha multifida*. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 19, p. 77-79, 2009.

DEHGAN, B. Novel jatrophas for Florida landscapes. **Proc Fla State Hort Soc**, v. 95, p. 277-280, 1982.

DEMISSIE, A. G.; LELE, S. S. Bioactivity-directed Isolation and Identification of novel alkaloid from *Jatropha curcas* (Linn.). **Res J Chem Environ Sci**, v. 1, p. 22-28, 2013.

DEVAPPA, R. K. et al. Potential of using phorbol esters as an insecticide against *Spodoptera frugiperda*. **Ind Crop Prod**, v. 38, p. 50-53, 2012.

DEVAPPA, R. K. MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha* Toxicity- A review. **J Toxicol Environ Health B**, v. 13, p. 476-507, 2010.

DEVAPPA, R. K. MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha* diterpenes: a review. **J Am Oil Chem Soc**, v. 88, p. 301-322, 2011.

DHALE, D. A.; BIRARI, R. Preliminary screening of antimicrobial and phytochemical studies of *Jatropha gossypifolia* L. **Rec Res Sci Tech**, v. 2, p. 24-28, 2010.

FACHINETTO, J. M. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, p. 49-54, 2007.

FALODUN, A. et al. Isolation and characterization of a new anticancer diterpenoid from *Jatropha gossypifolia*. **Pharm Chem J**, v. 45:636-639, 2012.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, p. 125-13, 2011.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pestic Biochem Physiol**, v. 88, p. 252-259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent-Trifluralin herbicide. **Ecotox Environ Safe**, v. 72, p. 1680-1686, 2009.

FILHO, R. B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Quim Nova**, v. 33, p. 229-239, 2010.

FISKESJO, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

GAIKWAD, R. S. et al. *In vitro* antimicrobial activity of crude extracts of *Jatropha* species. **Curr Bot**, v. 3, p. 09-15, 2012.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto, SP: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002.

HORSTEN, S. F. et al. Cyclogossine A: a novel cyclic heptapeptide isolated from the latex of *Jatropha gossypifolia*. **Planta Med**, v. 62, p. 46-50, 1996.

IGBINOSA, O. O.; IGBINOSA, E. O.; AIYEGORO, A. O. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). **Afr J Pharm Pharmacol**, v. 3, p. 58-62, 2009.

INBANESON, S. J.; RAVIKUMAR, S.; SUGANTHI, P. In vitro antiplasmodial effect of ethanolic extracts of coastal medicinal plants along Palk Strait against *Plasmodium falciparum*. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 2, p. 364-367, 2012.

INSANU, M.; ANGGADIREDJA, J.; KAYSER, O. Curcacycline A and B - new pharmacological insights to an old drug. **IJARNP**, v. 5, p. 26-34, 2012.

JAIN, S.; CHOUDHARY, G. P.; JAINA, D. K. *In vitro* free radical scavenging activity of *Jatropha gossypifolia* L. containing phenolic compounds. **J Med Plants Res**, v. 7, p. 1424-1428, 2013.

JANSEN, O. et al. Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties. **J Ethnopharmacol**, v. 130, p. 143-150, 2010.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 7 ed. São Paulo: Nacional, 1985.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 253-265, 2004.

JORDAN, S. A.; CUNNINGHAM, D. G.; MARLES, R. J. Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicol Appl Pharm**, v. 243, p. 198-216, 2010.

KANTH, B. S. et al. New bioactive macrocyclic diterpenoids from *Jatropha multifida*. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 21, p. 6808-6810, 2011.

KAWANGA, V. *Jatropha gossypifolia* L. In: Schmelzer, G.H. & Gurib-Fakim, A. (Editors). Prota 11(1): **Medicinal plants/Plantes médicinales 1**. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen, Netherlands, 2007.

KOBAYASHI, J. et al. Celogentins A-C, new antimitotic bicyclic peptides from the seeds of *Celosia argentea*. **J Org Chem**, v. 66, p. 6626-6633, 2001.

