

**Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos**

**Investigação dos efeitos antimicrobiano, citotóxico e
genotóxico do óleo essencial das folhas de *Croton
tricolor* Klotsch ex Baill (Euphorbiaceae)**

Sávio Benvindo Ferreira

João Pessoa - PB
2014

Sávio Benvindo Ferreira

Investigação dos efeitos antimicrobiano, citotóxico e genotóxico do óleo essencial das partes aéreas de *Croton tricolor* Klotsch ex Baill (Euphorbiaceae)

Dissertação apresentado ao **Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** do Centro de Ciências da Saúde, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**, na área de concentração: **FARMACOLOGIA**

Orientadora: Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa

João Pessoa – PB
2014

SÁVIO BENVINDO FERREIRA

Investigação dos efeitos antimicrobiano, citotóxico e genotóxico do óleo essencial das partes aéreas de *Croton tricolor* Klotsch ex Baill (Euphorbiaceae)

Banca Examinadora

Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa
Orientadora

Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
Membro interno

Profa. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Membro externo

À meus pais, Ana Cristina e Almir

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

São tantas pessoas que foram fundamentais para a conclusão de mais esse ciclo que espero não esquecer ninguém. Agradeço:

A Deus, antes de tudo, porque só ele teve a força para me amparar nos momentos de desespero e continuar me dando forças para seguir esse dois anos de muita batalha, resistência e superação.

Os meus amados pais: Ana Cristina Benvindo e Sousa Ferreira e Almir da Costa Ferreira, por todo amor, carinho, força e apoio em todos os momentos. Obrigado por serem exemplos de pessoas lindas, de seres humanos, de caráter, bondade, garra e amor.

Aos meus irmãos: Pablo Benvindo Ferreira, Siluana Benvindo Ferreira por sempre me apoiarem e por torcerem pelo meu bem, felicidade e superação e por todo amor que, apesar da distância, consigo sentir sempre em meu coração.

Em especial a minha irmã, Paula Benvindo Ferreira. Quando fiz o intermédio de sua vinda para este estado, tinha em mente ser uma forma de aproveitar melhor sua inteligência e prosseguir com sua jornada acadêmica. Engano o meu, sua vinda chegada para perto de mim foi um presente, um dos anjos de Deus que, mais uma vez, Ele me enviou para que eu pudesse seguir meu destino e conseguisse suportar tantas adversidades surgidas pelo caminho. Não tenho palavras para agradecer a dedicação, amor, carinho, cuidado e ajuda prestada. Só posso dizer que “Te amo”.

A toda minha família pela força, preces, pensamentos positivos. Foi um período de muitos desafios e superações para todos nós, mas com fé e com Deus em nossas vidas continuaremos atravessando todos os desafios propostos!

A professora Hilzeth de Luna Freire Pessôa, por toda a orientação, paciência, esforço, dedicação e compreensão durante todo o período. Mesmo eu às vezes ficando com os nervos a flor da pele, a senhora teve o dom de, após breves palavras trocadas, devolver a estabilidade e encher novamente de

esperança a mente estressada. Obrigado por me aceitar e querer continuar nessa jornada tão difícil mas não impossível.

A professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima por sempre poder contar com seu apoio há anos atrás até os dias de hoje, pela disposição sempre demonstrados e por aceitar participar da banca.

Ao professor Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho pela disponibilidade em participar da banca, contribuindo para meus ensinamentos e melhora acadêmica, além da compreensão demonstrada.

A Tassiana Dantas Barbosa, pra mim sempre “Tasse”! Uma pessoa iluminada, engraçada, amiga e de um coração como poucos. Conquistou-me com seu jeito e com suas atitudes que nunca vou esquecer.

A Carol Lima. Sem dúvidas uma pessoa que desde o início senti nossa ligação e que estaríamos juntos na vida um do outro daquele momento em diante. Sua amizade e companheirismo foram, e são, uma benção em minha vida.

A Danilo Lemos, por todo o companheirismo, amizade e afeto nos momentos de alegria e tristeza.

Aos amigos do “Legais sem Futuro”: Tassiana Dantas, Paula Benvindo, Carol Lima, Danilo Lemos, Iara Luna e Luiz Henrique Vasconcelos. Cheguei a meio a um trem já andando, cheio de novidades e informações e que sem o apoio de vocês não conseguiria ter conseguido concluir mais essa jornada.

As amigas do “Anônimos”: Karlla Viana, Júlia Dias, Danyelle Oliveira e Silvy Vieira, por me adotarem esse “cachorro” abandonado. Obrigado pela força, carinho e por fazer minha vida cheia de alegria, amor, paz, felicidade. Não teria sido possível essa vitória sem a presença de cada uma em minha vida.

