



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE

MONIQUE DE SOUSA PAIXÃO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA
ENTRECASCA DE *Croton argyrophyllus* Kunth**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2018

MONIQUE DE SOUSA PAIXÃO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA
ENTRECASCA DE *Croton argyrophyllus* Kunth**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde e Ambiente.

Orientadora: Prof^a Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2018

Catálogo na Fonte
Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Fernanda Bernardo Ferreira, CRB4-2165

- P142a Paixão, Monique de Sousa.
Avaliação da Toxicidade do extrato Hidroalcoólico da entrecasca de *Croton argyrophyllus* Kunth / Monique de Sousa Paixão. - Vitória de Santo Antão, 2018.
66 folhas; il.: color.
- Orientadora: Roberta Jeane Bezerra Jorge.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV,
Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2018.
Inclui referências e anexos.
1. Plantas medicinais. 2. Toxicidade aguda. 3. Citotoxicidade. 4.
Genotoxicidade. I. Jorge, Roberta Jeane Bezerra (Orientadora). II. Título.
- 633.88 CDD (23.ed.) **BIBCAV/UFPE-231/2018**

MONIQUE DE SOUSA PAIXÃO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA
ENTREGASCA DE *Croton argyrophyllus* Kunth

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde Humana e Meio Ambiente.

Aprovada em: 27/04/2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^o. Dr. René Duarte Martins
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Dr.^a Vitorina Nerivânia Covello Rehn
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Dr.^a Alice Valença Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a Zeneide Assis e
Filipe Lemos, que são meu porto seguro,
por todo incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu agradecimento por fazer-me recebedora de graças, por me sustentar em todos os momentos, me proteger em todas as viagens, por enxugar minhas lágrimas, tanto de angústia quanto de felicidade, além de proporcionar-me tantos sorrisos.

Aos meus pais, Marcos e Zeneide, por sempre acreditarem em meu potencial e cuidarem de mim e, em extensão, aos meus avós, José Paixão (in memoriam), Maria das Mercês (in memoriam), José Assis (in memoriam) e Zenite, por serem minha inspiração. E a minha irmã e cunhado, Morgana e Paulo, por seus incentivo e torcida.

A Filipe Lemos, por sua presença, apoio e amor, me mostrando que um sonho sonhado sozinho pode ser apenas um sonho, mas um sonho sonhado junto torna-se realidade mais facilmente. Que esse seja apenas o primeiro de tantos objetivos de vida a alcançarmos.

Agradeço também a ajuda prestimosa de minha orientadora, Dr^a Roberta Jeane, pela paciência, ensinamentos e acessibilidade com os quais sempre me acolheu em prol da pesquisa e do desenvolvimento científico em nossa área.

A toda família Sousa e Paixão e todos amigos que colaboraram com conselhos para que eu seguisse em frente, transformando esse desejo em realidade. Ilka e Davi por tantas acolhidas carinhosas. Fabiana Florêncio, Clarissa Costa, Laryssa Grazielle pela amizade de anos. Emanuel Ribeiro e toda equipe Singulus pela parceria e compreensão. Alexandre Morais, Sr. Afonso Macário e toda sua equipe pelo auxílio e amizade.

Ao professor Dr. René Duarte, que inicialmente me auxiliou no mundo acadêmico, com sua alegria e receptividade. Em extensão ao professor Dr. Rafael Ximenes, bem como aos professores Dr. Cristiano Chagas e Dr. Francisco Amanajás, por suas respectivas e importantes parcerias.

A Maria de Fátima Rodrigues, Wellinton Silva, Raudney e demais amigos do Laboratório de Antibióticos da UFPE. Aos parceiros do grupo GENOTOX: Meykson Alexandre, Ketsia Marinho, Ilka Dayane, Maria Eduarda Gomes e Luciana Rodrigues. Também agradeço a Danielle Feijó e Tamires, bem como ao veterinário Vinícius do biotério do CAV.

Aos amigos da melhor turma de mestrado, a turma 2016.1, todos os professores e demais colaboradores que compõem o quadro de profissionais do PPGSHMA que contribuíram para minha formação pessoal e profissional, especialmente à minha amiga Marcela Albuquerque, em extensão, a Marília e Patrícia por tantos momentos e pela amizade além do laboratório.

A UFPE/CAV por sua infraestrutura e recursos para o desenvolvimento da pesquisa e a CAPES pelos recursos ofertados.

E por fim, aos camundongos que foram fundamentais para os experimentos realizados e resultados obtidos.

RESUMO

O uso de plantas é uma antiga forma de prática medicinal. O *Croton argyrophyllus* é uma espécie da família Euphorbiaceae, pertencente ao gênero *Croton*. A referida espécie é utilizada para tratar doenças cardíacas, influenza e por seu efeito calmante, mas ainda há poucos registros na literatura sobre suas características que sirvam como parâmetro de segurança quanto à sua exposição e é conhecida popularmente como marmeleiro branco. Avaliar a toxicidade do extrato hidroalcoólico da entrecasca de *Croton argyrophyllus* em modelos experimentais. Foram realizados os testes de Toxicidade Aguda em dose única, testes de atividade genotóxica e mutagênica (ensaio cometa e teste do micronúcleo) e ensaios citotóxicos com análises *in vitro*. A toxicidade aguda em dose única foi avaliada de acordo com a diretriz 423 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2001). O ensaio cometa verificou em microscópio se houve dano ao DNA por meio da análise de intensidade da cauda de 100 nucleóides por animal, classificados em uma de cinco classes e verificou-se também a frequência de danos (FD%) através do cálculo da relação entre algum dano com o total de nucleóides contados. O teste de micronúcleo ocorreu através da contagem da sua frequência, que pode ser fator indicador de alterações cromossômicas. Os ensaios citotóxicos foram realizados em linhagens J774 (macrófagos), HEK (embrionária renal) e células tumorais S-180 (Sarcoma-180). No ensaio de toxicidade aguda ocorreram algumas alterações comportamentais nos animais, contudo não houve morte nos 14 dias de observações e nem variação significativa de peso entre o grupo tratado e grupo controle ($p=0.14$). O extrato foi avaliado como tendo baixa toxicidade. A presença de genotoxicidade na dose 150mg/kg de extrato e a sua ausência na dose 300mg/kg foram inversas aos resultados mutagênicos e pode ser justificada como um possível efeito de hormese. No modelo citotóxico entre células HEK-293 e extrato, foi potencializada a viabilidade celular. O estudo citotóxico entre células J774 e o extrato não demonstrou significância estatística. O resultado encontrado no ensaio citotóxico entre células do tipo Sarcoma-180 em diferentes doses do extrato aponta inibição da viabilidade celular do sarcoma no tempo de 24h. Diante dos achados deste estudo, podemos apontar o efeito antitumoral *in vitro* do extrato e sua baixa toxicidade, fator que não implica limitação para a continuação de ensaios pré-clínicos.

Palavras-chave: Toxicidade aguda. Citotoxicidade. Genotoxicidade.

ABSTRACT

The use of plants is an ancient form of medicinal practice. The *Croton argyrophyllus* is a species of the Euphorbiaceae family, belonging to the genus *Croton*. This species is used to treat heart disease, influenza and its calming effect, but there are still few reports in the literature about its characteristics that serve as a safety parameter for its exposure and is popularly known as white quince. To evaluate the toxicity of the hydroalcoholic extract of *Croton argyrophyllus* in the experimental models. Single-dose acute toxicity tests, genotoxic and mutagenic activity tests (comet assay and micronucleus test) and cytotoxic assays were performed with in vitro assays. Acute single-dose toxicity was assessed according to the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 2001) guideline 423. The comet assay microscopically checked for damage to the DNA by tail intensity analysis of 100 nucleoids per animal, classified into one of five classes and the frequency of damage (FD%) was also verified by calculating the relationship between some damage with the total number of TML óides counted. The micronucleus test occurred by counting its frequency, which may be a factor indicative of chromosomal changes. Cytotoxic assays were performed on J774 (macrophages), HEK (renal embryonic) and S-180 (Sarcoma-180) tumor cells. In the acute toxicity test, there were some behavioral changes in the animals; however, there was no death in the 14 days of observations and no significant variation in weight between the treated group and the control group ($p = 0.14$). The extract was assessed as having low toxicity. The presence of genotoxicity at the dose 150mg / kg extract and its absence at the 300mg / kg dose were inversely related to the mutagenic results and may be justified as a possible hormone effect. In the cytotoxic model between HEK-293 cells and extract, cell viability was potentiated. The cytotoxic study between J774 cells and the extract did not show statistical significance. The result found in the cytotoxic assay between Sarcoma-180 cells at different doses of the extract indicates inhibition of the cellular viability of the sarcoma in the time of 24h. In view of the findings of this study, we could point out the in vitro antitumor effect of the extract and its low toxicity, a factor that does not imply limitation for the continuation of preclinical tests.

Keywords: Acute toxicity. Cytotoxicity. Genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de algumas substâncias isoladas de espécies de Croton	24
Figura 2 - Croton argyrophyllus Kunth.....	34
Figura 3 - Rotaevaporador	35
Figura 4 - Liofilização do extrato de Croton argyrophyllus	35
Figura 5 - Relação de danos ao DNA com scores atribuídos para o ensaio cometa	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comparação entre avaliação ponderal de grupo controle e grupo tratado com extrato de <i>Croton argyrophyllus</i> 2000mg/Kg durante 14 dias.....	44
Gráfico 2 - Frequência de hemácias policromáticas com micronúcleo (HPCMn) em relação aos grupos Controle Negativo (CN), extrato de <i>Croton argyrophyllus</i> com dose 150mg/KG (ECA 150) e extrato de <i>Croton argyrophyllus</i> com dose 300mg/KG (ECA 300).....	46
Gráfico 3 - Distribuição hemácias policromáticas com micronúcleo (HPCMn) e correlação entre os grupos: grupo Controle Negativo (CN) e extrato de <i>Croton argyrophyllus</i> com dose 150mg/KG, grupo Controle Negativo (CN) e extrato de <i>Croton argyrophyllus</i> com dose 300mg.....	47
Gráfico 4 - Frequência de índice de dano (ID) em relação aos grupos Controle Negativo (CN), extrato de <i>Croton argyrophyllus</i> com dose 150mg/KG (ECA 150) e extrato de <i>Croton argyrophyllus</i> com dose 300mg/KG (ECA 300).	49
Gráfico 5 - Distribuição de índice de dano (ID) e correlação entre os grupos	49
Gráfico 6 - Distribuição de frequência de danos (FD%) em relação aos grupos Controle Negativo (CN), extrato de <i>Croton argyrophyllus</i> com dose 150mg/KG (ECA 150) e extrato de <i>Croton argyrophyllus</i> com dose 300mg/KG (ECA 300).	50
Gráfico 7 - Viabilidade de células embrionárias renais (HEK-293) em diferentes doses de extrato de <i>Croton argyrophyllus</i> nos períodos de 24 e 48 horas.	52
Gráfico 8 - Atividade celular em macrófagos (J774) em diferentes doses de extrato de <i>Croton argyrophyllus</i> nos períodos de 24 e 48 horas.....	53
Gráfico 9 - Viabilidade de células tumorais S-180 (Sarcoma-180) em diferentes doses de extrato de <i>Croton argyrophyllus</i> nos períodos de 24 e 48 horas.	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Algumas espécies de Croton e suas atividades biológicas	22
Quadro 2 - Classificação taxonômica da espécie Croton argyrophyllus.....	25
Quadro 3 - Princípios dos 3 métodos de avaliação da toxicidade aguda oral	26

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramma
Kg	Quilograma
mL	Mililitro
μl	Microlitro
°C	Grau(s) Celsius

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C.a.	Croton argyrophyllus
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CN	Controle negativo
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	Controle positivo
DL-50	Dose letal mediana
DMEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco (Do inglês: Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC	Ensaio cometa (Do inglês: Comet Assay)
ECA150	Extrato de Croton argyrophyllus 150mg/Kg
ECA300	Extrato de Croton argyrophyllus 300mg/Kg
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (Do inglês: Ethylenediamine tetraAcetic acid)
FD	Frequência de dano
GABA	Ácido gama-aminobutírico (Do inglês: Gamma-AminoButyric Acid)
GC	Grupo controle
GT	Grupo teste
HEK293	Células Embrionárias Humanas do Rim (Do inglês: Human Embryonic Kidney 293 cells)
HPCMn	Hemácias policromáticas com micronúcleo
ICCVAM	Comitê de Coordenação Interagências sobre a Validação de Métodos Alternativos (Do inglês: Interagency Coordination Committee on the Validation of Alternative Methods)
ID	Índice de dano
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
MN	Teste de micronúcleo (Do inglês: Micronucleus test)
MTT	MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio)

	(Do inglês: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NCE	Eritrócitos normocromáticos
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (Do inglês: Organisation for Economic Co-operation and Development)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC's	Células mononucleares de sangue periférico (Do inglês: peripheral blood mononuclear cell)
PCE	Eritrócitos policromáticos
PCEMn	Eritrócitos policromáticos micronucleados
PCEM-n	Eritrócitos policromáticos micronucleados
pH	Potencial hidrogeniônico
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
Q1	Quartil 1
Q3	Quartil 3
SNC	Sistema nervoso central
SUS	Sistema Único de Saúde
TRIS	Tris hidroximetil aminometano
US-EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Do inglês: United States-Environmental Protection Agency)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico de <i>Croton argyrophyllus</i>	41
Tabela 2 - Principais reações comportamentais relacionadas a dose de 2000mg/Kg administrada na avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroetanólico de <i>Croton argyrophyllus</i>	42
Tabela 3 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 FAMÍLIA EUPHORBIACEA	20
3.2 GÊNERO <i>CROTON</i>	21
3.3 <i>CROTON</i> E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	21
3.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ENCONTRADOS NO GÊNERO <i>CROTON</i>	23
3.5 ESPÉCIE <i>CROTON ARGYROPHYLLUS KUNTH</i>	25
3.6 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE (OECD)	26
3.7 MUTAGENICIDADE E GENOTOXICIDADE.....	27
3.8 CITOTOXICIDADE	28
4 ARTIGO	30
5 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	67

1 INTRODUÇÃO

Uma planta é considerada medicinal quando todo ou uma parte da espécie contém substâncias com atividade terapêutica, embora desde 1977 a OMS tenha incentivado o estudo dessas plantas, apenas em 2006 o Ministério da Saúde Brasileiro aprovou, por meio da Portaria nº 971, a Política Nacional de Práticas Integrativas (PNPIC) (BRASIL, 2010; YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

No contexto de biodiversidade brasileira, o gênero *Croton* (Euphorbiaceae) compreende em torno de 1.000 espécies largamente distribuídas e nativas da Região Nordeste do Brasil. Muitas destas espécies são utilizadas na medicina popular para o tratamento de inflamações, infecções de feridas, hipertensão, úlceras, câncer, reumatismo e malária (AGRA *et al.*, 2007, 2008; BIGHETTI *et al.*, 1999; BURKE *et al.*, 1981; HIRUMA-LIMA *et al.*, 2002; MARINI BETTOLO; SCARPATI, 1979; PERES *et al.*, 1998).

