



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANDERSON FELIPE SOARES DE FREITAS

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E
ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIPIRÉTICA DE
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Croton blanchetianus*

RECIFE
2021

ANDERSON FELIPE SOARES DE FREITAS

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E
ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIPIRÉTICA DE
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Croton blanchetianus*

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas do Centro de Biociências da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito para a obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas.

ORIENTADOR: PROF. DR. THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO
COORIENTADOR: DR. ALISSON MACÁRIO DE OLIVEIRA

Recife
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Freitas, Anderson Felipe Soares de

Caracterização do perfil fitoquímico e avaliação da toxicidade e atividades antinociceptiva, anti- inflamatória e antipirética de extrato etanólico das folhas de *Croton blanchetianus*. / Anderson Felipe Soares de Freitas. 2021.

72 f. : il., fig., tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão

Coorientador: Alisson Macário de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

Inclui referências e apêndice.

1. Fitoquímicos 2. Flavonoides 3. Euphorbiaceae I. Napoleão, Thiago Henrique (orient.) II. Oliveira, Alisson Macário de (coorient.) III. Título

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022 -305

ANDERSON FELIPE SOARES DE FREITAS

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E
ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIPIRÉTICA DE
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Croton blanchetianus*

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas do Centro de Biociências da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito para a obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas.

Aprovada em: 24 / FEVEREIRO / 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Michelle Melgarejo da Rosa (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Lidiane Pereira de Albuquerque (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Piauí

Dedico esse trabalho a todos que acreditaram em mim e me apoiaram, em especial a minha vó, dona Ivonete, que sempre me ajudou em tudo, que sem saber direito de sobre o que seria um mestrado sempre me deu total apoio.

AGRADECIMENTOS

Aproveito esse momento para agradecer a todos que participaram e contribuíram para que eu conseguisse trilhar esse novo caminho em minha vida.

Primeiramente agradeço aos meus avós, seu Assis e Dona Ivonete, que me apoiaram com todas as forças, mesmo as vezes sem entender do que se trata, apenas sabendo que é um novo passo em minha vida. Que me ensinaram os valores e qualidades que possuo hoje, serei sempre grato a criação que me deram, grato por apoiarem todas as minhas decisões, grato por me ensinarem a pensar no amanhã e não apenas no agora, obrigado por tudo!

Agradeço também aos meus tios e tias, Mauricio, Amaury, Tia Bete, Tia Josi, tia Vaninha e tia Lú, por sempre me ajudarem quando precisei, obrigado a todos.

Deixo aqui também ao professor orientador Thiago por me aceitar como orientando, mesmo sem conhecimento prévio sobre mim, me abrindo uma porta muito importante em minha vida, obrigado professor!

Agradeço também o Sr. Dr. Alisson que desde a graduação me acompanha e me ajudou diversas vezes em todo esse caminho percorrido, muito obrigado Sr., de verdade mesmo.

A uma pessoa que conheci no início dessa caminhada e que é muito, mas muito importante em minha vida, agradeço a você Suéllen Pedrosa, que me apoiou e ajudou diversas vezes nesse tempo, obrigado por sempre está ao meu lado, obrigado por estar presente em minha vida de uma forma tão especial.

Não posso esquecer dos meus amigos né, agradeço a todos eles, que mesmo no pouco contato nos últimos anos, são essenciais em minha vida, Diogo, Bito emo, Arysthon, Cleiton Oliver e Heron, vocês são muito importantes em minha vida, obrigado.

Por fim, agradeço a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de mestrado e apoio no desenvolvimento da pesquisa.

Se a vida fosse fácil como a gente quer
Se o futuro a gente pudesse prever
Eu estaria agora tomando um café
Sentado com os amigos em frente à TV
Eu olharia as aves como eu nunca olhei
Daria um abraço apertado em meus avós
Diria eu te amo a quem nunca pensei
Talvez é o que o universo espera de nós.

(Girassol, Priscilla Alcantara).

RESUMO

A presente dissertação determinou o perfil fitoquímico de extrato etanólico das folhas de *Croton blanchetianus*, bem como avaliou a toxicidade aguda e subaguda e os efeitos antinociceptivos, anti-inflamatórios e antipiréticos do extrato em camundongos. A análise fitoquímica foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), revelando a presença de alcaloides, açúcares redutores, derivados cinâmicos, flavonoides, saponinas, taninos condensados, terpenos e esteroides. A toxicidade aguda foi avaliada pela administração de dose única de 2.000 ou 5.000 mg/kg (*per os* ou *i.p.*). Já a toxicidade subaguda foi avaliada com doses diárias de 250, 500 e 1000 mg/kg durante 28 dias por via oral. Para avaliação da genotoxicidade, foram utilizados os ensaios de micronúcleo e cometa. O extrato (50, 100 e 200 mg/kg por via oral) foi avaliado quanto aos efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios. No ensaio de toxicidade aguda nenhuma morte foi observada, mas níveis séricos aumentados de marcadores hepáticos e renais, alterações hematológicas e histológicas no pulmão e rim foram observados exclusivamente quando o extrato foi administrado via *i.p.* Na análise da toxicidade em doses repetidas o extrato não causou alterações comportamentais ou óbito dos camundongos, porém foi observado aumento das transaminases nos grupos tratados por 4 semanas a 500 e 1.000 mg/kg. A administração oral não resultou em efeito genotóxico nas células da medula óssea ou do sangue periférico. O extrato apresentou atividades anti-inflamatória, reduzindo edema de pata induzido por carragenina em 42,97–63,24% nas doses de 50 a 200 mg/kg, e apresentou ação antipirética nas doses de 100 e 200 mg/kg em modelo de febre induzida por levedura. Nos ensaios de atividade antinociceptiva, o extrato reduziu o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em 47,16 a 88,81%, aumentou o tempo de latência (até 2,13 vezes) no teste de imersão da cauda e diminuiu o tempo de lambida da pata em até 74,07% e 97,76% na primeira e segunda fases do teste da formalina, respectivamente. Este trabalho contribuiu para a determinação da segurança e do potencial farmacológico de folhas de *C. blanchetianus*.

Palavras-chave: Euphorbiaceae; analgesia; levantamento toxicológico; genotoxicidade; flavonoides.

ABSTRACT

The present dissertation determined the phytochemical profile of ethanolic extract from the leaves of *Croton blanchetianus*, as well as evaluated the acute and sub-toxicity and the antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of the extract in mice. A phytochemical analysis was performed by thin layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC), revealing the presence of alkaloids, reducing sugars, cinnamic derivatives, flavonoids, saponins, condensed tannins, terpenes and steroids. Acute toxicity was assessed by administering a single dose of 2,000 or 5,000 mg / kg of body weight (*per os* or *i.p.*). Subacute toxicity was evaluated with daily doses of 250, 500 and 1000 mg / kg for 28 days orally. To assess genotoxicity, micronucleus and comet assays were used. The extract (50, 100 and 200 mg / kg orally) was evaluated for antinociceptive and anti-inflammatory effects through different testicles. No acute toxicity assay, no death was observed, but increased serum levels of liver and kidney markers, hematological changes and histological changes in the lung and border were observed exclusively when either extract was administered intraperitoneally. In the analysis of toxicity in repeated doses of extract, it did not cause physiological, behavioral changes or death in the mice, but an increase in transaminases was observed in the groups treated for 4 weeks at 500 and 1,000 mg / kg. Oral administration did not result in a genotoxic effect on bone marrow or peripheral blood cells. The extract shows anti-inflammatory activities, carrageenan-induced paw edema in 42.97–63.24% at doses of 50 to 200 mg / kg, and shows antipyretic action at doses of 100 and 200 mg / kg in a yeast-induced model. In the tests of antinociceptive activity, the extract reduced the number of abdominal contortions induced by acetic acid by 47.16 to 88.81%, increased the latency time (up to 2.13 times) in the tail immersion test and decreased the time up to 74.07% and 97.76% in the first and second stages of the formalin test, respectively. This work contributed to determine the safety and pharmacological potential of leaves of *C. blanchetianus*.

Keywords: Euphorbiaceae; analgesia; toxicological survey; genotoxicity; flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

Referencial teórico

Figura 1 –	Orientações da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico para avaliação da toxicidade oral aguda de produtos químicos.....	24
Figura 2 –	<i>Croton blanchetianus</i> . A- Arbusto, B- Detalhes das folhas	29

Artigo 1

Figure 1 –	Analysis of the chemical composition of ethanolic extract of <i>C. blanchetianus</i> leaves by high-performance liquid chromatography (HPLC). (A) A representative HPLC profile. (B) The ultraviolet absorption spectra of the 9 peaks detected in the extract, which correspond to condensed tannins (peaks 1, 2, 4, 5), cinnamic derivatives (peak 3), and flavonoids (peak 6 to 9).....	66
Figure 2 –	Representative photomicrographs of the livers, lungs, kidneys, and spleen of female mice from control group or groups treated with ethanolic extract of <i>C. blanchetianus</i> leaves at the doses of 2,000, and 5,000 mg/kg via intraperitoneal or oral administration. Livers: the centrilobular vein (v) is seen in all images. Kidneys: Renal glomeruli (Gr) and contorted tubules without alterations are visible in control and extract-treated groups, excepting that which received a dose of 5,000 mg/kg i.p., in which the kidneys presented venous congestion of glomeruli (arrows) and dilated proximal and distal tubules due to a vacuolar (hydropic) degeneration (*). Lungs: bronchiole (Br) and alveolar sac (As), visible, with preserved architecture in control and female mice treated orally with the extract at 2,0/00 (<i>per os</i> and i.p.) and 5,000 (<i>per os</i>) mg/kg. The lungs presented vascular congestion with interalveolar septa thickening (arrow) in group that received 5,000 mg/kg i.p. Spleen: The lymph nodes (Nd) are well-defined in the control and treated groups orally. Spleens of mice that received a dose of 5,000 mg/kg i.p. showed a considerable activation of lymph nodes. Hematoxylin-eosin staining was used. Magnification: 400 ×.....	68
Figure 3 –	Antinociceptive effect of ethanolic extract of <i>Croton blanchetianus</i> leaves (50, 100 and 200 mg/kg, <i>per os</i>) and reference drugs	

indomethacin (20 mg/kg i.p.) and morphine (10 mg/kg i.p.) in the acetic acid-induced writhing assay. The bars represent the average number of writhes $\pm$ SD. (*) indicates significant difference ($p < 0.001$) in comparison with control.....70

- Figure 4 – Responses of different concentrations of extract ethanolic of the *Croton blanchetianus* leaves to paw edema induced by carrageenan. * $p < 0.001$ compared with Control, two-way ANOVA followed by Bonferroni's Test.....71

Artigo 2

- Figura 1 – Peso corporal (g) de camundongos machos e fêmeas do grupo controle e dos grupos tratados diariamente por 14 dias (A e B) ou 28 dias (C e D) com o extrato etanólico das folhas de *Croton blanchetianus* a 250, 500 e 1000 mg/kg. Os valores são expressos como média $\pm$ DP..... 38
- Figura 2 – Consumo de ração por camundongos machos e fêmeas do grupo controle e dos grupos tratados diariamente por 14 dias (A e B) ou 28 dias (C e D) com o extrato etanólico das folhas de *Croton blanchetianus* a 250, 500 e 1000 mg/kg. Os valores são expressos como média $\pm$ DP. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 39
- Figura 3 – Consumo de água por camundongos machos e fêmeas do grupo controle e dos grupos tratados diariamente com o extrato etanólico das folhas de *Croton blanchetianus* a 250, 500 e 1000 mg/kg durante duas semanas (A, B) e quatro semanas (C, D). Não houve diferenças significativas em relação ao controle..... 40
- Figura 4 – Fotomicrografias representativas dos fígados, pulmões, rins, baço e coração dos camundongos machos do controle (A) ou grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *C. blanchetianus* nas doses de 250 (B), 500 (C) ou 1000 mg (D) / kg por administração oral. Fígados: a veia centrolobular (v) é vista em todas as imagens. Rins: Glomérulos renais (Gr) e túbulos contorcidos. Pulmões: saco alveolar (As), visíveis. Baço: os linfonodos (Nd). Ampliação: 400 x..... 41

Figura 5 –	Fotomicrografias representativas dos fígados, pulmões, rins, baço e coração dos camundongos fêmeas do controle (A) ou grupos tratados com extrato etanólico de folhas de <i>C. blanchetianus</i> nas doses de 250 (B), 500 (C) ou 1000 mg (D) / kg por administração oral. Fígados: a veia centrolobular (v) é vista em todas as imagens. Rins: Glomérulos renais (Gr) e túbulos contorcidos. Pulmões: saco alveolar (As), visíveis. Baço: os linfonodos (Nd). Ampliação: 400.....	42
Figura 6 –	Tamanho do edema em patas de camundongos do grupo controle e tratados com o extrato etanólico das folhas de <i>Croton blanchetianus</i> em diferentes doses (50, 100 e 200 mg/kg) no tempo zero após diferentes períodos de tratamento. (*) $p < 0,001$ em comparação com o controle.....	45
Figura 7 –	Monitoramento da temperatura retal de camundongos após administração do extrato etanólico das folhas de <i>C. blanchetianus</i> nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg ou do controle positivo dipirona (100 mg/kg)	46

LISTA DE TABELAS

Fundamentação teórica

Tabela 1 –	Toxicidade dos compostos com base em DL50.....	24
------------	--	----

Artigo 1

Table 1 –	Evaluation of food intake, water consumption, and weight gain of animals from control or treated for 14 days with the ethanolic extract from leaves of <i>Croton blanchetianus</i> by oral or intraperitoneal administration.....	72
Table 2 –	Hematological parameters of mice from control and treated for 14 days with the ethanolic extract from leaves of <i>Croton blanchetianus</i> by oral or intraperitoneal administration.....	72
Table 3 –	Biochemical parameters of blood of mice from control and treated for 14 days with the ethanolic extract from leaves of <i>Croton blanchetianus</i> by oral or intraperitoneal administration.....	72
Table 4 –	Evaluation of the relative weight of organs from mice of control group or treated for 14 days with the ethanolic extract from leaves of <i>Croton blanchetianus</i> by oral or intraperitoneal administration.....	73
Table 5 –	Time spent in the rotating rod by animals from control or treated with the ethanolic extract from <i>Croton blanchetianus</i> leaves (oral administration) or the reference drug diazepam (i.p.)	74
Table 6 –	Evaluation of <i>in vivo</i> genotoxicity of ethanolic extract from <i>Croton blanchetianus</i> leaves (oral administration) or positive control doxorubicin (DXR, i.p.) by determination of the number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) from bone marrow of mice.....	74

Artigo 2

Tabela 1 –	Parâmetros hematológicos de camundongos do grupo	
------------	--	--

	controle ou tratados com o extrato etanólico das folhas de <i>Croton blanchetianus</i> a 250, 500 e 1000 mg/kg por 14 ou 28 dias por administração oral.....	45
Tabela 2 –	Parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos do grupo controle ou tratados com o extrato etanólico das folhas de <i>Croton blanchetianus</i> a 250, 500 e 1000 mg/kg por 14 ou 28 dias por administração oral.....	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 OBJETIVOS.....	19
1.1.1 Objetivo Geral.....	19
1.1.2 Objetivos específicos	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS.....	20
2.2 TOXICOLOGIA DOS FITOTERÁPICOS	21
2.3 TOXICIDADE AGUDA.....	22
2.4 TOXICIDADE SUBAGUDA (DOSES REPETIDAS)	24
2.5 DOR.....	25
2.6 INFLAMAÇÃO	26
2.7 O GÊNERO <i>CROTON</i>	28
2.7.1 <i>Croton blanchetianus</i>	29
3 RESULTADOS	31
3.1 ARTIGO 1 – AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE SUBAGUDA E ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIPIRÉTICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE <i>CROTON BLANCHETIANUS</i>	31
3.2.1 Introdução	32
3.2.2 Materiais e métodos.....	33
3.2.2.1 Material vegetal.....	33
3.2.2.2 Preparação do extrato.....	33
3.2.2.3 Animais	34
3.2.2.4 Ensaio de toxicidade utilizando doses repetidas.....	34
3.2.2.5 Análises hematológicas e bioquímicas	34
3.2.2.6 Análise histológica.....	35
3.2.2.7 Ensaio de atividade anti-inflamatória	35
3.2.2.8 Ensaio de atividade antipirética	36
3.2.2.9 Análise estatística	36
3.2.3 Resultados e discussão.....	36
3.2.3 Conclusão.....	47
3.2.4 Referências.....	49
REFERÊNCIAS	55

APENDICE A. ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA SOUTH AFRICAN JOURNAL OF BOTANY - TOXICITY ASSESSMENT AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF AN ETHANOLIC EXTRACT FROM CROTON BLANCHETIANUS (EUPHORBIACEAE) LEAVES	63
--	----

1 INTRODUÇÃO

As plantas têm desempenhado papel fundamental no desenvolvimento humano, tanto como ingredientes de alimentos quanto na busca de estratégias para o tratamento de doenças. Além disso, o conhecimento sobre plantas medicinais muitas vezes simboliza o único recurso terapêutico para muitas comunidades e grupos étnicos devido à falta de acesso e alto custo dos medicamentos alopáticos convencionais (SHAW, 2010; SILVA; BIESKI, 2018).

As plantas medicinais foram o principal meio de tratamento de enfermidades até a Revolução Industrial no século XIX, quando as inovações tecnológicas possibilitaram a produção de medicamentos à base de drogas sintéticas em grande escala (COSTA et al., 2015). Porém, as plantas permaneceram sendo utilizadas pela população, mas principalmente de forma empírica, seja pela carência de estudos científicos e toxicológicos ou pelo desconhecimento dos resultados desses estudos. O crescente uso e comercialização de plantas medicinais tem resultado na busca por informações cientificamente comprovadas sobre sua segurança e eficácia terapêutica (KAUTZKY-WILLER et al., 2019; RIBEIRO et al., 2012).

Segundo a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), os fitoterápicos são produtos obtidos por meio de processos tecnicamente adequados, utilizando apenas materiais vegetais, e têm finalidade preventiva, terapêutica, aliviadora ou para fins de diagnóstico. Caracterizam-se também pela compreensão da eficácia e dos riscos da sua utilização, bem como da reprodutibilidade, estabilidade e qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico ou produto tradicional fitoterápico aqueles que incluam na sua composição substâncias ativas isoladas ou altamente purificadas, sejam elas sintéticas, semissintéticas ou naturais e nem as associações dessas com outros extratos, sejam eles vegetais ou de outras fontes, como a animal (BRASIL, 2014).

Dentre as plantas medicinais que são utilizadas popularmente, encontramos a *Croton blanchetianus*, planta pertence à família Euphorbiaceae. No Brasil, existem 300 espécies de *Croton*, que são conhecidas devido à diversidade de metabólitos secundários produzidos. Por essas razões, eles têm sido investigados cientificamente para uma variedade de atividades biológicas (OKOKON; NWAFOR, 2010; SILVA et al., 2010). *Croton blanchetianus* Baill, conhecida como "marmeleiro" (XAVIER et al.,

2015), é um arbusto amplamente encontrado no nordeste do Brasil. Suas folhas e casca são utilizadas na medicina popular para o tratamento de inchaços (NETO, 2011), distúrbios gastrointestinais, reumatismo, cefaleia (SÁ FIRMINO et al., 2019). Preparações de *C. blanchetianus* também apresentaram atividade antimicrobiana (MELO et al., 2013).

Tendo em vista os diversos relatos de propriedades medicinais de *Croton blanchetianus*, este trabalho avaliou extrato etanólico obtido de suas folhas quanto ao perfil fitoquímico e toxicidade aguda e subaguda em camundongos, verificando a taxa de sobrevivência, comportamento, alterações histológicas e parâmetros hematológicos e bioquímicos. Foi ainda investigado o potencial genotóxico do extrato. De posse das informações obtidas nos testes de toxicidade, foram então avaliadas as atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e antipirética em doses consideradas seguras.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar extrato etanólico de folhas de *Croton blanchetianus* quanto ao perfil fitoquímico e toxicidade e atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e antipirética em camundongos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil fitoquímico do extrato etanólico de folhas de *C. blanchetianus*.
- Avaliar a toxicidade aguda e subaguda do extrato para camundongos.
- Investigar possível efeito genotóxico do extrato em camundongos.
- Investigar a atividade antinociceptiva *in vivo* do extrato em diferentes modelos de indução de dor
- Avaliar o efeito anti-inflamatório *in vivo* do extrato em modelo de edema de pata.
- Avaliar atividade antipirética *in vivo* do extrato em modelo de febre induzida por levedura.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais e fitoterápicos

O uso de plantas medicinais sempre está presente em todos os períodos da História, não só pelo seu caráter dietético, mas também por suas propriedades biológicas. As primeiras civilizações sabiam desde cedo que algumas plantas contêm princípios ativos que, quando testados no combate às doenças, revelam empiricamente poder de cura (BADKE et al., 2011).

No Brasil, a Fitoterapia é um meio de tratamento que, em geral, atende às necessidades de atenção primária à saúde em diversos municípios, principalmente nas regiões mais pobres. Dentre os fatores que têm contribuído para a expansão da Fitoterapia, estão os efeitos adversos das drogas sintéticas, preferências do consumidor por tratamentos "naturais", aumento da validação científica das propriedades farmacológicas das plantas, desenvolvimento de novos métodos analíticos de controle de qualidade, desenvolvimento de novas formas de preparação, formulação e administração de produtos e custos relativamente baixos (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

A legalidade e a institucionalização dos métodos médicos tradicionais brasileiros de atenção à saúde tiveram início na década de 1980, principalmente a partir da implantação do Sistema Único de Saúde (SUS). Posteriormente, de acordo com a regulamentação promulgada pelo Ministério da Saúde (MS) nº 971 (MS) em 03 de maio de 2006, foi formulada no SUS a Política Nacional de Prática Integral e Complementar (PNPIC) com o objetivo de ampliar as opções de tratamento aos usuários do SUS. Entre essas opções estavam as plantas medicinais, com garantia de acesso aos fitoterápicos, com segurança, eficiência e qualidade (BRASIL, 2006; FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014).

Posteriormente, em 2008, foi criado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), tendo como objetivo garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da

indústria nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Segundo dados do Ministério da Saúde, entre os anos de 2014 e 2018 foi registrada uma saída média de mais de 2 milhões de produtos fitoterápicos das unidades farmacêuticas de fitoterápicos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename), mostrando o grande uso de produtos registrados no Brasil.

Por fim, em 2014, foi aprovada a Resolução do Conselho-RDC nº 26 (13 de maio de 2014), que previa o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e notificação dos fitoterápicos tradicionais.

2.2 Toxicologia dos fitoterápicos

Em comparação com as terapias tradicionais, a toxicidade dos medicamentos feitos de plantas pode parecer insignificante, mas esse é um sério problema de saúde pública. As plantas medicinais podem causar reações indesejáveis pelos próprios componentes, em decorrência de interações com outros medicamentos ou alimentos, e até relacionadas às características do paciente (BALBINO; DIAS, 2010). O diagnóstico errado, a identificação incorreta de espécies vegetais e o uso de métodos não tradicionais podem ser perigosos, podendo causar uma superdosagem, tratamento ineficaz e reações adversas (MACHADO et al., 2014).

Os testes de toxicidade visam classificar as substâncias do ponto de vista toxicológico, ao mesmo tempo em que fornecem informações sobre a forma correta de uso, bem como as medidas preventivas e terapêuticas a serem tomadas em caso de uso indevido, independentemente do tempo recomendado para uso em humanos. Esses testes avaliam os efeitos fisiológicos de substâncias naturais ou químicas administradas em animais, e os dados desses estudos fornecem uma base importante para a verificação clínica subsequente (VALADARES, 2006).

A partir do momento em que a legislação definiu fitoterápicos como medicamentos, eles ficaram sujeitos a provas de eficácia e estudos de segurança. Sendo assim, sempre que se inicia um estudo com plantas medicinais ou produtos fitoterápicos deve ser investigada a toxicidade, qualquer que seja o tempo de tratamento previsto (LIMA et al, 2017).

