



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

WILLAMS ALVES DA SILVA

**Perfil fitoquímico e atividade toxicológica do extrato etanólico da casca do
caule de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphobiaceae)**

Recife
2020

WILLAMS ALVES DA SILVA

Perfil fitoquímico e atividade toxicológica do extrato etanólico da casca do caule de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphobiacea)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Área de Concentração: Morfologia e Inovação Tecnológica

Orientadora: **Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite**

Co-orientadora: **Prof.^a Dr.^a Kristiana Cerqueira Mousinho**

Recife

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Silva, Willams Alves da

Perfil fitoquímico e atividade toxicológica do extrato etanólico da casca do caule de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphobiaceae) / Willams Alves da Silva - 2020.

57 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Sônia Pereira Leite

Coorientadora: Kristiana Cerqueira Mousinho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em
Morfofotecnologia. Recife, 2020.

Inclui referências e anexos

1. Fitoquímicos 2. Artemia 3. Toxicidade I. Leite, Sônia Pereira

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-058

WILLAMS ALVES DA SILVA

Perfil fitoquímico e atividade toxicológica do extrato etanólico da casca do caule de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphobiacea)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Aprovado em: 03/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Juliana Pinto de Medeiros (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^o Gilberto Gonçalves Rodrigues (Examinadora Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a. Roberta Maria Pereira Leite de Lima (Examinadora externa)
Centro Universitário Maurício de Nassau

A Deus
Aos meus pais, meu irmão e Bartholomeu.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente na minha vida, por me amparar, me dar forças e coragem nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Maria Isabel e Célio Manoel, pelo amor, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão Wanderson Alves, pelo apoio constante e incentivo.

A minha orientadora, Prof^a. Dra. Sônia Pereira Leite, pela oportunidade, sábios conselhos, além da amizade, confiança, paciência, incentivo e ensinamentos que contribuíram muito para minha formação pessoal e profissional.

A minha Coorientadora, Prof^a. Dra. Kristiana Cerqueira Mousinho, por todo amor que tem comigo desde a minha graduação. Serei eternamente grato por toda a sua ajuda na minha formação pessoal e profissional.

A toda minha família, especialmente minha avó Antônia por todo amor e carinho.

Aos meus companheiros de laboratório Renatha Cláudia, Tainá Santos, Marcos Aurélio, Jéssica de Andrade e Rayane Siqueira pela colaboração no trabalho, apoio, conselhos e por serem pessoas tão generosas que sempre estiveram dispostas a me ajudar.

A minha amiga Sandrine Arruda sou imensamente grato por ter me ajudado nessa grande jornada. Obrigado por sempre estar presente nas horas que eu mais precisei.

Aos meus amigos Kelly Guedes, Gabriela Mendonça, Dayane Nayara, Thannara Xavier, Karina Melo, Erick Oliveira, Katarine Melo, Manuela Purificação e Aline Côrte por escutarem meus desabafos, e sempre me darem forças.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa.

*Nenhuma condenação há para quem
está em ti, Jesus. (Armando Filho).*

RESUMO

Croton heliotropiifolius Kunth constitui uma espécie endêmica do Nordeste Brasileiro. É popularmente conhecida por suas propriedades medicinais de alívio da dor de estômago, na disenteria e antitérmico. O estudo foi desenvolvido investigando-se a presença de compostos químicos majoritários no extrato etanólico da casca do caule de *Croton heliotropiifolius* (EECroton) e seus efeitos toxicológicos. Foi realizada a cromatografia em camada delgada (CCD) para a identificação de seus constituintes químicos e para as avaliações toxicológicas foi utilizado ensaio *Artemia salina* Leach para determinação da concentração letal média (CL₅₀), e a toxicidade aguda utilizando camundongos albinos Swiss fêmeas onde foram observados consumo de água e ração e os parâmetros comportamentais, hematológicos, bioquímicos e histomorfométricos dos tecidos hepáticos e renais. Os metabólitos secundários encontrados foram: Cumarinas, flavonoides e terpenos. O EECroton apresentou uma toxicidade moderada com CL₅₀ de 396,6 µg/mL. Na toxicidade aguda foram observados uma diminuição no consumo de água e de ração no grupo tratado com EECroton (2000mg/kg). O EECroton não provocou alterações comportamentais persistentes, porém o animal 5 foi a óbito. O parâmetro hematológico não revelou nenhuma alteração. No Bioquímico foi observado uma redução significativa da concentração sérica de uréia do EECroton (54,2±10,5) em relação ao grupo controle (57,5±7,78). A histomorfometria da área (A) e perímetro (P) dos hepatócitos de camundongos tratados com EECroton (A-1,10; P- 1,20) apresentou valores significativo em relação ao controle (A - 0,98; P- 1,07). Para a área (A) e perímetro (P) dos corpúsculos renais de camundongos no grupo controle (A - 2,42; P 2,57) foi similar em relação ao grupo EECroton (2,57 P 2,51). Deste modo, os resultados obtidos, podemos concluir que o extrato estudado possui baixa toxicidade diante dos ensaios realizados, porém sugere-se o prosseguimento com estudos de atividades biológicas mais específicas.

Palavras – chaves: Artemia. Croton. Fitoquímica. Toxicidade.

ABSTRACT

Croton heliotropiifolius Kunth is an endemic species in Northeast Brazil. It is popularly known for its medicinal properties for relieving stomach pain, dysentery and antipyretic. The study was developed investigating the presence of major chemical compounds in the ethanolic extract of the stem bark of *Croton heliotropiifolius* (EECroton) and its toxicological effects. Thin layer chromatography (CCD) was performed to identify its chemical constituents and for toxicological evaluations, the *Artemia salina* Leach assay was used to determine the average lethal concentration (CL₅₀), and acute toxicity using female Swiss albino mice where they were observed water and feed consumption and behavioral, hematological, biochemical and histomorphometric parameters of liver and kidney tissues. The secondary metabolites found were: Coumarins, flavonoids and terpenes. EECroton showed moderate CL₅₀ toxicity of 396.6 µg / mL. In acute toxicity, a decrease in water and feed consumption was observed in the group treated with EECroton (2000mg / kg). EECroton did not cause persistent behavioral changes, but animal 5 died. The hematological parameter did not reveal any changes. In Biochemistry, a significant reduction in the serum urea concentration of EECroton (54.2 ± 10.5) was observed in relation to the control group (57.5 ± 7.78). The histomorphometry of the area (A) and perimeter (P) of the hepatocytes of mice treated with EECroton (A-1.10; P-1.20) showed significant values in relation to the control (A - 0.98; P- 1, 07). For the area (A) and perimeter (P) of the renal corpuscles of mice in the control group (A - 2.42; P 2.57) it was similar in relation to the EECroton group (2.57 P 2.51). Thus, the results obtained, we can conclude that the studied extract has low toxicity in the face of the tests carried out, however it is suggested to continue with studies of more specific biological activities.

Keywords: *Artemia*. *Croton*. Phytochemistry. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1- | Espécie <i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth..... | 20 |
| Figura 2- | Localização geográfica do Sítio de Malhada de Pedra, Caruaru – Pernambuco, Brasil..... | 25 |
| Figura 3- | Exsicata depositada no Herbário da UFPE..... | 26 |
| Figura 4- | Incubação dos cistos de <i>Artemia Salina</i> | 27 |
| Figura 5- | Organismos-testes expostos às diferentes concentrações do extrato etanólico da casca do caule de <i>C. heliotropiifolius</i> | 28 |
| Figura 6- | Porcentagem da viabilidade da <i>Artemia salina</i> nas concentrações estudadas..... | 31 |
| Figura 7- | Porcentagem das mortalidades nas concentrações estudadas..... | 31 |
| Figura 8- | Box-plot do consumo de água segundo o grupo avaliado. p-valor do teste de Mann-whitney..... | 33 |
| Figura 9- | Box-plot do consumo de ração segundo o grupo avaliado. p-valor do teste de Mann-whitney..... | 33 |
| Figura 10- | Fotomicrografia do tecido renal de camundongos albino Swiss (aumento 100x). (A) grupo controle; (B) grupo EECroton submetido a administração da dose de 2000mg/kg. A seta preta representa o Corpúsculo renal. A seta vermelha o túbulo contorcido proximal e a seta verde o túbulo contorcido distal..... | 36 |
| Figura 11- | Fotomicrografia de tecido de fígado de camundongos albino Swiss aumento (400X). (A) grupo controle. (B) grupo tratado EECroton na dose de 2000mg/kg. A seta vermelha representa veia centro lobular (VC). A seta verde representa o hepatócito. | |

| | | |
|-------------------|---|----|
| | Aumento 400x..... | 37 |
| Figura 12- | Box-plot da área dos hepatócitos dos camundongos dos grupos controle e tratados com EECroton. p-valor do teste de Mann-whitney..... | 38 |
| Figura 13- | Box-plot do perímetro segundo dos grupos avaliado. p-valor do teste de Mann-whitney..... | 39 |
| Figura 14- | Box-plot - área dos corpúsculos renais de camundongos dos grupos controle e tratados.p-valor do teste de Mann-whitney..... | 40 |
| Figura 15- | Box-plot - perímetro dos corpúsculos renais de camundongos dos grupos controle e tratados. p-valor do teste de Mann-whitney..... | 41 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Tabela 1- | Metabólitos majoritários do extrato etanólico da casca de caule <i>C. heliotropiifolius</i> | 30 |
| Tabela 2- | Mediana e amplitude interquartil do consumo de água e ração dos camundongos dos grupos controle e tratados..... | 32 |
| Tabela 3- | Evolução ponderal e peso relativo dos órgãos de camundongos albinos Swiis controle e tratados com EECroton..... | 34 |
| Tabela 4- | Parâmetros hematológicos de camundongos controle e tratados com EECroton na dose de 2000mg/kg..... | 35 |
| Tabela 5- | Parâmetros bioquímicos de camundongos grupos controle e tratados com EECroton na dose de 2000mg/kg..... | 36 |
| Tabela 6- | Mediana e amplitude interquartil da área e perímetro dos hepatócitos de camundongos dos grupos controle e tratado com EECroton na dose 2000mg/kg..... | 38 |
| Tabela 7- | Morfometria (Mediana e amplitude interquartil) da área e do perímetro dos corpúsculos renais de camundongos dos grupos controle e tratados..... | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| EECroton | Extrato etanólico da casca do caule de <i>Croton heliotropiifolius</i> |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| CL ₅₀ | Concentração Letal Média |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| IPA | Instituto Agronômico de Pernambuco |
| OECD | Organization for Economic Cooperation and Development |
| TGO | Transaminase Glutâmico-Oxalacética |
| TGP | Transaminase Glutâmico-Pirúvica |
| UFPE | Universidade Federal de Pernambuco |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 17 |
| 2.1 Considerações botânicas | 17 |
| 2.1.1 Família Euphorbiaceae | 17 |
| 2.1.2 Gênero Croton..... | 17 |
| 2.1.3 Considerações gerais sobre o <i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth..... | 19 |
| 2.2 Fitoquímica..... | 21 |
| 2.3 Atividades biológicas..... | 22 |
| 2.3.1 <i>Artemia salina</i> Leach..... | 22 |
| 2.3.2 Toxicidade Aguda..... | 23 |
| 3 OBJETIVOS | 24 |
| 3.1 Objetivo geral | 24 |
| 3.2 Objetivos específicos | 24 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 25 |
| 4.1 Comitê de ética na experimentação animal (CEUA) | 25 |
| 4.2 Modelo de estudo..... | 25 |
| 4.3 Coleta e identificação do material botânico..... | 25 |
| 4.4 Preparação do extrato..... | 26 |
| 4.4.1 Perfil fitoquímico de <i>C. heliotropiifolius</i> | 26 |
| 4.5 Ensaio da Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> | 26 |
| 4.6 Ensaio de Toxicidade aguda | 28 |
| 4.7 Análise histopatológica e histomorfométrica | 29 |
| 4.8 Análise estatística | 29 |
| 5 RESULTADOS | 30 |
| 5.1 Perfil fitoquímico do extrato etanólico da casca do caule de <i>C. heliotropiifolius</i> .. | 30 |
| 5.2 Ensaio Toxicológicos..... | 30 |
| 5.2.1 Potencial toxicológico do EECroton frente à <i>Artemia salina</i> Leach | 30 |
| 5.2.2 Toxicidade Aguda..... | 31 |
| 5.2.2.1 Avaliação do consumo de água e ração | 32 |
| 5.2.2.2 Evolução ponderal e peso relativo | 34 |

| | |
|--|----|
| 5.2.2.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos | 35 |
| 5.2.2.4 Avaliação histológica dos tecidos renais e hepático..... | 36 |
| 5.2.2.5 Avaliação histomorfométrica | 37 |
| 5.2.2.5.1 Área e perímetro dos hepatócitos | 37 |
| 5.2.2.5.2 Área e perímetro dos corpúsculos renais..... | 39 |
| 6 DISCUSSÃO | 42 |
| 6.1 Perfil fitoquímico..... | 42 |
| 6.2 Atividades Toxicológicas | 43 |
| 6.2.1 <i>Artemia salina</i> Leach..... | 43 |
| 6.2.2 Toxicidade aguda | 43 |
| 6.2.3 Avaliação histomorfométrica dos tecidos hepáticos e renais | 45 |
| 7 CONCLUSÕES | 47 |
| REFERÊNCIAS | 48 |
| ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ETICA DE USO ANIMAL (CEUA) ... | 55 |
| ANEXO B - EXSICATA DEPOSITADA NO HERBÁRIO | 57 |