A espécie botânica *Croton argyrophyllus* é uma planta da família Euphorbiaceae, nativa da região nordeste do Brasil (SANTOS *et al.*, 2013), conhecida como marmeleiro branco. Embora, seja utilizado pela sabedoria popular para algumas finalidades terapêuticas, tais como tratamento para doenças cardíacas, influenza, tranquilizante (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; COMPAGNONE *et al.*, 2010) e, também, como agente inseticida (CRUZ, 2016), ainda há necessidade de aprofundamento sobre suas características para o desenvolvimento de novos medicamentos, pois algumas plantas em determinadas concentrações ou diferentes modos de preparo podem causar algum tipo de toxicidade.

A avaliação da toxicidade é realizada com a finalidade de determinar o potencial de substâncias causarem danos à saúde do homem. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são empregados para classificar substâncias de acordo com o seu potencial de toxicidade ou letalidade (VALADARES, 2006).

Alguns tipos de estudos toxicológicos *in vivo* englobam ensaios de toxicidade aguda, toxicidade subcrônica, toxicidade crônica, abordando aspectos como mutagenicidade, embriofetotoxicidade, alterações de fertilidade, carcinogenicidade e indução de dependência (VILAS BOAS, 2006).

Os modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, são de grande relevância para a obtenção de dados sobre a toxicidade de uma droga em estudo (TALMADGE *et al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicação do extrato hidroalcoólico da entrecasca de *Croton argyrophyllus* em modelos experimentais genotóxico, mutagênico e de citotoxicidade.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico da entrecasca de *Croton argyrophyllus*;
- Investigar a atividade genotóxica do extrato hidroalcoólico da entrecasca de *Croton argyrophyllus*;
- Avaliar a atividade mutagênica do extrato hidroalcoólico da entrecasca de *Croton argyrophyllus*;
- Estudar a atividade citotóxica do extrato hidroalcoólico da entrecasca de *Croton argyrophyllus*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae está presente nas regiões tropicais e temperadas de todo o mundo com um total de 8.000 espécies, distribuídas em 317 gêneros. Estes estão reunidos em 49 tribos e cinco subfamílias, de acordo com o sistema de classificação proposto por Webster (1994).

São vegetais de hábito bastante diversificado, variando de ervas, subarbustos e árvores a trepadeiras, ocasionalmente suculentas, com folhas inteiras ou partidas, comumente com estípulas, latescentes ou não. Investigações florísticas apontam que no Brasil a família é uma das mais abastadas em número de espécies, em torno de 1.000 divididas em cerca de 80 gêneros e com presença em formações vegetacionais chamadas caatinga (BARROSO *et al.*, 1991; CARNEIRO *et al.*, 2002; CORDEIRO, 1995; HARLEY; SIMMONS, 1986; JUDD *et al.*, 1999).

Sua importância econômica se dá especialmente na alimentação humana, produção de látex e óleos, e ainda na medicina popular. Um exemplo de utilização na alimentação no Nordeste brasileiro é *Manihot esculenta* Crantz, da qual se extrai a farinha de mandioca. A extração do látex para a produção de borracha natural foram muito utilizadas as espécies dos gêneros *Hevea* Aublet, conhecida popularmente como seringueira. Óleos extraídos de espécies de *Croton* L. e *Jatropha* L., são utilizados em mistura de combustíveis (ALLEM; IRGANG, 1975; BRAGA, 1976; MORAES, 1981).

Na medicina popular, várias espécies da família Euphorbiaceae têm sido utilizadas com diversas finalidades, mas há relatos de que parte das espécies desta família é tóxica e causa intoxicação em humanos em várias partes do mundo (CALIXTO, 1984; OLIVEIRA, 2003). De acordo com Oliveria (2007), os casos de intoxicações com Euphorbiaceae corresponderam a uma parcela significativa (22%) dos casos de intoxicações por vegetais registrados na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, porém não foram registrados casos graves envolvendo coma ou óbito por envenenamento. Corroborando a necessidade de mais estudos toxicológicos de tais espécies para garantir sua segurança para uso.

3.2 Gênero *Croton*

A expressiva relevância econômica do gênero *Croton* está alicerçada em seu conteúdo de óleos essenciais e diversas substâncias ativas como terpenóides, flavonóides e alcalóides. Esses óleos apresentam várias atividades biológicas como: antimicrobiana, antiinflamatória, antisséptica, antifúngica, além de serem utilizados na medicina popular contra gastrite, azia, má digestão e como cicatrizante (SILVA, 2010; VUNDA, 2011).

O gênero *Croton* é um grupo de grande significância dentro do ecossistema do planeta, pois muitas de suas espécies são pioneiras, colonizando locais perturbados, a título de exemplo: beira de estradas, margem de rios e clareiras de matas. Essa particularidade ocorre, especialmente, em função da produção massiva de flores e frutos durante grande parte do ano, facilitando sua reprodução para recuperação de áreas degradadas (LIMA; PIRANI, 2008).

Dentre as espécies presentes no Brasil, 68 ocorrem no bioma caatinga, como ainda em áreas de brejos de altitude do estado da Bahia, assim como em outras partes do Nordeste e são usadas na medicina popular no tratamento de inflamações, úlceras e hipertensão (BIGHETTI *et al.*, 1999; CARNEIRO-TORRES *et al.*, 2011).

3.3 *Croton* e suas atividades biológicas

O *Croton* representa importante potencial econômico para a indústria farmacêutica devido aos seus diversos metabólitos secundários, como alcalóides, flavonóides e terpenóides (PAYO *et al.*, 2001; RIZSCK 1987).

Estudos demonstram que várias espécies de *Croton* apresentam atividade antioxidante como *Croton lechleri* (LOPES; LOPES *et al.*, 2004). Além de atividades antimicrobiana, antifúngica, antiúlcera, dentre outras. A seguir são descritas as principais atividades biológicas de dadas espécies de *Croton* (Quadro 1).

Quadro 1 - Algumas espécies de Croton e suas atividades biológicas

Planta	Atividade biológica	Referência
Croton adamantinus	Antiinflamatório tópico e sistêmico	MENDES e XIMENES, 2015.
Croton argyratus	Atividade citotóxica / antitumoral	HORGEN <i>et al.</i> , 2001 / MORAES <i>et al.</i> , 1997
Croton argyrophyloides	Atividade antioxidante / atividade antimicrobiana	MORAIS <i>et al.</i> 2006 / FORTES e GUEDES 2006
Croton bonplandianum	Atividade antifúngica / atividade antimicrobiana	MISHRA, DUBEY e MISHRA, 1993 / GANGA RAO e RAGA SUDHA, 2009
Croton cajucara	Atividade antiúlcera / atividade antifúngica	HIMURA-LIMA <i>et al.</i> , 1999 / MATOS 1999 e SOUZA <i>et al.</i> 2006
Croton campestris	Atividade antibacteriana	MATIAS <i>et al.</i> , 2010
Croton cascarilloides	Atividade antitumoral	MORAES <i>et al.</i> , 1997
Croton cordifolius	Antinociceptivo, antioxidante e antiinflamatório	NOGUEIRA, 2014.
Croton eluteria	Atividade antiviral	MAY e WILLUHN, 1978
Croton flavens	Atividade carcinogênica	HECKER <i>et al.</i> , 1982
Croton hieronymi	Atividade antitumoral	MORAES <i>et al.</i> , 1997
Croton insularis	Atividade antitumoral	MORAES <i>et al.</i> , 1997
Croton lechleri	Atividade antibacteriana / atividade antitumoral	CHEN, CAI e PHILLIPSON, 1994 / MORAES <i>et al.</i> , 1997
Croton nepetaefolius	Atividade hipotensiva	BHAKUNI <i>et al.</i> , 1971
Croton oblongifolius	Atividade antihepatotóxica	AHMED <i>et al.</i> , 2002
Croton palanostigma	Atividade antitumoral	MORAES <i>et al.</i> , 1997
Croton polyandrus	Atividade antifúngica em cepas de <i>Candida</i> .	FERNANDES, H. M. B., 2012.
Croton regelianus	Atividade antitumoral contra sarcoma modelo murino 180	BEZERRA <i>et al.</i> , 2009
Croton rhamnifolioides	Atividade relaxante muscular	RANDAU <i>et al.</i> , 2002

Croton rhamnifolius	Atividade relaxante muscular	RANDAU <i>et al.</i> , 2002
Croton sonderianus	Atividade antimoluscicida	ROUQUAYROL <i>et al.</i> , 1980
Croton tiglium	Atividade mutagênica /atividade antitumoral	LEE <i>et al.</i> , 1987 / MORAES <i>et al.</i> , 1997
Croton urucurana	Atividade analgésica / atividade citotóxica contra linhagens de células cancerígenas e antimicrobiana, antioxidante e efeito herbicida	PERES <i>et al.</i> , 1998 / SIMIONATTO <i>et al.</i> , 2009
Croton zambesicus	Atividade vaso relaxante / atividade antibacteriana / atividade antitumoral	BACCELLI <i>et al.</i> , 2010 / AJAYI e AKINTOLA, 2010 / MORAES <i>et al.</i> , 1997
Croton zehntneri	Atividade relaxante do músculo liso / atividade antibacteriana / ação antioxidante	COELHO-DE-SOUZA, CRIDDLE E LEAL-CARDOSO, 1998 / COSTA <i>et al.</i> , 2008 e RODRIGUES <i>et al.</i> , 2009 / MORAIS <i>et al.</i> , 2006

Fonte: Adaptado de Medeiros (2012).

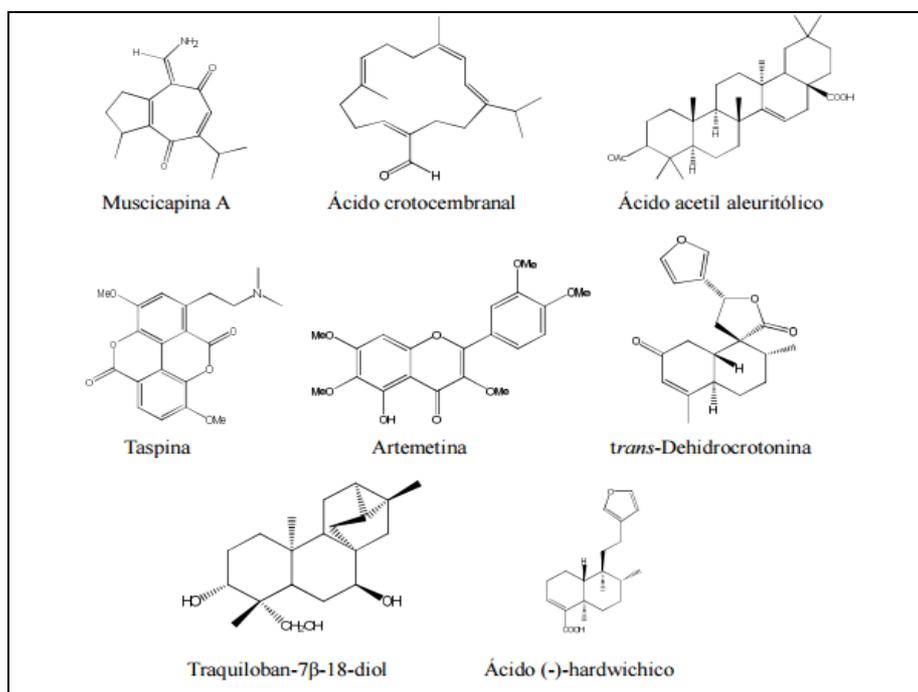
3.4 Metabólitos secundários encontrados no gênero *Croton*

Os compostos secundários têm sido utilizados por séculos em diversas finalidades, entre elas o uso na produção de medicamentos. Os metabólitos secundários são normalmente classificados através das vias biosintéticas, e incluem os compostos fenólicos, terpenos, alcalóides, cumarinas, esteróides, flavonóides, glicosídeos cardioativos, lignanas, óleos essenciais, saponinas, triterpenos, entre outros. Os métodos habitualmente utilizados para a extração, isolamento e purificação dos constituintes químicos dos extratos e óleos essenciais são os métodos cromatográficos e da prospecção fitoquímica (CROTEAU *et al.*, 2000; FIRN; JONES, 2003; SIMÕES *et al.*, 1999).

As principais substâncias encontradas no gênero *Croton* são diterpenos do tipo clodano. Estruturalmente são diterpenos com a presença de anéis furano. Mais de 800 diterpenos já foram isolados, com um número significativo deles apresentando atividades biológicas tais como antibiótica, antitumoral, inseticida, antiinflamatória, antinociceptiva, hipoglicêmica, antiúlcera e cardiovascular (MACIEL *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2005).

No estudo de Costa *et al.* (2012) a prospecção fitoquímica do extrato etanólico do caule de *Croton argyrophyllus* demonstrou a presença de ácidos fixos fortes, flavononóis e triterpenóides. Os flavononóis são constituintes químicos com elevada propriedade antitumoral, antiinflamatória e antibacteriana. Já os triterpenóides apresentam potente efeito inseticida. A Figura 1 demonstra a estrutura química de algumas das substâncias isoladas de *Croton*.

Figura 1 – Exemplos de algumas substâncias isoladas de espécies de *Croton*



Fonte: (MEDEIROS, 2012).

Avaliando a importância do gênero *Croton* e sua gama de constituintes químicos, nota-se a necessidade da realização de estudos mais aprofundados, envolvendo inclusive o seu potencial de toxicidade.