A professora Bagnólia Araújo por todos os ensinamentos, conselhos, carinho e afeto depositados em mim. Obrigado pelo apoio e por compreender meu jeito, a senhora é um exemplo raro a ser seguido.

A meus amigos de longa data: Rafaela Soares, João Maurício, Joelly Holanda, Allamahac Pequeno, Fabiana Galvão, Magda Araújo. Uma amizade construída a quase dez anos e que continua na mesma intensidade apesar da distância física. Amo vocês!

A meus amigos Rita de Cássia, Josimar Santana, Janaína Macêdo, Cris Lima, Landson Holanda e Zilka Nanes por serem meu ponto de apoio sempre quando precisado e por fazerem minha vida mais feliz. Sem amigos como vocês a jornada seria insuportável!

A todos do Laboratório de Farmacologia Funcional “Thomas George”, por aguentarem durante todos esses anos minha companhia, comentários e opiniões por vezes inconvenientes. Obrigado pela compreensão, vocês foram minha segunda “casa acadêmica” e que continuem assim, ainda temos pelo menos mais quatro anos.

A todos os companheiros do Bioger, em especial Camila Montenegro e Abraão, pela companhia, ensinamentos, ajuda e força sempre prestados.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia Molecular, DBM, pela força, ajuda e torcida.

A todos os funcionários do Centro de Biotecnologia, CBiotec, pelos serviços e ajuda disponibilizados sempre que possível.

A secretária do PPgPNSB, em especial a Caroline Mangueira, por toda paciência, preocupação, eficiência e serviços prestados ao longo de todos esses anos.

A todos os técnicos dos laboratórios envolvidos durante este mestrado, vocês são essenciais para a continuação desse processo.

Ao coordenador do Programa de Pós Graduação de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Prof. José Maria Barbosa Filho, e pelo vice-coordenador Prof. Josean Fachine Tavares pelo apoio na conclusão dessa jornada.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos pelos ensinamentos transmitidos e por me tornarem um profissional mais capacitado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro para a viabilização desse estudo.

A meus amigos da turma de mestrado, pelo apoio, ajuda, alegrias, acolhimento e por todos os bons momentos que podemos desfrutar juntos.

Em fim, gostaria de agradecer à todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho.

RESUMO

O uso de produtos de origem vegetal para o tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas da prática medicinal da humanidade e, embora grandes avanços sejam observados na medicina moderna, os produtos naturais continuam contribuindo de maneira considerável nos cuidados com a saúde. Entre as ações terapêuticas das plantas medicinais, a atividade antimicrobiana é uma das mais relevantes frente à taxa de mortalidade existente e à resistência antimicrobiana. Apesar das plantas possuírem muitos usos terapêuticos que são conhecidos tradicionalmente, o ser humano desconhece o fato de que elas podem apresentar toxicidade tanto para o homem quanto para os animais. *Croton tricolor* Klotsch ex Baill, conhecido popularmente como marmeleiro prateado, é nativo da caatinga do Nordeste do Brasil. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos biológicos do óleo essencial das folhas de *Croton tricolor* Klotsch ex Baill (Ct-OE). A concentração inibitória mínima (CIM) para a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 foi de 6,7 mg/mL, *Staphylococcus aureus* ATCC 25619 3,35 mg/mL, *Staphylococcus aureus* ATCC 8539 foi de 1,68 mg/mL e *Escherichia coli* ATCC 25922 foi de 3,35 mg/mL. Para as linhagens de *E. coli* de origem clínica a CIM variou de 1,67 a 3,35 mg/mL. Na avaliação da citotoxicidade frente a eritrócitos humanos, o óleo essencial apresentou um baixo nível de hemólise no sangue A⁺ e B⁺, mas não causou em eritrócitos tipo O⁺. O Ct-OE apresentou um leve aumento da oxidação em eritrócitos, mas a um valor muito inferior a fenilhidrazina (Ph). Entretanto, o Ct-OE conseguiu proteger os eritrócitos da oxidação pela Ph de forma mais eficiente que a vitamina C. O Ct-OE não promoveu dano cromossômico estrutural e/ou numérico em eritrócitos de camundongos *in vivo*.

Palavras-chave: *Croton tricolor*, CIM, hemólise, micronúcleo.