1 INTRODUÇÃO

O poder medicinal das plantas é tão primitivo quanto à origem da espécie humana. Desde a antiguidade sempre estiveram dependentes do reino vegetal, o que permitiu evidenciar empiricamente o seu potencial farmacológico (ARAÚJO; LEMOS, 2015). Por muito tempo, o uso tradicional das ervas constituiu-se como o principal auxílio medicinal utilizado no tratamento da saúde. No entanto, com o avanço tecnológico ocasionou no surgimento de novos protocolos farmacológicos, dando início aos medicamentos industrializados (ALMEIDA et al., 2017). Estes tratamentos ganharam o gosto e a confiança da população moderna, o que enfraqueceu o uso medicinal das plantas (BADKE et al., 2011).

De modo geral, os benefícios proporcionados pelo uso medicinal das espécies vegetais são esperançosos para a saúde, contanto que haja conhecimento prévio das utilidades, vantagens e riscos. Desta forma, os profissionais da saúde devem estar atentos ao seu uso tradicional, tendo em vista os valores culturais e de estilo de vida das comunidades submetida aos tratamentos (ISERHARD et al., 2009). Mudanças socioeconômicas mundiais inspiram os modelos de saúde e ocasionaram, no decorrer dos anos, o resgate do uso terapêutico dos recursos naturais que havia sido esquecido, fazendo com que as plantas retomem espaço e competitividade com os medicamentos convencionais (ALVIM et al., 2004).

No Brasil, o Ministério da Saúde destinou 6,7 milhões no ano de 2012, ao projeto “Arranjos Produtivos Locais de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no SUS”, com o objetivo de investir na aquisição de equipamentos e materiais, contratação de profissionais e qualificação técnica para promover a interação e a colaboração entre os agentes produtivos, a produção e a distribuição de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS (PORTAL DA SAÚDE, 2012). Deste modo, estudos fitoquímicos e etnofarmacológicos são cada vez mais importantes para ampliar os conhecimentos do uso popular de extratos naturais, comprovar cientificamente as atividades de seus componentes, além de ajudar na busca de princípios ativos contra diversas enfermidades (GONÇALVES et al., 2017).

Tais estudos são favorecidos pela disponibilidade de matéria prima, diversidade de compostos químicos, baixo custo, e seus resultados, muitas vezes superam os fármacos já existentes. Como por exemplo, muitos vegetais tem amplo espectro de atividade 18 antimicrobiana (ALMEIDA; SCHEFFER, 2012). O potencial

de alguns extratos de plantas em retardar ou inibir a oxidação de moléculas através da supressão de reações de oxidação em cadeia, confere efeito protetor que torna a sua utilização uma alternativa na medicina complementar (MAHBOUBI et al, 2013), pois o estresse oxidativo crônico é responsável por muitas doenças degenerativas, tais como: asma, doenças gastrointestinais, doenças cardíacas, doenças autoimunes e Alzheimer (LUSHCHAK, 2014; SIES, 2015).

Diante de todo esse potencial, uma medida prioritária é a determinação da capacidade tóxica de um produto vegetal, uma vez que vários compostos podem ser capazes de causar efeitos nocivos. Portanto, é recomendado que novos extratos ou extratos de ação ainda desconhecida sejam analisados quanto ao comportamento celular em meio controlado, livre das complexas interações do organismo. As vantagens dessas metodologias são, além do controle ambiental das células, a facilidade de execução e a rapidez (FRESHNEY, 2000).

A região Nordeste do Brasil comporta uma rica diversidade de uso de plantas com a finalidade medicinal, o que pode ser explicado por sua flora e pela interação de diferentes culturas (ALBULQUERQUE et al., 2010).

A espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth, popularmente conhecida como “velame”, “velaminho” e “velame-de-cheiro” devido aos seus minúsculos pelos, é endêmica no Nordeste Brasileiro e pode ser encontrada com frequência na vegetação da Caatinga, brejos, restingas e cerrado (RANDAU, 2001). Estudos voltados para o *C. heliotropiifolius* constataram a presença predominante de alcalóides, polifenóis e compostos redutores, sendo referido pela população como útil no alívio da dor de estômago, na disenteria e antitérmico (RANDAU, 2001). Assim, visando à importância de análises fitoquímicas e biológicas de plantas para a sua aplicação medicinal, este trabalho propôs-se investigar o perfil fitoquímico do extrato etanólico da casca do caule de *C. heliotropiifolius* (EECroton) e avaliar o seu potencial toxicológico in vitro e in vivo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações Botânicas

2.1.1 Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae destaca-se entre as angiospermas ocupando os mais variados tipos de vegetação e habitats, principalmente nos trópicos e subtropicais da América e África. Os membros desta família englobam cerca de 8000 espécies, 317 gêneros e 52 tribos (CREPALDI et al., 2016; TRINDADE; LAMEIRA, 2014).

Na flora brasileira é conhecida como uma das maiores e mais complexas famílias da ordem Malpighiales, compreendendo 64 gêneros e 940 espécies. As espécies que formam o grupo de Euphorbiaceae são assiduame

nte citadas como pioneiras constituídas por uma diversidade de plantas que vão desde grandes árvores, como por exemplo, *Hevea brasiliensis*, encontrada na selva amazônica, até ervas daninhas simples que crescem prostradas ao solo (CREPALDI et al., 2016; SODRÉ; SILVA, 2015; BARRERA et al., 2016; SANGHA; GAYATRI, 2014).

No que diz respeito à morfologia, são geralmente distinguida pela seiva leitosa (quando presente), folhas alternas, simples ou compostas, com estipulações, inflorescência cimosas, racemosas, espiciforme ou pseudantial, flores unissexuadas, geralmente monoperiantadas, em plantas monóicas ou dióicas, frutos esquizocarpo ou capsular, sementes com ou sem carúncula (BARRERA et al., 2016; SANGHA; GAYATRI, 2014; COSTA; SECCO; GURGEL, 2018).

Euphorbiaceae inclui um número de plantas que desempenham um importante papel no ramo econômico, como a mandioca (*Manihot esculenta*), que faz parte da alimentação base de boa parte do nordeste brasileiro através do consumo direto e da farinha de mandioca. A mamona (*Ricinus communis*), utilizada como matéria-prima para extração de óleo com diversos fins farmacêuticos e industriais. A seringueira (*Hevea brasiliensis*), conhecida pela produção de látex que compõe a maior parte (99%) da fabricação mundial de borracha natural (LAU et al., 2016; DRUMOND et al., 2019).

2.1.2 Gênero Croton

Croton é o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae compreendendo aproximadamente 1300 espécies comuns na África, Ásia e América do Sul. O Brasil é o centro da diversidade de *Croton*, com mais de 350 espécies distribuídas em todo o bioma brasileiro (Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Caatinga), dentre as quais 68 destas espécies são encontradas apenas em Caatinga, tipo de vegetação exclusivamente brasileira. Sua ampla distribuição geográfica e sua considerável diversidade morfológica fazem com que o *Croton* seja considerado um grupo de alta complexidade taxonômica (OSATHANUNKUL et al., 2015; CANELO et al., 2017; SODRÉ; DA SILVA, 2015; ARAÚJO et al., 2017; ALMEIDA; RAMALHO; SILVEIRA, 2018).

O gênero *Croton* foi proposto por Linnaeus em 1753 ao descrever 13 espécies da Ásia e África na primeira edição de *Species Plantarum*. No Brasil, estudos recentes salientaram a alta diversidade de *Croton*, tais como: Sodr e e Silva (2015), através de um levantamento taxon mico do g nero, na Floresta Nacional de Silvânia, identificaram dez espécies de *Croton*. Posteriormente, Santos; Riina; Caruzo (2016) reconheceram 20 espécies no Estado do Espírito Santo, contribuindo para enriquecimento do conhecimento acerca do *Croton* na floresta atlântica e no Brasil. Caruzo, Pereira e Cordeiro (2019), registraram a ocorrência de 40 espécies de *Croton* no estado de São Paulo, enquanto Farias; Medeiros; Riina (2019), descreveram a morfologia completa de uma nova espécie de sangue de dragão nominada como *Croton rizzinii*, localizada na Serra dos  rg os (RJ).

Athi -Souza et al. (2019), forneceram um inventário focado na flora do Parque Nacional do Catimbau situado em Pernambuco, incluindo 613 espécies pertencentes a 85 famílias. A Euphorbiaceae ficou entre as três famílias mais ricas em espécies, com destaque para o *Croton* com um total de 18 spp, algumas destas: *C. heliotropiifolius* Kunth, *C. campestris* A. St. – Hill, *C. glandulosus* L., *C. tricolor* Klotzsch ex Baill., *C. pedicellatus* Kunth.

A diversidade química apresentada por esse g nero oferece um arsenal de compostos com elevado potencial farmacológico devido à presença de diterpenos *labdano*, triterpenos, esteróides, alcalóides, substâncias fenólicas e flavonóides. Além destes metabólitos, muitas das espécies de *Croton* produzem óleos essenciais ricos em fenilpropanoides, mono e sesquiterpenoides (BARRERA et al., 2016; ARRAIS et al., 2014, ALMEIDA; RAMALHO; SILVEIRA, 2018).

No uso popular, as espécies de *Croton* são comumente utilizadas sob a forma de chás e infusões para o alívio de dores, tratamento de distúrbios digestivos, hipercolesterolemia, antiinflamatórios, antiulcerogênicos, analgésicos, antidiabéticos e antimaláricos (ARRAIS et al., 2014; ARAÚJO et al., 2017).

2.1.3 Considerações gerais sobre o *Croton heliotropiifolius* Kunth

O *Croton heliotropiifolius* Kunth (Figura 1), popularmente conhecido como “velame”, “velaminho” e “velame-de-cheiro”, devido aos seus minúsculos pelos, é uma espécie comumente encontrada no Brasil nas regiões Nordeste (compreendendo os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe), Centro-Oeste (abarcando o Distrito Federal e Goiás) e Sudeste (englobando o estado de Minas Gerais) (SILVA et al., 2017 a; ARAÚJO et al., 2017).