3.5 Espécie *Croton argyrophyllus* Kunth

A espécie *Croton argyrophyllus* foi descrita pela primeira vez em 1817 (Bonpl. E Kunth). Largamente distribuída em ambientes semi-áridos da América do Sul (Brasil, Colômbia, Bolívia e Venezuela), é nativa da região sudoeste da Bahia e facilmente encontrada no bioma caatinga. No Brasil está mais localizada nas Regiões Norte (Roraima e Rondônia) e Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Sergipe), em vegetações de caatinga e cerrado. Muito observada em áreas sob grandes perturbações, devido à sua facilidade de reprodução e dispersão, características essas que fazem dela uma das pioneiras típicas da caatinga e que tende a dominar os primeiros estágios de regeneração (CARNEIRO-TORRES *et al.*, 2002; GOMES, 2006; PEREIRA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2010).

A flor ou folha dessa planta tem sido utilizada popularmente para tratar doenças cardíacas e influenza, também para efeito calmante. É uma planta arbustiva de 1,6 a 5m de altura, amplamente distribuída em ambientes semiáridos, em solos arenosos e argilosos de vegetação semidecidual a decidual. Em campo é de fácil reconhecimento devido coloração prateada da face abaxial de suas folhas, devido ao adensamento dos tricomas lepidotos, prateados. (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; COMPAGNONE *et al.*, 2010; GOMES; SALES; MELO, 2010; SILVA, 2009). Sua classificação taxonômica encontra-se descrita a seguir no Quadro 1.

Quadro 2 - Classificação taxonômica da espécie *Croton argyrophyllus*

Classificação Científica	
Reino:	<i>Plantae</i>
Filo:	<i>Magnoliophyta</i>
Classe:	<i>Magnoliopsida</i>
Ordem:	<i>Malpighiales</i>
Família:	<i>Euphorbiaceae</i>
Subfamília:	<i>Crotonoideae</i>
Gênero:	<i>Croton</i>
Espécie:	<i>Croton arggyrophyllus</i> Kunth

Fonte: (SILVA *et al.*, 2010).

3.6 Avaliação de toxicidade (OECD)

Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são empregados para classificar substâncias de acordo com o seu potencial de toxicidade ou letalidade. Os estudos toxicológicos realizados em animais de laboratório e sob condições previamente planejadas, possibilitam definir possíveis efeitos de tais substâncias em seres expostos às mesmas (BARROS; DAVINO, 2003).

A Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) em 1981, incorporou o teste da dose letal mediana (DL50) e criou a diretriz 401, que recomendou a redução de animais, empregando apenas 30 para a avaliação da toxicidade oral aguda de um novo agente químico. Na década de 90 a (OECD) criou três métodos para a determinação da DL50: o teste de dose fixa, o método de toxicidade aguda de classe e o método up and down (BOTHAM, 2004).

Visando a aceitação internacional desses 3 métodos e a eliminação definitiva da diretriz 401, a OECD promoveu uma série de reuniões com especialistas entre 1998 e 2000, resultando na revisão das diretrizes 420, 423 e 425, além de um documento para o uso e interpretação de métodos alternativos de avaliação de toxicidade (VALADARES, 2006).

Desde 2000, o grupo de trabalho da OECD concluiu que a OECD diretriz 401 seria eliminada e as diretrizes 420, 423 e 425, foram revisadas, adotadas e recomendadas. O quadro 2 demonstra as diferenças entre os métodos das diretrizes 420, 423 e 425 da OECD.

Quadro 3 - Princípios dos 3 métodos de avaliação da toxicidade aguda oral

	Dose Fixa	Classe Tóxica	“Up and Down”
Nível da dose	Dose fixa de 5, 50, 300, 2000mg/kg. 5 animais por dose.	Dose fixa de 5, 50, 300, 2000mg/Kg. 3 animais por dose.	Dose inicial estimada (175mg/Kg), fator de progressão de 3, 2, 1 animal.
Princípio	Identificar a menor dose que cause toxicidade evidente.	Identificar a menor dose que cause mortalidade.	Estimar a DL50.

Dados Obtidos	Faixa estimada da DL50, sinais de toxicidade aguda. Órgão alvo.	Faixa estimada da DL50, sinais de toxicidade aguda. Órgão alvo.	Estimar a DL50, sinais de toxicidade aguda. Órgão alvo.
---------------	---	---	---

Fonte: (VALADARES, 2006).

Em 2002, em associação com a ICCVAM (Interagency Coordination Committee on the Validation of Alternative Methods) e US-EPA (United States-Environmental Protection Agency) o teste da DL50 foi finalmente eliminado (VALADARES, 2006).

3.7 Mutagenicidade e genotoxicidade

A importância de testes mutagênicos se dá através da análise de possíveis alterações permanentes transmissíveis, quantitativas ou estruturais, que podem ocorrer no material genético estudado. O estudo da genotoxicidade é ainda mais vasto e refere-se aos efeitos potencialmente nocivos ao material genético, entretanto estes não são obrigatoriamente associados à mutagenicidade (ZAMITH, 2015).

Denomina-se como agente mutagênico os casos em que a lesão é fixada, provocando alterações hereditárias (mutações), capazes de se perpetuar nas células filhas no processo de replicação (WHITE; RASMUSSEN, 1998). Ainda que aconteçam mutações espontâneas, a maior parte delas é ocasionada por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais os seres humanos e outros organismos podem ter contato (CALVIELLOA *et al.*, 2005).

O teste do micronúcleo *in vitro* é um exemplo de teste de mutagenicidade que pode ser complementado com o ensaio cometa (eletroforese em gel de células individuais) que é classificado como indicador, utilizado para esclarecimento de resultados positivos (ZAMITH, 2015).

Este ensaio foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos. O micronúcleo é assinalado no momento da divisão celular, podendo decorrer a partir da quebra de cromossomos com fragmentos acêntricos ou de cromossomos inteiros, que não são capazes de migrar para os pólos celulares durante o processo mitótico (FENECH, 2000; SCHMID, 1976).

O teste de micronúcleo tem sido diversamente utilizado em testes de genotoxicidade, pelo fato dos micronúcleos serem facilmente visualizados nos eritrócitos e serem potentes indicadores para avaliação de aberrações cromossômicas (CAMPANA *et al.*, 2003). O teste fundamenta-se na ampliação da frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleos, aplicando-se para tal observação, células de mamíferos (sangue periférico) de animais tratados. Esse modelo experimental se aplica como teste de screening nos estágios iniciais de formulação de drogas farmacêuticas, com o intuito de apontar substâncias que demonstram resultados positivos em ensaios de aberrações cromossômicas *in vitro* (PHELPS; GARRIOTT; HOFFMAN, 2002).

Já o ensaio cometa é uma das técnicas utilizadas para avaliação de danos no DNA. Este teste é capaz de revelar genotoxicidade, devido a sua capacidade de detectar lesões pré-mutagênicas. As células com dano aumentado no DNA mostram um aumento na migração de DNA cromossomal do núcleo em direção ao ânodo, que fica com aparência de um cometa. (KAMMANN *et al.*, 2001; SPEIT; HARTMANN, 1999).

O procedimento para realização do ensaio cometa é simples: as células são inclusas em gel sobre uma lâmina de microscopia, que passa por uma corrente elétrica e, devido ao DNA ter carga negativa, se este estiver rompido (clastogênese), migra para a área externa do núcleo, se assemelhando a um cometa ou cauda. O DNA quando não está rompido ou quebrado fica retido no núcleo por ser muito grande (SILVA *et al.*, 2003).

3.8 Citotoxicidade

As fontes naturais para tratamento do câncer ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico (COSTA-LOTUFO, 2009).

Os tumores malignos são responsáveis por uma crescente e significativa cifra de pacientes em nível mundial, sendo a segunda causa de morte da população do planeta (SRIVASTAVA, 2005).

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e

depois de comprovada a sua não toxicidade (International Standard Organization – ISO 10993).

4 ARTIGO

Artigo a ser submetido à revista Journal of Ethnopharmacology ISSN: 0378-8741.

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA ENTRECASCA DE *CROTON ARGYROPHYLLUS KUNTH*

PAIXÃO, M.S.^{1*}; OLIVEIRA, M.A.¹; MOURA, D.F.², ROCHA, A.T.²; RODRIGUES, M.F.²; SILVA, J.W.²; MUNIZ, M. G.²; XIMENES, R.M.²; MARTINS, R.D.¹; AGUIAR JÚNIOR, F.C.A.¹; JORGE, R.J.B.¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco Centro Acadêmico de Vitória (UFPE-CAV), Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão-PE *nica_paixao@hotmail.com ² Universidade Federal de Pernambuco Campus Recife (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife – PE.

RESUMO

O uso de plantas é uma antiga forma de prática medicinal. O *Croton argyrophyllus* é uma espécie da família Euphorbiaceae, pertencente ao gênero *Croton*. A referida espécie é utilizada popularmente para tratar doenças cardíacas, influenza e por seu efeito calmante, mas ainda há poucos registros na literatura sobre suas características que sirvam como parâmetro de segurança quanto à sua exposição. OBJETIVO: Avaliar a toxicidade do extrato hidroalcoólico da entrecasca de *Croton argyrophyllus* em modelos experimentais. Foram realizados os testes de Toxicidade Aguda em dose única, testes de atividade genotóxica e mutagênica (ensaio cometa e teste do micronúcleo) e ensaios citotóxicos com análises in vitro. METODOLOGIA: A toxicidade aguda em dose única foi avaliada de acordo com a diretriz 423 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2001). O ensaio cometa verificou em microscópio se houve dano ao DNA por meio da análise de intensidade da cauda de 100 nucleóides por animal, classificados em uma de cinco classes e verificou-se também a frequência de danos (FD%) através do cálculo da relação entre algum dano com o total de nucleóides contados. O teste de

micronúcleo ocorreu através da contagem da sua frequência, que pode ser fator indicador de alterações cromossômicas. Os ensaios citotóxicos foram realizados em linhagens J774 (macrófagos), HEK (embrionária renal) e células tumorais S-180 (Sarcoma-180). RESULTADOS: No ensaio de toxicidade aguda ocorreram algumas alterações comportamentais nos animais, contudo não houve morte nos 14 dias de observações e nem variação significativa de peso entre o grupo tratado e grupo controle ($p=0.14$). O extrato foi avaliado como tendo baixa toxicidade. A presença de genotoxicidade na dose 150mg/kg de extrato e a sua ausência na dose 300mg/kg foram inversas aos resultados mutagênicos e pode ser justificada como um possível efeito de hormese. No modelo citotóxico entre células HEK-293 e extrato, foi potencializada a viabilidade celular. O estudo citotóxico entre células J774 e o extrato não demonstrou significância estatística. O resultado encontrado no ensaio citotóxico entre células do tipo Sarcoma-180 em diferentes doses do extrato aponta inibição da viabilidade celular do sarcoma no tempo de 24h. CONCLUSÕES: Diante dos achados deste estudo, pudemos apontar o efeito antitumoral in vitro do extrato e sua baixa toxicidade, fator que não implica limitação para a continuação de ensaios pré-clínicos.

Palavras-chave: Toxicidade aguda. Citotoxicidade. Genotoxicidade.

**EVALUATION OF THE TOXICITY OF THE HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF
*CROTON ARGYROPHYLLUS KUNTH***

PAIXÃO, M.S.^{1*}; OLIVEIRA, M.A.¹; RODRIGUES, M.F.²; SILVA, J.W.²; MUNIZ, M.
G2; RAMOS, B. A2; XIMENES, R.M.²; MARTINS, R.D.¹; AGUIAR JÚNIOR, F.C.A.¹;
JORGE, R.J.B.¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco Centro Acadêmico de Vitória (UFPE-CAV), Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão-PE *nica_paixao@hotmail.com ² Universidade Federal de Pernambuco Campus Recife (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife – PE.

ABSTRACT

The use of plants is an ancient form of medicinal practice. The *Croton argyrophyllus* is a species of the Euphorbiaceae family, belonging to the genus *Croton*. This species is popularly used to treat heart disease, influenza and its calming effect, but there are few records in the literature about its characteristics that serve as a safety parameter for its exposure. **PURPOSE:** To evaluate the toxicity of the hydroalcoholic extract of *Croton argyrophyllus* in the experimental models. Single-dose acute toxicity tests, genotoxic and mutagenic activity tests (comet assay and micronucleus test) and cytotoxic assays were performed with in vitro assays. **METHODOLOGY:** Acute single-dose toxicity was assessed according to the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 2001) guideline 423. The comet assay microscopically checked for damage to the DNA by tail intensity analysis of 100 nucleoids per animal, classified into one of five classes and the frequency of damage (FD%) was also verified by calculating the relationship between some damage with the total number of TML óides counted. The micronucleus test occurred by counting its frequency, which may be a factor indicative of chromosomal changes. Cytotoxic assays were performed on J774 (macrophages), HEK (renal embryonic) and S-180 (Sarcoma-180) tumor cells. **RESULTS:** In the acute toxicity test, there were some behavioral changes in the animals; however, there was no death in the 14 days of observations and no significant variation in weight between the treated group and the control group ($p = 0.14$). The LD50 was considered to be $LD_{50} > 5000$ mg / kg and the extract was assessed as having low toxicity. The presence of genotoxicity at the dose 150mg / kg extract and its absence at the 300mg / kg dose were inversely related to the mutagenic results and may be justified as a possible hormone effect. In the cytotoxic model between HEK-293 cells and extract, cell viability was potentiated. The cytotoxic study between J774 cells and the extract did not show statistical significance. The result found in the cytotoxic assay between Sarcoma-180 cells at different doses of the extract indicates inhibition of the cellular viability of the sarcoma in the time of 24h. **CONCLUSIONS:** In view of the findings of this study, we could point out the in vitro antitumor effect of the extract and its low toxicity, a factor that does not imply limitation for the continuation of preclinical tests.

Keywords: Acute toxicity. Cytotoxicity. Genotoxicity.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é muito comum à população e o *Croton argyrophyllus* é uma espécie empregada para diversos tratamentos, mas, contudo há poucos registros na literatura sobre suas características de toxicidade que sirvam como parâmetro de segurança quanto à sua aplicação.