ABSTRACT

The use of plant products for the treatment, prevention and cure of diseases, is one of the oldest forms of medical practice of humanity, and although great advances observed in modern medicine are natural products still contribute considerably in care health. Among the therapeutic actions of medicinal plants, antimicrobial activity is one of the most important front of the existing rate of mortality and antimicrobial resistance. Although plants possess many therapeutic uses that are traditionally known, the human being unaware of the fact that they can be toxic both for humans and for animals. *Croton tricolor* ex Klotsch Baill, popularly known as silvery quince is native caatinga of Northeast Brazil. Thus, the present study aimed to investigate the biological effects of essential oil from leaves of *Croton tricolor* Klotsch ex Baill (Ct-OE). The minimum inhibitory concentration (MIC) for *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 was 6.7 mg/ml, *Staphylococcus aureus* ATCC 25619 3.35 mg/ml *Staphylococcus aureus* ATCC 8539 was 1.68 mg/mL and *E. coli* ATCC 25922 was 3.35 mg/mL. For *E. coli* strains of clinical origin MIC ranged from 1.67 to 3.35 mg/ml. In cytotoxicity against human erythrocytes, the essential oil exhibited a low level of hemolysis in blood A + and B +, but caused in type O + erythrocytes. The Ct -OE showed a slight increase in oxidation in erythrocytes, but a value much lower than phenylhydrazine (Ph). However, the Ct-OE could protect erythrocytes from oxidation by Ph more efficiently than vitamin C. The Ct -OE did not cause structural chromosomal damage and/or number of erythrocytes in mice in vivo.

Keywords: *Croton tricolor*, MIC, hemolysis, micronucleus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Teste de micronúcleo (óleo essencial de <i>Croton tricolor</i> na concentração de 2000 mg/kg)	51
Figura 2	Eritrócitos de camundongos tratados com ciclofosfamida (50mg/kg) - controle positivo	51
Figura 3	Eritrócitos de camundongos - controle negativo	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Atividade citotóxica do Ct-OE nas concentrações de 1,69, 3,35 e 6,7 mg/ml frente a eritrócitos tipo A.	45
Gráfico 2	Atividade citotóxica do óleo essencial de Ct-OE nas concentrações de 1,69, 3,35 e 6,7 mg/ml frente a eritrócitos tipo B.	46
Gráfico 3	Atividade citotóxica do Ct-OE nas concentrações de 1,69, 3,35 e 6,7 mg/ml frente a eritrócitos tipo O ⁺ .	47
Gráfico 4	Atividade oxidante do Ct-E nas concentrações de 1,69, 3,35 e 6,7 mg/ml.	48
Gráfico 5	Efeito do Ct-OE na proteção da formação de metHB em eritrócitos humanos (n=3).	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de <i>Croton tricolor</i> frente a cepas bacterianas	44
Tabela 2	Porcentagem de hemólise promovida pelo óleo essencial de <i>Croton tricolor</i>	45
Tabela 3	Quantidade de metahemoglobina (metHb) formada na presença e na ausência do óleo essencial de <i>Croton tricolor</i>	47
Tabela 4	Quantidade de metahemoglobina (metHb) formada na presença e na ausência do óleo essencial de <i>Croton tricolor</i> e do agente antioxidante padrão.	49
Tabela 5	Frequência de eritrócitos micronucleados em eritrócitos de sangue periférico de camundongos Swiss machos e fêmeas	50

LISTA DE ABREVIATURAS

- ❖ **ANVISA** – Agência de Vigilância Sanitária
- ❖ **ATCC**- American Type Culture Collection
- ❖ **CFM** - Concentração Fungicida Mínima
- ❖ **CIM** – Concentração Inibitória Mínima
- ❖ **Ct-OE** – Óleo essencial de Croton tricolor
- ❖ **DMSO** – Dimetilsulfóxido
- ❖ **DNA** - Ácido Desoxirribonucleico
- ❖ **Hb**- Hemoglobina
- ❖ **metHb** – Metahemoglobina
- ❖ **Ph**- Fenilhidrazina
- ❖ **SINITOX** - Sistema Nacional de Informações Toxicológicas
- ❖ **OMS**- Organização Mundial de Saúde
- ❖ **UFC** – Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
	2.1 Plantas Medicinais.....	21
	2.2 Óleos Essenciais	21
	2.3 Família Euphorbiacea.....	23
	2.4 Gênero Croton.....	24
	2.5 <i>Croton tricolor</i> Klotsch ex Baill.....	27
	2.6 Atividade antimicrobiana de produtos naturais.....	28
	2.7 Genotoxicidade.....	29
3	OBJETIVOS.....	31
	3.1 Geral.....	32
	3.1 Específicos.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS.	33
	4.1 Material Botânico.....	34
	4.2 Produto Teste.....	34
	4.3 Local da Pesquisa.....	35
	4.4 Meios de Cultura.....	35
	4.5 Bactérias.....	35
	4.6 Inóculo Bacteriano.....	36
	4.7 Eritrócitos humanos.....	36
	4.8 Animais.....	37
	4.9 Preparação da amostra de Ct-OE para os ensaios farmacológicos.....	37
	4.10 Avaliação da atividade antibacteriana do Ct - OE frente a bactérias de importância clínica.....	37
	4.11 Caracterização da atividade antimicrobiana do Ct-OE.....	38
	4.12 Avaliação citotóxica Ct-OE em eritrócitos humanos.....	38
	4.13 Avaliação do potencial oxidante e antioxidante do Ct-OE em eritrócitos humanos.....	39
	4.14 Avaliação do potencial clastogênico e aneugênico do Ct-OE através do teste do micronúcleo <i>in vivo</i>	39