KUMAR, A.; SINGH, N. *Jatropha gossypifolia* L. a potential genetic resource for herbal dye. **Genet Resour Crop Evol**, v. 59, p. 949-954, 2012.

KUMAR, V. P. et al. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v. 107, p. 182-188, 2006.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutat Res**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutat Res**, v. 7934, p. 1-11, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2ª Ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2008.

MA, B. et al. Total synthesis of the antimitotic bicyclic peptide celogentin C. **J Am Chem Soc**, v. 132, p. 1159-1171, 2010.

MA, T. H. et al. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutat Res**, v. 334, p. 185-195, 1995.

MARIZ, S. R. et al. Avaliação histopatológica em ratos após tratamento agudo com o extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, p. 213-216, 2008.

MARIZ, S. R. et al. Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão narrativa. **Rev Bras Pl Med**, v. 12, p. 346-357, 2010.

MARIZ, S. R. et al. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, p. 372-378, 2006.

MATOS, F. J. A. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. Editora UFC, Fortaleza, 448p, 2004.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, p. 13-18, 2011.

MIGLIETTA, A. L.; APPENDINO, G. G.; BOCCA, C. Biological properties of jatrophane polyesters, new microtubule-interacting agents. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 51, p. 67-74, 2003.

MONGKOLVISUT, W. et al. Integerrimides A and B, cyclic heptapeptides from the latex of *Jatropha integerrima*. **J Nat Prod**, v. 69, p. 1435-1441, 2006.

NARAYANASWAMY, N.; BALAKRISHNAN, K. P. Evaluation of some Medicinal Plants for their Antioxidant Properties. **Int J PharmTech Res**, v. 3, p. 381-385, 2011.

NAZEEMA, T. H.; GIRIJA, S. Comparative phytochemical investigations and in-vitro pharmacological studies of two medicinal species of *Jatropha* from South India. **Euro J Exp Bio**, v. 2, p. 421-426, 2012.

NAZEEMA, T. H. GIRIJA, S. Characterisation of the active antiproliferative principles of *Jatropha curcus* and *Jatropha gossypifolia* on Hela cell lines. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 5, p. 346-355, 2013.

NWOKOCHA, A. et al. Comparative phytochemical screening of *Jatropha* L. species in the Niger Delta. **Res J Phytochem**, v. 1, p. 1-8, 2011.

ODUOLA, T.; AVWIORO, O. G.; AYANNIYI, T. B. Suitability of the leaf extract of *Jatropha gossypifolia* as an anticoagulant for biochemical and haematological analyses. **Afr J Biotechnol**, v. 4, p. 679-681, 2005.

ODUOLA, T. et al. Use of *Jatropha gossypifolia* latex as a haemostatic agent: how safe is it? **J Med Plant Res**, v. 1, p. 14-17, 2007.

OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; NETO, M. J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Rev Bras Pl Med**, v. 12, p. 282-301, 2010.

OLIVEIRA, J. S. et al. Characteristics and composition of *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha curcas* L. oils and application for biodiesel production. **Biomass Bioenerg**, v. 33, p. 449-453, 2009.

OLIVEIRA, L. I. et al. Intoxicação experimental com as folhas de *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) em ovinos. **Pesq Vet Bras**, v. 28, p. 275-278, 2008.

OLOWOKUDEJO, J. D. Comparative epidermal morphology of West African species of *Jatropha* L. (Euphorbiaceae). **Bot J Linn Soc**, v. 111, p. 39-54, 1993.

OOTANI, M. A. et al. Use of essential oils in agriculture. **J Biotec Biodivers**, v. 4, p. 162-174, 2013.

OSKOEIAN, E.; ABDULLAH, N.; AHMAD, S. Phorbol esters from *Jatropha* meal triggered apoptosis, activated PKC- δ , Caspase-3 proteins and down-regulated the proto-oncogenes in MCF-7 and HeLa cancer cell lines. **Molecules**, v. 17, p. 10816-10830, 2012a.