Muitas plantas ainda são empregadas com base apenas no conhecimento passado através das gerações (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). Portanto, é de grande valia o estudo científico acerca da segurança no uso medicinal do *Croton argyrophyllus*, avaliando suas atividades, características e potencial toxicológico a nível fisiológico, morfológico e genético.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nos laboratórios de química do departamento de antibióticos UFPE – Recife, laboratório Farmácia Viva e laboratórios de Biodiversidade e Biotecnologia de Fármacos UFPE – CAV.

Material botânico

Foram coletados galhos da espécie *Croton argyrophyllus* Kunth (figura 2.1) na Unidade de Conservação do domínio do Atlântico do Vale do Catimbau, Buíque – PE, na região da Pedra do Cachorro, sob as coordenadas de número 8º 30' 57" S 37º 20' 59" 0 e encaminhadas ao Herbário do Instituto de Agrônomo de Pernambuco (IPA) sob a exsicata 93723.

Figura 2 - *Croton argyrophyllus* Kunth

Fonte: Photographer: P.E. Berry¹.

Preparo do extrato hidroalcoólico seco de *Croton argyrophyllus*

Para o preparo do extrato hidroalcoólico foi utilizada a espécie *Croton argyrophyllus*. Após a coleta e limpeza dos galhos, foi removida a entrecasca com auxílio de material cortante. Essa entrecasca foi congelada, pesada e triturada. Como solventes foram acrescentados água destilada e álcool respectivamente, sob as proporções de 30% e 70%. Em seguida esse material foi agitado por três horas em mesa agitadora, filtrado e levado ao rotaevaporador (figura 2.2) para a separação do solvente. E o material obtido foi congelado a -20 °C e liofilizado (figura 2.3).

¹ Disponível em:

<<http://www.cria.org.br/eventos/tdbi/flora/presentations/PaulBerry/crotonFB/Pages/HBK%20Holotypes%20P/c-argirophyllus-P.html>>

Figura 3 - Rotaevaporador



Fonte: Autor (2017).

Figura 4 - Liofilização do extrato de *Croton argyrophyllus*



Fonte: Autor (2017).

Posteriormente ao processo de liofilização, o material resultante foi acondicionado em um béquer e mantido sob refrigeração no laboratório de química de produtos naturais, sob orientação do professor Dr. Rafael Matos Ximenes.

Experimentos in vivo

Os experimentos que utilizaram animais tiveram proposta submetida e aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob o processo nº 23076.012460/2017-59 em reunião em

07/06/2017, por estar de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Foram liberados para essa pesquisa científica um total de 102 camundongos Swiss (25-35 g), adultos, machos e fêmeas, originários do Biotério do Departamento de Antibióticos (UFPE) no período de vigência de junho de 2017 a abril de 2018.

Toxicidade Aguda em dose única (14 dias)

A avaliação da toxicidade aguda tem por finalidade apontar as reações adversas em curto prazo após a administração de um composto. Os testes para determinar toxicidade aguda podem ser definidos como os efeitos adversos que acontecem dentro de um período de 24 horas após a administração de uma única dose ou de doses múltiplas (BARROS e DAVINO, 2003).

A toxicidade aguda foi avaliada de acordo com a diretriz 423 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2001). De forma que os camundongos Swiss foram separados em dois grupos, denominados grupo teste (GT) e grupo controle (GC), cada um com três fêmeas, tendo inicialmente 60 dias de vida. Os animais de GT receberam, por via oral, uma dose única de extrato hidroalcoólico preparado à base de entrecasca de *Croton argyrophyllus* na quantidade de 1mL/100g de peso, correspondendo a uma dose de 2000mg/Kg, como preconizado pelo protocolo experimental Guideline 423 da OECD (OECD, 2001), para o teste de toxicidade oral aguda. Os animais de GC receberam via oral, em dose única, 1mL/100g de peso em solução de cloreto de sódio 0,9%. Os animais sofreram privação da alimentação por duas horas antes do experimento ser iniciado e por mais duas horas após a administração do extrato hidroalcoólico e da solução de cloreto de sódio 0,9%. O período total de observação após administração da dose única foi de 14 dias.

A toxicidade aguda em dose única no GC e no GT foi avaliada pelos seguintes parâmetros:

a) Consumo de água e ração

Foi ofertada diariamente 200mL de água por grupo e 100g de ração labina. As observações foram realizadas diariamente até o 14º dia no mesmo horário (15h).

b) Avaliação Ponderal

Todos os animais foram pesados em balança digital antes da administração do extrato ou solução fisiológica (M0d) e diariamente durante os 14 dias (M14d) após exposição.

c) Avaliação das reações comportamentais (Screening Hipocrático)

A avaliação das principais reações comportamentais ou Screening hipocrático oferece uma estimativa geral de natureza farmacológica e toxicológica de uma substância desconhecida a respeito de: estado consciente e disposição (I), atividade e coordenação do sistema motor (II), reflexos (III), atividades sobre o sistema nervoso central (IV) e sistema nervoso autônomo (V) (MALONE e ROBICHAUD, 1962; MALONE, 1983). O ensaio foi realizado com os grupos acima descritos, nos tempos 30 minutos, 1, 2, 4, 24 e 48 horas após a administração das amostras.

d) Avaliação dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos

No eritrograma foi realizada a contagem de plaquetas e de hemácias, a determinação do hematócrito, da hemoglobina, do VCM-volume corpuscular médio, da HCM-hemoglobina corpuscular média, e da CHCM-concentração da hemoglobina corpuscular média. No leucograma contaram-se os leucócitos e fez-se a contagem da diferenciação celular. Essas determinações foram realizadas no analisador celular COBAS ARGOS 50 ROCHE.

Atividades genotóxica e mutagênica

Um total de 20 camundongos Swiss machos foi dividido aleatoriamente em quatro grupos experimentais, sendo: G1 (grupo controle negativo, que recebeu 0,5mL de água destilada), G2 (grupo controle positivo, que recebeu 20mg/Kg de ciclofosfamida), G3 (grupo que recebeu a dose de 150mg/Kg de extrato de entrecasca de *Croton argyrophyllus*) e G4 (grupo que recebeu a dose de 300mg/Kg de extrato de entrecasca de *Croton argyrophyllus*). A distribuição dos camundongos foi realizada igualmente (n= 5 por grupo) com animais adultos tendo 90 dias de vida, que receberam via gavagem as concentrações do extrato da entrecasca de *Croton argyrophyllus*, ou ciclofosfamida como agente mutagênico (grupo controle positivo)

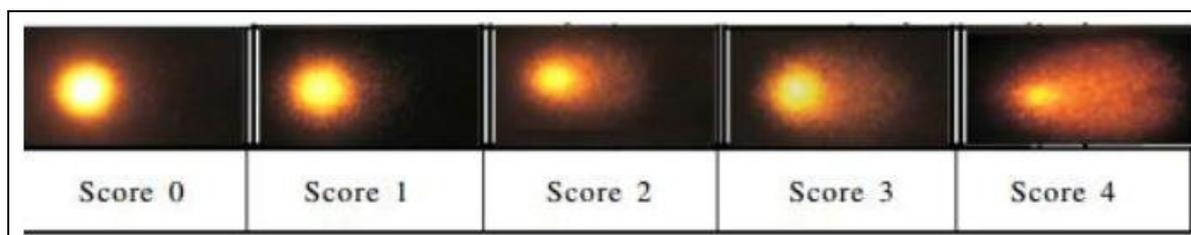
ou apenas água destilada (grupo controle negativo) veículo no qual os extratos foram dissolvidos.

Foi coletada uma amostra única de 1mL sangue de origem retro orbital de cada animal 48 horas após o tratamento, estando estes anestesiados com quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) através de via intraperitoneal, para realização do teste de micronúcleo e do ensaio cometa. Os camundongos foram eutanasiados por aprofundamento anestésico (300 mg/Kg de quetamina e 30 mg/Kg de xilazina).

a) Ensaio Cometa

Inicialmente, 15 μ L do sangue coletado foi homogeneizado com 100 μ L de agarose de baixo ponto de fusão, que foi aplicada em lâminas cobertas previamente por agarose padrão. Estas lâminas então foram cobertas com lamínulas e levadas para o refrigerador (temperatura de 4 °C) por um período de 10 minutos. Após o resfriamento, as lamínulas foram retiradas e as lâminas depositadas em cubas (sem exposição à luz) com solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100, DMSO 10%, com pH 10). Passadas 48 horas na solução de lise, as lâminas passaram por eletroforese em uma cuba horizontal contendo solução tampão alcalino (1M NaOH e 200mM sal dissódico EDTA, pH 13) por 20 minutos, com corrente de \pm 300 mA e diferença de potencial de 32V. As lâminas utilizadas no controle positivo foram aplicadas por 10 minutos em uma solução de peróxido de hidrogênio a 200mM, diluído no tampão de eletroforese em meio aos procedimentos de lise e eletroforese. Passado esse período, o tampão de eletroforese foi substituído por um novo e seguido o protocolo convencional do ensaio cometa. Depois da etapa de eletroforese, as lâminas foram neutralizadas durante 15 minutos em tampão Tris- HCl 0,4 M, pH 7,5, e fixadas durante 5 minutos em álcool absoluto. Para a revelação, todas as lâminas foram coradas com 30 μ L de solução de brometo de etídio (0, 002%, p/v). A análise foi feita em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2), com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 546. Foram analisados 100 nucleóides por camundongo, verificando-se a relação entre o comprimento da cauda e o tamanho da cabeça do cometa. Todos nucleóides analisados foram classificados em uma das cinco classes: 0 (a- sem dano); 1 (b- pouco dano aparente); 2 (c- dano médio); 3 (d- dano médio com cauda mais longa); e 4 (e- dano máximo).

Figura 5 - Relação de danos ao DNA com scores atribuídos para o ensaio cometa



Fonte: (GOMES *et al.*, 2015).

Desta forma, os valores obtidos para cada indivíduo podem variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4); este valor é nomeado como índice de dano (ID) por animal. Assim, o ID foi calculado da seguinte forma:

$$\text{ID total} = 0 (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe } 0) + 1 (\text{n}^\circ \text{ classe } 1) + 2 (\text{n}^\circ \text{ classe } 2) + 3 (\text{n}^\circ \text{ classe } 3) + 4 (\text{n}^\circ \text{ classe } 4)$$

Também foi analisado outro parâmetro distinto, a frequência de danos (FD%), que foi calculada de acordo com a porcentagem de todos os nucleóides com algum dano (classe 1 até classe 4) em relação ao total de nucleóides contados, indo da classe 0 a classe 4 (nº total) (COLLINS *et al.*, 2008). Adotando a fórmula:

$$\text{FD} = \frac{[(\text{n}^\circ \text{ total} - \text{n}^\circ \text{ classe } 0) \cdot 100]}{\text{n}^\circ \text{ total}}$$

b) Teste do Micronúcleo

Cinco microlitros do sangue coletado de cada camundongo foram aplicados sobre lâminas preparadas previamente com laranja de acridina, que foram cobertas com lamínulas com o intuito de distribuir o material biológico de maneira uniforme. Primeiramente, as lâminas foram banhadas com detergente neutro e água destilada,

depois lavadas com álcool 70% e encaminhadas para estufa (80 °C) por 15 minutos. Em cada lâmina, ainda acalorada, foi espalhado uniformemente 10 µL de laranja de acridina (1mg/mL), e estas foram colocadas para secar em temperatura ambiente por um período mínimo 30 minutos (EIJL *et al.*, 1992). Antes do MN, a citotoxicidade dos tratamentos foi analisada, de forma que 100 eritrócitos foram observados, contabilizando-se a proporção de eritrócitos policromáticos (PCE) em relação ao total de eritrócitos da seguinte maneira: $PCE / (PCE + NCE)$, onde NCE expressa eritrócitos normocromáticos. Em seguida, para o MN propriamente dito, 2000 PCE por camundongo foram observadas para se quantificar a presença de PCE micronucleados (PCEMn) (OCDE, 2014). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Zeiss-Imager M2, com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 488.

c) Análise Estatística da genotoxicidade e mutagênese

Os grupos tratados e o controle negativo foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis com análise a posteriori usando a tática de fazer testes t par-a-par com correção de Bonferroni. Para se apurar a eficiência dos testes, os grupos controle negativo e controle positivo foram comparados entre si pelo teste de Wilcoxon. O nível de significância estabelecido em todos os testes foi $p \leq 0,05$ e o software R foi empregado para todas as análises (R DEVELOPMENT, 2012).

Ensaio citotóxicos

Os ensaios citotóxicos foram analisados in vitro em linhagens de células saudáveis: J774 (macrófagos), HEK (embrionária renal) e células tumorais S-180 (Sarcoma-180). Um ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi empregado para apontar a viabilidade celular (MOSSMAN, 1983). As linhagens foram cultivadas em meio de cultivo celular DMEM (Dulbecco modification of. Minimum Essential Media), adicionado a soro fetal bovino (10%) e os antibióticos: penicilina-estreptomicina (1%). As PBMC's (peripheral blood mononuclear cell / células mononucleares de sangue periférico) foram retiradas do sangue periférico humano. As células foram injetadas em placas de 96 poços, a uma densidade de $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ células/mL e passadas 24h de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, foram realizados os tratamentos durante 24 e 48 horas, nas concentrações

finais de 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL. A composto foi solubilizado em meio de cultura não suplementado. Foram acrescidos 25µL de solução de MTT (5mg/mL) após o tratamento, e as placas foram incubadas durante 3h. O sobrenadante foi removido após a incubação e acrescidos 100µL de DMSO. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca. A citotoxicidade foi demonstrada em viabilidade celular: (Absda população celular tratada X 100 / Absda população celular não tratada) (SANTOS *et al.*, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização e prospecção fitoquímica

Em estudo paralelo com nosso grupo de pesquisa foi possível identificar grupos distintos de metabólitos secundários presentes no extrato hidroalcoólico da entrecasca de *Croton argyrophyllus*. Verificou-se a presença de flavonóides, fenilpropanóides, triterpenos, esteróides, saponinas, monoterpenos e sesquiterpenos, proantocianidinas e leucoantocianidinas (tabela 1). (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Tabela 1 - Caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *Croton argyrophyllus*

Classe de metabólitos secundários	<i>Croton argyrophyllus</i>
Flavonóides+++ (1)	
Fenilpropanóides++	
Triterpenos+++	
Estereóides+++	
Saponinas	+
Manoterpenos e sesquiterpenos+++	
Alcalóides-	
Cumarinas-	
Quinonas-	
Proantocianidinas e leucoantocianidinas+++ (2)	
Taninos hidrolisáveis	-

Fonte: (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Toxicidade Aguda em dose única

Toxicidade é um evento complexo que envolve um vasto espectro de efeitos, que podem ser desde simples morte celular até mudanças metabólicas complexas como neuro, hepato e/ou nefrotoxicidade, onde não ocorre morte celular necessariamente, contudo há alterações funcionais. Além da eficácia, a segurança de medicamentos fitoterápicos é de suma importância, pois pouco se sabe sobre o potencial tóxico de muitas plantas que são usadas na medicina tradicional (EISENBRAND *et al.*, 2002). As espécies que fazem parte do gênero *Croton* são geralmente odoríferas e a toxicidade do gênero está associada à presença de diterpenóides (HOEHNE, 1935; ABREU, 2001; RODRÍGUEZ, 2004).