4.15	Análise Estatística.....	40
5	RESULTADOS.....	41
5.1	Avaliação do efeito antibacteriano do óleo essencial do Ct – OE frente a bactérias de importância clínica.....	42
5.2	Caracterização da atividade antibacteriana do Ct-OE.....	42
5.3	Avaliação do efeito hemolítico do Ct-OE frente a eritrócitos humanos.....	43
5.4	Avaliação do potencial oxidante do Ct-OE em eritrócitos humanos.....	45
5.5	Avaliação do potencial antioxidante do Ct-OE em eritrócitos humanos.....	46
5.6	Investigação do potencial clastogênico e aneugênico do Ct-OE através do teste do micronúcleo em eritrócitos de roedores <i>in vivo</i> ..	48
6	DISCUSSÃO.....	51
7	CONCLUSÕES.....	60
	REFERÊNCIAS.....	62

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos de origem vegetal para o tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas da prática medicinal da humanidade e, embora grandes avanços sejam observados na medicina moderna, os produtos naturais continuam contribuindo de maneira considerável nos cuidados com a saúde (CRAGG et al., 1997; SHU, 1998; VEIGA JÚNIOR et al., 2005). O Brasil, possuindo uma grande biodiversidade de espécies vegetais, se destaca como fonte para obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica (KORDALI et al., 2008).

Apesar do uso de plantas medicinais ser uma prática milenar, pode-se notar que a demanda por medicamentos derivados de plantas cresceu nos últimos anos. Esta tendência é evidenciada nitidamente pelo crescimento rápido de deposição de patentes relacionadas à ao uso medicinal das plantas e pela grande taxa de crescimento (5-15 %) para tais medicamentos no mercado mundial, sendo o crescimento no Brasil girando em torno de 10 a 15 % ao ano (RAMOS et al., 2005; KARTAL, 2007).

Entre as ações terapêuticas das plantas medicinais, a atividade antimicrobiana é uma das mais relevantes frente à taxa de mortalidade existente e à resistência antimicrobiana. O interesse na busca por agentes antimicrobianos derivados de produtos naturais é justificável, uma vez que possuem uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos (ANGÉLICO, 2011).

Apesar das plantas possuírem muitos usos terapêuticos que são conhecidos popularmente, o ser humano desconhece o fato de que elas podem apresentar toxicidade tanto para o homem quanto para os animais (RODRIGUES; ALMEIDA; PIRES, 2010; MARTINS et al., 2012). De acordo com dados do Sistema Nacional de Informações Toxicológicas (SINITOX), no ano de 2010, no Brasil foram registrados 1132 casos de intoxicação humana por uso de plantas sendo que desses, 5 foram a óbito (SINITOX, 2010). Diante disso, a realização de estudos que investiguem as atividades citotóxicas e genotóxicas de compostos naturais mostra-se importante a fim de se garantir uma maior segurança do uso desses produtos pela população.

Diante dos vários compostos naturais obtidos de plantas, destacam-se os óleos essenciais. Essas substâncias são constituídas, na maioria das vezes, por

misturas complexas que podem ser originadas, pela biossíntese, a partir do ácido mevalônico por duas vias biossintéticas distintas: a série terpenica e, menos frequentemente, a dos fenilpropanoides (SAAD et al., 2009).

Dentre as famílias botânicas fornecedoras de óleos essenciais com ações farmacológicas se destaca a família Euphorbiaceae. Esta família possui cerca de 300 gêneros e 5000 espécies de árvores, arbustos e ervas conhecidas. Os 300 gêneros de Euforbiáceas estão agrupados em 52 tribos e 5 subfamílias, com diversas destas tribos sendo divididas em subtribos. A distribuição geográfica dos gêneros das Euforbiáceas concentrava-se, primitivamente, na África e Madagascar, mas algumas subfamílias se dispersaram nas regiões tropicais (WEBSTER, 1994).