Em 2013, a ANVISA divulgou o “Guia para a condução de estudos não clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica necessários ao desenvolvimento de

medicamentos”. Essa compilação é baseada em documentos das agências *Food and Drug Administration* (FDA), *European Medicines Agency* (EMA) e agências afins da área como *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), *National Cancer Institute* (NCI) e Organização Mundial da Saúde (OMS), buscando uma maior harmonização com as regulamentações internacionais (ANVISA, 2013).

Segundo dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox), entre os anos de 2012 e 2013 ocorreram 2.332 casos de intoxicação por plantas no Brasil, com 4 mortes. Embora a grande maioria desses casos tenha sido causada por acidentes individuais, cerca de 10% foram causados pelo uso com fins medicinais, mostrando que mesmo com o amplo conhecimento disponível sobre as plantas e seus potenciais medicinais, ainda existem vários casos de intoxicação (NUNES et al., 2017; SILVA; JUNIOR; MORAIS, 2018).

2.3 Toxicidade aguda

De acordo com o Ministério da Saúde, no período 2013-2015 o uso de fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) aumentou 161%. Um dos motivos para esse aumento no uso de plantas medicinais e seus derivados é a crença de que "se é natural não faz mal"; porém, isso é um mito (ANVISA, 2016). Dependendo da dose, as plantas podem causar reações como intoxicação, náusea, irritação, inchaço (edema) e até morte, como qualquer outra droga (BONIL; BUENO, 2009).

Os testes de toxicidade são essenciais para a triagem de medicamentos em desenvolvimento a fim de identificar os perigos potenciais da substância em estudo e caracterizar seus efeitos. A maioria dos testes de toxicidade são realizados em animais de laboratório, já que existe a possibilidade de definir de forma clara a composição genética e a possibilidade de exposição e tempo controlado, além da possibilidade de um exame detalhado de todos os tecidos após a dissecação (AROME; CHINEDU, 2014).

Dentre os ensaios realizados, encontramos o teste de toxicidade aguda, no qual os animais recebem uma única uma vez o produto em estudo ou, ocasionalmente, em doses divididas ao longo de um período não superior a 24 horas. O teste pode estimar

e avaliar preliminarmente a toxicidade de compostos fitoterápicos e fornecer informações sobre os riscos à saúde da exposição de curto prazo por meio de canais selecionados. (ANVISA, 2013). O teste fornece também um parâmetro denominado dose letal de 50%, mais conhecido como DL_{50} . A DL_{50} é um parâmetro estatístico e representa a probabilidade de que a dose cause um efeito letal em metade da população animal testada (PIERRE et al., 2019). É possível classificar o nível de toxicidade dos compostos através da DL_{50} em 6 níveis de toxicidade (ROSSIANA et al., 2020), mostrados na tabela abaixo:

Tabela 1. Toxicidade dos compostos com base em DL_{50} (ROSSIANA et al., 2020)

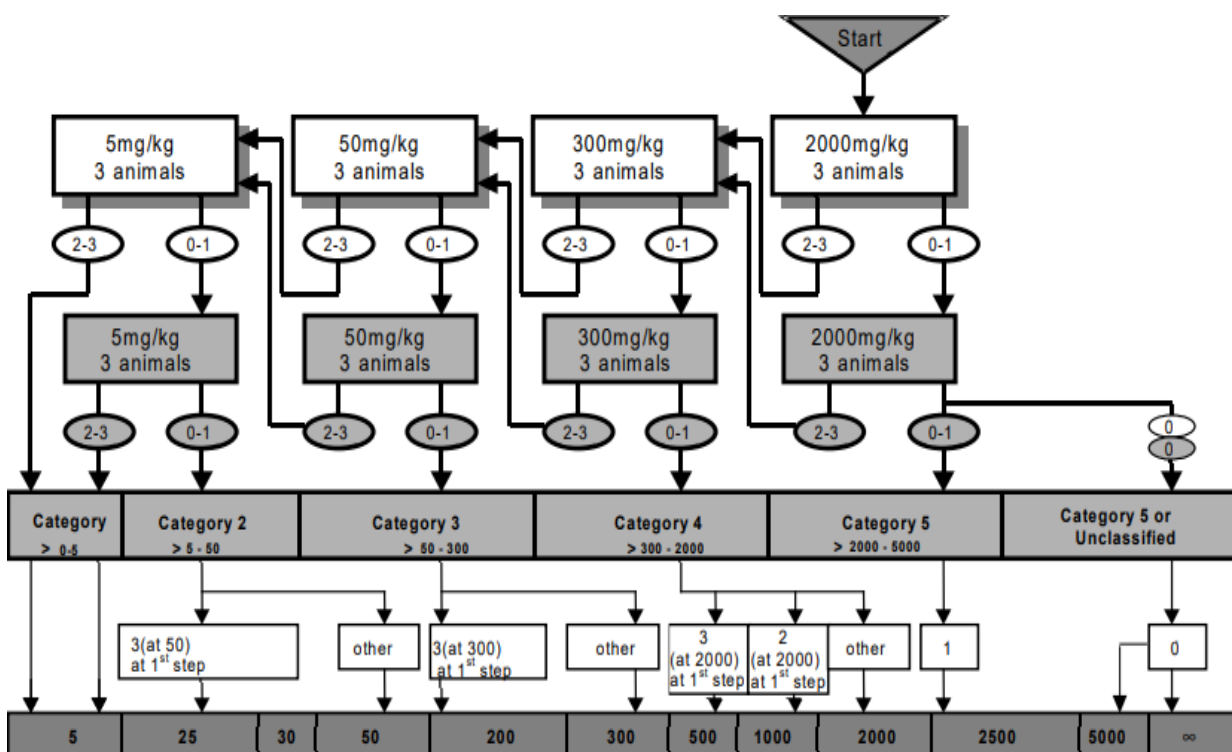
<i>Nível</i>	<i>Classificação</i>	<i>Faixa</i>
1	Extremamente tóxico	$DL_{50} \leq 1 \text{ mg/kg}$
2	Altamente tóxico	$1 \text{ mg/kg} \leq DL_{50} \leq 50 \text{ mg/kg}$
3	Moderadamente tóxico	$50 \text{ mg/kg} \leq DL_{50} \leq 500 \text{ mg/kg}$
4	Ligeiramente tóxico	$500 \text{ mg/kg} \leq DL_{50} \leq 5000 \text{ mg/kg}$
5	Quase não tóxico	$5.000 \text{ mg/kg} \leq DL_{50} \leq 15.000 \text{ mg/kg}$
6	Inofensivo	$DL_{50} \geq 15.000 \text{ mg/kg}$

O ensaio de toxicidade aguda fornece informações sobre o potencial de toxicidade aguda em humanos, pois é possível fazer uma estimativa de doses agudas seguras para humanos, além de apontar órgãos-alvo potenciais para toxicidade, curso de tempo de observações clínicas induzidas por drogas, além da dosagem apropriada para estudo de toxicidade de dose repetida. Com essas informações é possível prever as consequências de uma situação de overdose humana. A avaliação prévia da toxicidade aguda pode ser importante para indicações terapêuticas em que as populações de pacientes estão em risco aumentado de superdosagem, por exemplo, depressão, dor e demência (COLERANGLE, 2017).

Para o teste de toxicidade aguda, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Cooperation and Development*; OECD) recomenda o uso de camundongos ou ratos fêmeas e um número de três animais em cada estágio do experimento, onde a ausência ou presença de morte dos animais tratados determina a necessidade de etapas

adicionais (Figura 1). Além disso, a administração oral é mais recomendada e a dose limite de 2.000 mg/kg é suficiente para estimar a DL₅₀, podendo ser extrapolada para dose de 5.000 mg/kg em alguns casos (JONSSON et al., 2013; OECD, 2002).

Figura 1: Orientações da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico para avaliação da toxicidade oral aguda de produtos químicos



Fonte: OECD, 2002.

2.4 Toxicidade subaguda (doses repetidas)

Os estudos de toxicidade utilizando doses repetidas são essenciais para a avaliação quantitativa do risco de substâncias químicas. Esses estudos são conduzidos para avaliar os potenciais efeitos adversos de um medicamento por um período mais longo e a duração, em qualquer ponto do desenvolvimento pré-clínico, deve em princípio ser igual ou exceder a duração dos ensaios clínicos em humanos, até a duração máxima recomendada (COLERANGLE, 2017).

Estudos de toxicidade utilizando doses repetidas são realizados para avaliar os possíveis efeitos colaterais de um novo medicamento após 2 a 4 semanas de tratamento. Eles são realizados como estudos limitativos para selecionar os níveis de dose a serem usados em estudos subsequentes de toxicidade subcrônica e crônica.

Os estudos de toxicidade subaguda podem apoiar os ensaios clínicos iniciais e são projetados para avaliar a progressão e regressão do trauma induzido por drogas, mas geralmente são insuficientes para identificar quaisquer efeitos colaterais que podem ocorrer durante o uso clínico de longo prazo (HAYES; WANG; DIXON, 2020). Além disso, os estudos fornecem informações sobre as características gerais da toxicidade, tais como a toxicidade para órgãos-alvo específicos, a relação dose-resposta, respostas a metabólitos tóxicos formados no organismo, respostas retardadas, efeitos cumulativos e informações sobre reversibilidade e irreversibilidade do efeito (CAVAGNARO, 2010).

De acordo com as diretrizes da OCDE, é recomendável usar ratos para o teste, mas outros roedores também podem ser usados. Para evidenciar a diferença no nível de efeitos tóxicos, devem ser utilizadas três doses suficientemente separadas, até a dose limite de 1000 mg/kg/dia. Cada grupo deve ser composto por dez animais, sendo cinco machos e cinco fêmeas. A substância em estudo deve ser administrada por via oral, seja por gavagem, na dieta ou na água de beber. O modo de administração depende das propriedades físicas e químicas do produto em estudo (OECD, 2008).

2.5 Dor

Uma das formas de definição de dor mais completa é a da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IAPS) que a descreve como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano real ou potencial ao tecido, ou descrita em termos de tal dano”. A dor é um mecanismo biológico de transdução de sinal causado por estímulos nocivos do ambiente externo ou interno, com a função de restaurar a homeostase, ativar reações e induzir comportamentos preventivos, restaurando ou limitando os danos (LENT, 2010). A dor, sendo uma experiência subjetiva, inclui um forte componente cognitivo e emocional ou afetivo (SILVA; FILHO, 2011).

Receptores da dor, ou nociceptores, são terminações nervosas livres, amplamente presentes em todos os tecidos e órgãos, como camadas superficiais da pele, na parede que reveste a luz dos órgãos, no parênquima de órgãos sólidos, nas paredes das artérias e veias, nos ossos e nas articulações (GUYTON; HALL, 2011; LENT, 2010). A dor é iniciada a partir de um estímulo nociceptivo, que ativa ou

sensibiliza os nociceptores (SANDKÜHLER, 2009), gerando um potencial de ação que se transmite pelo neurônio periférico até a medula espinhal onde o sinal é transferido para o segundo neurônio e a seguir para regiões superiores do sistema nervoso central (GUYTON; HALL, 2011; LENT, 2010).

Quanto ao limiar de duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda ou rápida é caracterizada por pontualidade, limitação e deixa de existir quando o estímulo em desenvolvimento desaparece. A dor crônica ou lenta persiste por um longo tempo, associada a alterações fisiológicas crônicas e alterações no padrão de transmissão neuronal (GARLAND, 2012). Um processo inflamatório envolve mediadores inflamatórios e/ou provoca uma lesão que ativa ou sensibiliza os nociceptores locais. Diferentes mediadores nociceptivos como a endotelina, substância P, prostaglandinas e aminas simpatomiméticas sensibilizam diretamente os nociceptores (YU et al., 2013).

Dentre os vários métodos de tratamento da dor, o uso de plantas medicinais ainda é muito frequente. Mesmo havendo várias drogas sintéticas disponíveis, as pessoas ainda usam sua experiência e conhecimento para tratar algumas enfermidades (RIBEIRO; MELO; BARROS, 2016). Plantas como a hortelã (*Mentha spicata*), embora os principais benefícios sejam o alívio de gases e inflamações estomacais, também tem um interessante efeito analgésico que pode diminuir a dor gástrica e outras doenças associadas (SALEHI et al., 2018). Além de ser usada como tempero para dar sabor e aroma agradáveis, a canela (*Cinnamomum zeylanicum*) tem efeito analgésico que pode diminuir dores musculares, cãibras e espasmos, sendo utilizada normalmente como infusão das cascas (SÁ et al., 2017). Cordeiro et al. (2016) demonstraram que extrato metanólico feito da casca de *Croton urucurana* tem atividade analgésica, reforçando o conhecimento popular.

2.6 Inflamação

A inflamação é um mecanismo de defesa ou resposta protetora do corpo contra danos físicos (por exemplo, trauma mecânico, radiação, calor, frio), agentes químicos e/ou microrganismos (CRUVINEL et al., 2010). No processo de inflamação, células competentes da resposta imunológica são ativadas e atuam para promover a inativação e/ou destruição dos microrganismos invasores, remoção de substâncias

irritantes e antígenos proteicos, além de iniciar a reparação tecidual. Quando o processo reparatório se completa, naturalmente os sinais de inflamação desaparecem (FLOWER; PERRETTI, 2005).

A inflamação envolve dois estágios: a fase aguda e a fase crônica. Na fase aguda iniciam-se os eventos cardinais com envolvimento da resposta imune inata. Este tipo de inflamação persiste apenas por um curto período e é normalmente benéfica para o hospedeiro. Se a inflamação persistir por um longo período, é desencadeada a segunda fase da inflamação ou inflamação crônica, que pode predispor o hospedeiro a uma série de doenças crônicas (REUTER et al., 2010). Sendo assim, acredita-se que intervenções no processo inflamatório sejam um potencial alvo terapêutico para reduzir o risco de certas doenças e incapacidades (BEAVERS; BRINKLEY; NICKLAS, 2010).

Durante a reação inflamatória aguda, ocorre um processo quimiotático, quando os leucócitos migram através de sinais para o local onde ocorre o processo inflamatório. Essas células desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de processos inflamatórios, liberando moléculas solúveis chamadas citocinas, principalmente interleucinas 1 e 6 e fator de necrose tumoral (TNF- α). A migração de leucócitos envolve um mecanismo rígido para regular a adesão dessas células ao endotélio e subsequente migração para tecidos danificados. Esse mecanismo envolve a expressão de diferentes moléculas solúveis e de adesão, incluindo selectina e integrina, quimiocinas e óxido nítrico (CRUVINEL et al., 2010).

Existem vários meios de realizar estudos para descoberta de novos compostos com ação anti-inflamatória. Dentre eles, os modelos *in vivo* podem ser considerados a melhor ferramenta de pesquisa porque não existe outro método que possa estudar simultaneamente as células e mediadores que interagem durante a inflamação. Além disso, camundongos *knock-out* podem ser utilizados para compreender a função específica de receptores dentro de populações celulares selecionadas (KNAPP, 2009).

Dos diferentes protocolos do estudo *in vivo*, podemos citar os modelos induzidos por agentes flogísticos como por exemplo carragenina, dextrano, histamina e ácido araquidônico, que são bastante utilizados em estudos pré-clínicos (MARTINS et al., 2017; SANTOS et al., 2019). Estudos realizados com esses modelos fortalecem a literatura com informações sobre atividade anti-inflamatórias de diversos compostos,

entre eles plantas de uso popular, como é o caso o óleo essencial de folhas de *Croton*, *rhamnifolioides*, que demonstrou atividade anti-inflamatória em doses de 25 mg/kg (MARTINS et al., 2017).

2.7 O gênero *Croton*

O gênero *Croton* pertence à família Euphorbiaceae, que inclui cerca de 1.300 espécies de árvores, arbustos e gramíneas, sendo amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Na África, Sul da Ásia e América do Sul, muitas espécies de *Croton* têm sido usadas como remédios caseiros para tratar muitas doenças, incluindo dor abdominal, abscessos, inflamação e malária (XU; LIU; LIANG, 2018). No Brasil, cerca de 300 espécies desse gênero são descritas, incluindo ervas, subarbustos e árvores, a maioria das quais são encontradas em vegetação aberta ou floresta seca, mas também em florestas úmidas. Na Caatinga, são encontradas 68 espécies de *Croton*, das quais 21 são exclusivas (SILVA et al., 2010).

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido realizados com as espécies de *Croton*, motivados pela variedade de efeitos farmacológicos do gênero, como por exemplo, atividades antinociceptiva (CARMEN et al., 2016), anti-inflamatória (OLIVEIRA-TINTINO et al., 2018) e gastroprotetora (VIDAL et al., 2017). As espécies de *Croton* são plantas ricas em óleos essenciais e estudos mostraram que esses óleos possuem efeitos anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, entre outros (SILVA et al., 2010).

Dentre as várias espécies de *Croton* com efeitos relatados na literatura podemos citar *Croton argyrophylloides*, conhecido como marmeleiro prateado ou marmeleiro branco, uma planta comum no Nordeste que é usada em casos de cólicas intestinais. Estudos mostraram que essa planta possui ação antioxidante, antimicrobiana e antiparasitária (AGUIAR et al., 2012; SILVA et al., 2016; LIMA et al., 2016). Outra espécie que podemos citar é *Croton jacobinensis* (sinônimo: *Croton sonderianus* Müll.Arg.), planta nativa do nordeste do Brasil, popularmente conhecida como marmelo ou marmelo preto, sendo comumente usada para dores e sangramento. Essa planta contém compostos como diterpenos, alcalóides e flavonóides. Estudos recentes mostram

que seu óleo essencial possui efeitos citotóxicos e antifúngicos (SILVA; OLIVEIRA; CAMARA, 2018; PINO et al., 2016; SILVA et al., 2010).

2.7.1 *Croton blanchetianus*

Croton blanchetianus Baill., popularmente conhecido como "marmelo-preto", apresenta-se como um arbusto de dimensões variáveis até 6 m de altura (Figura 2A), ramificado, de folhas simples (Figura 2B), elíptico-ovais e peludas, com aroma de óleo de pinho, dotadas de grandes estípulas, principalmente nos ramos jovens. é encontrado nas regiões semiáridas do Brasil (ALVES et al., 2014). Existem alguns sinônimos botânicos, como *Croton alagoensis* Müll. Arg, *Croton micranthus* Müll. Arg. e *Oxydectes blanchetiana* (Baill.) Kuntze (FLORA DO BRASIL, 2020).

Figura 2. *Croton blanchetianus*. (A) Arbusto. (B) Detalhes das folhas.



Fonte: Autoria própria

C. blanchetianus é muito utilizada pela população rural, principalmente para a produção de lenha e a construção de cercas para pequenos animais. Suas folhas e casca são utilizadas como remédios populares para tratar doenças gastrointestinais, reumatismo e dores de cabeça (MELO et al., 2013). AQUINO et al., (2017) mostraram

o potencial antioxidante do extrato etanólico das folhas. Atividade antimicrobiana foi descrita por Melo et al., (2013), que detectaram atividade do óleo essencial das folhas frente às bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica*. Outro estudo mostrou que diterpenos isolados de *C. blanchetianus* têm efeitos antibióticos, que inibem a formação de biofilme e erradicam biofilmes pré-formados de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus parassanguinis* (SÁ FIRMINO et al., 2019). Mostrando assim ter potencial para pesquisas de novos fármacos.

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO 1 – Avaliação de toxicidade subaguda e atividades anti-inflamatória e antipirética do extrato etanólico de folhas de *Croton blanchetianus*

Anderson Felipe Soares de Freitas^a, Ramona Winder^a, Matheus Ferreira Nascimento^a, Wêndeo Kennedy Costa^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Alisson Macário de Oliveira^a, Thiago Henrique Napoleão^a

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

RESUMO

roton blanchetianus Baill, conhecido como "marmeleiro", é um arbusto amplamente encontrado no nordeste do Brasil, sendo suas folhas e casca utilizadas na medicina popular para o tratamento de inchaços, distúrbios gastrointestinais, reumatismo e cefaleia. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade subaguda desse extrato quando administrado por via oral em camundongos durante 2 ou 4 semanas. Adicionalmente, o extrato foi avaliado quanto às atividades antipirética e anti-inflamatória. A administração oral diária do extrato etanólico de folhas de *C. blanchetianus* por 14 e 28 dias, nas doses testadas, não causou óbitos nem induziu alterações fisiológicas e comportamentais de maior relevância em camundongos machos e fêmeas, porém foi observado aumento dos níveis séricos de transaminases, indicando a necessidade de cautela no uso prolongado. A histologia não mostrou alterações no fígado, porém, foi possível observar alterações nos rins, onde os glomérulos reduzidos com espaço de Bowman aumentado. O extrato apresentou atividades anti-inflamatória, obtendo uma inibição do edema em 34,07%, 39,72% e 58,27% quando tratados com 50, 100 e 200 mg/kg do extrato etanólico de *C. blanchetianus* em comparação com o controle negativo. O extrato apresentou também atividade antipirética, bem como potencial hipolipemiante, o que estimula a continuidade dos estudos acerca da toxicidade quando do possível desenvolvimento de fármacos a partir dessa planta.

Palavras-chave: Euphorbiaceae; levantamento toxicológico; flavonóides.

3.2.1 Introdução

As plantas estão presentes de diferentes formas em nosso cotidiano, seja para o tratamento de doenças ou como fontes de alimento. Pesquisas mostram que cerca de 80% da população mundial possui a medicina popular como principal método de atenção à saúde (YANG *et al.*, 2019). Pesquisas com plantas de uso popular constituem excelente método na busca de novos compostos para a produção de novos medicamentos (CALIXTO, 2019). Porém, muitas plantas são utilizadas sem qualquer base científica e avaliações de toxicidade, o que tem levado a preocupações crescentes sobre a segurança e eficácia de seu uso (CESÁRIO *et al.*, 2019; YUJING *et al.*, 2020).

A inflamação é um mecanismo de defesa que envolve uma combinação de fatores moleculares (como citocinas, óxido nítrico, prostaglandinas e outros mediadores) que pode ser desencadeado por patógenos, estresse ou danos aos tecidos. O objetivo da reação inflamatória é eliminar o estímulo induzido da resposta e iniciar a recuperação local do tecido, no entanto, a inflamação pode ser potencialmente prejudicial porque suas manifestações podem causar danos ao próprio organismo, às vezes mais prejudicial do que a própria substância nociva, como na artrite reumatoide (CRUVINEL *et al.*, 2010, ANTONELLI; KUSHNER, 2017). O tratamento convencional de várias condições inflamatórias geralmente envolve o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que são eficientes, mas têm efeitos adversos que podem causar complicações cardiovasculares, renais e gastrointestinais (JAJA-CHIMEDZA *et al.*, 2017).

Na busca de alternativas de fármacos anti-inflamatórios, diversas plantas vêm sendo estudadas, dentre elas algumas pertencentes ao gênero *Croton* (família Euphorbiaceae). No Brasil, existem cerca de 300 espécies desse gênero, as quais são conhecidas devido à diversidade de metabólitos secundários produzidos. Por essas razões, elas têm sido investigadas cientificamente quanto a uma variedade de atividades biológicas (AQUINO *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2020). *Croton blanchetianus* Baill, conhecido como "marmeleiro", é um arbusto amplamente encontrado no nordeste do Brasil, sendo suas folhas e casca utilizadas na medicina popular para o

tratamento de inchaços (NETO, 2011), distúrbios gastrointestinais, reumatismo e cefaleia (FIRMINO *et al.*, 2019). Essa planta é rica em diterpenos, flavonoides e outros compostos fenólicos e o seu óleo essencial já foi descrito atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e gastroprotetora (MELO *et al.*, 2013; GARCÍA DÍAZ *et al.*, 2019).

Em estudo anterior, foi demonstrado que extrato etanólico das folhas de *C. blanchetianus* não apresentou toxicidade aguda em camundongos quando administrado por via oral, além de apresentar atividade antinociceptiva (FREITAS *et al.*, 2020). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de doses repetidas desse extrato quando administrado por via oral em camundongos durante 2 ou 4 semanas. Adicionalmente, o extrato foi avaliado quanto às atividades antipirética e anti-inflamatória.