Embora os animais tenham apresentado comportamentos importantes descritos na tabela de screening hipocrático (tabela 2.2), não houve mortes nos 14 dias de observações na dose de 2000 mg/kg, e nem variação significativa de peso entre o grupo tratado e grupo controle ($p=0,14$) (gráfico 2.0). O extrato foi considerado de baixa toxicidade e segundo o critério da GHS (Globally Harmonized Classification System) pertence à classe 5 (composto com toxicidade aguda baixa ou não tóxico).

Na administração na dose de 2000 mg/Kg foi observado um período de reações como ereção da cauda, movimentos estereotipado, marcha em monobloco e movimentos da vibrissas.

Tabela 2 - Principais reações comportamentais relacionadas a dose de 2000mg/Kg administrada na avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroetanólico de *Croton argyrophyllus*

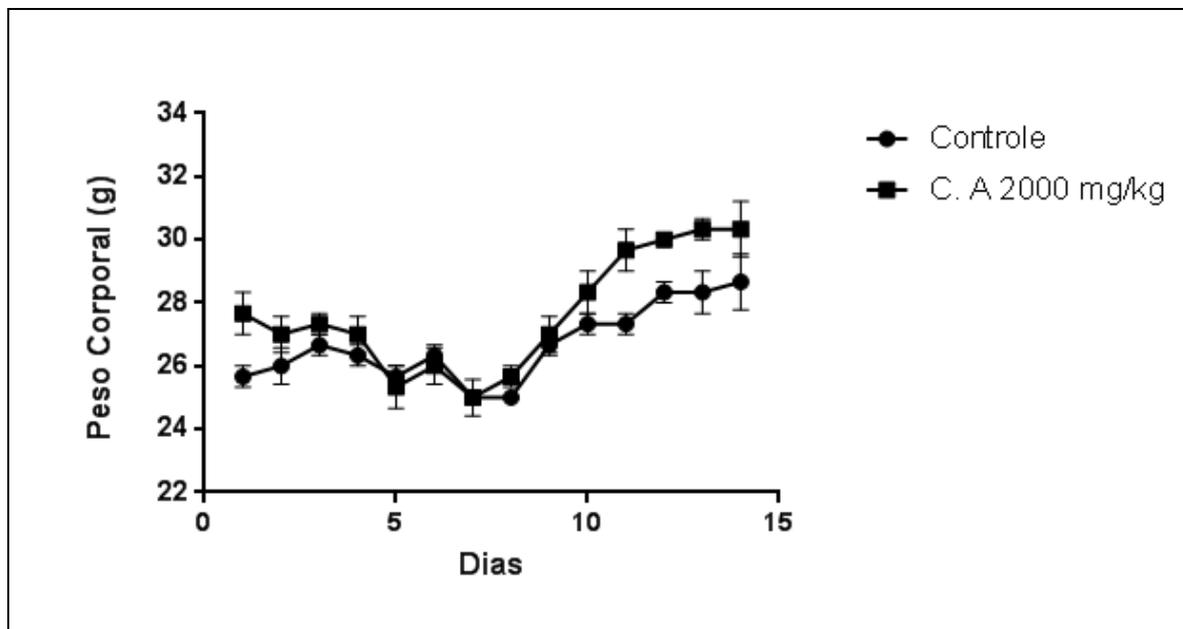
Ações / Parâmetros	GC	GT
ESTIMULANTES DO SNC		
Agitação	++	++
Agressividade	++	++
Aumento da frequência respiratória	++	++
Convulsões	-	-

Ereção de cauda	++	+++
Expansão do pavilhão auricular	+	++
Exoftalmia	-	-
Marcha em monobloco	+	+++
Movimento circular	+	+
Movimento estereotipado	+++	+++
Movimento de vibrissas	++	+++
Ondulação de cauda	+	+
Piloereção	+	++
Postura de ataque	-	+
Postura em garra	+++	+++
Tremores finos/ grosseiros	-	-
Taquicardia	+	+++
Salto	-	-
DEPRESSORES DO SNC		
Abaixamento do trem posterior	++	+++
Inversão de marcha	++	++
Prostração	-	+
Fotofobia	-	-
SNA		
Contorções	-	-
Distensão abdominal	+	++
Diurese	++	++
Espasmos musculares	+	+
Excreção	-	+++
Palidez	+	+++
Postura estática	+	+++
Reação de fuga	++	+++
Refluxo	+	+++
Hipertrofia testicular	-	-
Óbitos	0	0

GC– Grupo Controle; GT: Grupo Tratado (EHCa 2000 mg/kg/vo); (-) Ausência; (+) Presença leve; (++) Presença moderada; (+++) Presença Acentuada.

Fonte: Adaptada de Malone (1977).

Gráfico 1 - Comparação entre avaliação ponderal de grupo controle e grupo tratado com extrato de *Croton argyrophyllus* 2000mg/Kg durante 14 dias.



Fonte: Autor (2018).

No eritrograma foi feita a contagem de plaquetas e de hemácias, a determinação do hematócrito, da hemoglobina, do VCM-volume corpuscular médio, da HCM-hemoglobina corpuscular média, e da CHCM-concentração da hemoglobina corpuscular média. No leucograma contaram-se os leucócitos e fez-se a contagem da diferenciação celular. Essas determinações foram realizadas no analisador celular COBAS ARGOS 50 ROCHE. Todos os parâmetros hematológicos e bioquímicos estão demonstrados na tabela 2, a seguir.

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss

Parâmetros (unidade)	G1 SM	G1 CM	G1 LM	G2 SM	G2 CM	G2 LM
U	26,0	21,0	34,0	28,0	40,0	27,0
Cr	0,7	0,6	0,5	0,7	0,9	0,5
TGO	45,0	51,0	43,0	47,0	53,0	28,0
TGP	48,0	56,0	47,0	49,0	60,0	34,0
H	4520,000	4470,000	4780,000	4580,000	4230,000	4580,000
HB	13,3	13,0	14,3	13,6	12,3	13,3
HTC	40%	39%	43%	41%	37%	40%
V	88,8	88,6	91,4	89,0	88,0	88,8
H	29,0	29,1	30,0	29,3	29,1	29,0
CH	33,0	33,1	33,0	33,1	32,8	33,0
L	5000	4700	6000	4300	4800	5800
S	43-450	43-2021	42-2520	37-1591	41-1968	43-2494
G	01-50	05-235	03-180	03-129	03-144	01-58
LT	51-2550	50-2350	49-2940	55-2365	54-2592	49-2842
M	05-250	02-94	06-360	05-215	02-96	07-406
PL	161,000	152,000	136,000	172000	182,000	148,000

Fonte: Autor (2018).

Atividades genotóxica e mutagênica

Teste de Micronúcleo

Sabendo que uma gama de substâncias pode ocasionar ou prevenir danos ao material genético, torna-se fundamental a realização de testes citogenéticos para identificar possíveis efeitos mutagênicos da administração de extratos de plantas, em variadas concentrações, e avaliar a sua atuação no genoma. São escassos os estudos publicados a respeito da toxicidade do *Croton argyrophyllus*, e especialmente genotoxicidade e mutagenicidade.

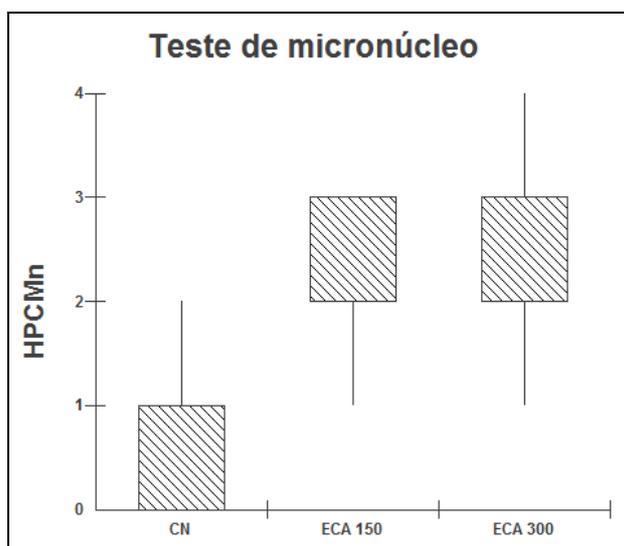
As doses testadas para genotoxicidade e mutagenicidade do extrato de *C. argyrophyllus* no presente estudo foram baseadas na proximidade da melhor dose

ativa, que é 200mg/Kg, de forma que foram escolhidos um valor inferior (150mg/Kg) e outro superior (300mg/Kg) para servir como parâmetro.

No que concerne ao teste de micronúcleo (gráfico 2.2), que é realizado através da contagem de hemácias policromáticas com micronúcleo (HPCMn), em relação a sua distribuição entre os grupos controle negativo (CN), extrato de *Croton argyrophyllus* dose 150mg/Kg (ECA 150) e extrato de *Croton argyrophyllus* dose 300mg/Kg (ECA 300), foi observado que houve dispersões de amplitude entre os valores mínimos e máximos dos grupos em estudo, caracterizando uma variação dos dados. Para evidenciar tal achado, foi realizado teste Kruskal-Wallis, no qual se observou diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

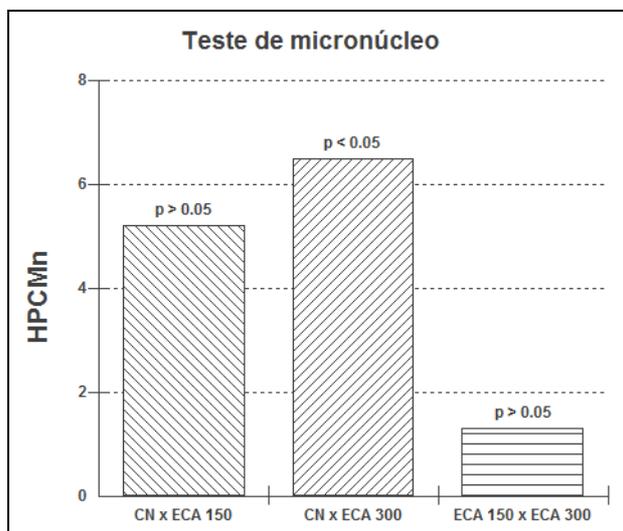
Para uma maior compreensão, realizou-se teste t par a par com correção de Bonferroni (gráfico 2.3), o qual demonstrou que há uma diferença estatística entre o grupo CN e o grupo ECA 300 ($p < 0,05$), evidenciado um caráter mutagênico nesta associação, o que não foi observado na relação entre CN e ECA 150.

Gráfico 2 - Frequência de hemácias policromáticas com micronúcleo (HPCMn) em relação aos grupos Controle Negativo (CN), extrato de *Croton argyrophyllus* com dose 150mg/KG (ECA 150) e extrato de *Croton argyrophyllus* com dose 300mg/KG (ECA 300).



Fonte: Autor (2018).

Gráfico 3 - Distribuição hemácias policromáticas com micronúcleo (HPCMn) e correlação entre os grupos: grupo Controle Negativo (CN) e extrato de *Croton argyrophyllus* com dose 150mg/KG, grupo Controle Negativo (CN) e extrato de *Croton argyrophyllus* com dose 300mg



Fonte: Autor (2018).

A relação entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de determinados compostos químicos serve como um importante indicador para testar sua aplicabilidade farmacológica. Várias drogas citotóxicas são do tipo não seletivas em suas ações, agindo e danificando também as células saudáveis (ANAZETTI *et al.*, 2003).

Apenas um método de genotoxicidade pode não oferecer informações referentes à totalidade dos indicadores de toxicidade genética. Desta forma, é necessário que cada composto químico seja analisado em diferentes ensaios para que se possa obter um maior apanhado a respeito de seu potencial genotóxico (CAVALCANTI, 2006).

Perante os achados analisados, ficou evidente que grupo tratado com a dose 300mg/Kg de extrato caracterizou-se como mutagênico, enquanto o tratado com a dose 150mg/Kg não, por prováveis danos ao cromossomo que são indicados pela presença de micronúcleos.