Em meio à diversidade de espécies dessa família, podemos destacar a *Croton tricolor* Klotsch ex Bail. Conhecido tradicionalmente como marmeleiro prateado é um arbusto de ramos delgados, cilíndricos, cinerescentes e escabros. É nativo da caatinga do Nordeste do Brasil, sendo as cascas do caule utilizadas para tratar cólicas intestinais (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; CATUNDA JR., 2003). Estudos químicos mostraram a presença de ácido carboxílico diterpenico e seu éter metílico, além de α -pineno e α -guaieno (CRAVEIRO, 1976; CATUNDA JR., 2003). Estudos recentes mostram que o óleo essencial dessa espécie possui atividade antioxidante e antibacteriana contra *Streptococcus* spp., *Serratia* spp., *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (CANUTO, 2005).

Entre as atividades farmacológicas apresentadas pelos produtos de origem vegetal, a antimicrobiana vem sendo exaustivamente estudada nas últimas décadas devido ao agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar (OLIVEIRA et al., 2006). Com o aumento progressivo da resistência, a busca de novos agentes antibacterianos derivados de produtos naturais de plantas poderia ser uma alternativa, uma vez que apresentam uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos (NOVAIS et al., 2003). Assim, as pesquisas com espécies vegetais têm sido avaliadas não somente pela atividade antibacteriana, mas também como agente modificador de resistência antibiótica (GIBBONS, 2004).

Atualmente, a maior parte dos fitoterápicos que são utilizados por automedicação ou por prescrição médica não tem o seu perfil tóxico bem conhecido (CAPASSO et al., 2000; VEIGA-JUNIOR; MELLO, 2008). A detecção de atividade citotóxica de um fitoterápico constitui uma medida prioritária, uma vez que vários compostos químicos podem ser capazes de causar efeitos tóxicos. Portanto, experimentos capazes de fornecer, com razoável margem de segurança, indicações sobre os riscos envolvidos na sua utilização são fundamentais (BENIGNI, 2005).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial de *Croton tricolor* Klotsch ex Bail frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, além de investigar a atividade a atividade citotóxica e genotóxica *in vitro* e *in vivo* em células eucarióticas.

REFERENCIAL TEÓRICO

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas Medicinais

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e, por um longo tempo, minerais, plantas e produtos animais foram as principais fontes de drogas (BAJPAI et al., 2008). O documento médico mais antigo conhecido é sumeriano e data de 4.000 anos atrás. Este documento menciona remédios a base de plantas utilizados no tratamento de diversas doenças (MORAIS; BRAZ-FILHO, 2007).

O interesse e os registros da utilização de produtos naturais feitos pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers, espécie de farmacopéia faraônica, escrita em torno em 1.550 a.C. descoberto e traduzido pela primeira vez em 1890 por H. Joachim, onde são enumeradas mais de 100 doenças e já fazia referência aos medicamentos de origem vegetal e mencionava cerca de 700 remédios, entre eles, o bulbo da cila, o óleo de rícino e a genciana (VILELA, 1977; GURGEL et al., 2005). Os egípcios já faziam uso medicinal dos vegetais, e algumas das espécies que eles utilizavam continuam sendo empregadas até os dias de hoje, tais como: *Papaver somniferum* (papoula), *Scilla maritima* (scila), *Aloe vera* (babosa) e *Ricinus communis* (óleo de rícino) (LAVABRE, 1993; MOTSEI et al., 2003; YAYLI et al., 2005; MAGWA et al., 2006; MORAIS; BRAZ-FILHO, 2007; ABDELGALEIL et al., 2008).

A eficácia e o uso de plantas medicinais são atribuídos as observações populares que contribuem de forma relevante, para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com freqüência, pelos efeitos medicinais que produzem apesar de não terem seus constituintes químicos muitas vezes conhecidos, mas tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas ao longo dos anos (MACIEL et al., 2002). O interesse popular na utilização de produtos naturais para fins terapêuticos tem sido muito significativo nos últimos tempos, principalmente nos países em desenvolvimento, devido ao difícil acesso da população aos medicamentos sintéticos. Segundo a OMS, entre 60% e 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional ou a fitoterapia no tratamento de várias doenças (BAGATINI et al., 2007).