3.2.2 Materiais e métodos

3.2.2.1 Material vegetal

Folhas de *C. blanchetianus* foram coletadas em 22 de abril de 2019 no município de Santa Terezinha, Pernambuco (07°22'40" S, 37°28'48" W). O acesso foi registrado (AEC4F6E) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). Um exemplar (nº 93.062) foi depositado no herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

3.2.2.2 Preparação do extrato

O extrato foi preparado como descrito por Freitas *et al.* (2020) O pó das folhas secas foi utilizado para preparar o extrato etanólico (EECB) por turbo extração (3 ciclos de 30 s com intervalo de 4 min), na proporção de 10% (p/v), utilizando etanol: água (1:1, v/v). O extrato foi seco em um Mini Spray Dryer LM MSDi 1.0 (LabMaq do Brasil, Ribeirão Preto, Brasil) e dissolvido em solução salina a 0,9% (p/v) para realização dos ensaios. Freitas *et al.* (2020) relataram a presença de alcaloides, terpenos/esteroides, ácidos cinâmicos, taninos condensados, saponinas e açúcares redutores nesse

extrato, bem como determinaram, por HPLC, conteúdos de 0,195%, 0,114% e 0,852% (p/v) de taninos condensados, derivados cinâmicos e flavonoides, respectivamente.

3.2.2.3 Animais

Camundongos Swiss machos e fêmeas (*Mus musculus*), com 50 dias de idade e pesando 30–40 g, foram obtidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram utilizados nos ensaios após uma semana de adaptação no Laboratório de Experimental Animal do Departamento de Bioquímica da UFPE. Os camundongos foram alojados em temperatura de 22 °C, com ciclo claro: escuro de 12:12 e acesso *ad libitum* a ração (Purina, Nestlé Brasil Ltda., Brasil) e água. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE (processo nº 0037/2019).

3.2.2.4 Ensaio de toxicidade utilizando doses repetidas

O estudo de toxicidade oral em doses repetidas seguiu as recomendações do protocolo 407/2008 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2008), com algumas modificações descritas por Oliveira *et al.* (2019). Camundongos machos e fêmeas (10 por grupo experimental, sendo 5 animais de cada sexo) foram divididos em um grupo controle (solução salina 0,9% *per os*) e grupos tratados com extrato de *C. blanchetianus* (250, 500 ou 1.000 mg/kg *per os*), e tratados diariamente por 14 dias ou 28 dias consecutivos. Durante o protocolo experimental, os animais foram observados diariamente quanto a sinais comportamentais e ocorrência de óbito. O ganho de peso e o consumo de água e ração foram registrados semanalmente. No 15º ou 29º dia, os animais foram mantidos em jejum de 8 horas e anestesiados utilizando cetamina (90mg/kg) e xilazina (5mg/kg) (i.p.), para realização de punção da veia cava inferior e coleta de sangue para análise de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Os órgãos internos foram avaliados macroscopicamente, pesados e em seguida processados para análise histológica.

3.2.2.5 Análises hematológicas e bioquímicas

A coleta do sangue foi realizada em dois tubos: 1 mL foi coletado usando um tubo de contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para as análises hematológicas e a outra parte foi centrifugada a 3.000 rpm por 15 min para obtenção do soro para as análises bioquímicas. Nas análises hematológicas, usando um analisador automático (ABC Vet, Montpellier, França) e microscópio óptico (NIKON Eclipse E-200, Japão), foram analisados os seguintes parâmetros: glóbulos vermelhos (GV), hematócrito (HTC), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas (PLQ), leucócitos totais (LEU), leucócitos segmentados (SEG), linfócitos (LIN), monócitos (MON), basófilos (BAS) e eosinófilos (EOS). Nas análises bioquímicas, foram determinados os níveis de albumina (ALB), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FAL), bilirrubina (BIL), gama glutamil transferase (GGT), proteína total (PT), ureia (UR), creatinina (CRE), colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG), utilizando kits específicos (Labtest Diagnósticos, Lagoa Santa, Brasil) e um analisador COBAS Mira Plus (Roche Diagnostics Systems, Basel, Suíça).

3.2.2.6 *Análise histológica*

Fígado, rim, baço, pulmão e coração dos animais dos grupos controle e tratados foram cortados e imersos em formalina tamponada (10%) para fixação por 24 h. Em seguida, foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. As seções (5 µm) foram montadas em lâminas, coradas com hematoxilina-eosina e montadas com lamínulas. As lâminas preparadas foram analisadas em microscópio óptico (NIKON Eclipse E-200, Japão) com aumento de 200× ou 400×.

3.2.2.7 *Ensaio de atividade anti-inflamatória*

Foi utilizado o modelo de edema da pata induzido com carragenina (WINTER *et al.*, 1962). Os camundongos foram divididos em cinco grupos de seis animais cada, sendo foram pré-tratados com extrato (50, 100 e 200 mg/kg), solução salina 0,9% (controle) ou indometacina (20 mg/kg), todos administrados por via oral. Após 1 hora, carragenina a 2% (p/v) foi injetada (15 µL) na região subplantar da pata direita do

camundongo. Na pata esquerda, foram injetados 15 µL de solução salina a 0,9%. O volume das patas foi medido com um paquímetro após 1, 2, 3 e 4 h.

3.2.2.8 Ensaio de atividade antipirética

A investigação da atividade antipirética do extrato foi realizada conforme Oliveira *et al.* (2019). Camundongos machos (30) com temperatura retal entre 35,0 e 36,0 °C foram submetidos à injeção subcutânea de *Saccharomyces cerevisiae* (1 mL/100 g de peso corporal; suspensão a 15%, p/v, em solução salina). As temperaturas retais foram registradas novamente 18 h depois e os camundongos que mostraram um aumento na temperatura corporal acima de 1 °C foram divididos aleatoriamente em grupos (n = 5) tratados com solução salina 0,9% (controle), extrato (100, 200 ou 400 mg/kg, *per os*) ou dipirona 100 mg/kg *per os* (controle positivo). As temperaturas retais foram registradas em termômetro digital 30, 60, 90, 120 e 180 min após o tratamento.

3.2.2.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média das repetições ± desvio padrão (DP). Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Um valor de $p < 0,05$ foi adotado como nível de significância.

3.2.3 Resultados e discussão

Estudos toxicológicos prolongados são extremamente valiosos na determinação da segurança de produtos naturais, permitindo avaliar a repercussão a longo prazo (YUJING *et al.*, 2020). Uma vez que o extrato etanólico de folhas de *C. blanchetianus* já foi avaliado quanto à toxicidade aguda (FREITAS *et al.*, 2020), passou-se então para a etapa de avaliação de toxicidade a médio prazo, utilizando doses repetidas, cujos resultados são descritos no presente trabalho.

Os camundongos machos e fêmeas que receberam o extrato de *C. blanchetianus* a 250 mg/kg e os machos que receberam a dose de 500 mg/kg não apresentaram alterações comportamentais ao longo do estudo, semelhantemente ao

grupo controle. Já os camundongos fêmeas tratados com uma dose de 500 mg/kg e os camundongos de ambos os sexos que receberam a dose de 1.000 mg/kg mostraram irritabilidade no período de 15–30 min após a administração. No entanto, esses sinais não foram mais observados após esse período.

Nenhuma morte foi observada nos grupos tratados diariamente por 14 ou 28 semanas. Na primeira semana de tratamento os houve redução de peso nos grupos de 500 e 1000 mg/kg dos machos e nas fêmeas tratadas com 1000 mg/kg, nos outros grupos houve uma pequena redução na média de peso dos animais, porém, não foi estatisticamente significativa; na segunda semana ocorreu uma redução na média do peso das fêmeas tratadas com 500 e 1000 mg/kg, porém, apenas estatisticamente significativa no grupo de 1000 mg; em relação aos machos, foi observado uma recuperação no peso em comparação a semana anterior (Figura 1A e 1B). A tendência de recuperação de peso continuou a ser observada nos camundongos machos na terceira e quartas semanas de tratamento, enquanto as fêmeas permaneceram com a tendência de diminuição do peso, ocorrendo uma redução significativa na quarta semana em todos os grupos tratados (Figuras 1C e 1D).

Esses dados estão fortemente relacionados ao consumo de alimentos (Figura 2): nos grupos tratados com o extrato por 14 ou 28 dias, os grupos de fêmeas apresentaram diminuição significativa no grupo de 1000 mg ($p < 0,05$) no consumo de alimentos a partir da segunda semana, também foi observado essa redução no grupo de 500 mg na última semana de tratamento (Figura 2A e 2C), enquanto camundongos machos mostraram uma diminuição da ingestão de ração nas duas primeiras semanas, seguidas por aumento gradual no consumo de alimentos na terceira e quarta semana (Figura 2B e 2D). Na análise do consumo de água, não foram observadas alterações nos grupos tratados tanto por 14 dias (Figuras 3A e 3B) ou 28 dias (Figuras 3C e 3D).

No geral, as mudanças no ganho de peso em camundongos refletem a toxicidade após a exposição a substâncias tóxicas. As alterações de peso são indicadores de efeitos adversos de drogas e produtos químicos e serão significativas se a perda de peso exceder 10% do peso corporal inicial (Teo *et al.*, 2002). Ao final dos 28 dias foi observado uma redução de 7,06%, 10,16% e 13,85% nos grupos das fêmeas de tratadas com 250, 500 e 1000 mg/kg respectivamente, já nos machos a redução foi de 0,92%, 0,96% e 4,65% para os animais tratados com 250, 500 e 1000

mg/kg respectivamente. Sendo observado a maior alteração no grupo das fêmeas provavelmente devido a sua maior sensibilidade reportada na literatura.

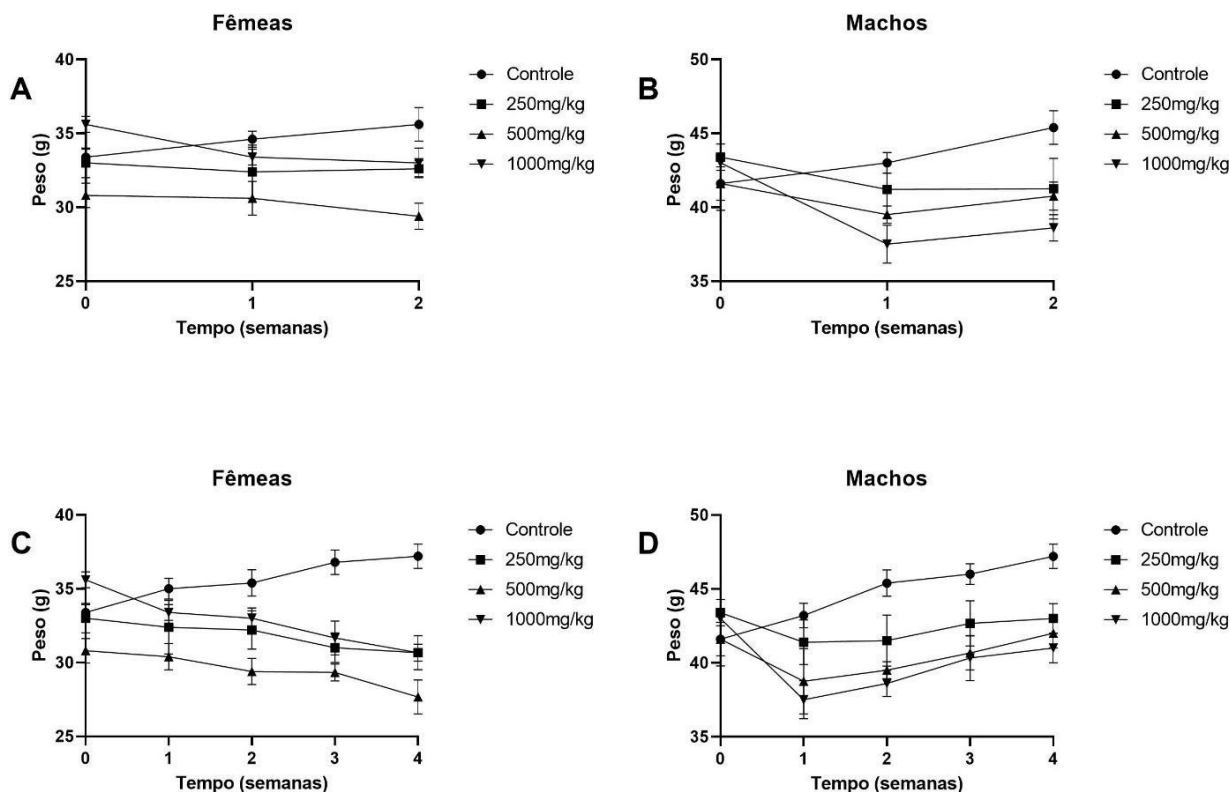


Figura 1. Peso corporal (g) de camundongos machos e fêmeas do grupo controle e dos grupos tratados diariamente por 14 dias (A e B) ou 28 dias (C e D) com o extrato etanólico das folhas de *Croton blanchetianus* a 250, 500 e 1000 mg/kg. Os valores são expressos como média $\pm$ DP.

A avaliação dos parâmetros hematológicos tem alto valor preditivo de toxicidade, pois o sistema hematopoiético é um dos alvos mais sensíveis a substâncias químicas (OLIVEIRA *et al.*, 2019; YUJING *et al.*, 2020). Os resultados da análise hematológica são apresentados na Tabela 1. Para ambos os sexos, não houve alterações significativas ($p > 0,05$) no número de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, VCM, HCM e CHCM em todos os grupos que receberam o extrato, bem como no número de leucócitos nos grupos tratados com 250 e 500 mg/kg por 14 e 28 dias em ambos os sexos.

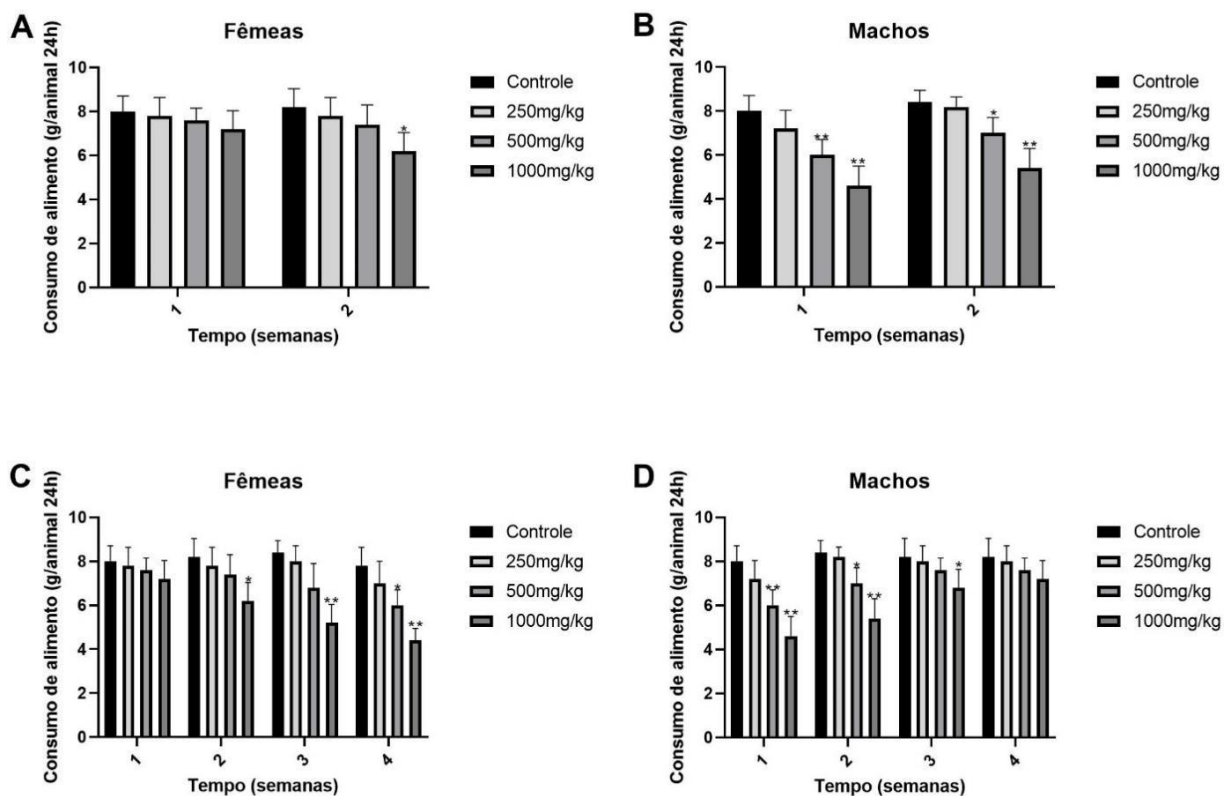


Figura 2. Consumo de ração por camundongos machos e fêmeas do grupo controle e dos grupos tratados diariamente por 14 dias (A e B) ou 28 dias (C e D) com o extrato etanólico das folhas de *Croton blanchetianus* a 250, 500 e 1000 mg/kg. Os valores são expressos como média $\pm$ DP. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Em contraste, uma diminuição significativa no número total de leucócitos foi observada nos animais machos e fêmeas tratados com 1.000 mg/kg por 28 dias. Porém, a porcentagem de linfócitos segmentados, monócitos, basófilos e eosinófilos foi semelhante ao controle (Tabela 1).

Os resultados das análises bioquímicas do soro dos animais são mostrados na Tabela 2. Nos grupos tratados por 2 semanas com o extrato a 1.000 mg/kg, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de ALT em machos e AST em animais de ambos os sexos. Achados semelhantes foram encontrados no tratamento por 28 dias, com um aumento significativo na AST para ambos os sexos nos tratamentos a 500 e 1.000 mg/kg. Uma redução significativa nos níveis de CT e TG foi observada nos tratamentos com todas as doses do extrato por 14 ou 28 dias, em animais de ambos os sexos.

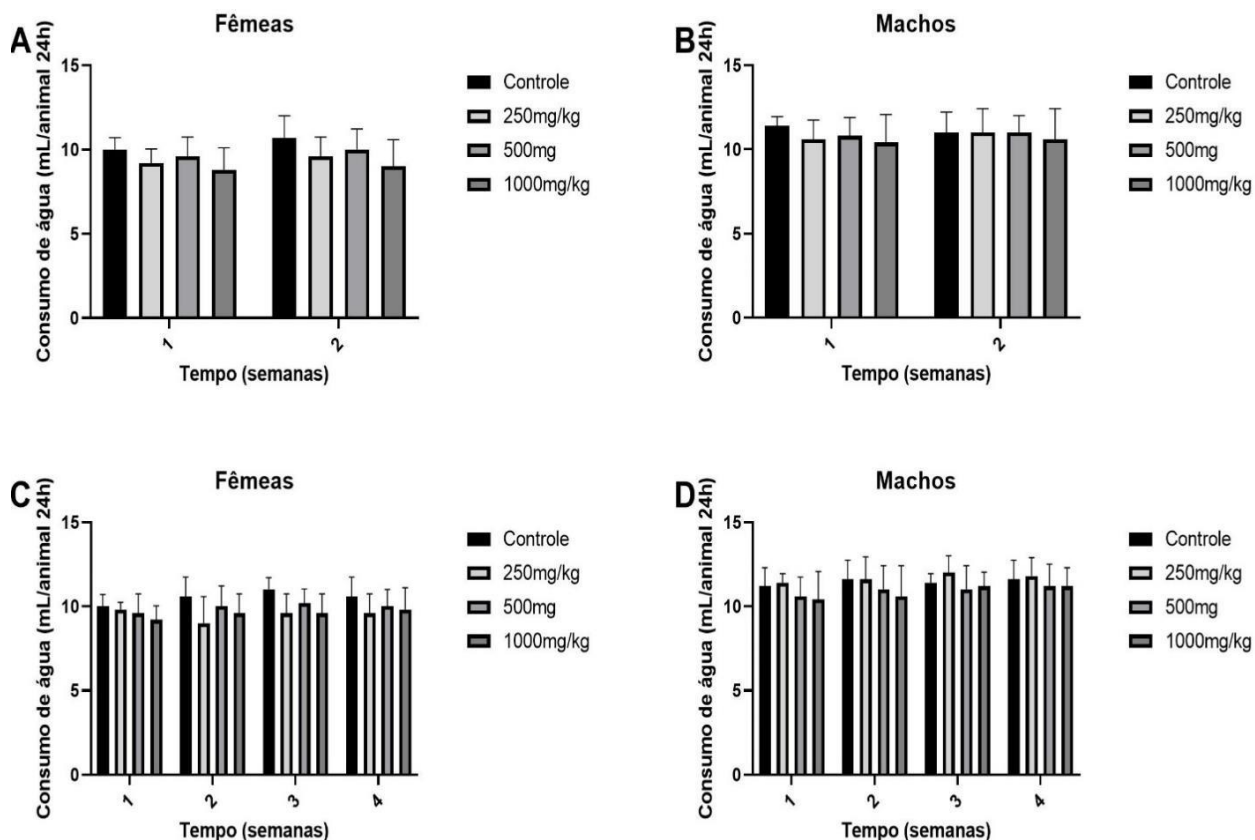


Figura 3. Consumo de água por camundongos machos e fêmeas do grupo controle e dos grupos tratados diariamente por 14 dias (A e B) ou 28 dias (C e D) com o extrato etanólico das folhas de *Croton blanchetianus* a 250, 500 e 1000 mg/kg. Os valores são expressos como média $\pm$ DP.

Os dados da literatura indicam que as alterações hepáticas causadas por certas plantas podem ser graves, como é o caso atividade antimitótica do *Symphytum officinalis* (Confrei), que ocorre nas células do fígado, fazendo com que o citoplasma se expanda sem divisão nuclear, transformando as células do fígado em células gigantes. Conforme as células morrem, elas são substituídas por tecido conjuntivo fibroso e o fígado gradualmente se torna insuficiente (LIMA, 2009). Alterações nos níveis de ALT e AST são sugestivas de dano hepático (Bertolami, 2005), sendo o nível de AST um parâmetro mais sensível (Zanardo *et al.*, 2013).

Como visto, todos os animais tratados com o extrato apresentaram diminuição dos níveis associados ao perfil lipídico, o que pode estar relacionado com o efeito hipolipidêmico relatado para flavonoides (JADHAV, PUCHCHAKAYALA, 2012) e para plantas do gênero *Croton*, como por exemplo a *Croton cajuara*, que em um estudo com ratos Wistar diabéticos tratados com 1,5 ml do extrato aquoso, obteve uma

redução significativa dos níveis de glicose, triglicérides e colesterol (RODRIGUES *et al.*, 2010).

A avaliação histopatológica dos fígados de camundongos no grupo controle negativo (Fig. 6A) mostrou regularidade nos cordões de hepatócitos e espaço de Disse bem definido. As veias centrolobulares apresentaram calibre usual com raras células vermelhas. Semelhantemente, os grupos tratados com EECB (Figs. 6B-D) apresentavam hepatócitos com morfologia poligonal e citoplasma granular e ausência de alterações.