Ensaio cometa ID e FD%

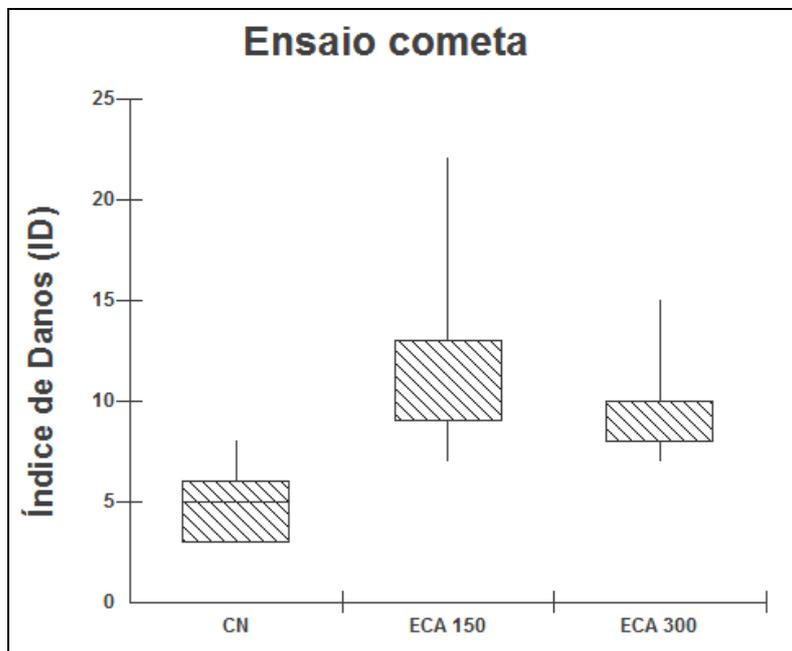
O ensaio cometa tem sido utilizado para testes de toxicologia genética devido aos seus benefícios e particularidades em relação a outros estudos que percebem substâncias genotóxicas, sendo basilar na investigação em ensaios de reparo de DNA, biomonitoramento ambiental e genotoxicidade. Oferece determinadas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, como o fato de poder ser utilizado para qualquer tipo de célula (qualquer tecido em que se possa extrair células nucleadas), utilizando apenas um pequeno número delas e por não precisar de células em divisão (ROSS *et al.*, 1995; HARTMANN; SPEIT, 1994).

Os agentes genotóxicos se relacionam quimicamente com o material genético, resultando em alterações oxidativas ou até quebras na molécula de DNA (WHITE; RASMUSSEN, 1998). Este teste não é aplicado para identificar mutações, mas lesões genômicas, que podem ser reparadas e, caso não reparadas, podem implicar em mutação. Também pode ser empregado para análises de reparo de DNA, monitorando o dano, de forma que as lesões percebidas por ele são suscetíveis de correção, ainda que impossibilite analisar a fidelidade do processo de reparo, pode fornecer dados cruciais referentes à cinética e o tipo de lesão reparada (GONTIJO; TICE, 2003; SILVA *et al.*, 2000; HARTMANN *et al.*, 2003).

Com relação ao ensaio cometa ID (gráfico 2.4), foi evidente uma maior amplitude frequência no grupo ECA 150, mostrando uma dispersão de valores, porém com um maior achado entre o quartil 1 (Q1) e quartil 3 (Q3).

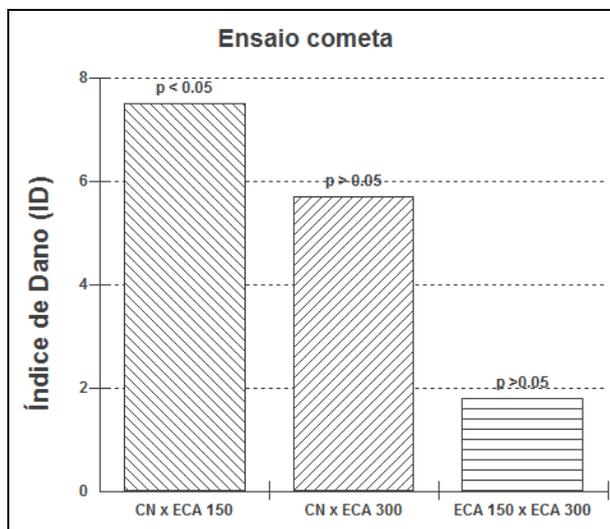
Por meio do teste de Kruskal-Wallis, observou-se diferença estatística dos grupos CN, ECA 150 e ECA 300 ($p < 0.05$), e associação de genotoxicidade em comparação com CN e ECA 150 ($p < 0,05$) estabelecida por meio do teste t par a par com correção de Bonferroni (gráfico 2).

Gráfico 4 - Frequência de índice de dano (ID) em relação aos grupos Controle Negativo (CN), extrato de *Croton argyrophyllus* com dose 150mg/KG (ECA 150) e extrato de *Croton argyrophyllus* com dose 300mg/KG (ECA 300).



Fonte: Autor (2018).

Gráfico 5 - Distribuição de índice de dano (ID) e correlação entre os grupos



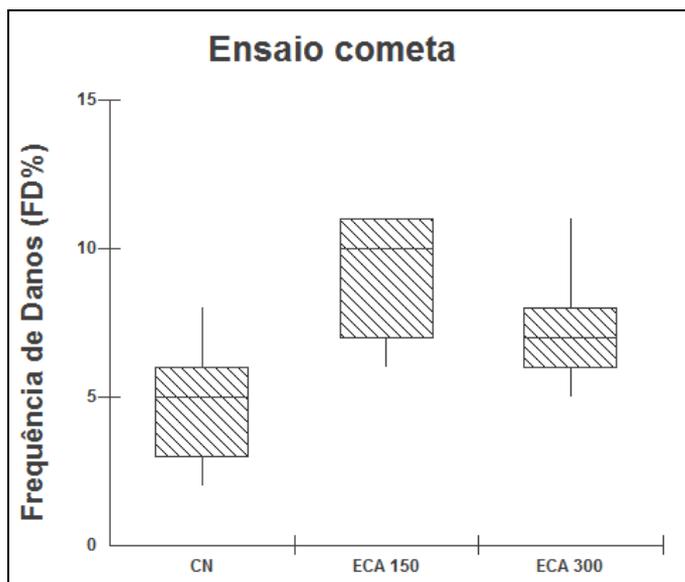
Grupo Controle Negativo (CN) e extrato de *Croton argyrophyllus* com dose 150mg/KG, grupo Controle Negativo (CN) e extrato de *Croton argyrophyllus* com dose 300mg/KG (ECA 300) e por fim extrato de *Croton argyrophyllus* na dose 150mg/Kg e dose 300mg/Kg.

Fonte: Autor (2018).

No ensaio cometa FD (gráfico 6), foi demonstrado uma distribuição mais central (Q1 e Q3) com menor amplitude de dispersão.

O teste estatístico de Kruskal-Wallis mostrou que não houve diferença entre os grupos CN, ECA 150 e ECA 300 ($p > 0,05$).

Gráfico 6 - Distribuição de frequência de danos (FD%) em relação aos grupos Controle Negativo (CN), extrato de *Croton argyrophyllus* com dose 150mg/KG (ECA 150) e extrato de *Croton argyrophyllus* com dose 300mg/KG (ECA 300).



Fonte: Autor (2018).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma importante relação entre capacidade de reparo do DNA e o risco de aparecimento de câncer e de outras enfermidades (AGNOLETTO *et al.*, 2007; TZORTZAKI *et al.*, 2012). Uma redução na aptidão de reparação resulta em uma ampliação da predisposição a mutações e instabilidade genética. Organismos apresentam diferenças em sua competência de reparação de DNA e a presunção é que polimorfismos genéticos podem distorcer a estrutura e função de proteínas, gerando uma alteração da capacidade de reparação (AGNOLETTO *et al.*, 2007).

O reparo do DNA é uma atividade bioquimicamente complexa, que utiliza diversas proteínas com diferentes funções. Alguns complexos protéicos são preferencialmente utilizados de acordo com a natureza do dano ou sua extensão (SLUPPHAUG *et al.*, 2003; MORAES *et al.*, 2012). E tais complexos protéicos determinam as vias de reparo de DNA, sendo responsáveis pela manutenção e integridade do genoma todas as condições fisiológicas (FRIEDBERG, 2008).

Substâncias antineoplásicas como a ciclofosfamida oferecem propriedades alquilantes, complexando-se com o DNA, indiscriminadamente, entre células normais e cancerosas. Conseqüentemente e contraditoriamente, diversos relatos literários assinalam para o potencial carcinogênico da ciclofosfamida. (KIJIMA *et al.*, 2003).

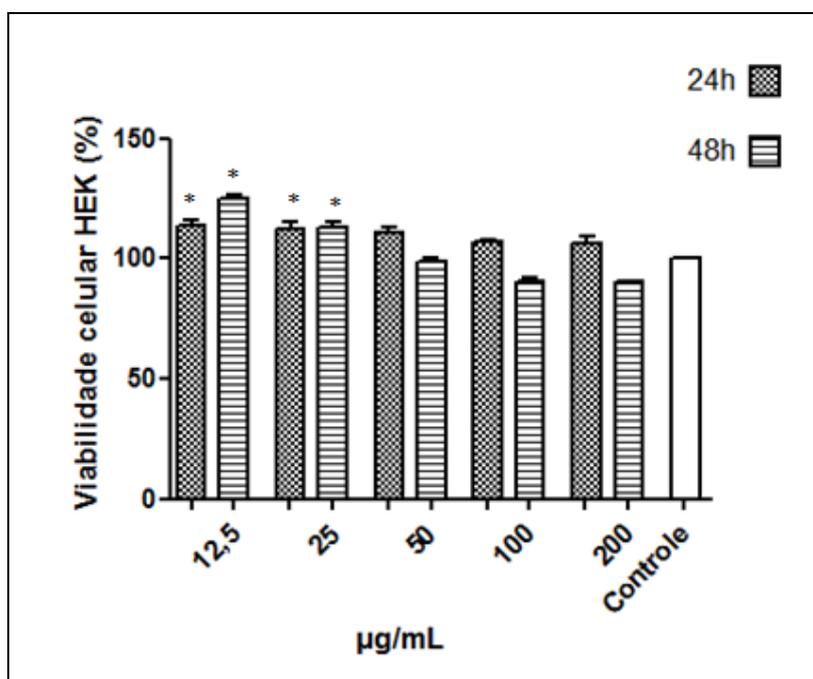
Para demonstrar a eficiência em detectar mutagenicidade nos testes de micronúcleo e genotoxicidade no ensaio cometa, foram comparadas as duas amostras CN (controle negativo) e CP (controle positivo com ciclofosfamida) por meio do teste de Wilcoxon, o qual demonstrou que há diferença entre o grupo-controle e o grupo estudado ($p < 0,05$).

O resultado de genotoxicidade na dose 150mg/kg de extrato e a sua ausência na dose 300mg/kg, inverso aos resultados mutagênicos, pode ser justificado como um possível efeito de hormese, que segundo Mattson (2008) é um termo utilizado por toxicologistas para se referir a uma dose bifásica - resposta a um agente ambiental caracterizado por uma dose baixa de estimulação ou efeito benéfico e uma dose alta de efeito inibitório ou tóxico, ou seja, é um processo em que as respostas biológicas seguem padrões diferentes da curva dose-resposta padrão.

Atividade em células embrionárias renais (HEK293)

No que se refere ao estudo citotóxico entre células HEK-293 (Human Embryonic Kidney 293 cells) e sua aplicação com o composto do extrato de *Croton argyrophyllus* em diferentes concentrações nos tempos de 24h e 48h, o gráfico 2.8 ratifica que nas concentrações de 12,5µg/mL e 25µg/mL nos tempos de 24 e 48 horas, potencializou a viabilidade celular das células embrionárias renais, havendo significância ($p < 0,05$).

Gráfico 7 - Viabilidade de células embrionárias renais (HEK-293) em diferentes doses de extrato de *Croton argyrophyllus* nos períodos de 24 e 48 horas.



* $p < 0,05$ comparado com o controle.

Fonte: Autor (2018).

O fato dessas células HEK293 terem continuado crescendo nas menores concentrações do extrato de *Croton argyrophyllus* e não terem apresentado diferença significativa nas maiores doses, pode ser justificado pelo processo chamado de hormese, que deriva do termo inglês "hormesis" e significa que uma dada substância tem efeitos opostos em doses altas e em doses baixas. Um maior entendimento dos mecanismos que ocorrem nesses casos atípicos, nos níveis celulares e moleculares, pode oferecer novas formas de prevenção e tratamento de diversas enfermidades.

O conceito de hormese também tem implicações importantes para o campo da medicina clínica. As relações dose-resposta para agentes médicos comumente exibem as mesmas relações dose-resposta horméticas que suas contrapartes tóxicas. Muitos agentes, como antibacterianos, antifúngicos, antivirais e drogas que combatem tumores, exibem respostas de dose hormética (CALABRESE, 2004).

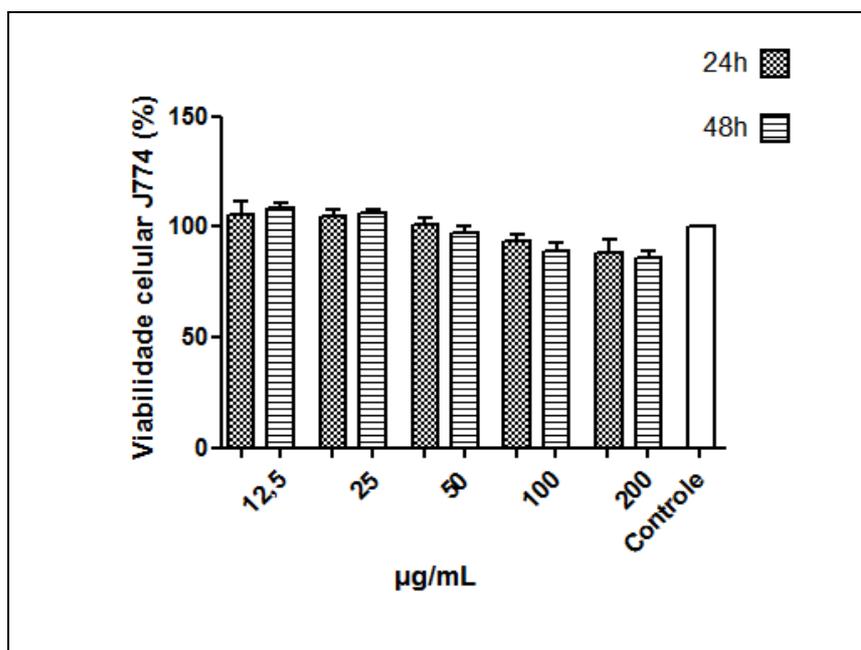
São exemplos de hormese exposições a baixas doses de certos fitoquímicos. Novos estudos têm esclarecido as vias de sinalização celular e os mecanismos moleculares que intercedem respostas horméticas envolvendo tipicamente enzimas

como quinases e desacetilases e fatores de transcrição como Nrf-2 e NF-kB. (MATTSON, 2008). O que justifica a investigação dos mecanismos envolvidos nos resultados do presente ensaio de viabilidade celular entre células HEK e *Croton argyrophyllus* em distintas concentrações ter apresentado diferentes respostas.