OSKOEIAN, E.; ABDULLAH, N.; AHMAD, S. Phorbol esters isolated from *Jatropha* meal induced apoptosis-mediated inhibition in proliferation of Chang and Vero cell lines. **Int J Mol Sci**, v. 13, p. 13816-13829, 2012b.

OUEDRAOGO, M. et al. Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. **J Ethnopharmacol**, v. 140, p. 492-512, 2012.

- PAES, A. M. A. et al. Relaxant effect of *Jatropha gossypifolia* L. on uterine smooth muscle. **International Journal of phytomedicine**, v. 4, p. 310-313, 2012.
- PAWLOWSKI, Â. et al. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. **S Afr J Bot**, v. 80, p. 96-103, 2012.
- PERTINO, M. et al. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug “yagua rova” (*Jatropha isabelli*). **J Ethnopharmacol**, v. 111, p. 553-559, 2007.
- PEŠIĆ, M. et al. New anti-cancer characteristics of jatrophone diterpenes from *Euphorbia dendroides*. **Food Chem Toxicol**, v. 49, p. 3165-3173, 2011.
- PING, K. Y. et al. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* assay. **Molecules**, v. 17, p. 7782-7791, 2012.
- PRATAP, B.; SINGH, A. Piscicidal and anti AChE activity of medicinal plant *Jatropha gossypifolia* (Family-Euphorbiaceae). **World J Fish Marine Sci**, v. 5, p. 367-372, 2013.
- PUNJAJI, S. A. Traditional oral healthcare practices in pathardi areas of Ahmednagar district, Maharashtra, India. **Environ Pharmacol Life Sci**, v. 1, p. 84-88, 2012.
- PUROHIT, M. C.; REENA, P. Evaluation of antimicrobial and anti-inflammatory activities of bark of *Jatropha gossypifolia*. **World J Sci Technol**, v. 10, p. 1-5, 2011.
- RANK, J.; NIELSEN, M. H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutat Res**, v. 312, p. 17-24, 1994.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 830 p., 2007.
- ROCHA, F. A. G.; DANTAS, L. I. S. Atividade antimicrobiana *in vitro* do látex do aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.), pinhão bravo (*Jatropha mollissima* L.) e pinhão roxo (*Jatropha gossypifolia* L.) sobre microrganismos patogênicos. **Holos**, v. 4, p. 3-11, 2009.
- RODRIGUES, A. G.; SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. **Informe Agropecuário**, v. 31, p. 7-12, 2010.

SABANDAR, C. W. et al. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. **Phytochemistry**, v. 85, p. 7-29, 2013.

SAHIDIN, A. et al. Terpenoids from the stem bark of *Jatropha* plants and their biological activities. **Makara Sains**, v. 15, p. 106-110, 2011.

SAKAI, R. et al. Structure and activity relationships of the didemnins1,2. **J Med Chem**, v. 39, p. 2819-2834, 1996.

SANTOS, M. F. S. et al. Avaliação do uso do extrato bruto de *jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 21, p. 2-7, 2006.

SASABE, M. et al. Phosphorylation of a mitotic kinesin-like protein and a MAPKKK by cyclin-dependent kinases (CDKs) is involved in the transition to cytokinesis in plants. **PNAS**, v. 108, p. 17844-17849, 2011.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RAZMILIC, I. Antiprotozoal activity of Jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and Jatrophone from *Jatropha isabellii*. **Phytother Res**, v. 10, p. 375-378, 1996.

SCHVARTSMAN, S. **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. 2^a edição. Sarvier, São Paulo, 288p., 1992.

SERVIN, S. C. N. et al. Ação do extrato de *Jatropha gossypifolia* L. (pião roxo) na cicatrização de anastomose colônica: estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 21, p. 89-96, 2006.

SETH, R.; SARIN, R. Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Jatropha gossypifolia* L. **Arch Appl Sci Res**, v. 2, p. 285-291, 2010.

SHAHWAR, D. et al. Antioxidant activities of the selected plants from the family Euphorbiaceae, Lauraceae, Malvaceae and Balsaminaceae. **Afr J Biotechnol**, v. 9, p. 1086-1096, 2010.