As plantas medicinais são os únicos recursos terapêuticos de grande parcela da população brasileira e mais de 2/3 da população do planeta. Vários fitoterápicos movimentam o mercado mundial, sendo que a balança comercial brasileira ainda é deficitária neste aspecto. O Brasil exporta sete milhões de reais em extratos vegetais de alcaçuz, aloés, bardana, catuaba, ipeca e quina entre outros e apesar da biodiversidade da nossa flora, o Brasil ainda importa grande quantidade de cosméticos, hormônios e outras drogas produzidas a partir de fontes naturais (FERNANDES; ANTUNES, 2000).

2.2 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são constituídos de substâncias orgânicas voláteis presentes em vários órgãos vegetais (folhas, cascas, raízes, frutos, e flores). (SARTORATTO et al., 2004). São originados do metabolismo secundário das plantas e possuem grande importância como marcadores taxonômicos nos diferentes níveis de hierarquia, inclusive na investigação de problemas taxonômicos, evolutivos e intraespecíficos (GONÇALVES et al., 1999; TRIGO et al., 2003).

Os óleos essenciais apresentam composição química muito variada, são constituídos por moléculas orgânicas voláteis de no máximo 300 Daltons e, em geral, compreendem misturas de várias classes de produtos naturais, principalmente terpenóides (especificamente monoterpenos-C10, e sesquiterpenos-C15, embora diterpenos-C20 possam também estar presentes), derivados de ácidos graxos, benzenóides e compostos nitrogenados; e cada uma delas pode conter os mais diversos grupos funcionais tais como: hidrocarbonetos alifáticos (lineares, ramificados, saturados ou insaturados), ácidos, álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres, lactonas, compostos contendo nitrogênio e enxofre, dentre outros. (SIMÕES et al., 2007, HENRIQUES et al., 2009).

Os óleos voláteis obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, caracteres físico-químicos e odores bem distintos. Assim como a composição química de um óleo volátil, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente, de acordo com a época de coleta, condições climáticas e de solo. Portanto, o ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo também influem sobre sua composição química (SIMÕES et al., 2007).

Nas plantas, os óleos essenciais desempenham importantes funções ecológicas agindo como sinais químicos para a comunicação entre espécies, na proteção contra micro-organismos patogênicos, herbívoros, na atração de animais polinizadores e dispersores de sementes, promovendo assim a perpetuação das espécies e contribuem também com o odor de folhas, flores e frutos (TAIZ; ZEIGER, 2006; MARASCHIN; VEPOORTE, 1999).

2.3 Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae, pertencente à ordem Malpighiales, apresenta como uma das principais características botânicas a produção de plantas tóxicas latexcentes. Constitui a sexta maior família depois das Asteraceae, Poaceae, Fabaceae, Orchidaceae e Rubiaceae, compreendendo 317 gêneros e 7.500 espécies de ervas, subarbustos, trepadeiras e árvores, distribuídas principalmente nos trópicos e subtropicais. (SANTOS et al., 2005; LIMA, 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

As Euphorbiaceae *sensu lato* eram tradicionalmente divididas em cinco subfamílias (Acalyphoideae, Crotonoideae, Euphorbioideae, Oldfieldioideae e Phyllantoideae) com grande variabilidade morfológica e poucas características em comum (CARUZO, 2005). Após estudos filogenéticos os limites da família foram redefinidos devido ao polifiletismo das Euphorbiaceae *sensu lato*, com a exclusão das subfamílias Phyllantoideae e Oldfieldioideae e Euphorbiaceae *sensu stricto* compreendendo Euphorbioideae, Crotonoideae e Acalyphoideae (LIMA, 2006).

Entre as plantas pertencentes à família Euphorbiaceae com uso medicinal amplamente registrado na literatura etnofarmacológica podem ser destacadas *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra), *Jatropha gossypifolia* L. (pinhão-roxo), *Ricinus communis* L. (mamona), além de diversas espécies do gênero *Croton* L. (PIO-CORREA, 1974; LORENZI & MATOS, 2002). Destaca-se pela importância econômica de algumas espécies, como por exemplo *Hevea brasiliensis*, produtora de látex, conhecida como a árvore da borracha. Outro exemplo é a mamona (*Ricinus communis*), nativa da África, fonte de óleo de rícino, fibras vegetais e compostos químicos usados na medicina, além de óleo lubrificante aplicado em propulsores de ônibus espaciais e foguetes. A mandioca (*Manihot esculenta*) é fonte primária de alimento em boa parte do nordeste brasileiro, de onde é extraída a farinha de

mandioca que é consumida em larga escala em todo o Brasil e também em muitos países africanos (WATSON, 2008).