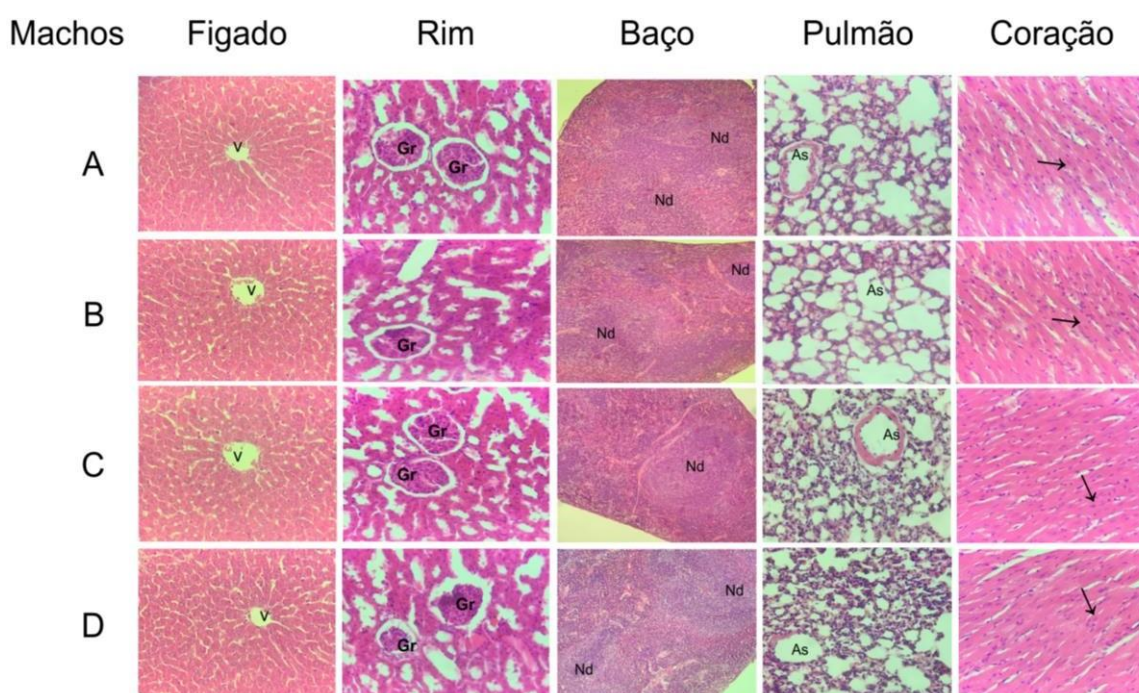


Figura 6. Fotomicrografias representativas dos fígados, pulmões, rins, baço e coração dos camundongos machos do controle (A) ou grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *C. blanchetianus* nas doses de 250 (B), 500 (C) ou 1000 mg (D) / kg por administração oral. Fígados: a veia centrolobular (v) é vista em todas as imagens. Rins: Glomérulos renais (Gr) e túbulos contorcidos. Pulmões: saco alveolar (As), visíveis. Baço: os linfonodos (Nd). Ampliação: 400 x.

Na histopatologia do tecido renal de camundongos do grupo controle negativo (Figs. 4A e A) e tratados com EECB nas concentrações de 250 (Figs. 4B e 5B) e 500 mg/Kg (Figs. 4C e 5C) revelou glomérulos com espaço de Bowman aparentemente normal e com homogeneidade em toda a lâmina com distribuição em toda zona cortical. Os túbulos proximal e distal e alça de Henle eram bem definidos com ausência de alterações morfológicas. Entretanto o grupo tratando com 1000 mg/kg de EECB

em machos (Fig. 4D) e fêmeas (Fig. 5D) apresentou glomérulos reduzidos com espaço de Bowman aumentado.

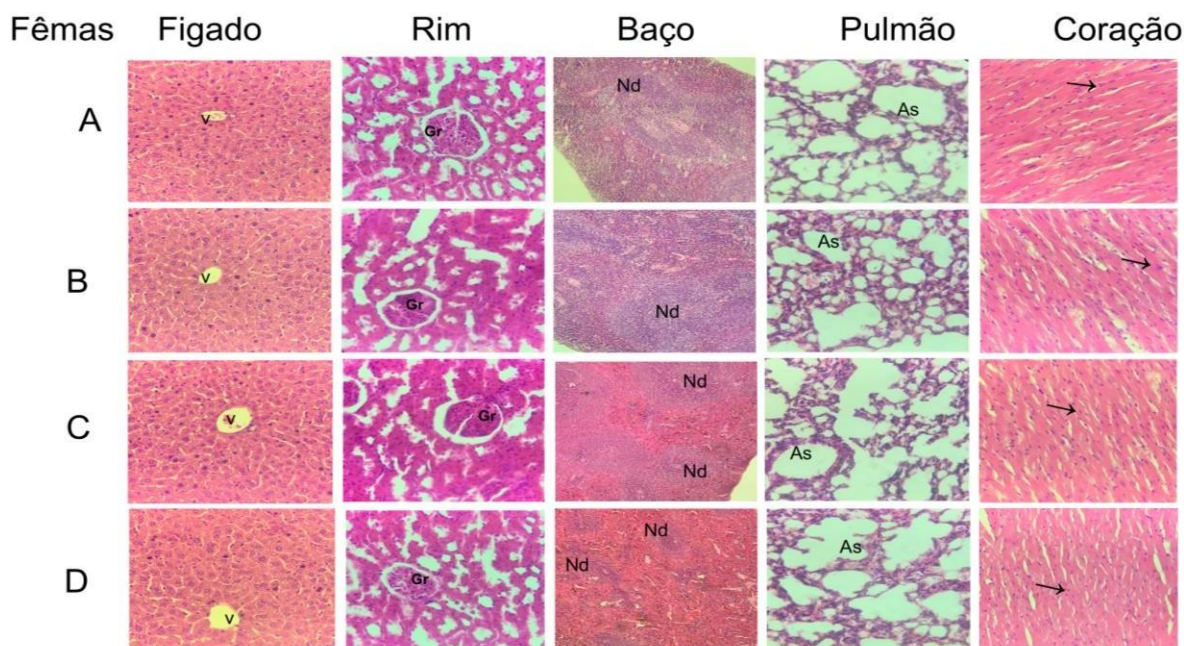


Figura 7. Fotomicrografias representativas dos fígados, pulmões, rins, baço e coração dos camundongos fêmeas do controle (A) ou grupos tratados com extrato etanólico de folhas de *C. blanchetianus* nas doses de 250 (B), 500 (C) ou 1000 mg (D) / kg por administração oral. Fígados: a veia centrolobular (v) é vista em todas as imagens. Rins: Glomérulos renais (Gr) e túbulos contorcidos. Pulmões: saco alveolar (As), visíveis. Baço: os linfonodos (Nd). Ampliação: 400 ×

A análise histopatológica do baço, os camundongos machos do grupo controle negativo (Fig. 6A) e tratados em todas as concentrações de EECB (Figs. 6B-D) apresentaram arquitetura normal, com polpas vermelha e branca delimitadas e com dimensões normais. Tais achados também foram percebidos em fêmeas controle (Fig. 7A) e tratados com EECB (Fig. 7B-D). Nos pulmões de grupos controle e tratados em todas as concentrações de EECB os septos alveolares, alvéolos e bronquíolos mantiveram sua integridade morfológica para ambos os sexos. Finalmente, nenhuma mudança foi observada no tecido cardíaco de camundongos machos e fêmeas em qualquer grupo.

Após observado que a concentração de 250 mg/kg foi a concentração sem nenhuma alteração bioquímica ou hematológica que indique toxicidade, foi selecionado como dose máxima a não ser extrapolada nos testes de avaliação anti-inflamatória e antipirética.

Tabela 1. Parâmetros hematológicos de camundongos machos e fêmeas do grupo controle e dos grupos tratados diariamente por 14 ou 28 dias com o extrato etanólico das folhas de *Croton blanchetianus* a 250, 500 e 1000 mg/kg.

Tratamentos		Parâmetros												
		GV	HTC	Hb	VCM	HCM	CHCM	PLQ	LEU	SEG	LIN	MON	BAS	EOS
14 dias	Machos													
	Controle	7,94±0,77	40,25±1,30	15,39±0,44	46,52±1,23	17,63±1,04	37,06±1,14	998,49±10,61	10,07±1,74	62,31±0,41	25,13±0,71	3,56±0,55	0,14±0,06	1,96±0,28
	Extrato													
	250 mg/kg	7,07±0,65	41,28±1,78	16,44 ±0,65	44,28±1,40	17,84±0,60	36,87 ±1,14	1002,51±12,80	10,98±1,72	61,81±1,08	24,52±0,94	3,73±0,67	0,11±0,04	1,87±0,23
	500 mg/kg	7,16±0,50	40,17±1,06	15,86±0,73	45,80±1,59	16,05±1,32	37,06±1,90	1003,50±11,28	11,07±1,34	62,27±1,10	25,36±0,75	3,26±0,72	0,10±0,04	1,87±0,19
	1000 mg/kg	7,01±0,41	40,87±1,85	15,90±0,66	46,98±1,42	16,99±0,84	36,90±1,03	995,42±14,06	8,38±0,09^a	52,91±0,51^a	31,73±0,53^a	3,45±0,49	0,12±0,05	2,03±0,18
	Fêmeas													
	Controle	6,64±0,29	40,22±1,65	16,03±0,48	45,51±1,46	17,63±1,02	37,41±0,96	984,90±14,31	11,29±1,02	61,64±1,18	27,08±1,47	3,38±0,71	0,15 ±0,05	1,79±0,45
	Extrato													
	250 mg/kg	6,79±0,17	41,74±1,11	16,02±0,76	46,16±2,84	18,14±1,24	37,56±0,88	990,61±12,66	11,33±1,44	62,02±1,88	26,42±1,66	3,46±0,56	0,16 ±0,05	1,77±0,44
28 dias	500 mg/kg	6,41 ±0,16	40,94±1,41	16,46 ±1,07	45,10±3,33	17,40±2,01	36,75±0,77	978,32±13,28	10,92±1,22	60,46±2,58	26,17±1,79	3,50±0,65	0,16 ±0,02	1,69±0,50
	1000 mg/kg	6,69 ±0,15	41,90±1,20	15,85 ±0,72	46,27±4,15	17,80±2,24	38,05±1,78	987,83±12,50	7,39±1,43^a	51,62±2,24	33,15±2,88	3,45±0,88	0,18 ±0,08	1,55±0,41
	Machos													
	Controle	7,53±0,67	41,26±0,41	15,55±0,34	44,12±0,27	17,53±0,34	38,03±0,51	915,61±12,52	10,07±0,74	72,31±0,41	25,13±0,71	2,56±0,55	0,02±0,01	1,65±0,20
	Extrato													
	250 mg/kg	7,06±0,13	41,89±0,77	15,94±0,73	44,89±0,70	17,94±0,56	38,46±0,57	927,76±27,65	10,65±0,87	70,18±1,31	25,13±0,80	3,72±0,31	0,04±0,02	1,82±0,17
	500 mg/kg	7,33±0,13	41,15±0,93	16,75±0,35	43,27±1,87	17,56±0,82	36,89±1,42	965,53±55,74	12,07±0,81	73,18±2,40	24,60 ±0,59	3,15±0,77	0,04±0,02	1,75±0,07
	1000 mg/kg	7,01±0,01	41,47±1,47	15,26±0,17	42,40±2,95	16,92±0,83	37,28±0,62	947,06±71,04	9,28±0,84^b	60,27±7,84^b	26,81±1,13^a	3,50±0,45	0,09±0,08	2,07±0,34
	Fêmeas													
	Controle	7,54±0,19	41,22±0,65	16,41±0,55	45,23±0,16	17,88±0,27	37,31±0,18	987,83±11,18	11,29±1,02	70,34±0,18	24,38±0,57	2,28±0,65	0,02±0,01	1,76±0,03
	Extrato													
	250 mg/kg	7,09±0,02	41,17±0,70	16,47 ±0,26	45,70±0,39	17,96±0,09	38,06±0,24	984,90±13,42	11,11±0,31	71,60±1,42	24,64±0,77	3,07±0,07	0,03±0,01	1,78±0,05
	500 mg/kg	6,70±0,34	40,38±1,19	15,24±0,30	42,73±3,21	15,18±0,26	37,71±0,68	995,65±13,48	10,47±1,15	65,38±5,64	23,70±1,46	2,81±0,31	0,05±0,02	1,65±0,01
	1000 mg/kg	6,42±0,45	42,53±0,11	14,76±0,17	40,46±1,77	16,54±0,14	38,08±2,21	981,50±12,32	8,95±0,23^b	55,92±0,07^b	26,95±1,09^a	2,90±0,16	0,02±0,01	1,53±0,01

GV: glóbulos vermelhos (10⁶/mm³). HTC: hematócrito (%). Hb: hemoglobina (g/dL); VCM: volume corpuscular médio (%). HCM: hemoglobina corpuscular média (%). CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média (%). PLQ: plaquetas (10³/mm³). LEU: leucócitos totais (10³/mm³). SEG: leucócitos segmentados (%). LIN: linfócitos (%). MON: monócitos (%). BAS: basófilos (%). EOS: eosinófilos (%). Os valores estão expressos como média ± DP. ^a p < 0,05 em relação ao controle. ^b p < 0,01 em relação ao controle.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos do soro de camundongos machos e fêmeas do grupo controle e dos grupos tratados diariamente por 14 ou 28 dias com o extrato etanólico das folhas de *Croton blanchetianus* a 250, 500 e 1000 mg/kg.

Tratamentos		Parâmetros										
		ALB	ALT	AST	ALP	GGT	TP	UR	CRE	BIL	TC	TG
14 dias	Machos											
	Controle	2,51±0,25	69,40±0,42	89,20±2,30	9,71±0,39	8,85±0,24	10,98±0,20	0,37±0,09	0,27±0,08	0,39±0,03	140,30±5,11	109,2±5,35
	Extrato											
	250 mg/kg	2,31±0,50	68,65±2,30	88,32±2,18	9,33±0,15	8,56±0,14	11,16±0,41	0,33±0,04	0,24±0,09	0,38±0,06	95,10±4,18^a	80,13±1,7^a
	500 mg/kg	2,44±0,08	67,92±1,07	88,25±2,08	9,20±0,16	8,89±0,71	10,79±0,30	0,36 ±0,12	0,29±0,04	0,41±0,06	95,67 ±4,32^a	80,05±0,30^a
	1000 mg/kg	2,41±0,03	60,87±0,65^b	96,23±2,20^b	9,27±0,12	8,62±0,40	10,83 ±0,24	0,35±0,01	0,25±0,03	0,39±0,03	94,80±4,89^b	79,37±1,0^b
	Fêmeas											
	Controle	2,59±0,19	64,62±2,30	87,20±2,23	9,39±0,24	9,29±0,33	10,79±0,42	0,35±0,12	0,31±0,06	0,42±0,07	145,6±4,65	110,5±4,77
	Extrato											
	250 mg/kg	2,35±0,17	65,03±2,65	89,88±2,70	9,41±0,39	9,52±0,43	10,96±0,48	0,40±0,06	0,38±0,09	0,43±0,06	93,84±1,64^b	79,20±1,49^a
28 dias	500 mg/kg	2,43±0,11	63,02±2,50	88,59±2,87	9,54±0,21	9,27±0,29	10,35±0,37	0,35±0,04	0,39±0,07	0,38±0,06	92,76±1,09^b	80,00±1,59^a
	1000 mg/kg	2,45±0,13	61,50±2,98	103,79±3,65^b	9,47±0,19	9,68±1,68	10,95±0,98	0,36±0,05	0,35±0,10	0,42±0,02	95,11±0,92^b	75,95 ±1,93^b
	Machos											
	Controle	2,41±0,20	69,40±2,42	92,4±2,33	9,90±0,34	9,83±0,40	10,98±0,19	0,37±0,07	4,27±0,40	0,39±0,03	140,3±4,11	119,3±5,45
	Extrato											
	250 mg/kg	2,52±0,21	69,97±2,57	91,55±3,40	9,51±0,47	9,79±0,77	11,64±0,38	0,39±0,03	4,50±0,46	0,31±0,08	94,07±2,26^b	76,09±4,83^b
	500 mg/kg	2,34±0,17	69,95±2,65	99,24±3,40^b	9,23±0,36	9,99±0,55	10,68±0,42	0,35±0,04	4,35±0,45	0,36±0,04	94,10±1,86^b	77,39±3,04^b
	1000 mg/kg	2,60 ±0,19	66,45±2,60	100,31±1,69^b	9,17±0,34	9,82 ±1,68	10,80 ±0,20	0,36±0,05	4,52±0,69	0,35±0,04	95,05 ±3,27^b	74,26±2,77^b
	Fêmeas											
	Controle	2,89±0,22	67,60±1,30	89,20±2,23	9,30±0,22	9,97±0,93	10,79±0,62	0,34±0,10	4,31±0,25	0,40±0,04	147,4±4,90	115,7±5,32
	Extrato											
	250 mg/kg	2,66±0,25	68,92±1,12	90,66±2,13	9,40±0,36	9,41±1,04	10,83±0,57	0,32±0,06	4,33±0,16	0,44±0,05	92,52±1,31^b	73,97±5,12^b
	500 mg/kg	2,77±0,21	66,01±1,31	105,29±1,35^b	9,27±0,29	10,01±1,21	11,15±0,70	0,37±0,07	4,25±0,18	0,39±0,06	93,47±1,39^b	74,43±2,67^b
	1000 mg/kg	2,68±0,22	64,17±1,43	120,23±1,56^b	9,35±0,27	10,12±1,27	10,93±0,44	0,30±0,07	4,43±0,22	0,45±0,06	93,34±2,23^b	72,35 ±2,61^b

ALB: albumina (g/dL). ALT: alanine aminotransferase (U/L). AST: aspartate aminotransferase (U/L). FAL: fosfatase alcalina (U/L); BIL: bilirrubina (mg/dL); GGT: gama glutamil transferase. PT: proteína total (g/dL). UR: ureia (mg/dL). CRE: creatinina (mg/dL), CT: colesterol total (mg/dL). TG: triglicerídeos (mg/dL). Os valores estão expressos como média ± DP. ^a p < 0,05 em relação ao controle. ^b p < 0,01 em relação ao controle.

O modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina é um ensaio padrão para avaliação de potenciais agentes anti-inflamatórios (CORDEIRO *et al.*, 2016). O efeito anti-inflamatório do extrato das folhas de *C. blanchetianus* sobre o edema induzido por carragenina pode ser analisado na Figura 6. A injeção de carragenina resultou em aumento no volume das patas em todos os grupos, como esperado, porém o tamanho do edema foi significativamente ($p < 0,05$) menor em todos os grupos tratados com o extrato, bem como no grupo tratado com indometacina, desde a primeira hora após a injeção. Ao final do ensaio, 4 h após a injeção, os animais que foram tratados com 50, 100 e 200 mg/kg exibiram em média 34,07%, 39,72% e 58,27% de inibição do edema, em comparação com o controle negativo.

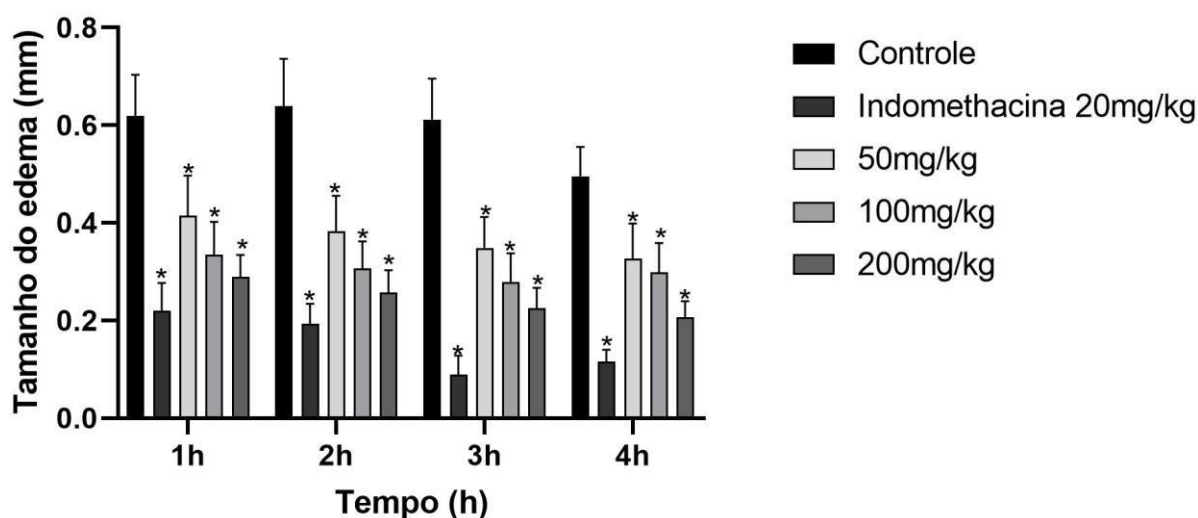


Figura 6. Volume da pata de camundongos do grupo controle (não-tratado) e dos grupos que foram tratados, previamente à injeção de carragenina, com o extrato etanólico das folhas de *Croton blanchetianus* a 50, 100 e 200 mg/kg ou com indometacina a 20 mg/kg. (*) $p < 0,01$ em comparação com o controle.

Efeito anti-inflamatório também foi observado com extrato etanólico das folhas de *Croton cajupara*, que inibiu a formação do edema de pata em 59% na dose de 100 mg/kg *per os*, além disso, foi observada a presença de altas concentrações de flavonoides, alguns foram identificados como catequinas, epicatequinas, kaempferol e quercetina, devido a essa elevada concentração, além de estudos anteriores, os autores correlacionam atividade anti-inflamatória com flavonoides (NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Além disso, tem sido relatado na literatura que certos flavonoides têm o efeito de inibir a liberação de histamina nos mastócitos e podem interagir diretamente com o sistema das prostaglandinas, como os anti-inflamatórios não esteroidais (WENG *et al.*, 2012, ARO *et al.*, 2016). Ambreen e Mirza (2020) mostraram em seu estudo utilizando o teste de edema de pata induzido por carragenina que taninos isolados do extrato metanólico das folhas de *Achyranthes aspera* e *Ocimum basilicum* possuem atividades anti-inflamatória, reforçando assim o poder anti-inflamatório dos polifenóis. Com isso tende-se a considerar que as atividades mostradas pela *C. blanchetianus* provem da mesma classe de compostos

A avaliação de uma possível ação antipirética do extrato foi realizada usando o modelo de febre induzida por levedura, que induz o processo a partir do aumento da produção de prostaglandinas (Saleem *et al.*, 2015). Os resultados apresentados na Figura 7 mostram que, após 180 min, os camundongos tratados com doses de 100 e 200 mg/kg apresentaram redução da temperatura corporal em comparação com o controle negativo. O controle positivo (dipirona) baixou a temperatura rapidamente após 30 min.

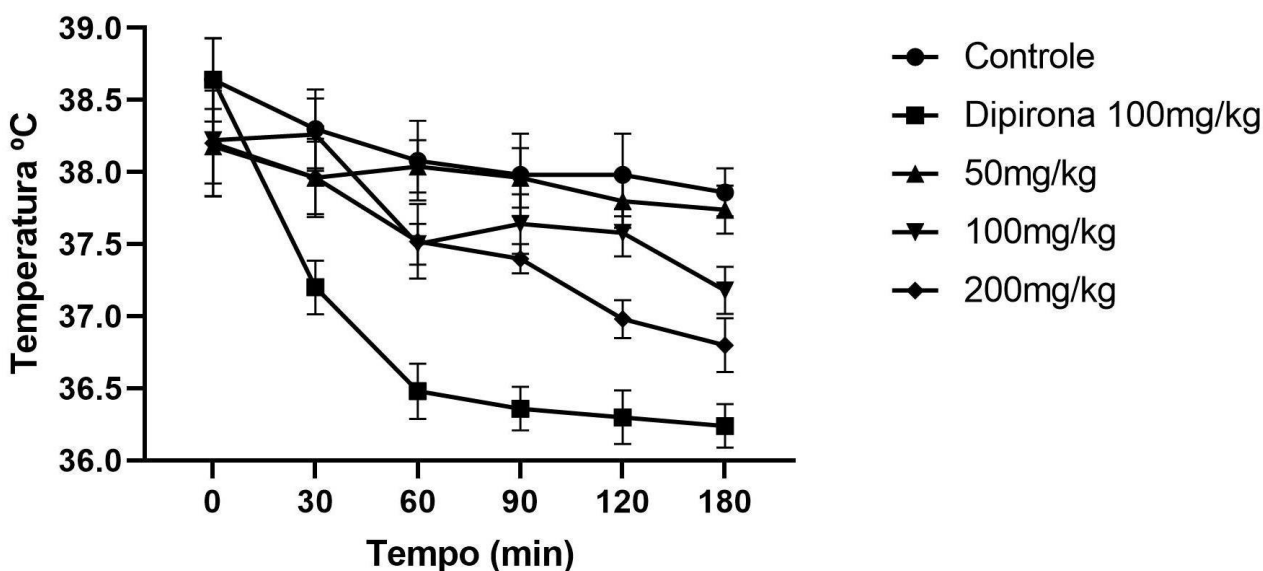


Figura 7. Temperatura retal de camundongos em estado de febre induzida por levedura após a administração o extrato etanólico das folhas de *Croton blanchetianus* a 50, 100 e 200 mg/kg ou com dipirona a 100 mg/kg.