SHEREMET, Y. A. et al. Effect of serine/threonine protein kinases and protein phosphatases inhibitors on mitosis progression in a synchronized tobacco BY-2 culture. **Cytol Genet**, v. 46, p. 89-95, 2012.

- SHEREMET, Y. A. et al. Effects of inhibitors of serine/threonine protein kinases on *Arabidopsis thaliana* root morphology and microtubule organization in its cells. **Cell Tissue Biol**, v. 4, p. 399-409, 2010.
- SILVA, A. M.; BRUM, R. L.; CALIXTO, J. B. The relaxant action of jatrophone in rat portal vein. A comparison with protein kinase C inhibitors. **Life Sci**, v. 57, p. 863-871, 1995.
- SILVESTRI, R. New prospects for vinblastine analogues as anticancer agents. **J Med Chem**, v. 56, p. 625-627, 2013.
- SINGH, D.; SINGH, A. The toxicity of four native Indian plants effect on AChE and acid/alkaline phosphatase level in fish *Channa marulius*. **Chemosphere**, v. 60, p. 135-140, 2005.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG II. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2006.
- TANK, J. G.; THAKER, V. S. Cyclin dependent kinases and their role in regulation of plant cell cycle. **Biol Plantarum**, v. 55, p. 201-212, 2011.
- THAKUR, H. A.; PATIL, D. A. The family Euphorbiaceae: anatomical conspectus. **World J Sci Technol**, v. 2, p. 51-57, 2012.
- VALENCIA, A. et al. Effect of *Jatropha gossypifolia* leaf extracts on three lepidoptera species. **Rev Colomb Entomol**, v. 32, p. 45-48, 2006.
- VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na região centro-norte do estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, p. 308-313, 2008.
- VESELY, J. et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. **Eur J Biochem**, v. 224, p. 771-786, 1994.
- VEYLDER, L. D.; BEECKMAN, T.; INZÉ, D. The ins and outs of the plant cell cycle. **Nat Rev Mol Cell Bio**, v. 8, p. 655-665, 2007.

WEBSTER, G. L. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Ann Missouri Bot Gard**, v. 81, p. 33-144, 1994.

WINK, M. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, v. 17, p. 12771-12791, 2012.

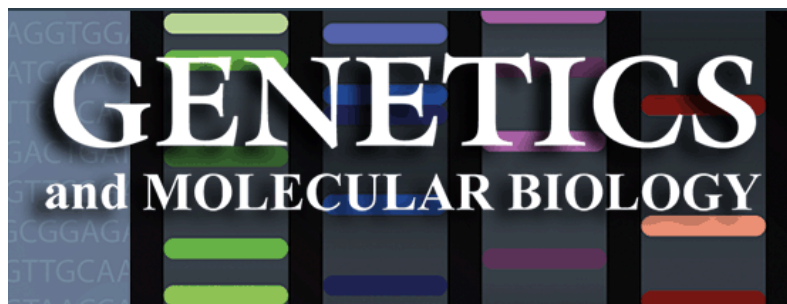
WU, L. et al. Study on the spatial structure of annomuricatin A, a cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. **J Mol Struct**, v. 827, p. 145-148, 2007.

YAMAMOTO, K. I.; KIKUCHI, Y. A. Comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. **Mutat Res**, v. 71, p. 127-31, 1980.

ZHANG, X. P. et al. Chemical constituents of the plants from genus *Jatropha*. **Chem Biodivers**, v. 6, p. 2166-2183, 2009.

ANEXO

INSTRUÇÕES PARA AUTORES DA REVISTA GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY



SUBMISSION OF PAPERS

There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage <http://www.gmb.org.br>.

1. Manuscripts must be submitted through our online submission platform hosted at:
<http://mc.manuscriptcentral.com/gmb>

The cover letter should be addressed to: Carlos C. F. Menck, Editor-in-Chief, Genetics and Molecular Biology.