Dependendo da sua localização, o *C. heliotropiifolius* mostra grande variação no tamanho e forma das folhas, cor da penugem e comprimento das inflorescências. Esta espécie apresenta-se como subarbusto ou arbusto com até dois metros de altura, provido de látex incolor, creme a avermelhado (quando oxidado). Os galhos têm forma cilíndrica e coloração cinza-esverdeado, quanto as folhas, são alternas e ligeiramente subopostas no ápice podendo possuir margem inteira ou serrilhada. As flores estão dispostas em inflorescências terminais, racemiformes, congestas. O fruto é uma cápsula, oblonga a subglobosa. Suas sementes são elípticas a oblongas, com tegumento castanho a preto. A época de floração e frutificação compreende os meses de maio e junho (OLIVEIRA et al., 2016; SILVA et al., 2017b).

Na prospecção fitoquímica realizada por Rodrigues et al. (2017), foi identificada no extrato etanólico das folhas de *C. heliotropiifolius* a presença de taninos condensados, flavonóides, flavononas, flavonóis, flavononóis, catequinas e xantonas.

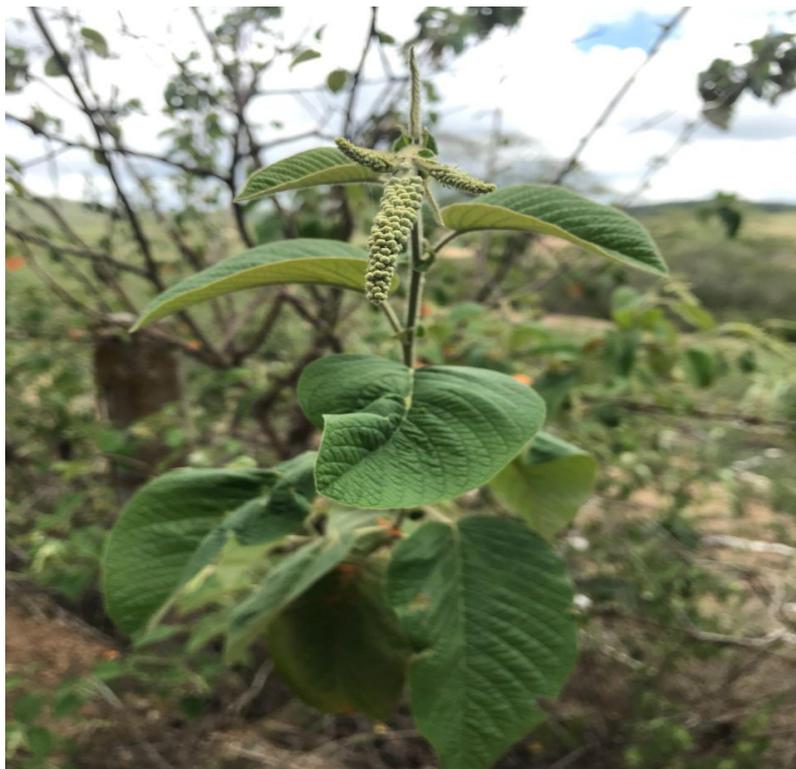


Figura 1. Espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth (Fonte: Autor, 2019)

A infusão de raízes (imersa em água) de *C. heliotropiifolius* tem sido utilizada na medicina popular para tratamento da gripe, dor geral, inflamação e dermatite (SARAIVA et al., 2015), as folhas e casca são usadas como infusões ou pílulas para perda de peso e distúrbios gastrointestinais (QUEIROZ et al., 2014). Alguns estudos do óleo essencial de *C. heliotropiifolius* demonstraram que este apresentou efeito antibacteriano (ARAÚJO et al., 2017), larvicida (DIAS e MORAES, 2014) e o extrato etanólico confirmou atividade inseticida significativa contra *Sitophilus zeamais* (SILVA et al., 2012).

Filho e colaboradores (2017) realizaram o primeiro estudo da variação da composição química do óleo essencial de *Croton heliotropiifolius* nas quatro estações do ano e atividade antibacteriana. A pesquisa demonstrou que o principal constituinte do óleo essencial das folhas dessa espécie era o β -cariofileno e em todas as análises, observou-se que a amostra de óleo essencial coletada no verão se destaca das demais estações, apresentando maior atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Análises com os extratos botânicos de *C. heliotropiifolius* resultaram na comprovação de ação antioxidante atribuída, provavelmente, pela presença de

compostos fenólicos identificados na investigação fitoquímica de extrato etanólico da planta, principalmente taninos e flavonóides (RODRIGUES et al., 2017).

Silva et al. (2017) avaliaram o efeito citotóxico do extrato metanólico de *Croton heliotropiifolius* Kunth, os resultados demonstraram uma porcentagem baixa a média de inibição do crescimento celular nas linhas de células tumorais, sendo respectivamente, (59,5%) em células tumorais de leucemia promielocítica aguda, (46,5%) no carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano, (26,7%) em carcinoma de laringe humano e (21,7%) nas células de adenocarcinoma de mama humano.

2.2 Fitoquímica

A fitoquímica é a área de conhecimento responsável por elucidar, caracterizar a estrutura química e avaliar as propriedades biológicas, além de registrar as substâncias provenientes das drogas vegetais (FILHO, 2010). A prospecção fitoquímica é um estudo preliminar que irá detectar a presença dos compostos de determinada planta e caracterizá-los. Por se tratar de um estudo básico para a investigação de plantas medicinais, é importante para orientar as etapas seguintes a serem realizadas na produção de fitoterápicos ou medicamentos de origem vegetal.

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos produzidos pela célula vegetal como derivação do metabolismo primário. Não possuem função vital para a planta, mas garantem a sua sobrevivência, reprodução e dispersão por possuírem a capacidade de proteção contra raios UV, atração de polinizadores e dispersores de sementes, ação contra herbívoros, comunicação entre plantas, entre outras (OOTANI et al., 2013; WINK, 2013).

Ensaio fitoquímico têm sido utilizados em muitos trabalhos (ESTEVAM et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010; CANUTO; SILVEIRA; BEZERRA, 2010) com o objetivo de demonstrar e registrar os constituintes resultantes do metabolismo secundário de plantas.

Para obtenção dessas informações são empregadas metodologias como separações cromatográficas, que são capazes de determinar a concentração dos compostos presentes, fazendo com que haja segurança e confiabilidade nos resultados (OBRADOVIC et al., 2007). Técnicas cromatográficas como a cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida e de alta eficiência, (CLAE) têm sido largamente utilizadas tanto para o estudo fitoquímico,

quanto na química analítica para o controle de qualidade de plantas medicinais, visto que proporcionam vantagens como a alta eficiência e rapidez (RIBANI et al., 2004).

2.3 Atividades biológicas

2.3.1 *Artemia salina* Leach.

Artemia salina é um microcrustáceo que vive em lagos de água salgada e salinas em todo o mundo pertencente a ordem Anostraca (ausência de carapaça), podendo tolerar salinidades que variam de 3,5 a 70% estando adaptada para sobrevivência em corpos de água que sofrem grandes variações sazonais. Seus ovos podem ser encontrados com facilidade em lojas de aquaristas devido ser amplamente utilizada como alimento vivo para peixes e outros crustáceos. Os ovos de artêmia quando não eclodidos são metabolicamente inativos, e podem ser conservados por longos períodos se mantidos desidratados e de preferência em vácuo e a 26 baixas temperaturas (MILANI; ZIOLLI, 2005).

Quando os ovos de *Artemia salina* são re-hidratados podem eclodir por cerca de 24 horas, se em condições ambientais adequadas, chegam à fase adulta com 20 a 30 dias de vida. Por apresentar um ciclo de vida relativamente curto o seu uso é favorecido em testes de toxicidade aguda e crônica (MILANI; ZIOLLI, 2005).

A *Artemia sp*, é um braquiópoda, pertencente ao filo Arthropoda conhecida também como camarão de salmoura. Devido à relativa resistência a fatores de estresse ambiental como variações abruptas de salinidade, de temperatura e de oxigênio dissolvido esta espécie está distribuída ao longo dos cinco continentes, sendo considerada cosmopolita e adaptada a vários ambientes. Ainda, devido à ampla distribuição geográfica e resistência ambiental desde a década de 50, *Artemia sp* é usada em inúmeros estudos sobre ecotoxicidade (TAS) e na avaliação de produtos como pesticidas, derivados petroquímicos e dispersantes, metais pesados, derivados carcinogênicos e metabólitos de microrganismos. (BEVILACQUA, A.; SUFFREDINI, I. B.; BERNARDI, M. M. 2008).

Há trabalhos que tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* em atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana, parasiticida, tripanossomicida, entre outras. No intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas, muitos

laboratórios de Produtos Naturais vêm inserindo dentro de suas rotinas o isolamento, purificação e elucidação estrutural em diversos ensaios biológicos simples. (SIQUEIRA et al., 1998).

Artemia spp ganhou popularidade como um organismo de ensaio devido à sua facilidade de cultura, tempo de geração curto, de distribuição cosmopolita e da 27 disponibilidade comercial de seus ovos dormentes (cistos). Dado que os animais de teste de eclosão de cistos são da mesma idade, genótipo e condição fisiológica, o teste de variabilidade é significativamente reduzido (KOUTSAFTIS; AOYAMA, 2007).

2.3.2 Toxicidade Aguda

O ensaio de toxicidade aguda é a etapa inicial para investigar o potencial tóxico sistêmico de uma substância administrada em única dose. Este teste pode sugerir a escolha da dose para os testes de toxicidades adicionais e fornecer informações relevantes sobre os riscos que essa substância pode causar à saúde animal e humana (SCANDELAI et al., 2019).

O principal objetivo do teste não é calcular a dose letal mediana (DL_{50}), que representa a dose capaz de matar metade dos animais em estudo, e sim obter informações suficientes para permitir a classificação de acordo com o grau de toxicidade ou letalidade da substância (SCANDELAI et al., 2019).

Para realização do teste, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organization for Economic Cooperation and Development; OECD) recomenda que sejam utilizados camundongos ou ratos fêmeas e um número de três animais em cada etapa do experimento, onde a ausência ou presença de morte dos animais tratados determinará a necessidade de etapas seguintes. Além disso, a administração oral é a mais aconselhada, e a dose limite de 2000 mg/Kg é suficiente para estimar a DL_{50} (OECD, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o perfil fitoquímico e avaliar o potencial toxicológico do extrato etanólico da casca de caule de *Croton heliotropiifolious*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil fitoquímico da casca de caule de *Croton heliotropiifolious*;
- Avaliar a toxicidade in vitro do extrato etanólico da casca de caule de *Croton heliotropiifolious*, frente à *Artemia salina*;
- Avaliar a toxicidade in vivo do extrato etanólico da casca de caule de *Croton heliotropiifolious* em camundongos albinos swiss;
- Realizar a análise histopatológica e histomorfométrica dos hepatócitos e corpúsculos renais em camundongos albinos swiss submetidos ao tratamento extrato etanólico da casca de caule de *Croton heliotropiifolious*

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA)

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal de Pernambuco sob o N° 0072/2018 (**ANEXO 1**).

4.2 Modelo de estudo

O estudo teve delineamento do tipo laboratorial experimental, sendo realizado na Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, em parceria com os pesquisadores dos seguintes departamentos: Departamento de Histologia e Embriologia, Departamento de botânica e Departamento de antibióticos.

4.3 Coleta e Identificação do Material botânico

A espécie *C. heliotropiifolius* foi coletada em Caruaru/PE, no sítio de Malhada de Pedra (Caruaru) (Figura 2), no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), no dia 02/03/2018. O material botânico foi depositado no Herbário Geraldo Mariz na Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências/Departamento de Botânica sob o N°83425 (Figura 3).