É a segunda família mais representativa da Caatinga em número de espécies, superada apenas por Leguminosae. No Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies desta família, difundidas em todos os tipos de vegetação e apresentando diversas formas de vida. Seus principais gêneros em número de espécies são *Euphorbia* (1.500), *Croton* (700), *Phyllanthus* (400), *Acalypha* (400), *Macaranga* (400), *Antidesma* (150), *Drypetes* (150), *Jatropha* (150), *Manihot* (150) e *Tragia* (150) (BARROSO, 1991; WEBSTER, 1993; SANTOS et al., 2005).

2.4 Gênero *Croton*

Croton é um gênero da família Euphorbiaceae subdividido em 40 seções com cerca de 1300 espécies, amplamente distribuídas em regiões tropicais de todo mundo. Entre as principais características do gênero estão inflorescências espiciformes, flores femininas com pétalas reduzidas, estames encurvados no botão, tipo de indumento (estrelado, escamiforme ou simples) e látex não-leitoso, que permitem distingui-lo de outros gêneros da subfamília Crotonoideae, tais como os já citados *Jatropha*, *Hevea* e *Manihot* (LIMA, 2006). No Brasil, é o gênero com maior número de representantes da família, com 350 espécies, distribuídas em 29 seções (Berry et al., 2005). Na região Nordeste estima-se um total de 52 espécies distribuídas em 18 seções (CORDEIRO e CARNEIRO TORRES, 2006).

Apesar do grande número de espécies e acentuado poliformismo, autores como Mueller e Baillon propuseram classificações infragenéricas de *Croton* ainda no século XIX. Com base nesses trabalhos, Webster (1993) utilizou características morfológicas para propor a subdivisão do gênero em 40 seções. Em 2005, Berry e colaboradores publicaram o primeiro estudo filogenético de *Croton*, incluindo 88 taxa, baseado em dados moleculares, morfológicos e biogeográficos. Os autores salientam a importância de futuros estudos que possam contribuir para elucidar as complexas relações entre as espécies de um gênero tão diverso, abundante em ecossistemas tropicais e com amplo potencial farmacológico.

Várias espécies do gênero *Croton* são ricas em constituintes que apresentam atividades biológicas e desempenham papel importante na terapêutica tradicional com plantas medicinais na África, Ásia e América do Sul (SALATINO et al., 2007).

Este gênero compreende ervas, arbustos e árvores, os quais estão descritos em diversas farmacopéias. Em geral, as preparações, na forma de infusões, chás e emplastos, com as espécies deste gênero são usados como: estimulante, inseticida, vermífugo, diurético, antisséptico, purgativo, analgésico, antipirético, cicatrizante e antimicrobiano. Da mesma forma preparações de espécies de *Croton* são aplicadas no tratamento de tumor, câncer, epilepsia, anorexia, ansiedade, reumatismo, inflamação, malária, diarreia, tuberculose, dor de cabeça e em uma série de sintomas gastrointestinais (MATOS, 2000; PALMEIRA, 2006).

O gênero *Croton* possui diversas espécies produtoras de óleo. Análises químicas dos óleos essenciais de algumas espécies reportam que monoterpenóides, sesquiterpenóides e fenilprenóides são os constituintes majoritários. Atualmente inúmeros trabalhos têm sido publicados tratando das propriedades biológicas dos óleos. Entre elas destacam-se as atividades gastroprotetora, miorelaxante, antiespasmódica, antinociceptiva e sobre alterações comportamentais (SALATINO et al., 2007).

Levando em conta a grande dimensão do gênero e a dispersão dos estudos sobre as espécies, não existem conclusões definitivas sobre a relação química entre as espécies de *Croton*. Os estudos relatam que a química desse gênero é diversa. Na literatura, estão descritos o isolamento de alcalóides, flavonóides, terpenóides, lignanas, benzenóides, poliprenóides, quinóides e um grande número de diterpenóides. Nesta última classe se encaixa a maior parte dos compostos identificados, com relevante destaque aos diterpenos com esqueleto clerodano (SALATINO et al., 2007).

MORAIS et al. (2006) investigou a composição do óleo essencial das partes aéreas de algumas espécies de *Croton* encontradas no nordeste do Brasil. Os óleos essenciais de *C. zehntneri* e *C. nepetaefolius* são constituídos de monoterpenóides, sesquiterpenóides e arilpropanóides; já o óleo de *C. argyrophyloides* também foi identificado em sua constituição monoterpenóides e sesquiterpenóides, mas não arilpropanóides.