2. For submission the following instructions must be observed:

- The manuscript must be submitted by the Corresponding Author. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for any payment that may incur during the editorial process.
- Entering the following metadata is required: (i) the manuscript title, (ii) a short running title (max. 35 characters), (iii) the Abstract, and (iv) up to five keywords. All these items must be exactly the same as those figuring in the first two pages of the manuscript file. Furthermore, a cover letter addressed to the Editor is required. It must be edited by the corresponding author inserted within the reserved data field.
- Statements are required informing that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. Furthermore, possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must also be disclosed.
- The names of all co-authors, including institutional affiliations and e-mail addresses must be entered, as contact information for the Editorial Office.
- In the referee suggestions field, up to five reviewer names can be entered by the author(s); valid e-mail contact addresses for these are required, in case they are selected by the editor. These suggestions can be made separately as preferred and not-preferred reviewer(s).
- Files must be uploaded separately and identified according to file types. The main text file must include references and, if applicable, figure legends, which must be typed on a separate page following the References and Internet Resources sections. Each table, figure and element containing supplementary material must be saved and uploaded in a separate file. Formats for text and tables are Word or RTF in

Windows platform. Figures should be in TIFF or JPEG formats (see detailed instructions in 3.1.h).

- Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed. Special attention should be given to the structuring of the manuscript and correct language usage. These are important factors in the smooth running of the editorial and peer-review process, and can result in faster publication.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page. The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of up to 35 characters (including spaces); up to five key words; the corresponding author's name, full postal, and email address.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately following the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Statistical analyses should be presented as complete as possible, i.e. not only *P*-values should be shown, but also all other test variables required for full appreciation of the results by the reviewers and

readers. Comments on relevance of results are appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) **The References Section:** References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by *et al.* Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>). Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. “Personal communication” refers to information obtained from individuals other than the authors of the manuscript being submitted; “unpublished data” refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript under consideration. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

Sample journal article citation: Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angela* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386. Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation: Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation: Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample electronic article citation: Gotzek D, Ross KG (2009) *Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants*. *PLoS One* 4:e7713.

f) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, as well as software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated. **Sample Internet resource citation:** Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2009) LEM Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm (September 4, 2009).

g) **Tables:** must be in Word format prepared with the table tool (do not use space bar or tabulator). A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered

consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript letters. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

h) **Figures** must be numbered consecutively using Arabic numerals. Images should be in TIFF or JPEG format. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. These resolutions refer to the output size of the file, that is the size in which it will appear printed in the journal; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted. Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Figure legends must be included at the end of the main text file and should be typed on a new page.

i) **Nomenclature:** Taxonomic names should be in accordance with current international standards. For rules concerning gene names and gene symbols, please see separate Instruction form.

j) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will inadvertently delay publication.

k) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) **Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a statement in the text that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must be uploaded during manuscript submission.

m) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. At publication, this material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement:

Supplementary material - the following online material is available for this article:

- *Table S1 – < short title >*
- *Figure S1 – < short title >*

This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>

3.2 Short Communications

Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications;

- should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited;
- should include an Abstract;
- but no further subdivision, with introduction, material and methods, results and discussion; all in a single section and without headers.
- up to four items (tables and/or figures) may be submitted;

Note: The title page, abstract and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see instructions in item 3.1.m.

3.3 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles

Review Articles are welcome. The Editor must be contacted prior to submission. Please, provide an Abstract and a list of your recent publications in the area.

3.5 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories

These are accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Articles accepted for publication

Once an article is accepted, the Editorial Office will send it to copy editor for language and technical corrections. If major corrections were proposed, the manuscript with the highlighted corrections will be returned to the corresponding author for approval. The final version approved by the authors must be free of any text/correction markings when returned to the Editorial Office. After typesetting, page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from typesetting errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval. Together with the proofs, a form of consent to publish and transfer of copyright is sent to the corresponding other. The latter will have sign this form, also on behalf of any co-authors, and send it by fax to the Editorial Office.

5. Reprints

Reprints are free of charge and will be provided as a pdf-file.