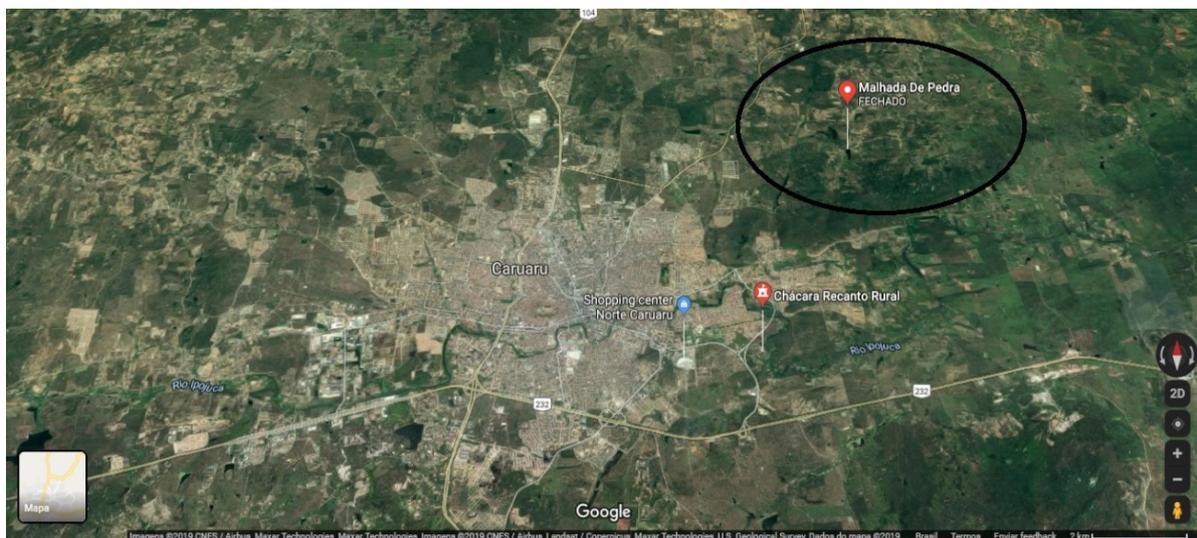


Figura 2. Localização geográfica do Sítio de Malhada de Pedra, Caruaru – Pernambuco, Brasil.
Fonte: Google Maps.



Figura 3. Exsicata depositada no Herbário da UFPE. Fonte: (Autor, 2019).

4.4 Preparação do Extrato

Foram pesadas 50 g da casca do caule de *C. heliotropiifolius* (EECroton), reduzidas a um menor tamanho em moinho de facas e a elas adicionado álcool etílico P.A. (500 ml), deixando-se a mistura sob extração por 72h. Após filtração foi rotaevaporado à 40° C, obtendo um material de aspecto viscoso e posteriormente calculado seu rendimento.

4.4.1 Perfil Fitoquímico de *C. heliotropiifolius*

O perfil fitoquímico foi realizado através de cromatografia em camada delgada (CCD), onde seguiu os procedimentos estabelecidos por Wagner e Bladt¹² com adaptações. Para a realização do procedimento foram utilizadas cromatoplasas de alumínio de sílica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após obtenção do extrato de *C. heliotropiifolius* foi avaliado por CCD, a fim de detectar a presença de metabólitos secundários: Alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas e terpenos.

4.5 Ensaio da Toxicidade frente à *Artemia salina* Leach

Seguiu-se a metodologia descrita por Meyer e colaboradores com adaptações, onde foram utilizadas as larvas na forma de metanúplios, utilizando-se como análise a Concentração Letal Média (CL₅₀). Os cistos de *Artemia salina* foram incubados em um recipiente contendo 500 mL de solução salina (Figura 4), com isso, obtendo o estágio metanúplio. O recipiente foi colocado dentro de uma incubadora iluminada por uma lâmpada fluorescente, no qual foram adicionados 0,2 mg de cistos de *A. salina*, mantendo a água em aeração constante, com auxílio de um compressor de aeração para aquário. A incubação foi feita durante o período de 48 horas. Logo em seguida, os organismos-testes foram expostos às diferentes concentrações (50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL) do extrato etanólico da casca do caule de *C. heliotropiifolius*, por 24 horas, utilizando-se tubos de ensaio, cada um contendo 10 metanúplios de *A. salina* (Figura 5). Foi utilizado 0,3 mL de Carboximetilcelulose 1% (CMC) para a diluição do extrato. Os testes foram feitos em triplicatas para cada concentração. Um grupo controle foi preparado contendo os metanúplios em água do mar e 0,3 mL de Carboximetilcelulose (CMC). Logo em seguida, permaneceu em incubação sob luz artificial durante 24 h e foi realizada a contagem dos metanúplios vivos e mortos para a obtenção da CL₅₀. A vitalidade da *A. salina* foi definida considerando o movimento dos microcrustáceos. Para a determinação da CL₅₀ foi utilizado o programa *GraphPadPrism* 6.0® e para a tabulação dos dados foi utilizado o programa *Microsoft Excel* 2010®.



Figura 4. Incubação dos cistos de *Artemia Salina*. Fonte: (Autor, 2019).



Figura 5. Organismos-testes expostos às diferentes concentrações do extrato etanólico da casca do caule de *C. heliotropiifolius*. Fonte: (Autor, 2019).

4.6 Ensaio de Toxicidade aguda

Foram utilizados 12 camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas procedentes do Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE, com faixa etária de 60 dias, pesando 25 ± 5 g, separados por 2 grupos de 3 animais em cada gaiola. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente $23 \pm 2^\circ\text{C}$ sob o ciclo claro/escuro, com água e alimento a vontade durante o experimento.

O grupo teste recebeu por via oral o extrato etanólico da casca de caule *C. heliotropiifolius* na dose de 2000 mg/kg (grupo tratado) e Carboximetilcelulose 1% (CMC) utilizado como grupo controle. Após a administração, os animais foram observados nas primeiras horas e depois a cada 24 h diariamente (OECD, 2001). Em seguida foi utilizado o método de screening hipocrático, o qual examina aspectos importantes dos animais como: o estado de consciência, disposição,

atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular, atividade do sistema nervoso central e autônomo. Também foi observado o consumo de água, ração e peso dos animais. No 14º dia, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com Cetamina (90 - 120mg/kg IP) + Xilazina (5- 10 mg/kg IP) / em seguida coletado sangue por punção cardíaca dos animais devidamente anestesiados e para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos possíveis efeitos tóxicos sistêmicos, os órgãos (fígado, rins) foram extirpados e seus índice calculado seguindo a fórmula: Índice = Peso do órgão (g) / Peso do animal (g).

4.7 Análise histopatológica e histomorfométrica

As amostras dos tecidos renal e hepáticos foram retiradas para os ensaios histopatológicos e histomorfométricos foram fixadas em formalina tamponada neutra a 10% por um período de 24 horas. Em seguida, desidratadas com etanol, clareada com xilol e infiltrada com parafina. Cortes de aproximadamente 5 µm de espessura foram realizados e as amostras coradas com hematoxilina/eosina. Para análise histomorfométrica das preparações histológicas foram fotografadas no microscópio Olympus BX-50 (Aumento de 100x e 400x), digitalizadas pelo programa DP2-BSW e submetidas à padronização específica do programa *Image J* 1.51. Quanto à análise estatística, os valores foram expressos como média ± SEM ($n = 3$ para cada grupo).

4.8 Análise estatística

Para análise dos dados foi construído um banco na planilha eletrônica Microsoft Excel a qual foi exportada para o software SPSS, versão 18, onde foi realizada a análise. Foi avaliada a normalidade consumo de água e ração e histomorfometria da área e perímetro dos hepatócitos e corpúsculos renais utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Uma vez indicada a não normalidade das medidas em algum dos grupos foram calculadas as medianas e amplitude interquartil para representação da área e do perímetro. A comparação entre o grupo controle e EECroton foi feita pela aplicação do teste de Mann-Whitney. O resultado dos dados foram expresso pelo nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil fitoquímico do extrato etanólico da casca do caule de *C. heliotropiifolius*

Foi obtido um rendimento de 8% a partir de 50 g casca de caule de *C. heliotropiifolius*. O extrato mostrou presença predominante de cumarinas, flavonoides e terpenos, e a ausência de alcaloides, saponinas e taninos, como esta representada na Tabela 1.

Tabela 1. Metabólitos majoritários do extrato etanólico da casca de caule *C. heliotropiifolius*.

| Classes de Metabólitos | Resultado |
|-------------------------------|------------------|
| Alcaloides | - |
| Cumarinas | + |
| Flavonoides | + |
| Saponinas | - |
| Taninos | - |
| Terpenos | + |

Expressão dos resultados: (+) positivo; (-) negativo

5.2 Ensaio Toxicológicos

5.2.1 Potencial toxicológico do EECronton frente à *Artemia salina* Leach

O resultado mostrou que o extrato etanólico apresentou uma toxicidade moderada com CL_{50} de 396,6 $\mu\text{g/mL}$. A Figura 6 mostra a porcentagem da viabilidade frente à *A. salina*, onde quanto menor a concentração do extrato maior o número de metanúplios vivos, enquanto para a mortalidade é o inverso, quanto maior a concentração do extrato maior a taxa de mortalidade (Figura 7)

Quando na avaliação de extratos vegetais apresentarem uma CL_{50} inferior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ são considerados bioativos. Podendo considerar que o extrato tem uma baixa toxicidade quando a CL_{50} for superior a 500 $\mu\text{g/mL}$; moderada para CL_{50} entre 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$ e muito tóxico quando a CL_{50} for inferior 100 $\mu\text{g/mL}$ (MEYER et al., 1982).

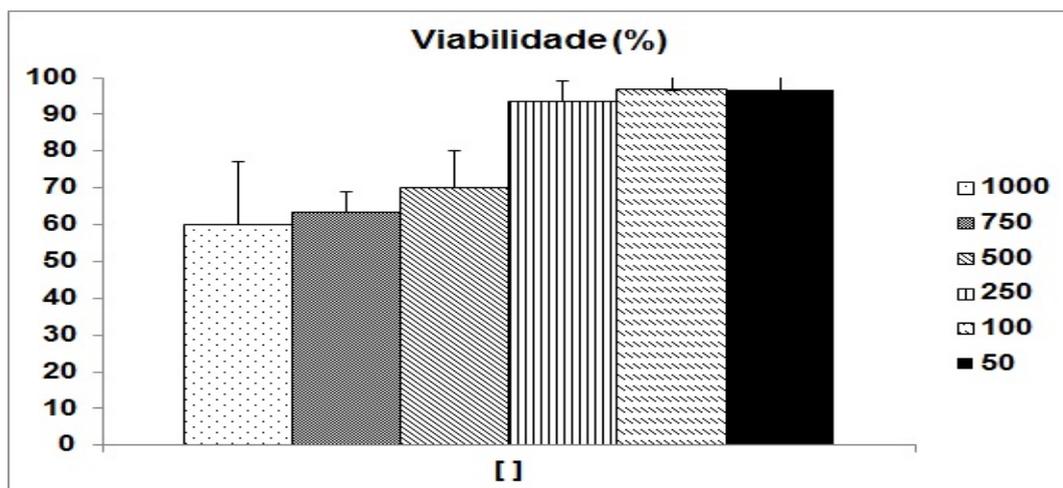


Figura 6. Porcentagem da viabilidade da *Artemia salina* nas concentrações estudadas.

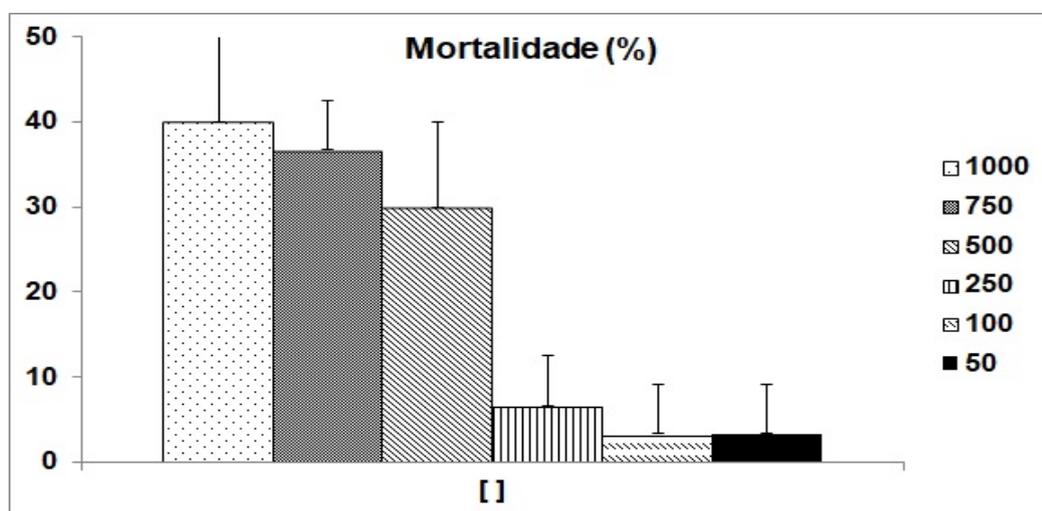


Figura 7. Porcentagem das mortalidades nas concentrações estudadas.