A febre está intimamente ligada à inflamação, uma vez que a resposta febril visa potencializar as respostas de defesa do organismo, sendo mediada

principalmente por citocinas como IL-1 e TNF, no entanto, essas e outras citocinas, combinadas com substâncias pró-inflamatórias como as prostaglandinas, produzem diversas manifestações adversas, como sonolência, astenia, mialgia, lombalgia, artralgia e cefaleia (VOLTARELLI, 1994).

No tratamento de reações inflamatórias, também é desejável tratar todos os outros sintomas desencadeados pela inflamação, razão pela qual a pesquisa sobre a atividade antipirética dos compostos é tão importante. Estudos realizados em plantas do gênero *Croton* e plantas ricas em polifenóis têm demonstrado atividade antipirética. Okokon e Nwafor (2010) mostraram em seu estudo que o extrato etanólico da raiz de *Croton zambesicus* é um potente composto com atividade antipirética, onde em doses de 87 mg /kg mostrou-se mais eficaz que o fármaco controle utilizado, o ASA 100 mg/kg no teste de em pirexia induzida por anfetamina e levedura ratos.

Sivakumar *et al.* (2008) relataram em seus estudos que o extrato metanólico de *Croton roxburghii* possui efeitos anti-inflamatórios e antipiréticos, assim como o extrato de folha de *Croton sparsiflorus*, onde sua fração alcaloide obteve atividade antipirética na dose de 50 mg/kg foi semelhante à do paracetamol (100 mg/kg), indicando que as plantas de *Croton* podem ser excelentes fontes desses agentes. (KUMAR *et al.*, 2016).

Como pôde ser verificado no presente estudo, o extrato etanólico de *Croton blanchetianus* apresenta propriedades anti-inflamatórias e antipiréticas, efeito este também descrito para plantas do mesmo gênero, além de plantas ricas em compostos fenólicos, principalmente flavonoides e taninos, devido a isso, podemos associar as atividades demonstradas a esses compostos.

3.2.3 Conclusão

A administração oral diária do extrato etanólico de folhas de *C. blanchetianus* por 14 e 28 dias, nas doses testadas, não causou óbitos nem induziu alterações fisiológicas e comportamentais de maior relevância em camundongos machos e fêmeas, porém foi observado aumento dos níveis séricos de transaminases, indicando a necessidade de cautela no uso prolongado. O extrato apresentou atividades anti-inflamatória e antipirética, bem como potencial hipolipemiante, o que estimula a continuidade dos estudos acerca da toxicidade quando do possível desenvolvimento de fármacos a partir dessa planta.

CRediT authorship contribution statement

Anderson Felipe Soares de Freitas: Investigation, Methodology, Data curation, Formal analysis, Conceptualization, Writing - original draft. **Ramona Winder, Matheus Ferreira do Nascimento and Wêndeo Kennedy Costa:** Investigation, Methodology. **Patrícia Maria Guedes Paiva:** Funding acquisition, Resources, Supervision, Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Alisson Macário de Oliveira:** Investigation, Methodology, Data curation, Formal analysis, Supervision, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Thiago Henrique Napoleão:** Funding acquisition, Resources, Supervision, Data curation, Formal analysis, Conceptualization, Writing - original draft, Writing – review & editing.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for financial support (405297/2018-1; 407192/2018-2) and investigator research grants (PMGP and THN). They are also grateful to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES; Finance Code 001) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE: APQ-0108-2.08/14, APQ-0493-4.03/14) for financial support. AFSF would like to thank FACEPE (IBPG-1135-2.08/18) for graduate scholarship. AMO would like to thank FACEPE (BFP-0122-4.03/19) for a post-doctoral scholarship.

3.2.4 Referências

- Aguilar Urbano Miguel; Priego, Manuel Pineda; Prieto, Pilar. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E 1. 2013.
- AMBREEN, Madieha; MIRZA, Safdar Ali. Evaluation of anti-inflammatory and wound healing potential of tannins isolated from leaf callus cultures of *Achyranthes aspera* and *Ocimum basilicum*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, v. 33, 2020.
- ANTONELLI, Maria; KUSHNER, Irving. It's time to redefine inflammation. *The FASEB Journal*, v. 31, n. 5, p. 1787-1791, 2017.
- Aoueya, B., Sameta, A.M., Fetoui, H., Simmonds, M.S.J., Bouaziz, M., 2016. Anti-oxidant, anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of grapevine leaf extract (*Vitis vinifera*) in mice and identification of its active constituents by LC–MS/MS analyses. *Biomed. Pharmacother.* 84, 1088–1098.
- Are, P.C., Ram, R., Adidala, R., Puchchakayala, G., 2011. Hypoglycemic and Antidiabetic Activity of Flavonoid on Streptozotocin-Nicotinamide Induced Type 2 Diabetic Rats. *Eur. J. Biol. Sci.*
- ARO, Abimbola O. *et al.* Extracts of six Rubiaceae species combined with rifampicin have good in vitro synergistic antimycobacterial activity and good anti-inflammatory and antioxidant activities. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2016.
- Bertolami, M.C., 2005. Mecanismos de hepatotoxicidade. *Arq. Bras. Cardiol.* 85, 25–27. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2005002400007>
- Brito, S.S., Silva, F., Malheiro, R., Baptista, P., Pereira, J.A., 2018. *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. *Ind. Crops Prod.* <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.044>
- Calixto, J.B., 2019. The role of natural products in modern drug discovery. *An. Acad. Bras. Cienc.* <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190105>
- Coelho, P.L.C., de Freitas, S.R.V.B., Pitanga, B.P.S., da Silva, V.D.A., Oliveira, M.N., Grangeiro, M.S., Souza, C. dos S., El-Bachá, R. dos S., Costa, M. de F.D.,

- Barbosa, P.R., Nascimento, I.L. de O., Costa, S.L., 2016. Flavonoids from the Brazilian plant croton betulaster inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. *Brazilian J. Pharmacogn.* <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.013>
- Cordeiro, K.W., Felipe, J.L., Malange, K.F., do Prado, P.R., de Oliveira Figueiredo, P., Garcez, F.R., de Cássia Freitas, K., Garcez, W.S., Toffoli-Kadri, M.C., 2016. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. *J. Ethnopharmacol.* 183, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.051>
- Costa, W.K., Oliveira, J.R.S.D., Oliveira, A.M.D., Santos, I.B.D.S., Cunha, R.X.D., Freitas, A.F.S.D., Silva, J.W.L.M.D., Silva, V.B.G., Aguiar, J.C.R.D.O.F.D., Silva, A.G.D., Navarro, D.M.D.A.F., Lima, V.L.D.M., Silva, M.V.D., 2020. Essential oil from *Eugenia stipitata* McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice. *Ind. Crops Prod.* 144. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112059>
- Couto, M.A.L., Canniatti-Brazaca, S.G., 2010. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. *Cienc. e Tecnol. Aliment.* <https://doi.org/10.1590/s0101-20612010000500003>
- Cruvinel, Wilson de Melo *et al* . Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev. Bras. Reumatol.*, São Paulo , v. 50, n. 4, p. 434-447, Aug. 2010. access on 28 Jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042010000400008>.
- Cruz, B.G., dos Santos, H.S., Bandeira, P.N., Rodrigues, T.H.S., Matos, M.G.C., Nascimento, M.F., de Carvalho, G.G.C., Braz-Filho, R., Teixeira, A.M.R., Tintino, S.R., Coutinho, H.D.M., 2020. Evaluation of antibacterial and enhancement of antibiotic action by the flavonoid kaempferol 7-O- β -D-(6'-O-cumaroyl)-glucopyranoside isolated from *Croton piauhiensis* müll. *Microb. Pathog.* <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104144>.
- de Oliveira, A.M., da Silva, W.A.V., Ferreira, M.R.A., Paiva, P.M.G., de Medeiros, P.L., Soares, L.A.L., Carvalho, B.M., Napoleão, T.H., 2019. Assessment of 28-day oral toxicity and antipyretic activity of the saline extract from *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) stem in mice. *J. Ethnopharmacol.* 234, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.036>

- Ekor, M., 2014. The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front. Neurol.* <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177>
- Freitas, A. F. S., Costa, W. K., Machado, J. C. B., Ferreira, M. R. A., Paiva, P. M. G., Medeiros, P. L., ... & Napoleão, T. H. (2020). Toxicity assessment and antinociceptive activity of an ethanolic extract from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) leaves. *South African Journal of Botany*, 133, 30-39.
- García Díaz, J., Tuentler, E., Escalona Arranz, J.C., Llauradó Maury, G., Cos, P., Pieters, L., 2019. Antimicrobial activity of leaf extracts and isolated constituents of *Croton linearis*. *J. Ethnopharmacol.* 236, 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.049>
- Joatilde o, da R.L.N., Amanda, D. de A. uacute jo U. ocirc a, Priscila, A. de M., Clovis, M. ecirc do B.F., Juciara, C.G.T. oacute rio, Alexandre, G. da S., Rafael, M.X., M aacute rcia, V. da S., Maria, T. dos S.C., 2016. Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. *J. Med. Plants Res.* 10, 409–416. <https://doi.org/10.5897/jmpr2015.5979>
- LIMA, Ana Paula de. Análise bioquímica e histológica da toxicidade do *Symphytum officinale* fitoterápico e homeopático em fígado e rins de ratos. 2009. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, 2009.
- MARTINS, Anderson Geber *et al.* Levantamento etnobotânico de plantas medicinais, alimentares e tóxicas da Ilha do Combu, Município de Belém, Estado do Pará, Brasil. 2005.
- Melo, G.F. do A., Costa, A.C.V. da, Garino Junior, F., Medeiros, R.S., Madruga, M.S., Queiroga Neto, V., 2013. The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to *Croton blanchetianus* Baill essential oil. *Brazilian J. Microbiol.* 44, 1189–1194. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000009>
- Mfotie Njoya, E., Eloff, J.N., McGaw, L.J., 2018. *Croton gratissimus* leaf extracts inhibit cancer cell growth by inducing caspase 3/7 activation with additional anti-inflammatory and antioxidant activities. *BMC Complement. Altern. Med.* 18, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2372-9>
- Nascimento, A.M., Maria-Ferreira, D., Dal Lin, F.T., Kimura, A., de Santana-Filho, A.P., Werner, M.F. de P., Iacomini, M., Sassaki, G.L., Cipriani, T.R., de Souza, L.M., 2017. Phytochemical analysis and anti-inflammatory evaluation of compounds

- from an aqueous extract of *Croton cajucara* Benth. J. Pharm. Biomed. Anal. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.032>
- Neto, A. de C.L., 2011. Caracterização genética de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) ocorrentes no nNordeste brasileiro 135.
- Okokon, J.E., Nwafor, P.A., 2010. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities of ethanolic root extract of *Croton zambesicus*. Pak. J. Pharm. Sci. 23, 385–392.
- Oliveira-Tintino, C.D. de M., Pessoa, R.T., Fernandes, M.N.M., Alcântara, I.S., da Silva, B.A.F., de Oliveira, M.R.C., Martins, A.O.B.P.B., da Silva, M. do S., Tintino, S.R., Rodrigues, F.F.G., da Costa, J.G.M., de Lima, S.G., Kerntopf, M.R., da Silva, T.G., de Menezes, I.R.A., 2018. Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in in vivo models. Phytomedicine 41, 82–95. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.02.004>
- Rafael Alves Santana Cesário, F., Rodrigues de Albuquerque, T., Mendes de Lacerda, G., Rayane Correia de Oliveira, M., Anderson Fernandes da Silva, B., Bezerra Rodrigues, L., Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins, A., Roberto Guedes da Silva Almeida, J., Lima Vale, M., Douglas Melo Coutinho, H., Rose Alencar de Menezes, I., 2019. Chemical fingerprint, acute oral toxicity and anti-inflammatory activity of the hydroalcoholic extract of leaves from *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum. Saudi J. Biol. Sci. 26, 873–880. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.01.008>
- RODRIGUES, Graziella *et al.* Hepatics alterations and genotoxic effects of *Croton cajucara* Benth (SACACA) in diabetic rats. Arquivos de Gastroenterologia, v. 47, n. 3, p. 301-305, 2010.
- Sá Firmino, N.C., Alexandre, F.S.O., de Vasconcelos, M.A., Pinheiro, A.A., Arruda, F.V.S., Guedes, M.L.S., Silveira, E.R., Teixeira, E.H., 2019. Diterpenes isolated from *Croton blanchetianus* Baill: Potential compounds in prevention and control of the oral *Streptococci* biofilms. Ind. Crops Prod. 131, 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.062>
- Saleem, U., Ahmad, B., Ahmad, M., Hussain, K., Bukhari, N.I., 2015. Anti-nociceptive, anti-inflammatory and anti-pyretic activities of latex and leaves methanol extract of *Euphorbia helioscopia*. Asian Pacific J. Trop. Dis. 5, 322–328. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60791-X](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60791-X)

- Salvemini, D., Wang, Z.Q., Wyatt, P.S., Bourdon, D.M., Marino, M.H., Manning, P.T., Currie, M.G., 1996. Nitric oxide: A key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br. J. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15475.x>
- Silva, L., Mendes-Maia, P. V., Do Nascimento Garcia, T.M., Cruz, J.S., De Moráis, S.M., Coelho-De-Souza, A.N., Lahlou, S., Leal-Cardoso, J.H., 2010. *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. *Phytomedicine* 17, 721–725. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.01.015>
- Sivakumar, T., Rajavel, R., Karthikeyan, D., Duraisamy, R., Srinivasan, K., Kumar, S.S., Karki, S.S., 2008. Anti-pyretic and anti-inflammatory activity of chloroform extract of *Croton roxburghii* in standard animal models. *Orient. Pharm. Exp. Med.* 8, 252–259. <https://doi.org/10.3742/opem.2008.8.3.252>
- Soares, S.E., 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes Phenolic acids as antioxidants. *Rev. Nutr.*
- VOLTARELLI, Júlio C. Febre e inflamação. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 27, n. 1/2, p. 7-48, 1994.
- WENG, Zuyi *et al.* Quercetin is more effective than cromolyn in blocking human mast cell cytokine release and inhibits contact dermatitis and photosensitivity in humans. *PLoS one*, v. 7, n. 3, p. e33805, 2012.
- XAVIER, M.V.A., MATOS, C.H.C., OLIVEIRA, C.R.F., SÁ, M.G.R., SAMPAIO, G.R.M., 2015. Toxicidade e repelência de extratos de plantas da caatinga sobre *Tetranychus bastosi* Tutler, Baker & Sales (Acari: Tetranychidae) em pinhão-mansão. *Rev. Bras. Plantas Med.* 17, 790–797. https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_063
- Yang, M., Wu, Z., Wang, Y., Kai, G., Singor Njateng, G.S., Cai, S., Cao, J., Cheng, G., 2019. Acute and subacute toxicity evaluation of ethanol extract from aerial parts of *Epigynum auritum* in mice. *Food Chem. Toxicol.* 131, 110534. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.042>
- Yujing, L., Yongliang, Z., Wenhui, T., Liping, S., 2020. In vivo acute and subacute toxicities of phenolic extract from Rambutan (*Nephelium lappaceum*) Peels by oral administration. *Food Chem.* 126618. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126618>

4 CONCLUSÃO

Em ensaio de toxicidade aguda, o extrato etanólico das folhas de *C. blanchetianus* mostrou-se seguro em camundongos quando administrado por via oral, mas induziu algumas alterações hematológicas, bioquímicas e histológicas na administração intraperitoneal. Do ponto de vista genotóxico, o extrato não foi prejudicial por nenhuma das vias de administração. Na análise dos dados da toxicidade em doses repetidas, a administração oral diária de extrato etanólico de folhas de *C. blanchetianus* não resultou em alterações comportamentais ou óbitos de camundongos, porém foi observado aumento das transaminases nos grupos tratados por 4 semanas de 500 e 1.000 mg/kg, mostrando que o uso prolongado deve ser cauteloso.

O extrato também proporcionou reduções significativas na dor neurogênica e inflamatória sem afetar a coordenação motora dos animais tratados. Além disso, apresentou atividade anti-inflamatória e antipirética relevante, possivelmente atribuído ao alto teor de flavonoides.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Liza Araújo et al. Antispasmodic effects of a new kaurene diterpene isolated from *Croton argyrophylloides* on rat airway smooth muscle. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01494.x.
- ALVES, S. G.; ALVES, G. M. F.; MARTINS, L. R. A.; SOUSA, J. S.; SOUTO, J. S. Contribuição do *Croton blanchetianus* Baill na produção de serrapilheira e ciclagem de nutrientes em área do Seridó da Paraíba. **Revista Verde**, [S. l.], 2014.
- ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **Versão 2**, [S. l.], 2013.
- ANVISA. Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, [S. l.], 2016.
- AQUINO, Vitória Viviane Ferreira; COSTA, José Galberto Martins; ANGÉLICO, Elissandra Couras; MEDEIROS, Rosália Severo; LUCENA, Maria de Fatima Araujo; RODRIGUES, Onaldo Guedes. Metabólitos Secundários e ação antioxidante de *Croton heliotripifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 28, 2017. DOI: 10.22571/Actabra13201730. Disponível em: <http://revistas.ufcg.edu.br/ActaBra/index.php/actabra/article/view/30>.
- AROME, David; CHINEDU, Enegide. The importance of toxicity testing. **Journal of Pharmaceutical and BioScience**, [S. l.], 2014.
- BADKE, Marcio Rossato; BUDÓ, Maria De Lourdes Denardin; SILVA, Fernanda Machado Da; RESSEL, Lúcia Beatriz. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, [S. l.], 2011. DOI: 10.1590/S1414-81452011000100019.
- BALBINO, Evelin E.; DIAS, Murilo F. Farmacovigilância: Um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [S. l.], 2010. DOI: 10.1590/S0102-695X2010005000031.
- BEAVERS, Kristen M.; BRINKLEY, Tina E.; NICKLAS, Barbara J. **Effect of exercise training on chronic inflammation** *Clinica Chimica Acta*, 2010. DOI: 10.1016/j.cca.2010.02.069.
- BONIL, Larissa; BUENO, Sílvia. Plantas Medicinais: Benefícios e malefícios. **Unilago**, [S. l.], 2009.
- BRASIL. RDC nº 26, de 13 de Maio de 2014. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília**, [S. l.], 2014.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE.SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE.DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: uma ação de inclusão.** [s.l: s.n.]. v. 11 DOI: 10.1590/S1413-81232006000300034.

BRITO, Sara Samanta; SILVA, Franceli; MALHEIRO, Ricardo; BAPTISTA, Paula; PEREIRA, José Alberto. Croton argyrophyllus Kunth and Croton heliotropiifolius Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.01.044.

CARMEN, Rejón Orantes; WILLAM, Hernández Macías John; DEL CARMEN, Grajales Morales Azucena; NATALY, Jiménez García; STEFANY, Coutiño Ochoa Samantha; ANAHI, Cañas Avalos; DOMINGO, Parceros Torres Jorge; LEONARDO, Gordillo Pérez; DE LA MORA MIGUEL, Pérez. Antinociceptive effect of aqueous extracts from the bark of Croton guatemalensis Lotsy in mice. **Research in Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], 2016.

CAVAGNARO, J. Considerations for the Preclinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals. **Comprehensive Toxicology, Second Edition**, [S. l.], v. 3, p. 29–51, 2010. DOI: 10.1016/B978-0-08-046884-6.00308-0.

COELHO, Paulo Lucas Cerqueira et al. Flavonoids from the Brazilian plant croton betulaster inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1016/j.bjp.2015.05.013.

COLERANGLE, J. B. Preclinical Development of Nononcogenic Drugs (Small and Large Molecules). In: **A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1016/b978-0-12-803620-4.00025-6.

CORDEIRO, Kátia Wolff; FELIPE, Josyelen Lousada; MALANGE, Kauê Franco; DO PRADO, Pâmela Rafaela; DE OLIVEIRA FIGUEIREDO, Patrícia; GARCEZ, Fernanda Rodrigues; DE CÁSSIA FREITAS, Karine; GARCEZ, Walmir Silva; TOFFOLI-KADRI, Mônica Cristina. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Croton urucurana Baillon bark. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 183, p. 128–135, 2016. DOI: 10.1016/j.jep.2016.02.051. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.051>.

COSTA, N. D. J.; OLIVEIRA, S. F. C.; SILVA, J. N.; PACHECO, A. C. L.; ABREU, M. C.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; FERREIRA, P. M. P. POTENCIAL TERAPÊUTICO E TECNOLÓGICO DA PLANTA Calotropis procera. **Revista Gestão Inovação e Tecnologias**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 2222–2236, 2015. DOI: 10.7198/S2237-0722201500030001. Disponível em: <http://www.revistageintec.net/portal/index.php/revista/article/view/434>.

COUTO, Meylene Aparecida Luzia; CANNIATTI-BRAZACA, Solange Guidolin. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, [S. l.], 2010. DOI: 10.1590/s0101-

20612010000500003.

CRUVINEL, Wilson de Melo; MESQUITA JÚNIOR, Danilo; ARAÚJO, Júlio Antônio Pereira; CATELAN, Tânia Tieko Takao; SOUZA, Alexandre Wagner Silva De; SILVA, Neusa Pereira Da; ANDRADE, Luís Eduardo Coelho. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S. l.], 2010. DOI: 10.1590/s0482-50042010000400008.

CRUZ, Beatriz G. et al. Evaluation of antibacterial and enhancement of antibiotic action by the flavonoid kaempferol 7-O- β -D-(6'-O-cumaroyl)-glucopyranoside isolated from *Croton piauhiensis* müll. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104144.

DE FIGUEREDO, Climério Avelino; GURGEL, Idê Gomes Dantas; GURGEL JUNIOR, Garibaldi Dantas. A política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos: Construção, perspectivas e desafios. **Physis**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 381–400, 2014. DOI: 10.1590/S0103-73312014000200004.

FLOWER, Roderick J.; PERRETTI, Mauro. Controlling inflammation: A fat chance? **Journal of Experimental Medicine**, 2005. DOI: 10.1084/jem.20050222.

GARLAND, Eric L. Pain Processing in the Human Nervous System. A Selective Review of Nociceptive and Biobehavioral Pathways Primary Care. **Clinics in Office Practice**, 2012. DOI: 10.1016/j.pop.2012.06.013.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. **Guyton & Hall: Tratado de Fisiologia médica**. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.

HAYES, A. Wallace; WANG, Tao; DIXON, Darlene. **Toxicologic testing methods**. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1016/b978-0-12-815921-7.00013-2.

JAJA-CHIMEDZA, Asha et al. Biochemical characterization and anti-inflammatory properties of an isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extract. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. e0182658, 2017.

JO ATILDE O, Da Rocha Lins Neto; AMANDA, Dias de Ara uacute jo Uch ocirc a; PRISCILA, Andrade de Moura; CLOVIS, Mac ecirc do Bezerra Filho; JUCIARA, Carneiro Gouveia Ten oacute rio; ALEXANDRE, Gomes da Silva; RAFAEL, Matos Ximenes; M AACUTE RCIA, Vanusa da Silva; MARIA, Tereza dos Santos Correia. Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. **Journal of Medicinal Plants Research**, [S. l.], v. 10, n. 27, p. 409–416, 2016. DOI: 10.5897/jmpr2015.5979.

JONSSON, Martina; JESTOI, Marika; NATHANAIL, Alexis V.; KOKKONEN, Ulla Maija; ANTTILA, Marjukka; KOIVISTO, Pertti; KARHUNEN, Pirkko; PELTONEN, Kimmo. Application of OECD Guideline 423 in assessing the acute oral toxicity of moniliformin. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], 2013. DOI:

10.1016/j.fct.2012.11.023.

KAUTZKY-WILLER, Alexandra et al. Uso de plantas medicinais para o tratamento do Diabetes Mellitus no Vale do Paraíba-SP. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 10–20, 2019. DOI: 10.1210/er.2015-1137.

KNAPP, Sylvia. **LPS and bacterial lung inflammation modelsDrug Discovery Today: Disease Models**, 2009. DOI: 10.1016/j.ddmod.2009.08.003.

KUNDU, Amit et al. Protective effects of Croton hookeri on streptozotocin-induced diabetic nephropathy. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1016/j.fct.2019.110873.