Atividade celular em macrófagos (J774)

A relação do estudo citotóxico entre células J774 (linhagem celular de macrófagos J774) e a aplicação do extrato de *Croton argyrophyllus* nas concentrações de 12,5µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL nos tempos de 24h e 48h, não demonstrou significância estatística ($p < 0,05$), de forma que o gráfico 2.9 corrobora a inexistência de alteração em viabilidade celular perante a aplicação do composto estudado.

Gráfico 8 - Atividade celular em macrófagos (J774) em diferentes doses de extrato de *Croton argyrophyllus* nos períodos de 24 e 48 horas.



Fonte: Autor (2018).

Os dados da viabilidade celular entre o extrato hidroalcoólico de *Croton argyrophyllus* e células J774, representam que as doses testadas não apresentaram diferença significativa, sugerindo que as substâncias presentes na entrecasca sejam menos tóxicas e diferentes daquelas encontradas nas folhas que são utilizadas no preparo do óleo essencial já demonstradas na literatura.

Durante este ensaio de viabilidade celular são aplicadas de células de linhagem J774, classificadas como macrófagos. O objetivo é verificar se estas células de defesa sofrem variação na presença de outra substância, no caso o extrato de *Croton argyrophyllus*. A diminuição dos macrófagos pode ser prejudicial, pois representa uma diminuição da resposta imune do organismo. O estudo de Santos (2015) demonstrou que na análise de citotoxicidade e viabilidade celular da linhagem J774 com o látex de *Croton lechleri* a concentração 25µg/mL foi capaz de matar aproximadamente 50% das células. As concentrações de 6,25 e 12,5µg/mL do extrato não apresentaram efeito citotóxico relevante quando comparadas com o controle. Diferente da nossa análise, que não demonstrou alteração significativa, nem de diminuição, nem aumento celular dos macrófagos (gráfico 9).

Araújo (2014) analisou o óleo essencial de *Croton argyrophyllus*, que apresentou atividade citotóxica significativa e induziu morte celular em macrófagos murinos J774 nas concentrações 50 e 100µg/ml. Estes resultados encorajam estudos adicionais sobre os mecanismos envolvidos na citotoxicidade *in vitro*.

Atividade antitumoral

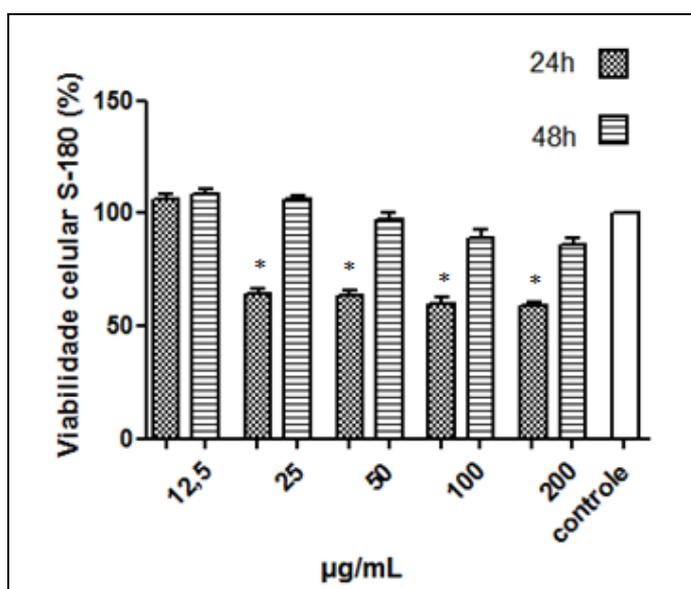
Nos últimos anos percebe-se uma tendência maior de pesquisas em busca de quimioterápicos com a finalidade de se aplicar tratamentos mais efetivos e seletivos, ou que bloqueiem o avanço do câncer, quando já instalado (BRANDÃO *et al.*, 2010). E nessa busca por novos agentes antitumorais, tanto os testes *in vitro* quanto os *in vivo* são amplamente utilizados. Os testes de citotoxicidade (*in vitro*), os quais direcionam a pesquisa para moléculas com potencial de viabilidade de células tumorais em cultura, são os mais vastamente empregados (HOLBECK, 2004).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que os casos de câncer continuarão subindo e, até 2030, as taxas de mortalidade irão chegar a mais de 11 milhões de mortes por ano (MATSUO *et al.*, 2010). Tais informações corroboram que, apesar de todas as pesquisas, o câncer ainda é uma das maiores causas de mortalidade mundial e reforça a importância de cada resultado que possa sugerir alguma forma de diminuição de morbimortalidade, através do controle do câncer, seja por meio de métodos preventivos ou mesmo curativos.

No que diz respeito ao estudo citotóxico realizado entre células tumorais do tipo Sarcoma-180 e sua aplicação com o composto do extrato de *Croton*

argyrophyllus em diferentes concentrações nos tempos de 24h e 48h, o gráfico 2.7 demonstra que nas concentrações de 25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL no tempo de 24 horas inibiu a viabilidade celular do sarcoma, havendo significância ($p < 0,05$).

Gráfico 9 - Viabilidade de células tumorais S-180 (Sarcoma-180) em diferentes doses de extrato de *Croton argyrophyllus* nos períodos de 24 e 48 horas.



* $p < 0,05$ comparado com o controle

Fonte: Autor (2018).

Os resultados obtidos podem ser reforçados no fato que concerne que várias espécies de *Croton* e diversos constituintes isolados oferecem atividade antitumoral in vitro e in vivo através de distintos mecanismos de ação. Dentre elas, podemos citar: *C. argyratus*, *C. cascarilloides*, *C. hieronymi*, *C. insularis*, *C. lechleri*, *C. palanostigma*, *C. tigilium* e *C. zambesicus* (MORAES *et al.*, 1997).

Além de que através de levantamento etnofarmacológico foi demonstrado que determinadas espécies de *Croton* são empregadas na medicina popular para o tratamento do câncer como *C. draco*, *C. tigilium*, *C. urucurana*, *C. oblongifolius*, *C. lechleri*, *C. erythrochilus* e *C. draconoides* (PIACENTE *et al.*, 1998). Já de acordo com Pessoa (2013), o óleo essencial de *Croton polyandrus* apresenta potente atividade antitumoral in vivo, apesar de não apresentar efeitos in vitro, e moderada toxicidade.

De acordo com o ensaio antitumoral da linhagem S-180, o presente estudo demonstrou que as concentrações de 25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL de *Croton argyrophyllus* no tempo de 24 horas inibiram a viabilidade das células observadas. Conseqüentemente é possível entender que o extrato hidroalcoólico testado possui significativa atividade antitumoral *in vitro* e alguma toxicidade nos modelos experimentais genotóxico e citotóxico, fator não limitante para continuação de outros estudos pré-clínicos.

CONCLUSÃO

O presente estudo fornece informações inéditas sobre o extrato hidroalcoólico da entrecasca de *Croton argyrophyllus*. Investigamos além da segurança de sua ingestão, alguns de seus efeitos como antitumoral que demonstraram importantes resultados, tornando esta planta interessante para novos estudos em busca do desenvolvimento de medicamentos.

REFERÊNCIAS

ABREU, A. S.; BARBOSA, P. S.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var *Glabrior* (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de Iniciação Científica**, v.1, n.1, 2001. Disponível em: <http://www.cultura.ufpa.br/rcientifica/ed_anteriores/pdf/ed_02_asa.pdf> Acesso em 03/09/2017

AGNOLETTO, M. H.; GUECHEVA, T. N.; DONDE, F.; DE OLIVEIRA, A. F.; FRANKE, F.; CASSINI, C.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A.; SAFFI, J. Association of low repair efficiency with high hormone receptors expression and SOD activity in breast cancer patients. **Clinical Biochemistry**, 40(16-17): 1252-1258, 2007.

ALBUQUERQUE, U. P., MEDEIROS, P. M., ALMEIDA, A. L. S., MONTEIRO, J. M., LINS NETO, E. M. F., MELO, J. G., SANTOS, J. P, 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-árido) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach, **Rev. J Ethnopharmacol**, 114, 325-354.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M, 2003. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**. 188, 261-274.

ARAUJO, S.S.. SANTOS, M.I.S, DIAS ,A.S. , FERRO J.N.S. , LIMA R.N. , BARRETO E.O, 2014. **Chemical composition and cytotoxicity analysis of the**

essential oil from leaves of *Croton argyrophyllus* Kunth. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10412905.2014.956233> / Acesso em: 22/04/2018.

BARROS, S.B.; DAVINO, S.C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S; CAMARGO, MMA e BATISTUZZO, JAO (Org.). **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, ed. 2, p. 57-68, 2003.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; MASCIMENTO, J. A.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1359-1369, 2010.

CALABRESE, E. J. Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine. **EMBO reports**. v.5, n.1, out 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1299203/> Acesso em: 17/04/2018.

CAVALCANTI, Bruno Coêlho. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do ácido caurenóico, um diterpeno isolado da planta *Copaifera Langsdorffii* Desf. (Leguminosae)**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 95 f., 2006 .

COLLINS, A.R. *et al.*, 2008. Review: The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, 23, 143-151.

EIJI, Y. *et al.*, 1992. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides with triethylenemelamine. **Mutation Research / Genetic Toxicology**, 278, 127-130. ISSN 0165-1218.

EISENBRAND, G. *et al.* Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.193-236, 2002.

FRIEDBERG, E.C. A brief history of the DNA repair field. **Cell Research**, v.18, n.1, p.3-7, 2008.

GOMES, A.P.S., 2006. **Revisão das espécies sulamericanas de *Croton* L. subgen. *Croton* sect. *Argyroglossum* Baill. (Crotonoidea e Euphorbiaceae)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 124pp.

GOMES, M. e Freitas, Adriane e Liz, Marcus e Utzig, Larisa e Algarte Ramsdorf, Wanessa. (2015). **Avaliação da Ecotoxicidade Aguda e da Genotoxicidade do Clorpirifós em *Daphnia magna* e *Danio rerio***. 10.20906/CPS/SICITE2015-0776.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R., 2003. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra. 173-200.

HARTMANN, A. *et al.* Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**. v.18, p.45-51, 2003.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). **Mutation Research**, v. 346, p. 49-56, 1994.

HOEHNE, F. C.; **Plantas e substâncias vegetais tóxicas**. São Paulo: Graficars, 1935.

HOLBECK S. L. Update on NCI in vitro drug screen utilities. **European Journal of Cancer**, v.40, p.785-793, 2004.

KIJIMA, T.; MASUDA, H.; SUZUKI, M.; OKADA Y., YANO, M.; HYOCHI, N.; FUJII, Y.; KAWAKAMI, S.; HAYASHI, T.; KOBAYASHI, T.; KIHARA, K. Cyclophosphamide-induced bladder cancer: three case reports. **Hinyokika Kiyo**, v.49, p.483-486, 2003.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, 25(4): 320-331, 1962.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. The pharmacological evaluation of natural products – General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **J. Ethnopharmacol.**, 8: 127-147, 1983.

MATSUO, A. L.; TANAKA, A. S.; JULIANO, M. A.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R. A novel melanoma-targeting peptide screened by phage display exhibits antitumor activity. **Journal of Molecular Medicine**, v.88, n.12, p.1255-1264, 2010.

MATTSON, M. P. Hormesis defined. **Ageing Research Reviews**. v.7, n.1, p.1-8, jan. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163707000712> Acesso em: 17/04/2018.

MORAES, M. C. S.; NETO, J. B. C.; MENCK, C. F. M. DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v.17, p.1362-1388, 2012.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity. **Journal Immunology Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MORAES, M. O.; FONTELE, M. C.; MORAES, M. E. A.; MACHADO, M. I. L.; MATOS F. J. A. Screening for anticancer activity of plants from the northeast of Brazil. **Fitoterapia**, v.68, p.235-239, 1997.

OCDE. **Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris, 2014. Disponível em: <http://www.oecdilibary.org/docserver/download/9714541e.pdf?expires=1455135783&id=id&accname=guest&checksum=FAA3E240036470DE7F48522BC3B7FFFA>. Acesso em 10/08/2016.

OECD- Organization for Economic Co-operation and Development. 2001. **Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**. OECD, Paris.14pp.

PESSOA, D. R. **Estudo da toxicidade e atividade antitumoral do óleo essencial de Croton Polyandrus Spreng. (Euphorbiaceae) em Modelo Experimental de Tumor Ascítico de Ehrlich**. 108 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

PIACENTE, S; BELISARIO, M. A.; DEL CASTILHO, H.; PIZZA, C.; DE FEO, V. Croton ruizianus: platelet proaggregating activity of two new pregnane glycosides. **Journal of Natural Products**, v. 61, p.318-322, 1998.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011. R: **A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing. ISBN: 3-900051-07-0. Available from: <http://www.R-project.org/>.

RDEVELOPMENT, C. TEAM 2009: R: **A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria**. 2012. Disponível em: [http:// https://www.r-project.org/](http://https://www.r-project.org/) Acesso em 21/04/2018.

RODRIGUEZ, J. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. S. Antiulcer activity and subacute toxicity of trans-dehydrocrotonin from Croton cajucara. **Human & experimental toxicology**. v.23, n.455, 2004.

ROSS, G. M.; McMILLAN, T. J.; WILCOX, P.; COLLINS, A. R. The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (comet assay): Technical Aspects and Applications. Report on the 5 th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research. **Mutat. Res.** v.337, p.57-60, 1995.

SANTOS, A. P. A; PACHECO S. G. A.; TELES, C. B. G. Efeito leishmanicida in vitro do látex de Croton lechleri (Euphorbiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.36, n.3, p.413-418, 2015 ISSN 1808-4532

SANTOS, N. P. S.; NASCIMENTO, S. C.; SILVA, J. F.; PEREIRA, E. C. G; SILVA, N.H, 2005. Usnic Acid - Loaded Nanocapsules : An Evaluation of Cytotoxicity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. 15, 355-361.

SILVA, J.; FREITAS, T. R. O.; MARINHO, J. R, 2000. Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay) to environmental in vivo biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**. 23, 241-245.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B. & KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research**, v.531, n.1-2, p.231-51, 2003.

TUROLLA, M.S.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, p.289-306, 2006.