5.2.2 Toxicidade Aguda

No presente estudo não foram observadas alterações persistentes comportamentais, porém o animal 5 foi a óbito após tratamento com o EECroton. Durante a análise comportamental algumas alterações se mostraram presentes até 2h após a administração do extrato testado e foram: agitação, resposta ao toque e movimentos estereotipados.

A estimativa da DL_{50} foi superior a 2000 mg/kg, sendo considerado de baixa toxicidade de acordo com o método de classes preconizado pela OECD 423 (OECD, 2001). A dose seguinte a ser testada seria a de 5000 mg/kg.

Ao final dos 14 (quatorze) dias, os órgãos (rins e fígado) foram removidos e pesados, e analisados de forma macroscópica quanto a sua coloração,

consistência, presença de petéquias ou pontos hemorrágicos. Não sendo observado qualquer sinal de alteração.

5.2.2.1 Avaliação do consumo de água e ração

Na tabela 2 representa a mediana (M) e amplitude interquartil do consumo de água e de ração, de acordo com o grupo de tratamento. Verifica-se maior mediana do consumo de água no grupo controle (M = 32,75) em comparação ao grupo EECroton (M= 20,18). Ainda, observa-se que o teste de comparação de distribuição foi significativo (p-valor = 0,003), indicando que os animais do grupo controle apresenta maior consumo de água.

Para ração foi encontrada situação semelhante, foi observado maior nível de consumo de ração no grupo de animais do grupo controle (M = 18,75) em comparação ao grupo EECroton (M= 12,68). O teste de comparação distribuição foi significativo (p-valor = 0,003), indicando que o grupo controle costuma ter maior demanda alimentar do que o grupo EECroton.

Tabela 2. Mediana e amplitude interquartil do consumo de água e ração dos camundongos dos grupos controle e tratados.

| Grupos | Consumo | |
|----------------------|--------------|--------------|
| | Água | Ração |
| Controle | 32,75 (5,93) | 18,75 (2,36) |
| EECroton | 20,18 (5,36) | 12,68 (2,93) |
| p-valor ¹ | 0,003 | 0,003 |

¹ p-valor do teste de Mann-whitney.

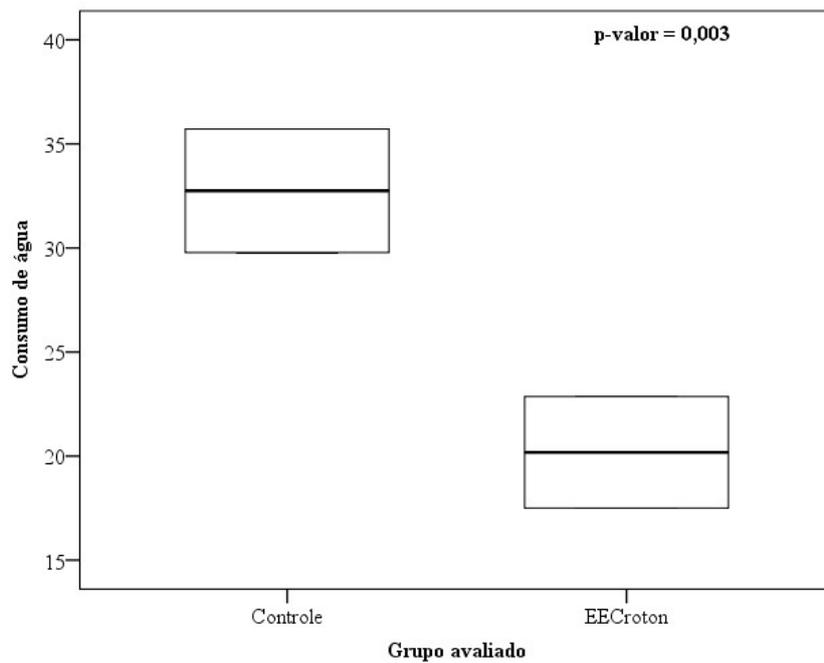


Figura 8. Box-plot do consumo de água segundo o grupo avaliado. p-valor do teste de Mann-whitney.

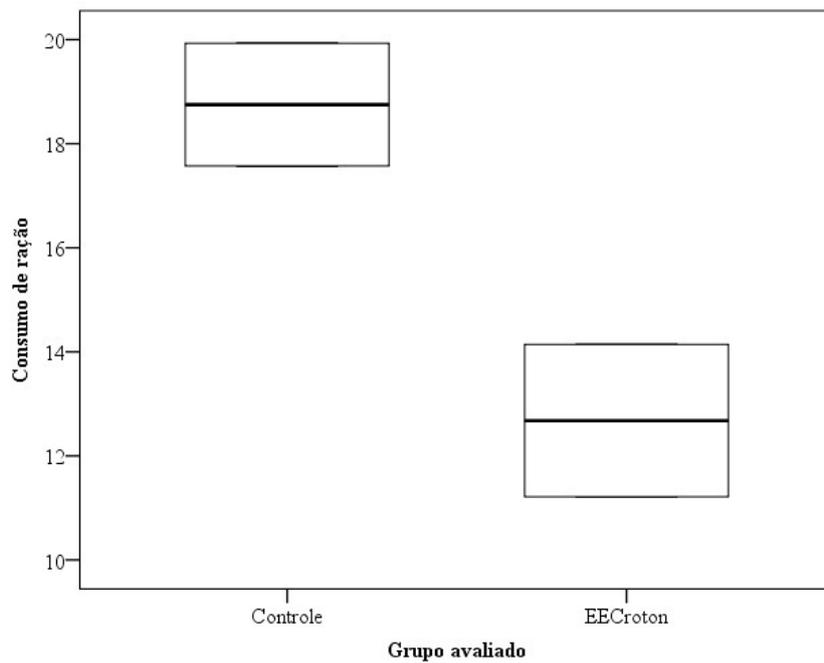


Figura 9. Box-plot do consumo de ração segundo o grupo avaliado. p-valor do teste de Mann-whitney.

5.2.2.2 Evolução ponderal e peso relativo

Tabela 3. Evolução ponderal e peso relativo dos órgãos de camundongos albinos Swiis controle e tratados com EECroton.

| Grupos | Peso dos animais (g) | Peso relativo dos órgãos | |
|---------------|-----------------------------|---------------------------------|------------|
| | Inicial/Final | Fígado | Rim |
| Controle | 37,8 ± 0,7 – 30,1 ± 1,0 | 2,00 ± 0,0 | 0,51 ± 0,0 |
| EECroton | 31,0 ± 0,8 – 28,0 ± 1,9 | 1,68 ± 0,0 | 0,48 ± 0,0 |

Os valores são expressos como média ± SEM ($n = 3$ para cada grupo).

5.2.2.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

A tabela 4 expressa os resultados dos parâmetros hematológicos dos grupos controle e tratados com EECroton, onde observa-se que não houve alteração nos níveis hematológicos.

A investigação dos efeitos toxicológicos do EECroton através das análises bioquímicas não revelou alterações na atividade enzimática de TGO (transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (transaminase glutâmico-pirúvica) dos animais do grupo controle e dos submetidos a dose de 2000mg/kg de EECroton.

Ainda em relação aos parâmetros bioquímicos, na avaliação da função renal, foi possível observar um aumento da concentração sérica de uréia dos camundongos tratados com EECroton na dose de 2000mg/kg ($54,2 \pm 10,5$) e do grupo controle ($57,5 \pm 7,78$). Não foram observadas alterações significativas na concentração sérica de creatinina na dose testada do EECroton, como pode ser observado na tabela 5.

Tabela 4. Parâmetros hematológicos de camundongos controle e tratados com EECroton na dose de 2000mg/kg.

| Animais/ Parâmetros | PARÂMETROS NORMAIS | Controle | EECroton |
|-------------------------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| Hemácias ($10^6 / \text{mm}^3$) | 9,0- 11,3 | $8,6 \pm 0,74$ | $8,8 \pm 0,69$ |
| Hemoglobina (g/dL) | 13,5- 17,0 | $10,2 \pm 1,00$ | $11 \pm 0,97$ |
| Hematócrito (%) | 45-55 | $45,3 \pm 4,20$ | $44 \pm 4,43$ |
| VCM (μg) | 47-55 | $52,8 \pm 1,83$ | $49,6 \pm 1,80$ |
| HCM (pg) | 13-16 | $11,9 \pm 0,43$ | $12,5 \pm 0,25$ |
| CHCM (%) | 29-34 | $22,5 \pm 0,60$ | $25,3 \pm 0,52$ |
| Leucócitos ($10^3 / \text{mm}^3$) | 2- 10 | $3,2 \pm 0,74$ | $6,1 \pm 1,32$ |

Os valores são expressos como média \pm SEM ($n = 3$ animais para cada grupo).

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos de camundongos grupos controle e tratados com EECroton na dose de 2000mg/kg.

| Parâmetros | Parâmetros Normais | Controle | EECroton |
|--------------------|--------------------|------------|------------|
| Ureia (mg/dL) | 15 – 40 | 57,5±7,78 | 54,2±10,5 |
| Creatinina (mg/dL) | 0,2 – 0,6 | 0,49±0,03 | 0,33±0,06 |
| TGO (U/L) | 70 – 400 | 187,9±39,6 | 184,6±23,5 |
| TGP (U/L) | 25 – 100 | 69,0±8,39 | 110,9±19,0 |

Os valores são expressos como média ± SEM ($n = 3$ para cada grupo).

5.2.2.4 Avaliação histológica dos tecidos renais e hepáticos

As figuras 10 e 11 expressam observações da histologia dos tecidos renal e hepático dos camundongos albinos Swiss dos grupos controle e tratados com EECroton submetido a administração da dose de 2000mg/kg. onde não foram demonstradas alterações morfológicas. Os tecidos foram corados com hematoxilina-eosina (HE). Na figura 10 observar-se cortes transversais dos túbulos contorcidos proximais (células cuboides com borda em escova - seta vermelha) situado logo após a saída da cápsula do Bowman corpúsculo renal (seta preta) com polo vascular bem preservado. Na figura 11 observa-se o tecido hepático presença da veia centro lobular (VC) e hepatócitos com citoplasma visível e núcleo arredondado organizados em fileiras delimitadas pelos sinusóides.