LENT, R. Receptores Sensoriais e a Transdução: Primeiros Estágios para a Percepção. In: **Cem bilhões de neurônios? conceitos Fundamentais da Neurociência**. [s.l: s.n.].

LIMA, Cinthia Celene Benck de et al. A fitoterapia na saúde pública: estudo de caso da fabricante municipal de medicamentos-FABRIMED (Telêmaco Borba, 1993-2008). 2017.

LIMA, T. M.; SANTOS, D. R. V.; SOUZA, R. M.; BASTOS, N. G.; VANNIER-SANTOS, M. A.; NUNES, E. S.; DIAS-LIMA, A. G. Plantas medicinais com ação antiparasitária: Conhecimento tradicional na etnia Kantaruré, aldeia Baixa das Pedras, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 240–247, 2016. DOI: 10.1590/1983-084X/15_063.

MACHADO, H. L.; MOURA, V. L.; GOUVEIA, N. M.; COSTA, G. A.; ESPINDOLA, F. S.; BOTELHO, F. V. Pesquisa e atividades de extensão em fitoterapia desenvolvidas pela Rede FitoCerrado: Uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos por idosos em Uberlândia-MG. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1590/1983-084X/13_072.

MARTINS, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra et al. Anti-edematogenic and anti-inflammatory activity of the essential oil from Croton rhamnifolioides leaves and its major constituent 1,8-cineole (eucalyptol). **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.005.

MELO, Geiseanny Fernandes do Amarante; COSTA, Ana Carolyn Vieira Da; GARINO JUNIOR, Felício; MEDEIROS, Rosália Severo; MADRUGA, Marta Suely; QUEIROGA NETO, Vicente. The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to Croton blanchetianus Baill essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 1189–1194, 2013. DOI: 10.1590/S1517-83822014005000009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822013000400023&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

MFOTIE NJOYA, Emmanuel; ELOFF, Jacobus N.; MCGAW, Lyndy J. Croton gratissimus leaf extracts inhibit cancer cell growth by inducing caspase 3/7 activation with additional anti-inflammatory and antioxidant activities. **BMC**

Complementary and Alternative Medicine, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1186/s12906-018-2372-9.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008**. 2008.

NASCIMENTO, Adamara M. et al. Phytochemical analysis and anti-inflammatory evaluation of compounds from an aqueous extract of *Croton cajucara* Benth. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.07.032.

NETO, Amaro de Castro Lira. Caracterização genética de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) ocorrentes no nNordeste brasileiro. [S. l.], p. 135, 2011.

NUNES, Caroliny Ribeiro de Melo; ALENCAR, Gustavo De Oliveira; BEZERRA, Camila Alencar; BARRETO, Maria De Fátima Rocha; SARAIVA, Emanuela Machado Silva. PANORAMAS DAS INTOXICAÇÕES POR MEDICAMENTOS NO BRASIL. **Revista E-Ciência**, [S. l.], v. 5, n. 2, 2017. DOI: 10.19095/rec.v5i2.247. Disponível em: <http://www.revistafjn.com.br/revista/index.php/eciencia/article/view/247>.

OECD. OECD Guidelines for the testing of chemicals: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. **Drug and chemical toxicology**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 13, 2008. DOI: 10.1787/9789264070684-en. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en.

OECD. **Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure**. [s.l.] : OECD, 2002. DOI: 10.1787/9789264070943-en. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-420-acute-oral-toxicity-fixed-dose-procedure_9789264070943-en.

OKOKON, Jude E.; NWAFOR, Paul A. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities of ethanolic root extract of *Croton zambesicus*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 385–392, 2010.

OLIVEIRA-TINTINO, Cícera Datiane de Moraes et al. Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in in vivo models. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 41, n. December 2017, p. 82–95, 2018. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.02.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.02.004>.

PIERRE, Massapihanhoro Ouattara; KAFOUMBA, Bamba; KOUAKOU, N'guessan Nobel; NAHOSSÉ, Ziao. Determination of Descriptors Which Influence the Toxicity of Organochlorine Compounds Using Qsar Method. **Chemical Science International Journal**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 1–13, 2019. DOI: 10.9734/CSJI/2019/v27i130107. Disponível em: <http://journalcsij.com/index.php/CSIJ/article/view/30107>.

PINO, Cleonilda Claita C.; DE MENEZES, Jane Eire S. A.; SIQUEIRA, Sonia

Maria C.; MELO, Diego S.; FEITOSA, Cleia R. S.; SANTOS, Hécio S. Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Croton jacobinensis* Baill. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, [S. l.], 2016.

REUTER, Simone; GUPTA, Subash C.; CHATURVEDI, Madan M.; AGGARWAL, Bharat B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. **Free Radical Biology and Medicine**, 2010. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.

RIBEIRO, Sandra S. et al. Evaluation of the cytotoxic activity of some Brazilian medicinal plants. **Planta Medica**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1055/s-0032-1315043.

RIBEIRO, Simone Cardoso; MELO, Nyrreyne D. P. De; BARROS, Arthur Bezerra. ETNOCONHECIMENTO DE PEQUENOS AGRICULTORES TRADICIONAIS SOBRE PLANTAS MEDICINAIS NO TRATAMENTO DE DORES PROVOCADAS PELO TRABALHO. **Cadernos de Terapia Ocupacional da UFSCar**, [S. l.], 2016. DOI: 10.4322/0104-4931.ctoao1249.

ROSSIANA, Nia; ALIPIN, Kartiawati; MALINI, Desak; INDRAWATI, Ida; RAHAYUNINGSIH, Sri Rejeki; MEDIA, Nana; DHAHIYAT, Yayat. Urgency longterm oil sludge biophytoremediation: Acute, subchronic toxicity on liver and kidney rats. **Environmental Technology & Innovation**, [S. l.], v. 19, p. 100766, 2020. DOI: 10.1016/j.eti.2020.100766. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100766>.

SÁ FIRMINO, Nairley C.; ALEXANDRE, Francisco Serra O.; DE VASCONCELOS, Mayron A.; PINHEIRO, Aryane A.; ARRUDA, Francisco Vassiliepe S.; GUEDES, Maria Lenise S.; SILVEIRA, Edilberto R.; TEIXEIRA, Edson H. Diterpenes isolated from *Croton blanchetianus* Baill: Potential compounds in prevention and control of the oral *Streptococci* biofilms. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 131, n. September 2018, p. 371–377, 2019. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.01.062. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.062>.

SÁ, Rita de; LIMA, Tamires Cardoso; DA NÓBREGA, Flávio Rogério; DE BRITO, Anna Emmanuela Medeiros; DE SOUSA, Damião Pergentino. Analgesic-like activity of essential oil constituents: An updateInternational. **Journal of Molecular Sciences**, 2017. DOI: 10.3390/ijms18122392.

SALEHI, Bahare et al. Plants of genus *Mentha*: From farm to food. **factoryPlants**, 2018. DOI: 10.3390/plants7030070.

SALVEMINI, Daniela; WANG, Zhi Qiang; WYATT, Pamela S.; BOURDON, David M.; MARINO, Margaret H.; MANNING, Pamela T.; CURRIE, Mark G. Nitric oxide: A key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], 1996. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15475.x.

SANDKÜHLER, Jürgen. Models and mechanisms of hyperalgesia and

allodynia. **Physiological Reviews**, 2009. DOI: 10.1152/physrev.00025.2008.

SANTOS, Enaide Soares et al. Anti-inflammatory activity of herb products from *Licania rigida* Benth. **Complementary Therapies in Medicine**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1016/j.ctim.2019.06.001.

SHAW, Debbie. **Toxicological risks of Chinese herbs** *Planta Medica*, 2010. DOI: 10.1055/s-0030-1250533.

SILVA, Antonio Adailson; MORAIS, Selene Maia; MARTINS, Clécio Galvão; VIEIRA-ARAÚJO, Francisco Marcelo. ANTI-LEISHMANIAL AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF THE ETHANOL EXTRACT OF *Croton argyrophylloides* MUELL. ARG. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [S. l.], 2016. DOI: 10.5216/ref.v13i3.35358.

SILVA, Cléia G. V.; DE OLIVEIRA, José C. S.; DA CAMARA, Claudio A. G. Insecticidal activity of the ethanolic extract from *Croton* species against *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, [S. l.], 2018. DOI: 10.15446/rfna.v71n2.62881.

SILVA, Francisca Fabrícia de Assis Viana; JUNIOR, Francisco de Assis Gomes Maciel; MORAIS, Isabel Cristina Oliveira De. Intoxicações Exógenas No Brasil: Um Problema De Saúde Pública. **Mostra Científica da Farmácia**, [S. l.], 2018.

SILVA, José Aparecido; RIBEIRO-FILHO, Nilton Pinto. A dor como um problema psicofísico. **Revista Dor**, [S. l.], 2011. DOI: 10.1590/s1806-00132011000200011.

SILVA, Juliana Santos; SALES, Margareth Ferreira De; GOMES, Ana Paula de Souza; CARNEIRO-TORRES, Daniela Santos. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, [S. l.], 2010. DOI: 10.1590/s0102-33062010000200015.

SILVA, L.; MENDES-MAIA, P. V.; DO NASCIMENTO GARCIA, T. M.; CRUZ, J. S.; DE MORÁIS, S. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. *Croton sonchifolius* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 17, n. 10, p. 721–725, 2010. DOI: 10.1016/j.phymed.2010.01.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2010.01.015>.

SILVA, Sheila Gomes Da; BIESKI, Isanete Geraldini Costa. A IMPORTÂNCIA MEDICINAL DOS FLAVONÓIDES NA SAÚDE HUMANA, COM ENFÂSE NA ESPÉCIE *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. **VerlRevista Saúde Viva Multidisciplinar da AJES**. [s.l.: s.n.].

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, [S. l.], 2002.

SOUZA-MOREIRA, Tatiana M.; SALGADO, Hérica R. N.; PIETRO, Rosemeire C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], 2010. DOI: 10.1590/s0102-

695x2010000300023.

TIAN, Jin Long; YAO, Guo Dong; WANG, Yu Xi; GAO, Pin Yi; WANG, Di; LI, Ling Zhi; LIN, Bin; HUANG, Xiao Xiao; SONG, Shao Jiang. Cytotoxic clerodane diterpenoids from *Croton crassifolius*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.01.055.

TREEDE, Rolf-Detlef. The International Association for the Study of Pain definition of pain. **PAIN Reports**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. e643, 2018. DOI: 10.1097/PR9.0000000000000643. Disponível em: <http://insights.ovid.com/crossref?an=01938936-201804000-00002>.

VALADARES, Marize C. Acute toxicity evaluation: strategies post “DL50 test era”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [S. l.], 2006.

VIDAL, Cinara Soares et al. Gastroprotective effect and mechanism of action of *Croton rhamnifolioides* essential oil in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.02.005.

XAVIER, M. V. A.; MATOS, C. H. C.; OLIVEIRA, C. R. F.; SÁ, M. G. R.; SAMPAIO, G. R. M. Toxicidade e repelência de extratos de plantas da caatinga sobre *Tetranychus bastosi* Tutler, Baker & Sales (Acari: Tetranychidae) em pinhão-mansão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, [S. l.], v. 17, n. 4 suppl 1, p. 790–797, 2015. DOI: 10.1590/1983-084X/14_063. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722015000500790&lng=pt&tlng=pt.

XU, Wen Hui; LIU, Wei Yi; LIANG, Qian. **Chemical constituents from croton species and their biological activities** *Molecules*, 2018. DOI: 10.3390/molecules23092333.

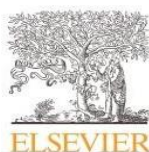
YU, De Gang et al. Strontium ranelate reduces cartilage degeneration and subchondral bone remodeling in rat osteoarthritis model. **Acta Pharmacologica Sinica**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1038/aps.2012.167.

YUJING, Li; YONGLIANG, Zhuang; WENHUI, Tian; LIPING, Sun. In vivo acute and subacute toxicities of phenolic extract from Rambutan (*Nephelium lappaceum*) Peels by oral administration. **Food Chemistry**, [S. l.], p. 126618, 2020. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126618. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126618>.

APENDICE A - ARTIGO 1 - Toxicity assessment and antinociceptive activity of an ethanolic extract from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) leaves

ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO "South African Journal of Botany"
(Volume 133, September 2020, Pages 30-39).

South African Journal of Botany 133 (2020) 30–39



Contents lists available at ScienceDirect

South African Journal of Botany

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sajb



Toxicity assessment and antinociceptive activity of an ethanolic extract from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) leaves

A.F.S. Freitas^a, W.K. Costa^a, J.C.B. Machado^b, M.R.A. Ferreira^b, P.M.G. Paiva^a, P.L. Medeiros^c, L.A.L. Soares^b, A.M. Oliveira^{a,b}, T.H. Napoleão^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^c Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article History:

Received 27 March 2020

Revised 27 May 2020

Accepted 10 June 2020

Available online xxx

Edited by L. Verschaeve

Keywords:

Euphorbiaceae

Analgesia

Toxicological survey

Genotoxicity

Flavonoids

ABSTRACT

In this study, the toxicity and antinociceptive effects of the ethanolic extract of *Croton blanchetianus* leaves were investigated in mice. Phytochemical analysis was performed by thin layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) revealed the presence of alkaloids, reducing sugars, cinnamic derivatives, flavonoids, saponins, condensed tannins, terpenes, and steroids. Acute toxicity was evaluated by administration of a single dose of 2000 or 5000 mg/kg b.w. (*per os* or *i.p.*). The extract (50, 100, and 200 mg/kg *per os*) was evaluated for genotoxicity through micronucleus and comet assays, and antinociceptive effects using different tests. No death was observed but increased serum levels of hepatic and renal markers, hematological changes, and histological alterations in the lung and kidney were observed exclusively with intraperitoneal administration. Oral administration did not result in genotoxicity in bone marrow or peripheral blood cells. The extract reduced the number of abdominal writhings by 47.16–88.81%, increased the latency time (up to 2.13 times) in the tail-immersion test, and decreased the paw licking time by as much as 74.07% and 97.76% in the first and second phases of the formalin test, respectively. This work contributes to the determination of safety and pharmacological potential for *C. blanchetianus* leaves.

© 2020 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pain is defined as an unpleasant sensory or emotional experience associated with actual or potential tissue damage (Treede, 2018). Several analgesic drugs have demonstrated efficacy in the treatment of pain; however, their associated adverse effects are obstacles to effective treatment. For example, paracetamol (acetaminophen) has hepatotoxic potential and is readily accessible, making cases of overdose leading to severe liver damage and even acute liver failure common (Ramachandran and Jaeschke, 2019).

Croton plants are known as a highly diverse genus with production of a wide array of secondary metabolites and have thus been investigated for a variety of biological activities, such as anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic effects (Okokon and Nwafor, 2010). These pharmacological effects have been attributed to different phytochemicals, but primarily to alkaloids, terpenoids (diterpenes, triterpenoids and steroids), proanthocyanidins, flavonoids and other phenolic compounds (García Díaz et al., 2019). However, substances obtained from some *Croton* species, such as *Croton*

lechleri, *Croton palanostigma* and *Croton sylvaticus*, have been reported to be cytotoxic and/or genotoxic (Elgorashi et al., 2002; Lopes et al., 2004; Maistro et al., 2013).

Croton blanchetianus, known as "marmeleiro preto," is a shrub widely found in northeastern Brazil. Its leaves and bark are used in popular medicine for the treatment of gastrointestinal disorders, rheumatism and headache (Melo et al., 2013). A previous study showed that ethanolic extract from *C. blanchetianus* leaves has antioxidant activity, attributed to phenolic compounds present in large quantities in this part of the plant (Aquino et al., 2017). Other work has reported the acaricidal activity (Rodrigues et al., 2019) and antibacterial activity on foodborne pathogens (Melo et al., 2013) of essential oils from leaves, and antibiofilm activity of root diterpenes on oral *Streptococci* (Firmino et al., 2019). However, literature on the pharmacological properties of this plant is scarce.

The present study aimed to detail the phytochemical profile of an ethanolic extract obtained from *C. blanchetianus* leaves and to analyze its safety through analysis of acute toxicity and genotoxicity *in vivo*. In addition, the study investigated possible antinociceptive effects of the extract using multiple murine nociception models.

* Corresponding author.

E-mail address: thiago.napoleao@ufpe.br (T.H. Napoleão).

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Leaves from *C. blanchetianus* were collected on April 22, 2019 in the municipality of Santa Terezinha, Pernambuco (07°22'40" S, 37°28'48" W). The access was recorded (AEC4F6E) in the *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado* (SisGen). A voucher specimen (no. 93.062) was deposited at the herbarium Dárdano de Andrade Lima in the *Instituto Agronômico de Pernambuco* (IPA). Collected leaves were cleaned and dried at 36 °C for 48 h, then ground to powder and stored at 4 °C.

2.2. Preparation of the extract

The dried leaf powder was used for preparation of hydroethanolic extract using turbo-extraction (3 cycles of 30 s with 4-min interval), at a proportion of 10% (w/v), using an ethanol: water (50%, v/v) mixture as solvent. The extract was then dried using a Mini Spray dryer LM MSDi 1.0 (LabMaq do Brasil, Ribeirão Preto, Brazil) to obtain the dried product.

2.3. Phytochemical analysis

2.3.1. Thin layer chromatography

Thin-layer chromatography (TLC) was used to screen the extract for the presence of alkaloids, coumarins, cinnamic acid derivatives, flavonoids, tannins, terpenes/steroids, and sugars. The plates were developed in a high-performance TLC (HPTLC) system (Camag, Muttenz, Switzerland) consisting of a Linomat V sample applicator equipped with a 100 μ L syringe (Hamilton, Landsberg am Lech, Germany) connected to compressed air, and winCATS® software (Camag). Silica gel plates (60-F₂₅₄; Merck, Darmstadt, Germany) were placed in a twin trough vertical glass chamber (10 × 10 cm, Camag). The plates were developed using the appropriate mobile phase for each compound class (Markhan, 1982; Abreu, 2000; Wagner and Bladt, 2001). Saturation time for the mobile phase was 30 min at 25 ± 2 °C. After development, the plates were derivatized by spraying with the reagents specific to each class of compound and visualized under 254 or 365 nm ultraviolet light. The images were acquired using the UVP MultiDoc-It Imaging System model 125 (Analytik Jena, Jena, Germany) and a Canon camera Rebel T3, EOS 1100 D (Tokyo, Japan).

2.3.2. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis

The dried ethanolic extract (25 mg) was dissolved in 5 mL of HPLC grade methanol (Tedia, Fairfield, OH, USA) and diluted in ultrapure water (Purelab Classic UV, ELGA LabWater, High Wycombe, UK) to obtain a 5 mg/mL solution. Analysis was conducted on an HPLC Ultimate 3000 system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) coupled to a Diode Array Detector (DAD) and equipped with a binary pump HPG-3 × 00RS, a degasser, and an autosampler with a loop of 20 μ L (ACC-3000). The wavelength was set to 270 nm for detection of polyphenols. Chromatographic separations were achieved with a C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm i.d., particle size 5 μ m; Dionex, Sunnyvale, CA, USA) equipped with a guard column (C₁₈, 4 mm × 3.9 μ m; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Separations were performed at a temperature of 25 ± 2 °C. The mobile phase consisted of purified water (A) and methanol (B), both acidified with 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid, and run at a flow rate of 0.8 mL/min. A gradient (methanol in water, or B in A) program was applied as follows: 0–5 min, 10–25% B; 5–10 min, 25–40% B; 10–15 min, 40–55% B; 15–20 min, 55–75% B; 20–28 min, 75–10% B; 28–33 min, 10% B. Data analysis and processing were performed using Chromeleon version 6 (Thermo Fisher Scientific).

2.4. Animals

The Ethics Committee on Animal Experimentation of UFPE approved all the experiments (process no. 0037/2019). Male and female Swiss mice (*Mus musculus*), 50 day-old and weighing 30–40 g, were obtained from the vivarium of the *Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami* (LIKA) at the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE). The animals were acclimated for 1 week in the experimental laboratory located at the *Departamento de Bioquímica* from UFPE before being used in assays. Mice were housed at a temperature of 22 °C, with a 12-h:12-h light: dark cycle and *ad libitum* access to food (Purina, Nestlé Brasil Ltda., Brazil) and water.

2.5. Acute toxicity evaluation

Acute toxicity was evaluated according to guidelines from the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 2001), protocol 423. Female mice were separated into three groups ($n = 3$ /group) that received a single dose by oral gavage or intraperitoneal injection. The first group of mice received only saline (control) and two other groups received *C. blanchetianus* extract at 2000 or 5000 mg/kg body weight (b.w.). Behavioral changes were assessed during the first 60 min after treatment administration, divided into four periods (0–15, 15–30, 30–45, and 45–60 min) and once daily for 14 days. The following parameters were evaluated: piloerection, stool appearance, sensitivity to sound and touch, mobility, and aggressive behavior. In addition, body weight and water and food intake were assessed daily. On post-treatment day 15, mice were euthanized and blood was collected from the inferior vena cava (Conybeare et al., 1988) in two tubes: one containing the anticoagulant ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) and one tube without anticoagulant. Organs were removed (liver, kidneys, lungs, spleen, and heart) weighed, macroscopically analyzed, and processed for histological evaluation.

An automated analyzer (Animal Blood Counter: ABC Vet, Montpellier, France) and light microscopy were used to evaluate the following hematological parameters: number of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (HCM), hemoglobin concentration, corpuscular mass (CHCM), and total and differentiated leukocyte analysis. Biochemical analysis of blood samples was performed to evaluate albumin, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase, gamma glutamyl transferase (GGT), total cholesterol, triglycerides, urea, and creatinine levels by using specific kits (Labtest Diagnostic, Lagoa Santa, Brazil) and a COBAS Mira Plus analyzer (Roche Diagnostics Systems, Basel, Switzerland).

2.6. Evaluation of extract effects on motor function and exploratory activity

2.6.1. Open-field test

Female and male Swiss mice (six per group, of the same sex) received saline (control) or *C. blanchetianus* extract (50, 100, or 200 mg/kg) orally, and after 30, 60, 90, and 120 min, each animal was subjected individually to the open-field test in a square arena (56 × 56 cm) for a period of 5 min. The parameters assessed were: ambulation (number of segments crossed by the animal with all four legs), grooming frequency, number of raising occurrences, and number of fecal masses (Mota et al., 2011).

2.6.2. Rotarod test

The test was performed according to Dunham and Miya (1957). Twenty hours before the assay, male mice were prescreened according to their ability to remain on the rotating bar (7 rpm) for at least 3 min in three trials. The preselected mice were then divided into 4 groups ($n = 6$ per group), orally administered saline (control) or *C. blanchetianus* extract (50, 100, or 200 mg/kg), and evaluated 30, 60, 90, and 120 min

after treatment. The time spent on the rotating rod for a period of up to 3 min (from 5 to 40 rpm) was recorded for each mouse. The animals that fell were repositioned on the bar for up to three attempts. Diazepam (10 mg/kg, i.p.) was used as a reference drug.

2.7. Genotoxicity evaluation

2.7.1. Treatments

Male mice were divided into experimental groups of ten animals each. *C. blanchetianus* extract was dissolved in saline solution (0.9% NaCl) and administered by oral gavage in a single dose of 0.1 mL at 1000 or 2000 mg/kg b.w. or by intraperitoneal injection. The negative control group received only saline solution *per os*, and the positive control group received an intraperitoneal injection of doxorubicin (DXR) at 30 mg/kg b.w.

2.7.2. Micronucleus test

Micronucleus testing was carried out following the protocol described by Maistro et al., (2014). Five mice of each group were euthanized 24 h after the treatment and the other five after 48 h. Bone marrow was flushed from the femur using 2 mL of saline solution and centrifuged for 7 min. For each animal, 10 μ L of bone marrow or peripheral blood collected via the retro-orbital plexus was placed on three slides and stained with acridine orange. The presence of micronuclei was evaluated using a fluorescence microscope Olympus BX 50 (Olympus, Tokyo, Japan). For each slide, coded for blind analysis, 2000 polychromatic erythrocytes were counted by a single researcher and the number of micronucleate polychromatic erythrocytes (MNPCE) was determined.