TZORTZAKI, E. G.; DIMAKOU, K.; NEOFYTOU, E.; TSIKRITSAKI, K.; SAMARA, K.; AVGOUSTI, M.; AMARGIANITAKIS, V.; GOUSIOU, A.; MENIKOU, S.; SIAFAKAS, N.M. Oxidative DNA damage and somatic mutations: a link to the molecular pathogenesis of chronic inflammatory airway diseases. **Chest Journal**. v.141, n.5, p.1243-1250, 2012.

WHITE P. A.; RASMUSSEN. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutat. Res.** n.410, p.223-226, 1998.

WHITE, P. A; RASMUSSEN, J. B. The Genotoxic Wastes in Surface Waters. **Mutat Res.**, Madrid, v.410, p.223-236, Jan. 1998.

5 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

O *Croton argyrophyllus* da família Euphorbiaceae, gênero *Croton*, conhecido como marmeleiro branco, por ser pouco relatado na literatura sobre sua segurança de uso nos levou a investigar as características toxicológicas do extrato hidroalcoólico da sua entrecasca. E, além disso, foram estudados determinados efeitos, como antitumoral que evidenciaram importantes resultados, tornando interessante continuação de ensaios pré-clínicos. Os resultados encontrados no presente estudo apontaram:

- Baixa toxicidade no ensaio de toxicidade aguda com o extrato;
- Genotoxicidade na dose 150mg/kg de extrato e sua ausência na dose 300mg/kg, inversas aos resultados mutagênicos, talvez por efeito hormese;
- No ensaio citotóxico entre células HEK-293 e extrato, foi potencializada a viabilidade celular.
- No modelo citotóxico entre células J774 e o extrato não demonstrou significância estatística.
- Inibição da viabilidade celular do sarcoma no tempo de 24h no ensaio citotóxico entre células do tipo Sarcoma-180 em diferentes doses do extrato

Desta forma, podemos sugerir sua segurança de uso da baixa toxicidade apresentada e apontar o efeito antitumoral in vitro do extrato, fator que nos oferece subsídios para a continuação de ensaios pré-clínicos.

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Sinopse das plantas conhecidas como medicinais e venenosas no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

ALLEM, A. C.; IRGANG, B. E. **Euphorbiaceae**: Tribo euphorbial. Porto Alegre: UFRGS, 1975. 97p. (Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul, v. 34).

ALBUQUERQUE, U. P. *et al.* Medicinal plants of the caatinga (semi-árido) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, Limerick, v. 114, p. 325-354, 2007.

BARROS, S. B.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. (Org.). **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 57-68.

BARROSO, G. M. *et al.* **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Editora UFV, 1991. 2 v.

BIGHETTI, E. J. B. *et al.* Anti-inflammatory and Antinociceptive Effects in Rodents of the Essential Oil of Croton cajucara Benth. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 51, n. 12, p. 1447-1453, 1999.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity--prospects for tiered testing strategies. **Toxicol in vitro**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 227-230, 2004.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste especialmente do Ceará**. 3. ed. Mossoró, RN : Fundação Guimarães Duque, 1976. (Coleção Mossoroense, n. 362).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 10**, de 09 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Brasília: ANVISA, 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html>. Acesso em: 12 jul. 2018.

BURKE, B. A. *et al.* The structure of crotonitenone, a novel casbane diterpene from Croton nitens Sw. (Euphorbiaceae). **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, Cambridge, v.1, p.2666-2669, 1981.

CALVIELLO A, G. *et al.* DNA Damage and Apoptosis Induction by the Pesticide Mancozeb in Rat Cells: Involvement of the Oxidative Mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 211, n. 2, p.87-96, 2006.

CAMPANA, M. A. *et al.* Micronuclei induction in Rana Catesbeiana tadpoles by the Pyrethroid insecticide lambdaCyhalothrin. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 26, n.1, p.99-103, 2003.

CARNEIRO, D.C.; CORDEIRO, I.; FRANÇA, F. A família Euphorbiaceae na Flora de Inselbergs da região de Milagres, Bahia, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 20, p.31-47, 2002.

CALIXTO, J. B. *et al.* Antispasmodic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*: a comparative study with papaverine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 17, n. 3-4, p. 313-321, 1984.

CARNEIRO-TORRES, D. S. *et al.* Three new species of *Croton* (Euphorbiaceae s.s.) from the Brazilian Caatinga. **Brittonia**, New York, v. 63, n. 1, p. 122-132, 2011.

CARNEIRO-TORRES, D.S.; SANTOS, F.A.R.; GIULIETTI, A.M. A tribo Euphorbieae Dumort (Euphorbiaceae) na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: palinologia e implicações taxonômicas. **Polibotânica**, Distrito Federal, MEX, v.13, p. 83-96, 2002.

COMPAGNONE, R.S. *et al.* Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. **Records of Natural Products**, Kocaeli, Türkiye, v.4, p.101-108, 2010.

CORDEIRO, I. Euphorbiaceae. In: STANNARD, B. L. (ed.). **Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil**. Chicago: Kew, Royal Botanic Gardens, 1995. p.300-317.

COSTA, M.A. R. *et al.* Prospecção fitoquímica e avaliação da atividade larvicida do extrato etanólico do caule de *Croton argyrophyllus* Kunth (Euphorbiaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 64., 2012, São Luís – MA. **Resumos...** São Luís-MA: UFMA, 2012. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/64ra/resumos/resumos/5696.htm> Acesso em: 21 abr. 2018.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010. Disponível em: <http://rvq.s bq.org.br/imagebank/pdf/v2n1a06.pdf> Acesso em: 17 abr. 2018.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

CRUZ, R. C. D. **Avaliação do potencial inseticida das folhas de *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) sobre o *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e toxicológica sobre *Mus musculus* (Rodentia: Muridae)**. 2016. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais, Itapetinga, 2016.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, n.1-2, p.81-95, 2000.

FIRN, R. D.; JONES, C. G. Natural products – a simple model to explain chemical diversity. **Natural product reports**, London, n. 20, p. 382-391, 2003.

GOMES, A. P. S.; SALES, M. F.; MELO, A. L. Novidades taxonômicas em *Croton* sect. *Argyroglossum* Bail e *Croton* sect. *Lasiogyne* Klotzsch (Crotonoideae-Euphorbiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 24, n.4, p.905-908, 2010.

GOMES, A.P.S. **Revisão das espécies sulamericanas de *Croton* L. subgen. *Croton* sect. *Argyroglossum* Baill. (Crotonoidea e Euphorbiaceae)**. 2006. 124 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

HARLEY, R.M.; SIMMONS, N.A. **Florula of Mucugê, Diamantina, Brazil**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1986.

HIRUMA-LIMA, C.A. *et al.* Effect of essential oil obtained from *Croton cajucara* Benth. in the healing of gastric ulcer and factors of protection of the gastric mucosa. **Phytomedicine**, Stuttgart, v.9, n.6, p.523-529, 2002.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5: 1992**. Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for Cytotoxicity. Geneva: ISO, 1992. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/36406.html> Acesso em: 15 abr. 2018.

ZAMITH, H. Testes mutagênicos e carcinogênicos e sua respectiva importância em vigilância sanitária. In: JORNADA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UEZO, 4., 2015, Rio de Janeiro. **Palestras...** Rio de Janeiro: UEZO, 2015. Apresentação de slides. Disponível em: <http://www.uezo.rj.gov.br/IV-Jornada-Farmacia/palestras/Helena%20Zamith%20-%20Testes%20mutag%C3%AAnicos%20e%20carcinog%C3%AAnicos%20e%20sua%20respectiva%20import%C3%A2ncia%20em%20vigil%C3%A2ncia%20sanit%C3%A1ria.pdf> Acesso em: 07 abr. 2018.

JUDD, W. S. *et al.* **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999. 464 p.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam v.498, n. 1-2, p.61-77, 2001.

LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropical**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 177-231, abr. 2008.

LOPES E LOPES, M. I. *et al.* Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 95, n. 2-3, p. 437-445, 2004.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 823-828, 1998.

MARINI BETTOLO, R.; SCARPATI, M. L. Alkaloids of *Croton draconoides*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 520, 1979.

MEDEIROS, V. M. **Estudo fitoquímico de *Croton grewoides* Baill. e revisão da ocorrência das principais classes de metabólitos do gênero *Croton***. 2012. 287 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

MENDES, R. F. V.; XIMENES, R. M. Estudo Etnofarmacológico de *Croton Adamantinus* Müll. Arg. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 23.; CONGRESSO DE INICIAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E INOVAÇÃO DA UFPE, 7.; ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO ENSINO MÉDIO DA UFPE, 4., 2015, Recife. **Anais...** Recife: UFPE, 2015. p. 1-4. Disponível em:
https://www.ufpe.br/documents/616030/865952/Estudo_etnofarmacologico_de_croton.pdf. Acesso em: 13 abr. 2018.

MORAES, J. L. **Manual dos óleos vegetais e suas possibilidades energéticas**. [S.l.]: CNI-DAMPI, 1981.

MORAES, M. O. *et al.* Screening for anticancer activity of plants from the northeast of Brazil. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 68, p. 235-239, 1997.

NOGUEIRA, L. M. **Estudo etnofarmacológico e screening de atividades farmacológicas do óleo essencial extraído das folhas de *Croton cordiifolius* Baill.** 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2014.

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. **Plantas tóxicas**: conhecimento e prevenção de acidentes. Ribeirão Preto: Holos, 2003.

OLIVERIA, R. B.; GIMENEZ, V. M. M.; GODOY, S. A. P. Intoxicações com Espécies da Família Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 69-71, jul. 2007.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure**. Paris: OECD/OCDE, 2001. OECD/OCDE-420.

_____. **Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**. Paris: OECD/OCDE, 2001. OECD/OCDE-423.

_____. **Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure**. Paris: OECD/OCDE, 2001. OECD/OCDE-425.

_____. **The validation of test methods considered for adoption as OECD test guidelines**. Paris: OECD, 1998.

PAYO, H.A. *et al.* Tamizaje fitoquímico preliminar de espécies del género *Croton* L. **Revista Cubana de Farmácia**, Ciudad de la Habana, v. 35, p. 203-206, 2001.

PEREIRA, I. M. *et al.* Regeneração natural em um remanescente de caatinga sob diferentes níveis de perturbação, no agreste paraibano. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 431-426, 2001.

PERES, M.T. L.P. *et al.* Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon: Pharmaco-chemical criteria used in its isolation. **Fitoterapia Research**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 209-211, 1998.

PHELPS, J. B.; GARRIOTT, M. L.; HOFFMAN, W. P. A protocol for the micronucleus test II. Contributions for the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 521, n. 1-2, p. 103-112, 2002.

RIZSK, A. F. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 94, p. 293-326, 1987.

SANTOS, R. R. C. *et al.* Avaliação quantitativa da atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Croton argyrophyllus* Kunth (euphorbiaceae) pelo método do sequestro de radicais livres DPPH. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 65., 2013, Recife. **Resumos...** Recife: UFPE, 2013. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/65ra/resumos/resumos/5678.htm> Acesso em: 22 abr. 2018.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: HOLLAENDER, A. (Ed.). **Principles and Methods for Their Detection**. New York: Plenum Press, 1976. V. 4. p.31-53

SILVA, J. S.; SALES, M. F.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 441-453, 2010.

SILVA, J. S.; SALES, M. F.; CARNEIRO-TORRES, D.S. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil.: **Rodriguésia** Rio de Janeiro, v. 60, n. 4, p. 879-901, dez. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rod/v60n4/2175-7860-rod-60-04-0879.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2018.

SILVA, J.; ERDTAMNN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SILVA, R. M. *et al.* Cardiovascular effects of transdehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* in rats. **Vascular Pharmacology**, New York, v. 43, n. 11, p. 11-18, 2005.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. UFRGS; Ed. UFSC, 1999.

SOUSA, T. K .G. **Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial das folhas de *Croton grewoides* (Euphorbiaceae)**. 2013. 67 f. TCC (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da

Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, João Pessoa, 2013. Disponível em: <http://rei.biblioteca.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/546/1/TKGS11072014.pdf>
Acesso em: 03 set. 2017.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test) – A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in molecular biology**, Totowa, v. 113, p. 203-212, 1999.

SOLOMON, V. R. *et al.* Design and synthesis of new antimalarial agents from 4-aminoquinoline. **Bioorganic & medicinal chemistry**, Oxford, v.13, n. 6, p. 2157-2165, 2005.

TALMADGE, J. E. *et al.* Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **The American journal of pathology**, New York, v. 170, n. 3, p. 793-804, 2007.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50” **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiania, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.
Disponível em:
<http://www.usp.br/bioterio/Artigos/Procedimentos%20experimentais/Alternativa.pdf>
Acesso em: 15 abr. 2018.

VILAS BOAS, O. M. G. C. **História da Farmacologia**. Alfenas: [s. n.], 2006.
Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/53304325/1/Historia-da-Farmacologia>.
Acesso em: 28 jun. 2016.

VUNDA, S. L. L. **Estudo químico e biológico de espécies de Croton (Euphorbiaceae) nativas do Rio Grande do Sul**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, 2011. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/40406> Acesso em: 21 abr. 2018.

WEBSTER, G. L. Classification of the Euphorbiaceae. **Annals of Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v.81, n. 1, p. 3-32, 1994.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation research**, Amsterdam, v. 410, n. 3, p. 223-226, 1998.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Eds.). **Plantas medicinais sob a óptica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p.17-46.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351

fax: (55 81) 2126 8350
www.ccbx.ufpe.br

Recife, 19 de junho de 2017.

Ofício nº 47/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof.ª Roberta Jeane Bezerra Jorge

Centro de Vitória- CAV

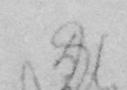
Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.012460/2017-59

Certificamos que a proposta intitulada “**Toxicidade de Croton sargyrophyllus em camundongo Swiss.**” registrada com o nº **23076.012460/2017-59** sob a responsabilidade de **Prof.ª Roberta Jeane Bezerra Jorge** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 07/0/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Junho de 2017 a abril de 2018
Espécie/ linhagem/raça	Mus musculus (Camundongos, linhagem Swiss)
Nº de animais	102
Peso/Idade	25-35g 60 dias
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Bioterio do Departamento de Antibióticos da Universidade Farmacologia da (UFPE).

Atenciosamente,


 Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691