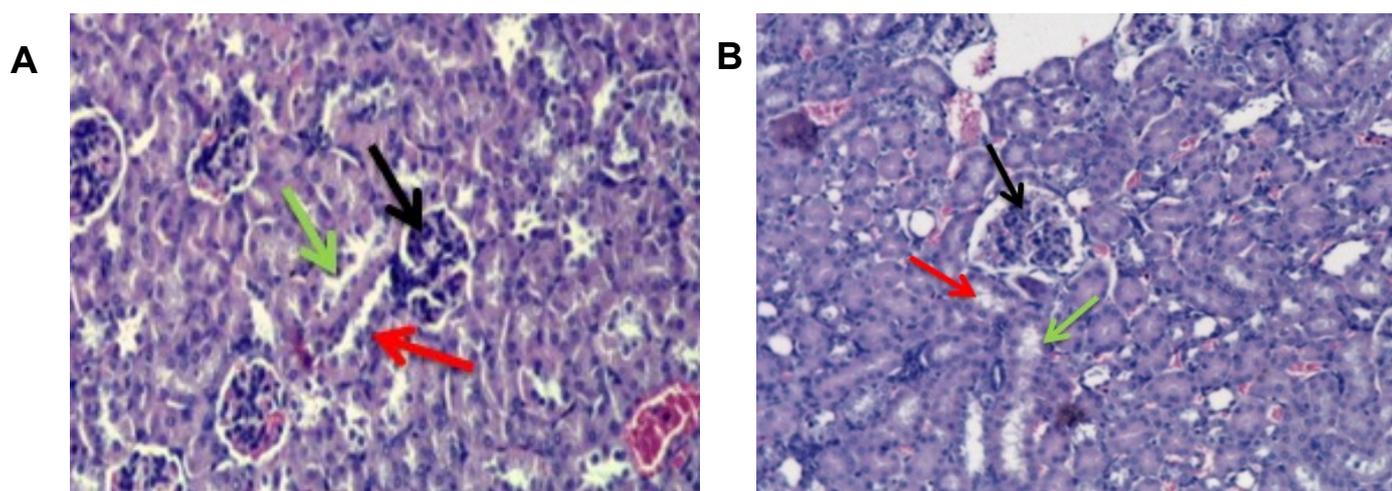


Figura 10. (A e B) Fotomicrografia do tecido renal de camundongos albino Swiss (aumento 100x). (A) grupo controle; (B) grupo EECroton submetido a administração da dose de 2000mg/kg. A seta preta

representa o Corpúsculo renal. A seta vermelha o túbulo contorcido proximal e a seta verde o túbulo contorcido distal.

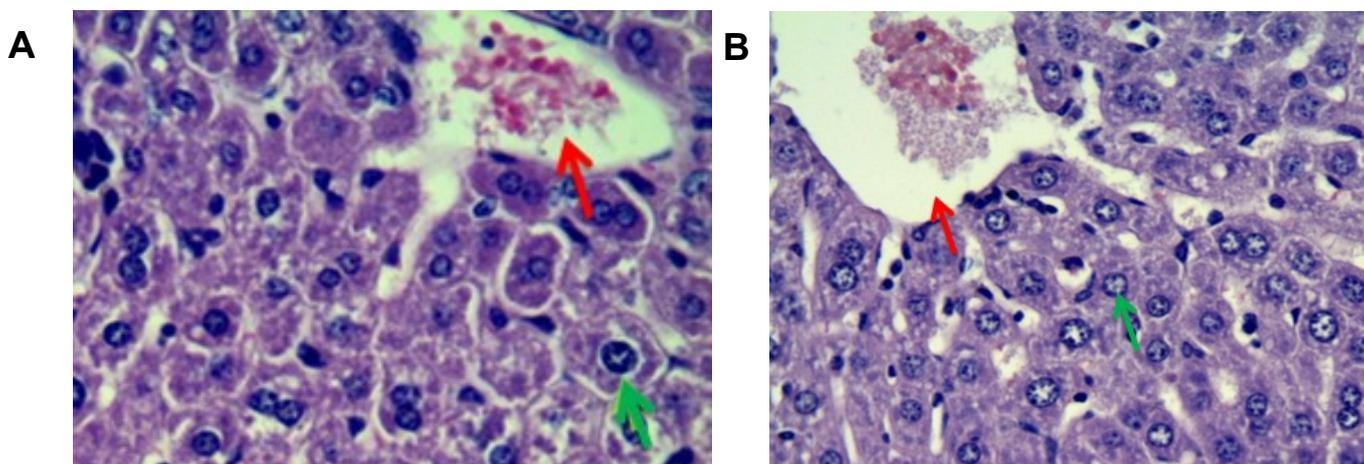


Figura 11. (A e B) Fotomicrografia de tecido hepático de camundongos albino Swiss aumento (400X). (A) grupo controle. (B) grupo tratado EECroton na dose de 2000mg/kg. A seta vermelha representa veia centro lobular (VC). A seta verde representa o hepatócito. Aumento 400x.

5.2.2.5 Avaliação histomorfométrica

5.2.2.5.1 Área e perímetro dos hepatócitos

A tabela 6 representa a mediana e amplitude interquartil da área e perímetro dos hepatócitos de camundongos albinos Swiss dos grupos controle e tratado EECroton (2000 mg/kg).

As figuras 12 e 13 representa mediana (M) da área (A) e perímetro (P) no grupo EECroton (A -1,10 e P - 1,20) quando comparado ao grupo controle (A - 0,98 e P- 1,07). O teste de comparação da distribuição foi significativo (p-valor = 0,028: p-valor =0,018), indicando que o grupo EECroton apresenta maiores valores da área e perímetro em relação ao grupo controle.

Tabela 6. Histomorfometria da área e perímetro dos hepatócitos de camundongos dos grupos controle e tratado com EECroton na dose 2000mg/kg

| Grupos | Hepatócitos | |
|----------------------|-------------|-------------|
| | Área | Perímetro |
| Controle | 0,98 (0,31) | 1,07 (0,10) |
| EECroton | 1,10 (0,15) | 1,20 (0,15) |
| p-valor ¹ | 0,028 | 0,018 |

¹ p-valor do teste de Mann-whitney.

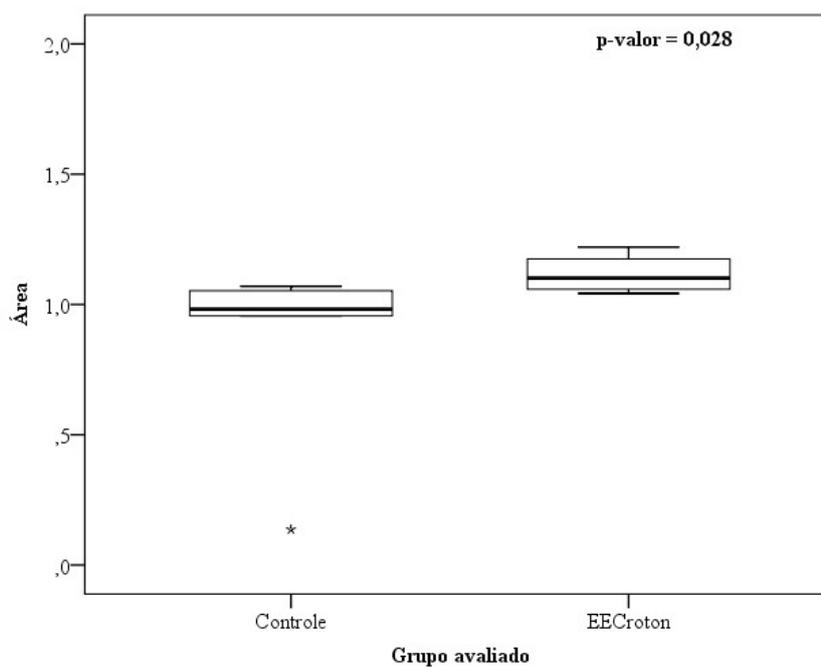


Figura 12. Área dos hepatócitos dos camundongos dos grupos controle e tratado com EECroton. Teste de Mann-whitney. p-valor do 0,28.

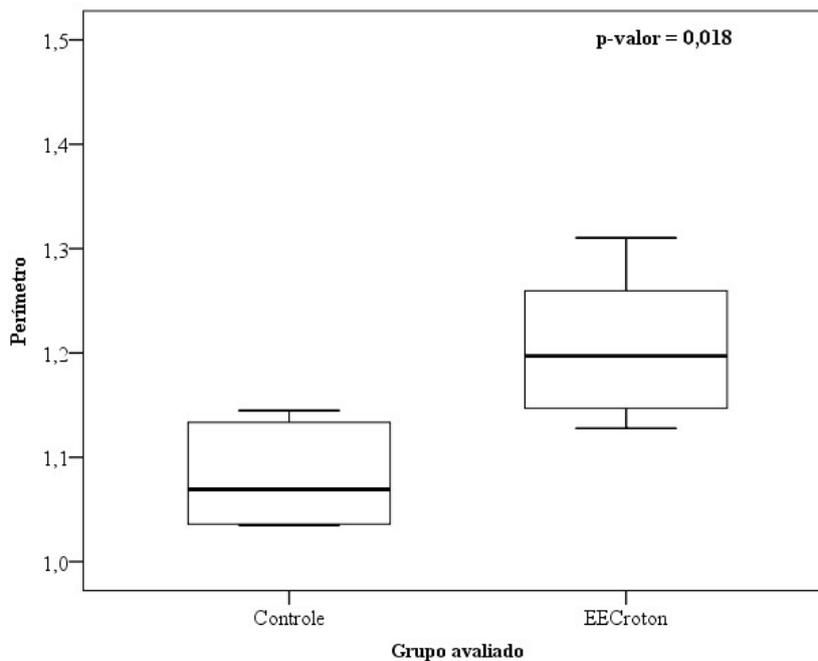


Figura 13. Box-plot do perímetro segundo dos grupos avaliado. p-valor do teste de Mann-whitney.

5.2.2.5.2 Área e perímetro dos corpúsculos renais

Na tabela 7 representa à mediana e amplitude interquartil da área e perímetro dos corpúsculos renais dos camundongos dos grupos controle e tratados. Na figura 14 Verifica-se maior mediana (M) da área no grupo controle (M = 2,42) quando comparado como grupo EECroton (M = 2,38).

Mesmo sendo encontrada diferença pontual da mediana da área dos corpúsculos renais (figura 14) entre os grupos avaliados, o teste de comparação de distribuição não foi significativo (p-valor = 0,584), indicando que os grupos apresentam área semelhante. Para o perímetro (figura 15) foi encontrado resultado semelhante. Houve maior mediana no grupo controle (M = 2,57) em comparação ao grupo EECroton (M = 2,51) o teste de comparação de distribuição não foi significativo (p-valor = 0,584), indicando que distribuição do perímetro são semelhantes nos dois grupos avaliados.

Tabela 7. Histomorfometria (Mediana e amplitude interquartil) da área e do perímetro dos corpúsculos renais de camundongos dos grupos controle e tratados.

| Grupos | Corpúsculo Renal | |
|----------------------|------------------|-------------|
| | Área | Perímetro |
| Controle | 2,42 (0,20) | 2,57 (0,21) |
| EECroton | 2,38 (0,33) | 2,51 (0,37) |
| p-valor ¹ | 0,584 | 0,584 |

¹p-valor do teste de Mann-whitney.

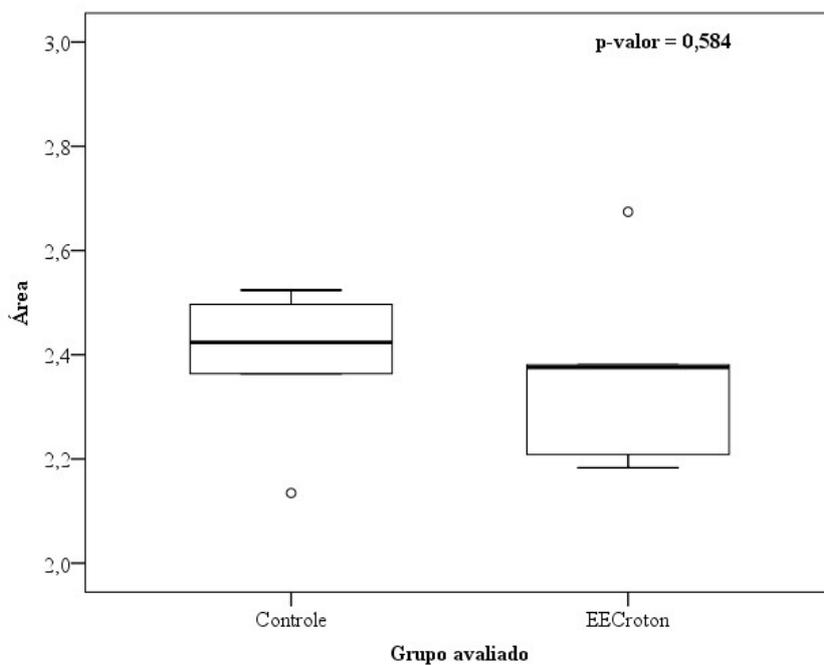


Figura 14. Box-plot - área dos corpúsculos renais de camundongos dos grupos controle e tratados. p-valor do teste de Mann-whitney.