2.7.3. Comet assay

The comet assay was carried out according to a modified method proposed by Burlinson et al. (2007). Samples of peripheral blood from the orbital plexus were obtained from five mice 4 h and 24 h after treatment. Bone marrow samples were collected after 24 h and analyzed. Cell counting was performed using a hemocytometer and viability was determined by trypan blue dye exclusion. The experiment was conducted only if cell viability was greater than 90%.

An aliquot (10 μ L) of cells from each animal was mixed with 0.5% low melting point agarose (120 mL) at 37°C and spread onto two microscope slides pre-coated with 1.5% normal melting point agarose. The slides were cover slipped and allowed to gel at 4°C for 20 min. Next, the coverslips were removed and the slides were immersed at 4°C for 1 h in lysing solution [2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 0.2 M NaOH, 1% (w/v) sodium lauryl sarcosine, 0.1% (v/v) Triton X-100 and 1% (v/v) dimethyl sulfoxide], protected from light. Then, they were placed in the gel box, positioned at the anode end, and left in electrophoresis buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA) at 4°C for 20 min prior to running, to permit DNA unwinding. The electrophoresis run was carried out at 4°C for 20 min at 300 mA and 25 V. The slides were then immersed in 0.4 M Tris-HCl pH 7.5 for 15 min, dried at 25°C, fixed in 100% ethanol for 10 min, and stored overnight. For staining, the slides were briefly rinsed with distilled water, covered with 30 mL of ethidium bromide staining solution (20 mg/mL) and cover slipped. The material was evaluated immediately at 400 $\times$ magnification using a fluorescence microscope with a 515–560 nm excitation filter and a 590 nm barrier filter. Only individual nucleoids were scored, examining 100 randomly selected and non-overlapping cells per animal in a blind analysis. The cells were scored according to tail size, into the following classes: 0 – no tail; 1 – tail shorter than the head (nucleus) diameter; 2 – tail length measuring one to two times the head diameter; 3 – tail length measuring more than twice the head diameter (Hartmann and Speit, 1997). The total score for 100 comets was obtained by multiplying the number of cells in each class by their damage score for a possible range of 0 (all undamaged) to 300 (all damaged).

2.8. Antinociceptive evaluation

2.8.1. Acetic acid-induced writhing test

The method employed was that proposed by Hunskaar and Hole (1987) with minor modifications by Viana et al. (1998). Male mice were separated into six groups ($n = 6$ per group). The groups were treated with saline *per os* (control), *C. blanchetianus* extract (50, 100, or 200 mg/kg *per os*), morphine (10 mg/kg, i.p.), or indomethacin (20 mg/kg, i.p.). Subsequently, each animal received an intraperitoneal injection of 0.85% (v/v) acetic acid in saline. Saline solution or plant extract was administered 1 h before the acetic acid, while morphine or indomethacin were administered 30 min before. The mice were then placed in a polyethylene box to record the latency period (time until the first writhing) and the number of writhes in the interval corresponding to 5–15 min after the injection of acetic acid.

2.8.2. Tail-immersion test

Male mice were prescreened for sensitivity by immersing their tails (3 cm tail) in warm water ($55 \pm 1^\circ\text{C}$). Animals that removed their tails in less than 5 s were selected for the assay. The test was performed as adapted from Khatun et al., (2015). Male mice were divided into five groups ($n = 6$ per group) that received saline *per os* (control), morphine 10 mg/kg i.p. (positive control), or *C. blanchetianus* extract (50, 100 or 200 mg/kg *per os*). The latency period (the time required for each mouse to remove its tail) was determined 30, 60, and 90 min after administration of the treatments. A latency period of 20 s was considered complete analgesia, and the tail was withdrawn to avoid injury.

2.8.3. Formalin test

Male mice were divided into six groups ($n = 6$ per group) and the following pre-treatments were administered: saline *per os* (control), *C. blanchetianus* extract (50, 100, or 200 mg/kg *per os*), morphine (10 mg/kg i.p.), or indomethacin (20 mg/kg i.p.). After 60 min, 20 μ L of 2.5% (v/v) formalin in saline was injected into the subplantar region of the right hind paw of each animal. The time spent by the mouse licking its paw was recorded during the first 5 min after formalin injection (first phase: neurogenic pain) as well as 15–30 min (second phase: inflammatory pain) after the injection (Hunskaar and Hole, 1987).

To evaluate the possible involvement of the opioid system in the antinociceptive effect of the *C. blanchetianus* extract, mice were pre-treated with naloxone 2 mg/kg i.p. or vehicle (saline solution, i.p.) as described by Trevisan et al. (2014). After 15 min, the animals were treated with extract (200 mg/kg, *per os*), morphine (10 mg/kg, subcutaneous), or saline (control, *per os*). The formalin test was performed 1 h after the treatment with the extract or 30 min after the treatment with morphine and evaluation for spontaneous nociception was performed immediately after the subplantar injection of formalin.

2.9. Statistical analysis

Results are expressed as mean replicates $\pm$ standard deviation (SD). Analysis of variance (ANOVA) was performed by Bonferroni test for multiple comparisons. A value of $p < 0.05$ indicated statistical significance.

3. Results and discussion

Research conducted with medicinal plants has confirmed beneficial effects from their use. However, insufficient study into the adverse effects of plants can lead to serious damage. For example, *Symphytum officinale* was disseminated as a medicinal plant able to cure various diseases but subsequent studies have shown it to be a highly hepatotoxic plant (Bettega et al., 2011; Oliveira, 2007). In the present study, we aimed to verify the safety of *C. blanchetianus* leaves

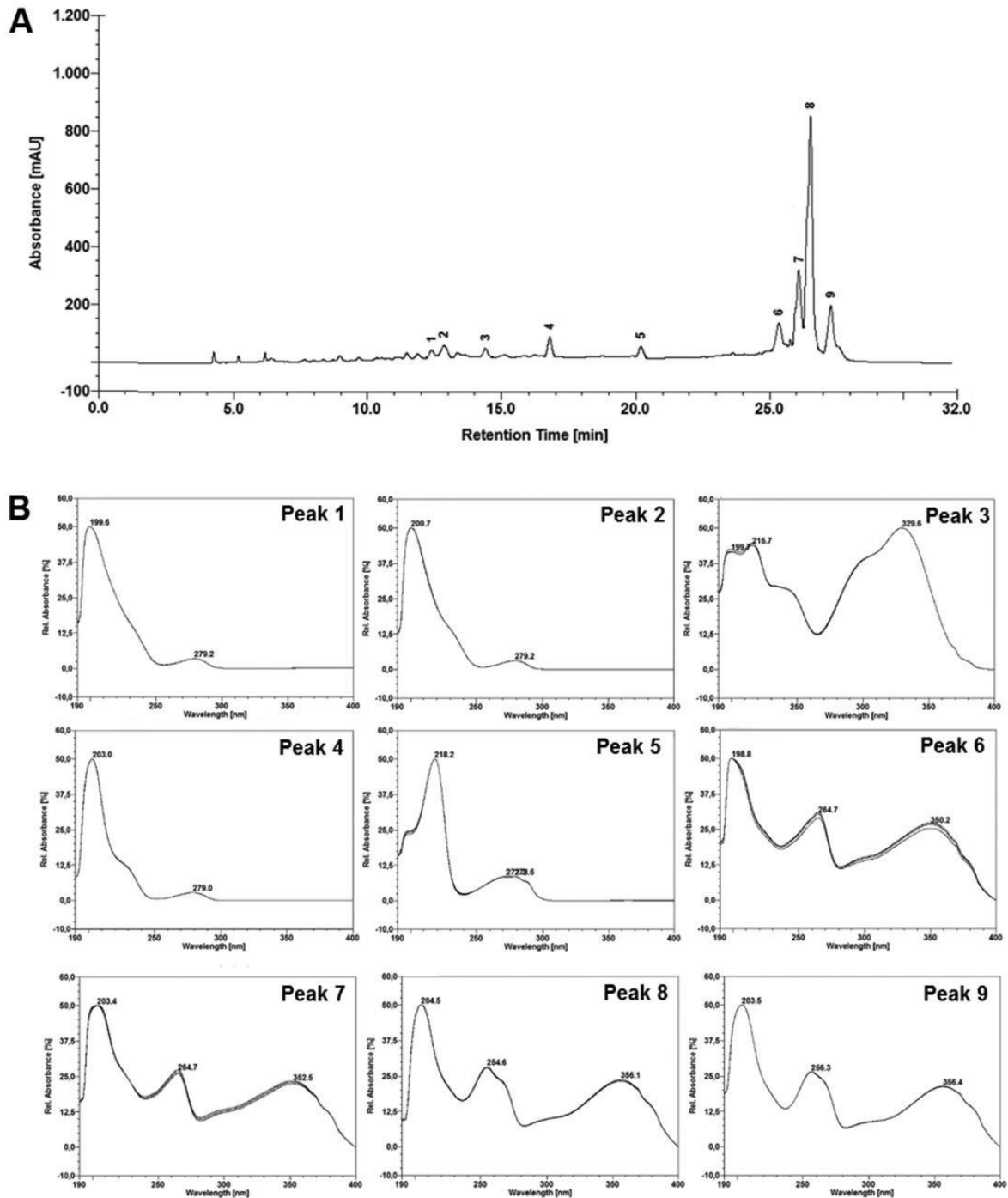


Fig. 1. Analysis of the chemical composition of ethanolic extract of *C. blanchetianus* leaves by high-performance liquid chromatography (HPLC). (A) A representative HPLC profile. (B) The ultraviolet absorption spectra of the 9 peaks detected in the extract, which correspond to condensed tannins (peaks 1, 2, 4, 5), cinnamic derivatives (peak 3), and flavonoids (peak 6–9).

Table 1

Evaluation of food intake, water consumption, and weight gain of animals from control or treated for 14 days with the ethanolic extract from leaves of *Croton blanchetianus* by oral or intraperitoneal administration.

Parameter	Administration route					
	Oral			Intraperitoneal		
	Control	Extract		Control	Extract	
		2000 mg/kg	5000 mg/kg		2000 mg/kg	5000 mg/kg
Water consumed (mL)	35.69±0.21	34.97±0.21	34.77±0.13	31.41±0.18	32.44±0.11	32.55±0.22
Food consumed (g)	13.8±0.35	12.8±0.36	12.4±0.29	12.4±0.12	11.9±0.15	12.2±0.16
Weight gain (g)	5.7±0.22	5.5±0.19	5.5±0.11	5.1±0.32	5.2±0.22	5.4±0.33

Values represent the mean ± SEM. No significant differences ($p > 0.05$) were found in comparison with controls.

Table 2

Hematological parameters of mice from control and treated for 14 days with the ethanolic extract from leaves of *Croton blanchetianus* by oral or intraperitoneal administration.

Parameter	Administration route					
	Oral			Intraperitoneal		
	Control	Extract		Control	Extract	
		2000 mg/kg	5000 mg/kg		2000 mg/kg	5000 mg/kg
Erythrocytes ($10^6/\text{mm}^3$)	9.54±0.19	9.32±0.22	9.21±0.29	9.94±0.77	9.81±0.42	9.75±0.93
Hematocrit (%)	46.22±0.65	46.02±0.21	46.32±0.23	47.26±0.42	38.35±0.19*	35.65±0.32*
Hemoglobin (%)	16.41±0.55	16.32±0.12	16.29±0.21	17.19±0.34	17.22±0.21	16.49±0.88
MCV (%)	45.23±0.16	45.41±0.15	45.51±0.34	47.12±0.27	36.25±0.28*	37.12±0.65*
MCH (%)	17.88±0.27	17.53±0.23	17.42±0.20	18.03±0.34	17.92±0.52	18.11±0.24
MCHC (%)	37.31±0.18	37.54±0.88	38.32±0.32	38.03±0.51	28.14±0.32*	22.93±0.35*
Leukocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	11.29±1.02	11.12±0.91	11.10±0.95	10.07±0.74	10.44±1.02	10.12±0.89
Segmented (%)	50.34±0.18	50.24±0.23	50.19±0.54	52.31±0.41	52.12±0.41	51.42±0.62
Lymphocytes (%)	38.38±0.07	38.52±0.32	38.49±0.20	35.13±0.71	35.32±0.45	36.22±0.68
Monocytes (%)	11.28±0.65	11.51±0.11	11.34±0.37	12.56±0.55	12.24±0.32	12.09±0.29

MCV: mean corpuscular volume. MCH: mean corpuscular hemoglobin. MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration. Values represent the mean ± SEM. (*) Significant difference ($p > 0.05$) in comparison with control.

by investigating the acute toxicity of an ethanolic extract from the plant's leaves in murine models.

TLC analysis revealed the presence of alkaloids, terpenes/steroids, cinnamic acids, condensed tannins, flavonoids, saponins, and reducing sugars. Coumarins were not detected. Based on the TLC analysis results, the extract was subjected to high performance liquid chromatography (HPLC) analysis monitored at 270 nm for the detection of polyphenols. A representative chromatogram is shown in Fig. 1(A). Several peaks were observed in the HPLC profile, four of which were

indicative of the presence of condensed tannins [peak 1, retention time (rt) = 12.39 min; peak 2, rt = 12.86 min; peak 4, rt = 16.78 min; peak 5, rt = 20.19 min], one of cinnamic derivatives (peak 3, rt = 14.40 min), and four of flavonoids (peak 6, rt = 25.34 min; peak 7, rt = 26.08 min; peak 8, rt = 26.52 min; peak 9, rt = 27.28 min), as confirmed by the scan spectra at different wavelengths (Fig. 1(B)). The relative content of the condensed tannins, cinnamic derivatives, and flavonoids were found to be 0.195%, 0.114%, and 0.852% (w/w), expressed as catechin, caffeic acid, and rutin equivalents, respectively.

Table 3

Biochemical parameters of blood of mice from control and treated for 14 days with the ethanolic extract from leaves of *Croton blanchetianus* by oral or intraperitoneal administration.

Parameter	Administration route					
	Oral			Intraperitoneal		
	Control	Extract		Control	Extract	
		2000 mg/kg	5000 mg/kg		2000 mg/kg	5000 mg/kg
Albumin (g/dL)	3.89±0.12	3.82±0.16	3.84±0.19	3.41±0.18	3.52±0.21	3.44±0.16
ALT (U/L)	67.6±0.30	67.1±0.44	66.9±0.39	69.4±0.42	69.7±0.34	99.6±0.22*
AST (U/L)	110.2±0.23	111.0±0.51	110.7±0.35	102.4±0.33	102.1±0.12	165.9±0.51*
Alkaline phosphatase (IU/L)	12.3±0.22	13.5±0.21	12.3±0.24	11.9±0.34	11.9±0.27	12.2±0.18
GGT (U/L)	10.21±0.23	11.0±0.44	10.5±0.31	9.83±0.10	9.68±0.24	10.1±0.11
Total protein (g/dL)	5.79±0.12	5.38±0.21	5.42±0.33	4.98±0.19	4.96±0.13	5.02±0.15
BUN (mg/dL)	38.5±0.12	37.6±0.16	35.9±0.18	35.7±0.22	36.1±0.26	35.6±0.31
Creatinine (mg/dL)	0.31±0.06	0.33±0.10	0.29±0.12	0.27±0.04	0.28±0.03	0.30±0.01
Bilirubin	0.22±0.01	0.21±0.01	0.23±0.02	0.19±0.03	0.21±0.01	0.22±0.02
Total Cholesterol (mg/dL)	149.4±3.32	148.1±1.22	149.2±1.30	110.3±3.11	110.3±3.89	109.3±3.07
Triglycerides (mg/dL)	95.3±4.05	94.1±2.19	96.8±2.36	99.3±4.45	95.7±4.11	98.5±4.87

ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; GGT: gamma-glutamyl transferase; BUN: blood urea nitrogen. Values represent the mean ± SEM. (*) indicates significant difference ($p < 0.05$) in comparison with control.

Table 4

Evaluation of the relative weight of organs from mice of control group or treated for 14 days with the ethanolic extract from leaves of *Croton blanchetianus* by oral or intraperitoneal administration.

Relative weight (g/10 g)	Oral			Intraperitoneal		
	Control	Extract		Control	Extract	
		2000 mg/kg	5000 mg/kg		2000 mg/kg	5000 mg/kg
Liver	2.18±0.11	2.19±0.19	2.18±0.18	2.17±0.10	2.18±0.09	2.17±0.20
Kidney	0.31±0.01	0.29±0.04	0.31±0.06	0.31±0.02	0.30±0.02	0.31±0.02
Lung	0.24±0.04	0.24±0.02	0.24±0.04	0.24±0.03	0.24±0.06	0.25±0.02
Heart	0.19±0.01	0.20±0.01	0.21±0.01	0.19±0.01	0.20±0.00	0.21±0.04
Spleen	0.29±0.01	0.29±0.00	0.29±0.02	0.29±0.01	0.30±0.02	0.30±0.03
Intestine	0.26±0.01	0.28±0.02	0.29±0.03	0.26±0.02	0.26±0.01	0.25±0.02
Ovary	0.11±0.01	0.10±0.02	0.07±0.03	0.12±0.01	0.10±0.00	0.11±0.02

Values represent the mean ± SEM. No significant differences ($p > 0.05$) were found in comparison with controls.

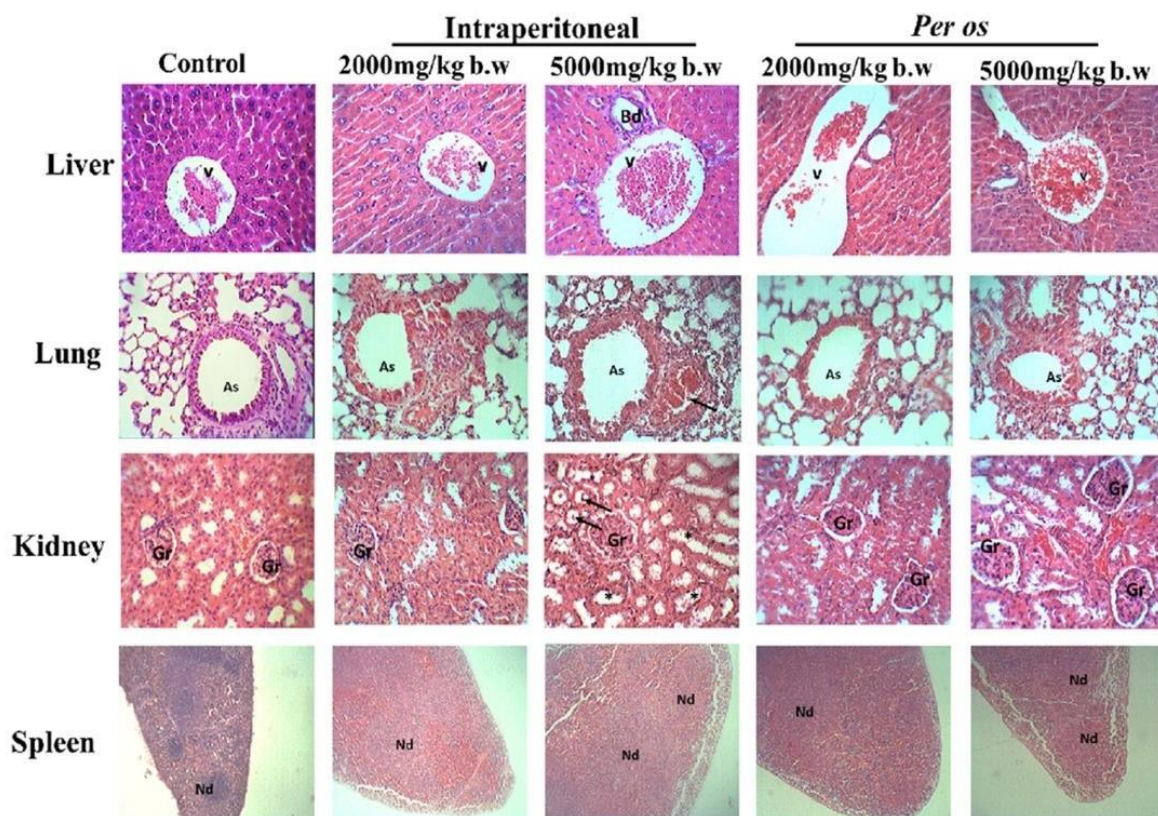


Fig. 2. Representative photomicrographs of the livers, lungs, kidneys, and spleen of female mice from control group or groups treated with ethanolic extract of *C. blanchetianus* leaves at the doses of 2000, and 5000 mg/kg via intraperitoneal or oral administration. **Livers:** the centrilobular vein (v) is seen in all images. **Kidneys:** Renal glomeruli (Gr) and contorted tubules without alterations are visible in control and extract-treated groups, excepting that which received a dose of 5000 mg/kg i.p., in which the kidneys presented venous congestion of glomeruli (arrows) and dilated proximal and distal tubules due to a vacuolar (hydropic) degeneration (*). **Lungs:** bronchiole (Br) and alveolar sac (As), visible, with preserved architecture in control and female mice treated orally with the extract at 2000 (*per os* and i.p.) and 5000 (*per os*) mg/kg. The lungs presented vascular congestion with interalveolar septa thickening (arrow) in group that received 5000 mg/kg i.p. **Spleen:** The lymph nodes (Nd) are well-defined in the control and treated groups orally. Spleens of mice that received a dose of 5000 mg/kg i.p. showed a considerable activation of lymph nodes. Hematoxylin–eosin staining was used. Magnification: 400 ×.

Similar to what we found in *C. blanchetianus* leaf extract, the main metabolite class in methanolic extracts from leaves of *Croton rhamnifolius* and *Croton rhamnifolioides* were flavonoids, and coumarins were also absent (Randau et al., 2004). Silva et al. (2017) showed that methanolic extract of the leaves of *Croton heliotropifolius* contained flavonoids and did not contain coumarins, but unlike *C. blanchetianus* extracts, saponins were not detected.

In the acute toxicity test, there was no death in the control or experimental groups over 14 days of observation, indicating an $LD_{50} > 5,000$ mg/kg. However, behavioral changes were identified in the groups treated with *C. blanchetianus* extract (2,000 and 5,000 mg/kg *per os* or i.p.) including reductions in ambulation, escape behavior, and anxiety and a reduction of fecal bolus. However, all these changes were reversed after a period of 4 h. Analysis of food and water

Table 5

Time spent in the rotating rod by animals from control or treated with the ethanolic extract from *Croton blanchetianus* leaves (oral administration) or the reference drug diazepam (i.p.).

Treatment	Dose (mg/kg)	Period after administration			
		30 min Time spent (s)	60 min	90 min	120 min
Control	–	181.3±0.32	180.9±0.30	181.2±0.33	182.2±0.22
Diazepam	25	72.4 ± 5.2*	70.1 ± 6.8*	77.4±3.43*	70.5 ± 9.2*
Extract	500	177.6±1.05	175.0±1.41	177.8±0.51	177.0±0.89
Extract	1000	178.8±1.03	176.1±1.00	177.8±0.51	175.8±1.13

In negative control, mice received saline orally. (*) Significantly different ($p < 0.05$) from control.

consumption and weight gain revealed no significant changes in the treated groups compared to control (Table 1).

The hematopoietic system serves as an important indicator of physiological and pathological changes since it is highly sensitive to toxic compounds (Adeneye et al., 2006). The hematological parameters of the animals from control and groups that receive the extract orally (Table 2) showed no significant alterations ($p > 0.05$) in the number of erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, MCV, MCH, MCHC, and leukocyte number. However, when the extract was administered intraperitoneally, there was a significant reduction in hematocrit, MCV, and MCHC in animals treated with both 2000 mg/kg and 5000 mg/kg (Table 2). According to Sultatos (2007), when substances are administered orally, they are absorbed by the gastrointestinal tract and metabolized in the liver. Many of the components then do not leave the liver and therefore never reach the bloodstream, in contrast to when the drug is administered intraperitoneally.

Biochemical analysis (Table 3) showed no significant changes ($p < 0.05$) when *C. blanchetianus* extract was administered orally at both doses as well as when a dose of 2000 mg/kg was administered intraperitoneally. However, administration of 5000 mg/kg i.p. led to alterations in ALT and AST, indicating probable liver damage. The hematological and biochemical analysis showed that the *C. blanchetianus* ethanolic extract, when administered orally, was not toxic at doses up to 5000 mg/kg. Thus, this route of administration was chosen for subsequent assays.