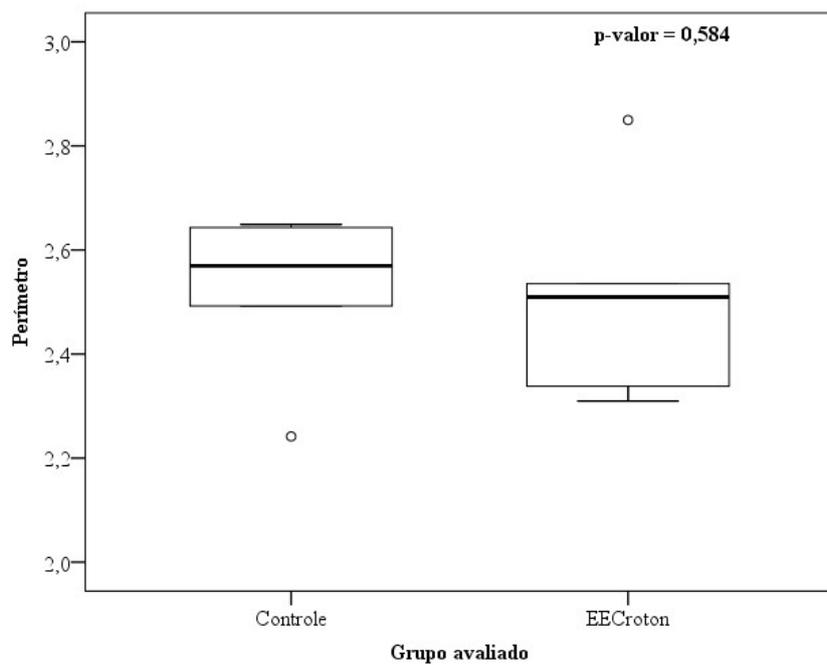


Figura 15. Box-plot - perímetro dos corpúsculos renais de camundongos dos grupos controle e tratados. p-valor do teste de Mann-whitney.

6 DISCUSSÃO

6.1 Perfil Fitoquímico

O EECroton apresentou um perfil fitoquímico compatível com o gênero e com a maioria dos representantes da família Euphorbiaceae. A análise cromatográfica em camada delgada constatou a presença de cumarinas, flavonoides e terpenos, e ausência de alcaloides, saponinas e taninos, corroborando com descrições fitoquímicas presentes na literatura.

Os flavonoides, grupo químico identificado na investigação fitoquímica, também foi identificado no estudo de Randau et al., (2004) com o *C. heliotropiifolius*. No estudo de Silva et al., (2017), onde realizaram uma prospecção fitoquímica das flores de *C. heliotropiifolius*, também foi encontrado flavonoides. Este grupo desempenha diversas funções biológicas, compreendendo a eliminação de radicais livres e ação antiinflamatória (SUHARTONO et al., 2012; LIU et al., 2013), o que justifica o uso popular da espécie em disfunções intestinais, no tratamento de feridas e inflamações (SARAIVA et al., 2015).

A ausência de alcalóides na casca do caule de *C. heliotropiifolius* evidenciada no estudo, também foi descrita por Schoefs (2002). Entretanto, em seu trabalho foi elucidada a presença de alcalóides na casca das suas raízes (SCHOEFS, 2002). Cumarinas estiveram presentes no extrato estudado, estas substâncias são raras na família Euphorbiaceae e no gênero Croton, existe a constatação apenas de escopoletina em *C. sonderianus* (CRAVEIRO; SILVEIRA, 1982).

A investigação de saponinas foi negativa, o que também foi relatada em outra espécie do gênero, o *Croton linearifolius* (CUNHA et al., 2014). Não foram encontrados taninos na espécie estudada. Os taninos hidrolisáveis são constituídos de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados. Possuem propriedades adstringentes e a estes compostos é atribuído o efeito antidiarréico, anti-séptico e impermeabilizador das camadas mais expostas da pele e mucosas, conferindo proteção às camadas subjacentes (BRUNETON, 1991). Foi constatada a ausência de taninos condensados, embora estes compostos tenham sido reconhecidos na espécie por Randau et al., (2004).

6.2 Atividades Toxicológicas

6.2.1 *Artemia salina* Leach

Ensaio *in vitro*, tal como a avaliação toxicológica frente à *Artemia salina* são extremamente importantes, pois funcionam como uma ótima ferramenta em pesquisas com plantas medicinais, devido à diminuição do uso de animais vertebrados na experimentação, o que vem sendo uma preocupação dos Comitês de ética em experimentação animal (BEDNARCZUK et al., 2010).

O uso de bioensaios, como o de *A. salina*, para o monitoramento de bioatividade em extratos, frações ou compostos isolados de plantas medicinais, tem sido cada vez mais frequente em pesquisas fitoquímicas (NOLDIN; FILHO, 2003). Somando-se a isso, temos a simplicidade, rapidez e baixo custo deste método favorecendo a sua utilização em diversos estudos. O potencial tóxico observado no EECroton mostram a importância de estudos químicos posteriores para esta espécie, uma vez que esta pesquisa é a primeira registrada na literatura consultada, até o presente momento.

6.2.2 Toxicidade aguda

Posteriormente, com o intuito de avaliar a toxicidade do EECroton *in vivo*, foi realizado o teste de toxicidade aguda segundo o que preconiza o protocolo OECD, 423. Os resultados obtidos deixam claro que houve uma baixa toxicidade, nas condições avaliadas. O que pode ser confirmado através da análise dos parâmetros avaliados nesses 14 dias de observação. Foi observado diminuição significativa relacionada ao consumo de água para o grupo tratado com EECroton porém este fato não provocou alterações na evolução ponderal dos animais.

Parâmetros metabólicos, tais como a evolução ponderal e consumo de água e ração são utilizados para investigar a toxicidade de uma amostra em estudo sobre o sistema gastrointestinal ou mesmo sobre o sistema nervoso central caso haja alteração em mais de um dos parâmetros em questão. Um dos órgãos de grande importância para o corpo humano é o fígado, já que sua função está relacionada com o metabolismo de nutrientes e a biotransformação de drogas e produtos químicos, o que confere ao organismo proteção contra agentes tóxicos (AL-ASMARI et al., 2014).

Podemos encontrar enzimas em todos os tecidos do corpo e são elas as responsáveis por várias reações químicas importantes em nosso organismo. Algumas reações podem acontecer no plasma e outras no soro e sua aferição sérica pode indicar um estado de normalidade ou dano celular. Para a avaliação da função hepática, duas enzimas têm grande importância, a transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e Transaminase glutâmico-pirúvica (TGP). A ação dessas enzimas tem sido utilizada como indicador de dano hepatocelular (MONTEIRO, 2010).

A TGO catalisa a conversão de aspartato em oxaloacetato, é encontrada em diversos órgãos e tecidos dentre eles o fígado, coração (miocárdio), músculo esquelético entre outros. Está presente no citoplasma e também nas mitocôndrias, portanto sua elevação indica um dano celular mais profundo. A TGP catalisa a conversão de alanina em ácido pirúvico, é encontrada em maior concentração no fígado e rim, sua origem é predominantemente citoplasmática, fazendo que se eleve rapidamente quando ocorre lesão hepática, o que a torna um marcador sensível da função do fígado (MINCIS, 2006).

Não foi observada alteração na atividade de TGO nem de TGP nos animais expostos ao EECroton, demonstrando que o mesmo está isento de toxicidade hepática nas condições testadas. A toxicidade medicamentosa decorrente da excreção inadequada de medicamentos ou seus metabólitos pode levar a uma alteração da função renal. Desta forma, a avaliação dos níveis sanguíneos de uréia e creatinina é um excelente indicador de toxicidade renal. Particularmente o acúmulo dessas substâncias nitrogenadas no sangue pode indicar insuficiência dos rins (HENRY, 2008).

A uréia, o produto final do metabolismo protéico, é excretada pelos rins. Os túbulos renais reabsorvem 40% desse produto, portanto, os níveis sanguíneos desse parâmetro constituem uma indicação da função renal e podem servir como índice da taxa de filtração glomerular (SCHOSSLER et al., 2001), teoricamente, a creatinina é a mais indicada para verificar a função renal, uma vez que a quantidade de creatinina presente nos rins é mais constante, porém não é reabsorvida nos túbulos renais como a uréia (EMANUELLI et al., 2008).

Os animais controles e os tratados com EECroton apresentaram uma elevação significativa da concentração sérica de uréia, o que pode ser um indicativo de diminuição da taxa de filtração glomerular. Porém alguns fatores não associados à

disfunção renal, tais como hemorragia gastrointestinal, terapia com corticosteroide e dieta rica em proteínas pode elevar a produção de uréia (KLEIN et al., 2008).

Nenhum achado clínico importante foi observado na histopatologia do fígado, não evidenciando, portanto, toxicidade em nível tecidual do extrato testado.

Na análise histopatológica dos rins dos animais submetidos ao EECroton também não foram observadas alterações significativas, apesar do aumento nos níveis séricos de uréia. O que sugere que esse aumento causou um dano leve e não foi capaz de alterar a estrutura do tecido.

Para estudos de toxicidade a análise dos parâmetros hematológicos são muito importantes, já que o sistema hematopoético é bem sensível a atividades de agentes tóxicos. As análises hematológicas são realizadas com direcionamento para os eritrócitos (hemácias), leucócitos e trombócitos (EVANS, 2008).

A exposição ao EECroton mostrou que todos os resultados estão dentro da faixa de parâmetros normais. Os índices dos órgãos são importantes indicadores fisiopatológicos relacionados ou não à injúria causada por alguma substância em animais e humanos (VAGHASIYA; SHUKLA; CHANDA, 2011).

6.2.3 Avaliação histomorfométrica do tecidos hepáticos e renais

Observações histológicas são importantes ferramentas para detectar alterações histofisiológicas nas funções gastrointestinais. O fígado é um órgão de suma importância e desempenha um papel importante no metabolismo e detoxificação de toxinas exógenas e agentes terapêuticos. (SETTY et al 2007). Estudos toxicológicos constituem ferramentas importantes para avaliação dos efeitos adversos dos compostos químicos nos organismos vivos. Em nossos experimentos não foram identificados alterações morfológicas no tecido hepático de camundongos albinos suíços submetidos ao tratamento (doses diárias de 2000 mg/kg) com EECroton. Nesse estudo a análise morfométrica da área e perímetro dos hepatócitos de camundongos no grupo EECroton não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle.

Trabalhos reportando o estudo da toxicidade aguda *in vivo* em camundongos com a espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth não foram encontrados na literatura, o que dificulta comparar os resultados com outros nas mesmas condições. Contudo foi possível detectar experimentos com análise histomorfométrica em tecido hepático e renal com outra espécie vegetal. Estudo realizado por Brito da Silva (2014) que

mostrou a ausência de alteração estrutural no epitélio hepático de camundongos portadores de sarcoma 180 após tratamento com Indican de folhas de *I. suffruticosa*, porém alterações significativas foram observadas no grupo controle com sarcoma 180. Em um estudo realizado por Lima et al., (2019), onde analisou a área, perímetro do núcleo e diâmetro dos capilares sinusóides dos hepatócitos de camundongos submetidos à lesão por paracetamol após tratamento subcrônico com extrato metanólico de folhas *Indigofera suffruticosa* Mill. foram semelhantes quando comparados a silimarina. O extrato e a silimarina não mostraram diferenças estatísticas significativas.