The internal organs of mice treated at both doses and by both routes showed no gross color or texture changes when compared to the control group. There was no significant difference ($p > 0.05$) in the weight of the organs of the treated animals (for both doses and routes) compared to the organs of the control group animals (Table 4). In the histopathological analysis (Fig. 2) of the organs from control and orally-treated animals, there were no observed changes in organization or architecture. In the case of intraperitoneal administration, the group treated with 2000 mg/kg presented well-preserved and delimited organs, similar to control. However, at the highest dose (5000 mg/kg) the lungs presented vascular congestion with thickening of the interalveolar septa. Furthermore, the kidneys presented venous congestion of glomeruli and dilated proximal and distal tubules due to a vacuolar (hydropic) degeneration (Fig. 2). Importantly, these findings did not result in alteration of the biochemical renal markers evaluated. Of note, the spleen was found to be larger, possibly due to activation of the lymph nodes (Fig. 2).

The open field test is a model of anxiety-like behavior used to evaluate locomotor and exploratory activity (Prut and Belzung, 2003) and the rotarod test evaluates muscle relaxation and motor incoordination as caused by a substance (Dunham and Miya, 1957). In the open-field test, there were no differences in the behavior of mice that received *C. blanchetianus* extract orally and those from control group. The results from rotarod test (Table 5) did not show significant differences between the animals treated with the extract and those from control. On the other hand, the positive control diazepam promoted a significant reduction in the time spent in the rotating rod

compared to the negative control. As longer the animal remains on the rotating bar, lesser is the probability that the compound will interfere with the animal motor activity. Thus, these data reveal that the *C. blanchetianus* extract probably does not promote depression in the central nervous system.

Genotoxicity was evaluated with the micronucleus and comet assays. At all doses and times tested, *C. blanchetianus* leaf extract did not induce the formation of micronuclei, while the positive control DXR, a genotoxic agent, induced a high number of MNPCE when compared to the control group (Table 6). In the comet test using peripheral blood samples collected 4 h and 24 h after administration of the extract, no significant differences in relation to the control were found (Table 7). Similarly, no alterations were observed in analyses of samples from bone marrow. The positive control DXR induced DNA damage, detectable as a large number of damaged cells (classes 2, 3 and 4). Our results are distinct of those found for *Croton palanostigma*, which showed to be genotoxic to Swiss mice that received a single administration of the plant sap at 300, 1000 or 2000 mg/kg (Maistro et al., 2013).

Having obtained this toxicity panel for *C. blanchetianus* leaf extract, the antinociceptive effect was then evaluated in three different experimental models through oral administration. The abdominal writhing method induced by intraperitoneal injection of acetic acid involves the release of a variety of mediators, including bradykinins, prostaglandins, and proinflammatory cytokines, leading to stimulation of peripheral nociceptors and neurons sensitive to inflammatory mediators and resulting in alterations in behavioral reactions (Le Bars et al., 2001; Pradhan et al., 2011; Oliveira Junior et al., 2016). The results (Fig. 3) show that *C. blanchetianus* extract was effective in reducing the number of writhes by 47.16, 67.91 and 88.81% when administered at doses of 50, 100, and 200 mg/kg, respectively. Reference drugs morphine and indomethacin showed expected antinociceptive effects with a reduction in the number of writhes by 94.78% and 73.88%, respectively.

Table 6

Evaluation of *in vivo* genotoxicity of ethanolic extract from *Croton blanchetianus* leaves (oral administration) or positive control doxorubicin (DXR, i.p.) by determination of the number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) from bone marrow of mice.

Treatments	Collection time	Number of MNPCE per animal					Mean MNPCE
		M1	M2	M3	M4	M5	
Control	24 h	1	0	0	0	1	0.40 ± 0.02
	48 h	0	1	1	0	1	0.60 ± 0.01
Extract 1000 mg/kg	24 h	1	0	1	0	0	0.40 ± 0.01
	48 h	1	0	0	1	1	0.60 ± 0.02
	24 h	1	0	1	0	1	0.60 ± 0.02
	48 h	1	0	1	0	1	0.60 ± 0.02
	24 h	20	22	27	25	22	23.20 ± 2.60*
	48 h	22	21	23	25	19	22.00 ± 2.52*

In negative control, mice received saline orally. (*) Significantly different from the control ($p < 0.05$).

Table 7

Evaluation of *in vivo* genotoxicity of ethanolic extract from *Croton blanchetianus* leaves (oral administration) or positive control doxorubicin (DXR, i.p.) by comet assay in mice peripheral blood and bone marrow: mean frequency of damaged cells, average distribution per class and average damage score.

Sample	Collection time	Treatments	Frequency ^a	Damage class				Score
				0	1	2	3	
Peripheral blood	4 h	Control	3.33±1.50	96.67±1.50	3.16±1.72	0.16±0.40	0.00±0.00	3.50±0.56
		Extract						
		1000 mg/kg	2.83±1.47	97.17±1.47	2.83±1.47	0.00±0.00	0.00±0.00	2.83±1.47
		2000 mg/kg	3.50±1.04	96.50±1.04	3.33±1.21	0.17±0.40	0.00±0.00	3.66±1.03
	24 h	DXR 30 mg/kg	26.44±4.03*	73.56±3.27*	17.30±2.13*	7.04±1.33*	2.01±0.44*	23.12±3.11*
		Control	2.16±0.66	97.83±1.06	2.16±1.31	0.00±0.00	0.00±0.00	2.33±0.78
		Extract						
		1000 mg/kg	2.83±1.16	99.17±1.16	2.83±0.46	0.00±0.00	0.00±0.00	2.44±0.85
Bone marrow	24 h	2000 mg/kg	2.33±1.75	97.67±1.75	2.33±0.58	0.00±0.00	0.00±0.00	2.06±0.86
		DXR 30 mg/kg	64.30±3.18*	35.70±3.15*	51.85±2.66*	7.50±1.47*	4.95±0.59*	64.55±3.48*
		Control	1.76±0.23	98.33±1.03	1.76±0.23	0.00±0.00	0.00±0.00	1.83±1.32
		Extract						
	24 h	1000 mg/kg	1.69±0.38	97.17±1.98	1.69±0.21	0.00±0.00	0.00±0.00	1.45±0.98
		2000 mg/kg	1.72±0.25	96.00±1.78	1.72±0.25	0.00±0.00	0.00±0.00	1.72±0.28
		DXR 30 mg/kg	58.34±2.17*	41.66±2.01*	42.75±4.09*	11.39±1.22*	4.20±0.75*	50.16±4.24*

In negative control, mice received saline orally. (*) Significantly different from the control ($p < 0.001$).

^a Total number of damaged cells (class 1 + 2 + 3).

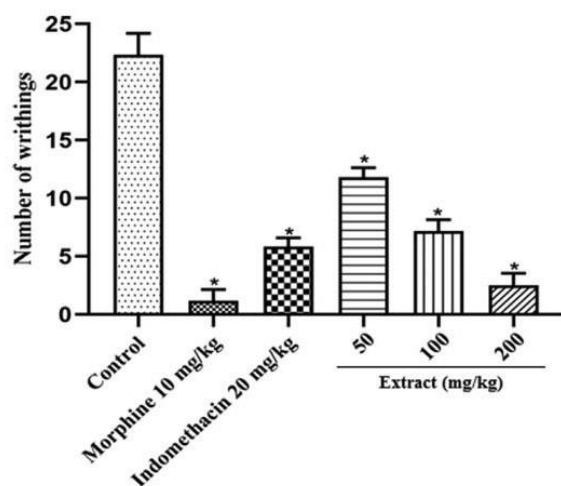


Fig. 3. Antinociceptive effect of ethanolic extract of *Croton blanchetianus* leaves (50, 100 and 200 mg/kg, *per os*) and reference drugs indomethacin (20 mg/kg *i.p.*) and morphine (10 mg/kg *i.p.*) in the acetic acid-induced writhing assay. The bars represent the average number of writhes $\pm$ SD. (*) indicates significant difference ($p < 0.001$) in comparison with control.

The tail immersion assay is a widely recognized test used to evaluate the antinociceptive activity of drugs with central action (Dey et al., 2019). In this study, *C. blanchetianus* extract significantly alleviated pain perception at all experimental doses (Table 8). Morphine was also effective in this assay, as expected. The highest dose of extract (200 mg/kg) led to an increase in latency time of 2.1-fold in comparison with control.

The formalin test is divided into two phases: acute, corresponding to non-inflammatory (neurogenic) pain, and late, corresponding to inflammatory pain characterized by local inflammation with release of inflammatory mediators and hyperalgesia (Hunskar and Hole, 1987). Administration of *C. blanchetianus* extract at all experimental doses decreased time spent licking the paw in both acute and late phases. In the first phase (neurogenic pain), the reduction of licking time ranged between 49.57% and 74.07%, while in the second phase (inflammatory pain), the extract promoted reduction of between 90.23 and 97.76% (Fig. 4). The reference drug indomethacin inhibited the nociception in 74.66% in the second phase, while

morphine was active in both acute and late phases, achieving reductions of 83.19% and 76.90%, respectively.

Considering the activity of the extract in both phases in the formalin test, we analyzed the possible involvement of opioid pathway in its antinociceptive action. For this, naloxone, a non-selective opioid receptor antagonist, was administered (Lewanowitsch et al., 2006) before *C. blanchetianus* extract at 200 mg/kg. A reversion of the antinociceptive effect was observed only in the first phase (Fig. 4), suggesting the involvement of opioid receptors in the central action of *C. blanchetianus* extract. Naloxone also significantly reversed the antinociceptive effect of morphine in both phases.

Similar activities are found in other plants of the genus *Croton* as shown by Okokon and Nwafor (2010), who reported anti-inflammatory, antipyretic, and antinociceptive activities of *Croton zambesicus* root ethanolic extract at doses below 100 mg/kg. In addition, Campos et al. (2002) demonstrated that at doses of 100 and 200 mg/kg, the methanolic extract of *Croton cajucara* leaves had antinociceptive activity.

Based on the data obtained in this work, the ethanolic extract of *C. blanchetianus* leaves can exert antinociceptive activity due to the presence of phenolic compounds, which were already reported in the literature as analgesic substances (Kupeli et al., 2007; Fischer et al., 2008; Güvenç et al., 2010). Flavonoids, one of the main class of compounds found in plants from *Croton* genus (Puebla et al., 2004), have been reported to have antinociceptive effects (Toker et al., 2004; Kupeli and Yesilada, 2007). Thus, we believe that the analgesic activity of the *C. blanchetianus* extract is related to these compounds.

Table 8

Mean latency time in the tail immersion assay of mice from control or treated with *Croton blanchetianus* leaf extract (oral administration) or the reference drug morphine (*i.p.*).

Treatment	Dose (mg/kg)	Period after administration			
		30 min	60 min	90 min	120 min
Latency time (s)					
Control	—	3.76±0.12	3.69±0.25	3.71±0.21	3.81±0.18
Extract	50	3.61±0.74	3.79±0.21	5.81±0.44*	6.30±0.89*
	100	3.77±0.66	4.01±0.19*	6.21±0.32*	7.40±0.43*
	200	3.70±0.42	6.07±0.66*	7.28±0.19*	8.12±0.51*
Morphine	10	3.74±3.2	7.11±2.04*	7.4±2.11*	8.50±1.21*

In negative control, mice received saline orally. (*) Significantly different from the control ($p < 0.05$).

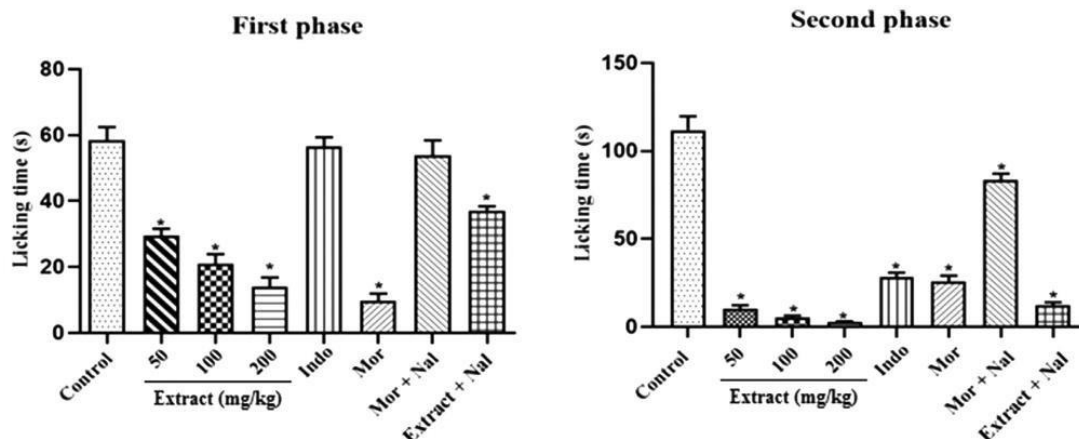


Fig. 4. Antinociceptive effect of *Croton blanchetianus* ethanol extract (50, 100 and 200 mg/kg, *per os*) and reference drugs indomethacin (Indo, 20 mg/kg *i.p.*) and morphine (Mor, 10 mg/kg *i.p.*) in both phases of the formalin test. The bars represent the average time mice spent licking their paws $\pm$ SD. The involvement of opioid receptors in the antinociceptive effect was evaluated by administering naloxone (Nal, 2 mg/kg *i.p.*) to mice 30 min prior to administration of the extract or morphine. (*) indicates significant difference ($p < 0.001$) in licking time versus control.

4. Conclusion

The ethanolic extract of *C. blanchetianus* leaves proved safe in mice when administered orally, but induced hematological, biochemical, and histological alterations upon intraperitoneally administration. From the genotoxic point-of-view, the extract was not damaging by either route of administration. The extract also provided significant decreases in neurogenic and inflammatory pain without affecting the motor coordination of treated animals, suggesting the need for future studies of the extract itself or its compounds as potential analgesic drugs.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for financial support (405297/2018–1; 407192/2018–2) and investigator research grants (PMGP, LALS and THN). They are also grateful to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES; Finance Code 001) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE: APQ–0108–2.08/14, APQ–0493–4.03/14) for financial support. AFSF would like to thank FACEPE (IBPG–1135–2.08/18) for graduate scholarship. AMO would like to thank CNPq (380058/2019–7) and FACEPE (BFP–0122–4.03/19) for a post-doctoral scholarships.

Author's contributions

AFS: Investigation, Methodology, Data curation, Formal analysis, Conceptualization, Writing – original draft. JCBM, WKC, MFN and RW: Investigation, Methodology. MRAF: Investigation, Methodology, Data curation, Formal analysis. PMGP and PLM: Funding acquisition, Resources, Data curation, Formal analysis. LALS: Funding acquisition, Resources, Supervision, Data curation, Formal analysis. AMO and THN: Funding acquisition, Resources, Supervision, Data curation, Formal analysis, Conceptualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

References

- Abreu, M., 2000. Triagem Fitoquímica de Plantas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Universidade de Ouro Preto, Ouro Preto.
- Adeneye, A.A., Ajagbonna, O.P., Adeleke, T.I., Bello, S.O., 2006. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.027>.
- Aquino, V.V.F., Costa, J.G.M., Angélico, E.C., Medeiros, R.S., Lucena, M.F.A., Rodrigues, O.G., 2017. Metabólitos secundários e ação antioxidante de *Croton heliotripifolius* e *Croton blanchetianus*. *Acta Brasiliensis* 1, 28–31. <https://doi.org/10.22571/ActaBras13201730>.
- Bettega, P.V.C., Czulsiak, G.R., Piva, R., Namba, E.L., Ribas, C.R., Antonio, E., Rosa, R., 2011. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. *Archives of Oral Research* 7, 89–97. <https://doi.org/10.7213/aor.v7i1.23149>.
- Burlinson, B., Tice, R.R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S.Y., Collins, A.R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T.S., Nakajima, M., Sasaki, Y.F., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., Hartmann, A., 2007. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research – Toxicology and Environmental Mutagenesis* 627, 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.011>.
- Campos, A.R., Albuquerque, F.A.A., Rao, V.S.N., Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., 2002. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. *Fitoterapia* 73, 116–120. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00004-7](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00004-7).
- Conybeare, G., Leslie, G.B., Angles, K., Barrett, R.J., Luke, J.S.H., Gask, D.R., 1988. An improved simple technique for the collection of blood samples from rats and mice. *Laboratory Animals* 22, 177–182. <https://doi.org/10.1258/002367788780864529>.
- Dey, M., Hossain, L., Parvin, M.N., 2019. In vivo assessment of the antinociceptive activity of ethanol bark extract of *Thevetia peruviana* (Family: Apocynaceae) in Swiss albino mice. *International Journal of Neuroscience and Behavioral Science* 7, 13–21. <https://doi.org/10.13189/ijnbs.2019.070201>.
- Dunham, N.W., Miya, T.S., 1957. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 46, 207–208. <https://doi.org/10.1002/jps.3030460322>.
- Elgorashi, E.E., Taylor, J.L., Maes, A., De Kimpe, N., Van Staden, J., Verschaeve, L., 2002. The use of plants in traditional medicine: potential genotoxic risks. *South African Journal of Botany* 68, 408–410. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30409-9](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30409-9).
- Fischer, L.G., Santos, D., Serafin, C., Malheiros, A., Delle Monache, F., Delle Monache, G., Cechinel Filho, V., Souza, M.M., 2008. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31, 235–239. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.235>.
- Firmino, N.C.S., Alexandre, F.S.O., Vasconcelos, M.A., Pinheiro, A.A., Arruda, F.V.S., Guedes, M.L.S., Teixeira, E.H., 2019. Diterpenes isolated from *Croton blanchetianus* Baill: Potential compounds in prevention and control of the oral Streptococci biofilms. *Industrial Crops and Products* 131, 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.062>.
- García-Díaz, J., Tuentler, E., Arranz, J.C.E., Maury, G.L., Cos, P., Pieters, L., 2019. Antimicrobial activity of leaf extracts and isolated constituents of *Croton linearis*. *Journal of Ethnopharmacology* 236, 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.049>.
- Güvenç, A., Okada, Y., Akkol, E.K., Duman, H., Okuyama, T., Çahş, I., 2010. Investigations of anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of phenolic compounds from *Sideritis brevibracteata*. *Food Chemistry* 118, 686–692. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.034>.

- Hartmann, A., Speit, G., 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology Letters* 90, 183–188. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(96\)03847-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(96)03847-7).
- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice. Dissociation between inflammatory pain. *Pain* 30, 103–114. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90088-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(87)90088-1).
- Khatun, A., Imam, M.Z., Rana, M.S., 2015. Antinociceptive effect of methanol extract of leaves of *Persicaria hydropiper* in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15, 63. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0558-y>.
- Küpeli, E., Şahin, F.P., Çalı, İ., Yeşilada, E., Ezer, N., 2007. Phenolic compounds of *Sideritis azurkai* and their in vivo anti-inflammatory and antinociceptive activities. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 356–360. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.017>.
- Küpeli, E., Yeşilada, E., 2007. Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 524–530. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.04.011>.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews* 53, 597–652.
- Lewanowitsch, T., Miller, J.H., Irvine, R.J., 2006. Reversal of morphine, methadone and heroin induced effects in mice by naloxone methiodide. *Life Sciences* 78, 682–688. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.062>.
- Lopes, M.L., Saffi, J., Echeverrigaray, S., Henriques, J.A.P., Salvador, M., 2004. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *Journal of Ethnopharmacology* 95, 437–445. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.08.025>.
- Maistro, E.L., 2014. The in vivo rodent micronucleus test. In: Sierra, L.M., Gaivão, I. (Eds.), *Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach, Methods in Pharmacology and Toxicology*. Springer Science Business Media, New York, pp. 103–113.
- Maistro, E.L., Ganthous, G., Machado, M.S., Zermiani, T., Andrade, S.F., Rosa, P.C.P., Perazzo, F.F., 2013. Dragon's blood *Croton palanostigma* induces genotoxic effects in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 147, 406–411. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.026>.
- Markhan, K.R., 1982. *Techniques of Flavonoids Identification*. Academic Press, London.
- Melo, G.F.A., Costa, A.C.V., Junior, F.G., Medeiros, R.S., Madruga, M.S., Queiroga Neto, V., 2013. The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to *Croton blanchetianus* Baill essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 1189–1194. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000500009>.
- Mota, V.G., Carvalho, F.L., Morais, L.C.S.L., Bhattacharyya, J., Almeida, R.N., Alencar, J.L., 2011. Antinociceptive activity of the chloroform fraction of *Dioclea virgata* (Rich.) Amshoff (Fabaceae) in Mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2011/342816>.
- Okokon, J.E., Nwafor, P.A., 2010. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities of ethanolic root extract of *Croton zambesicus*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 23, 385–392.
- Oliveira, F.Q., 2007. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte. Minas Gerais. *Rev. Eletr. Farm.* 3, 36–41. <https://doi.org/10.5216/refv3i2.2074>.
- Oliveira Júnior, J.O., Portella Junior, C.S.A., Cohen, C.P., 2016. Inflammatory mediators of neuropathic pain. *Revista Dor* 17, 35–42. <https://doi.org/10.5935/1806-0013.20160045>.
- Organization for Economic Cooperation and Development, 2001. OECD guideline for testing of chemicals. Guideline 423: Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Puebla, P., Guerrero, M., Correa, S., 2004. Flavonoides del género *Croton*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 33, 77–85. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa>.
- Pradhan, S., Shah, U.H., Mathur, A., Sharma, S., 2011. Experimental evaluation of antipyretic and analgesic activity of aspartame. *Indian Journal of Pharmacology* 43, 89–90. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.75683>.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* 463, 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X).
- Ramachandran, A., Jaeschke, H., 2019. Acetaminophen hepatotoxicity. *Seminars in Liver Disease* 39, 221–234. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1679919>.
- Randau, K.P., Florêncio, D.C., Ferreira, C.P., Xavier, H.S., 2004. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14, 89–96. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2004000200001>.
- Rodrigues, O.G., Falcão, B.R.M., Barbosa, B.C., Pereira, A.V., Aquino, V.V.F., 2019. In vitro biological activity of the *Croton blanchetianus* (Baill) essential oil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Applied Biology and Biotechnology* 7, 55–58. <https://doi.org/10.7324/JABB.2019.70210>.
- Silva, J.A.G., Lima, I.R., Santana, M.A.N., Silva, T.M.S., Silva, M.A.G., Leite, S.P., 2017. Screening fitoquímico e avaliação da toxicidade de *Croton heliotropifolius* Kunth (Euphorbiaceae) frente à *Artemia salina* Leach. *Revista Virtual de Química* 9, 934–941. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170060>.
- Sultatos, L., 2007. Drug absorption from the gastrointestinal tract. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* 1–2. <https://doi.org/10.1016/b978-008055232-3.60021-2>.
- Toker, G., Küpeli, E., Memisoglu, M., Yeşilada, E., 2004. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *Journal of Ethnopharmacology* 95, 393–397. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.08.008>.
- Trevisan, G., Rossato, M.F., Hoffmeister, C., Müller, L.G., Pase, C., Córdova, M.M., Rosa, F., Tonello, R., Hausen, B.S., Boligon, A.A., Moresco, R.N., Athayde, M.L., Burguer, M.E., Santos, A.R., Ferreira, J., 2014. Antinociceptive and antiedematogenic effect of pecan (*Carya illinoensis*) nut shell extract in mice: a possible beneficial use for a by-product of the nut industry. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 25, 401–410. <https://doi.org/10.1515/jbcp-2013-0137>.
- Treede, R.-D., 2018. The international association for the study of pain definition of pain. *Pain Reports* 3, e643. <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000643>.
- Viana, G.S.B., Vale, T.G., Rao, V.S.N., Matos, F.J.A., 1998. Analgesic and anti-inflammatory effects of two chemotypes of *Lipia alba*: a comparative study. *Pharmaceutical Biology* 36, 347–351. <https://doi.org/10.1076/phbi.36.5.347.4646>.
- Wagner, H., Bladt, S., 2001. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, second ed. Springer, New York.