O rim é um órgão de suma importância e desempenha um papel importante na regulação da pressão sanguínea e do volume de fluido corporal no equilíbrio ácido base e na formação e liberação de certos hormônios (GARTNERT, 2007). Estudos realizados por Nascimento et al (2012) utilizando um extrato aquoso de folhas de *Indigofera suffruticosa* em camundongos portadores de sarcoma 180 não foram identificados alterações morfológicas no tecido renal. Nesse estudo foram observados que os perímetros dos tubúlos proximais renais do camundongos portadores de sarcoma 180 não apresentaram alterações histomorfométricas em relação ao controle.

Em nosso estudo a análise histomorfométrica da área (A) e perímetro (P) dos corpúsculos renais de camundongos submetidos ao tratamento com EECroton (2000 mg/kg) não apresentou valores significativos em relação ao controle. O corpúsculo renal no grupo controle foi similar em relação ao grupo EECroton. De acordo com Leite et al (2003) que utilizou a espécie *Indigofera suffruticosa* demonstrou que o extrato aquoso de folhas de *I.suffruticosa* possui baixa ordem de toxicidade. Na atividade toxicológica a DL₅₀ não foi determinada, o extrato pode ser considerado praticamente atóxico. O extrato aquoso de folhas de *I.suffruticosa* nas diferentes doses de 300 a 2.000 mg/kg i.p não provocou índice de mortalidade durante 72 horas de observação no ensaio preliminar. Segundo Fontes Júnior (2006), essa variação em medidas em valores numéricos, depende de vários fatores, tal como a fixação de tecidos, processamento histológico, armazenamento do material.

7 CONCLUSÕES

- Os constituintes químicos majoritários identificados na espécie ***Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphobiacea)** são: presença de cumarinas, flavonoides e terpenos, e ausência de alcaloides, saponinas e taninos
- EECroton frente à *Artemia salina* resultou em uma toxicidade moderada com CL₅₀ de 396,6 µg/mL.
- A toxicidade aguda nos camundongos grupo tratado com EECroton (2000mg/kg v.o) não apresentou alterações comportamentais, foram observados diminuição no consumo de água e de ração em relação ao controle.
- O parâmetro hematológico dos camundongos não revelou nenhuma alteração entre os grupos. No Bioquímico foi observado uma redução significativa da concentração sérica de uréia do EECroton (54,2±10,5) em relação ao grupo controle (57,5±7,78).
- Os resultados obtidos na análise histopatológica dos tecidos hepático e renal de camundongos albinos Swiss submetidos ao tratamento na dose de 2.000 mg/kg v.o. do EECroton não apresentam alterações morfológicas. Contudo, nos corpúsculos renais foi demonstrado na área e perímetro diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA J. R. G. S, RAMALHO A. C. M., SILVEIRA F. G. *Croton zehntneri* Pax & K. Hoffm (Euphorbiaceae). In: Albuquerque U., Patil U., Máthé Á. (eds) Medicinal and Aromatic Plants of South America. Medicinal and Aromatic Plants of the World, vol 5. Springer, Dordrecht, 2018.

ARRAIS, L. G. et al. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Baill.(Zabelê). **Rev. bras. plantas med**, v. 16, n. 2, supl. 1, p. 316-322, 2014.

ARAÚJO, F. M. et al. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial crops and products**, v. 105, p. 203-206, 2017.

ATHIÊ-SOUZA, S. M et al. Phanerogamic flora of the Catimbau National Park, Pernambuco, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 19, n. 1, 2019.

BARRERA, C. et al. Importancia medicinal del género *Croton* (Euphorbiaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 2, p. 234-247, 2016.

BEVILACQUA, A. H. V.; SUFFREDINI, I. B.; BERNARDI, M. M., Neem *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) toxicity in *Artemia* sp: comparison of a commercial preparation and the pure oil. **Revista do Instituto de Ciência da Saúde**, v.26, n. 2, p.157-160, 2008.

BRITO DA SILVA, I; RANGEL LIMA, I; NASCIMENTO SANTANA, M. A; PEREIRA LEITE, R. M; PEREIRA LEITE, S. *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae): Hepatic Responses in Mice Bearing Sarcoma 180. **International Journal of Morphology**, v. 32, n. 4, 2014.

CANELO, L. I. N et al. Chemical constituents of a population of *Croton gratissimus* (euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1035-1038, 2017.

CANUTO, K. M., SILVEIRA, E. R., BEZERRA, A. M. E. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* AC Smith). **Química Nova**, 33(3), 662-666, 2010.

CARUZO, M. B. R.; PEREIRA, A. P. N.; CORDEIRO, I. Croton (Euphorbiaceae) in the State of São Paulo, Brazil: an update. **Hoehnea**, v. 46, n. 1, 2019.

COSTA, J. L. C.; SECCO, R. S.; GURGEL, E. S. C. Flora of the canga of Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Euphorbiaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 1, p. 59-75, 2018.

CREPALDI, C. G. et al. Richness and ethnobotany of the family Euphorbiaceae in a tropical semiarid landscape of Northeastern Brazil. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 157-165, 2016.

DIAS, Clarice Noletto; MORAES, Denise Fernandes Coutinho. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae) larvicides. **Parasitology research**, v. 113, n. 2, p. 565-592, 2014.

DRUMOND, A. A. L. et al. Qualidade fisiológica de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) após o beneficiamento. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 2, p. 224-232, 2019.

ESTEVAM, C. D. S., CAVALCANTE, A. D. M., CAMBUI, É. V. F., ARAÚJO NETO, V., LEOPOLDO, P. D. T. G., FERNANDES, R. P. M., SANTANA, A. E. G. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart.(Celastraceae), 2009.

FARIAS, S. Q.; MEDEIROS, D.; RIINA, R. A new species of dragon's blood Croton (Euphorbiaceae) from Serra dos Órgãos (Rio de Janeiro, Brazil). **PhytoKeys**, v. 126, p. 13, 2019.

FILHO, J. M. T. A et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 440-444, 2017.

FILHO, R. B. Contribuição da Fitoquímica Para o Desenvolvimento de um País Emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, 2010.

FONTES JÚNIOR, W.S. Histologia e morfometria dos rins de camundongos *Mus musculus*, tratados com o extrato hidroalcoólico de *Datura stramonium* L. 2006.67f. **Dissertação (Mestrado em Patologia)**. Universidade Federal de Pernambuco. Recife- PE, 2006.

KOUTSAFTIS, A.; AOYAMA, I. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. **Science of the Total Environment**, v. 387, p.166–174, 2007.

LIMA, I.R. Investigação da *Indigofera suffruticosa* sobre atividade antitumoral e aspectos histológicos e morfométricos do tecido hepático de camundongos portadores de sarcoma 180. 2013.

LIMA, I. R; SILVA, I. B; LIMA, R. M. L; SILVA, T. M. S; MAIA, M. B. S; LEITE, S. P. Eficácia hepatoprotetora do extrato metanólico de *Indigofera suffruticosa* (Mill) em lesão hepática induzido por paracetamol em camundongos. **Arquivos de Gastroenterologia**, n. ahead, 2019

LAU, N. S. et al. The rubber tree genome shows expansion of gene family associated with rubber biosynthesis. **Scientific reports**, v. 6, p. 28594, 2016.

Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E, Jacobsen, L. B.; Nichols, D.E, McLaughlin, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta med**, 1982, 45, 31.

MILANI, M. G.; ZIOLLI, R. L.; Avaliação do potencial tóxico de novos compostos e de compostos de interesse ambiental através do ensaio de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina*.

OBRADOVIC, M.; KRAJESEK, S. S.; DERMASTIA, M.; KREFT S. A new method for the authentication of plant samples by analysing fingerprint chromatograms. *Phytochemical analysis*, v. 8 p. 123-132,2007.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 420. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

OLIVEIRA, Douglas Dourado et al. Fixed and volatile constituents of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Bahia-Brazil. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 26, p. 540-545, 2016.

OOTANI, M. A.; AGUIAR, R.W.; RAMOS, A. C. C.; BRITO, D. R.; SILVA, J. B.; CAJAZEIRA, J. P. Use of Essential Oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-174, 2013.

OSATHANUNKUL, M et al. Refining DNA barcoding coupled high resolution melting for discrimination of 12 closely related croton species. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0138888, 2015.

QUEIROZ, M. M. F. et al. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. **Phytochemistry Letters**, v. 10, 2014.

RODRIGUES, K. A. D. F.; DIAS, C. N.; FLORÊNCIO, J. C.; VILANOVA, C. M.; GONÇALVES, J. D. R. S.; COUTINHO-MORAES, D. F. Prospecção Fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia* L. **Cadernos de Pesquisa**, 17(2), 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**. 2004.

RODRIGUES, O. G. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos botânicos de *Croton Heliotropiifolius* Kunth. e *Croton blanchetianus* Baill. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 12, n. 3, p. 237-241, 2017.

SANGHA, R. B.; GAYATRI, M. C. Ethanomedicinal properties of Euphorbiaceae family-a comprehensive review. **International Journal of Phytomedicine**, v. 6, n. 2, p. 144-156, 2014.

SANTOS, R. F.; RIINA, R.; CARUZO, M. B. R. *Croton sapiifolius* Müll. Arg. In: a new occurrence for the State of Espírito Santo, Brazil. **Hoehnea**, v. 43, n. 4, p. 529-531, 2016.

SARAIVA, M. E. et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 141-153, 2015.

SCANDELAI, Ana Paula Jambers et al. Toxicidade aguda à *Lactuca sativa* de lixiviado tratado por ozonização e oxidação supercrítica/Acute toxicity of leachate treated by ozonation and supercritical oxidation in *Lactuca sativa*. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 4, p. 3191-3197, 2019.

SILVA, J. A. G. et al. Physicochemical characteristics and cytotoxic effect of the methanolic extract of *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 28, p. 321-326, 2017a.

SILVA, J. A. G. et al. Screening Fitoquímico e Avaliação da Toxicidade de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae) frente à *Artemia salina* Leach. **Rev. Virtual Quim.** Vol 9, n. 3, 934-941. 2017b.

SILVA, L.B et al. Toxicidade do extrato etanólico de *Croton heliotropiifolius* em populações de gorgulho de grãos de milho armazenados. **J. Entomol.** 6: 413-421, 2012.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. P.; GARCEZ, W. S.; MARIA AMÉLIA DIAMANTINO BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis*

lindmanii - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre Artemia salina Leach. **Química Nova**, p. 557-559, 1998.

SODRÉ, R. C.; DA SILVA, M. J. O gênero Croton L.(Euphorbiaceae ss–Crotonoideae) na Floresta Nacional de Silvânia, Goiás, Brasil. **Iheringia Série Botânica**. v. 70, n. 1, p. 89-104, 2015.

TRINDADE, MJ de S.; LAMEIRA, O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 164–175, 2013.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ETICA DE USO ANIMAL (CEUA)



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Cavaca, 414
 50720-420 / Recife - PE - Brasil
 Fone: 2126 6142
 www.ufpe.br

Recife, 28 de agosto de 2019

Ofício nº 52/19

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

Para: Prof. Sonia Pereira Leite
 Departamento de Histologia e Embriologia
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 0072/2018

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos biológicos do extrato etanólico da casca de *croton heliotropifolius* - Estudos *in vivo* e *in vitro*", registrado com o nº 0072/2018 sob a responsabilidade de Prof. Sonia Pereira Leite o 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 27/08/2019

| | |
|-------------------------------------|--|
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 02/09/2019 a 23/12/2019 |
| Espécie/Inhagem/raça | Camundongos albinos Swiss |
| Nº de animais | 32 |
| Peso/idade | 25-30g / 60 dias |
| Sexo | Fêmea (12) Macho (20) |
| Origem: Biotério de Criação | Biotério do Departamento de Antibióticos-Laboratório de Cancerologia Experimental da UFPE. |
| Destino: Biotério de Experimentação | Biotério do Departamento de Antibióticos-Laboratório de Cancerologia Experimental da UFPE |

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345891

ANEXO B – EXSICATA DEPOSITADA NO HERBÁRIO