Segundo relatos da literatura, *Croton zehntneri* Pax et Hoffm, podem apresentar quatro quimiotipos: anetol- para os exemplares coletados em Fortaleza (CE) e Viçosa (CE); eugenol- para os coletados em Areia Branca (RN) e Quixadá (CE); metileugenol- para os coletados em Ipu (CE) e Oeiras (PI); estragol- para os

exemplares coletados em Tianguá (CE) e Granja (CE) (COUTINHO et al., 2010; MORAIS et al., 2006).

Segundo BOYON et al. (2002) os componentes presentes nos óleos essenciais obtidos de diferentes partes *C. zambesicus* Muell. (folhas, casca do caule e casca da raiz) apresentam composição química qualitativamente similar.

Estudos dos óleos essenciais das folhas de *C. grewioides* mostraram a predominância de fenilpropanóides, cujo componente majoritário tanto nas folhas como no caule foi (*E*)-anetol (SILVA et al., 2008).

Os estudos sobre *C. gossypifolius* Vahl. mostraram que a composição química dos óleos essenciais das folhas e flores são caracterizados pela presença majoritária de sesquiterpênos oxigenados (SUÁREZ et al., 2011).

Vários estudos na literatura demonstram as atividades biológicas dos óleos voláteis; Silva et al. (2011) demonstraram atividade antibacteriana de *Croton sonderianus* frente a bactérias que fazem parte do biofilme dental, como *S. salivaris*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis* e *S. sobrinus*. Vieira et al. (2007) avaliaram a atividade antifúngica dos óleos voláteis de *Croton argyrophyllodes* e *Croton zehntneri* frente a cepas de *Trichophyton rubrum*.

A atividade antiprotozoária também vem sendo destaque nos óleos voláteis de diversas famílias de plantas como, por exemplo, o estudo conduzido por Sauter et al. (2011), demonstrando a atividade antiprotozoária do óleo volátil de *Pterocaulon polystachyum* frente à *Acanthamoeba polyphaga*. Apesar de grande número de trabalhos com óleos voláteis de diversas famílias de plantas com atividade antiprotozoária, para o gênero *Croton*, mais especificamente para espécies nativas do Rio Grande do Sul, ainda não há estudos considerando este tema.

2.5 *Croton tricolor* Klotsch ex Bail

O *Croton tricolor*, conhecido como marmeleiro prateado, é um arbusto de ramos delgados, cilíndricos, cinerescentes e escabros. É nativo da caatinga do Nordeste do Brasil (CATUNDA JR., 2003). De acordo com Moraes et al. (2006), esta espécie não é usada popularmente por causa do aspecto não atrativo de suas folhas. Alguns trabalhos recentes mostram resultados importantes sobre a atividade antioxidante e antibacteriana do seu óleo essencial contra *Streptococcus* spp.,

Serratia spp., *Staphylococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (CANUTO, 2005).

O fracionamento dos extratos hexânicos e alcoólicos do lenho do caule e do extrato hexânico da casca do caule do *C. tricolor* levaram ao isolamento de um ácido carboxílico diterpênico e seu éter metílico. O estudo químico do seu óleo essencial mostrou a presença de α -pineno e α -guaieno (CRAVEIRO, 1976; CATUNDA JR., 2003).

Em seu estudo, LIMA et al (2006) avaliou a atividade larvicida das soluções aquosas do óleo essencial (hidrolatos) do caule e folhas de *C. tricolor*, *C. nepetaefolius*, *C. sonderianus* e *Croton zehntneri* contra larvas de *Aedes aegypti*. Este estudo demonstrou que todas as espécies analisadas apresentaram compostos com propriedades larvicidas, com diferenças entre as partes da planta. O hidrolato do caule de *C. tricolor* induziu mortalidade de 54%, enquanto o hidrolato da folha promoveu 100% de mortalidade. O hidrolato de *C. sonderianus* caule induzida mortalidade de 8%, enquanto hidrolato de folhas promoveu 52% da taxa de mortalidade das larvas.

A atividade antifúngica, *in vitro*, foi inicialmente avaliada pela técnica de difusão em ágar, a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo. Testes de toxicidade aguda foram realizados em camundongos. Os óleos essenciais das espécies de *Croton* demonstraram melhor atividade antifúngica contra as cepas de *M. canis*. Das três plantas analisadas, o *C. tricolor* apresentou uma melhor atividade para *M. canis* com CIM variando de 9 a 19 $\mu\text{g ml}^{-1}$. A administração aguda dos óleos essenciais até 3 g/kg por via oral, em camundongos, foi desprovida de toxicidade.

2.6 Atividade antimicrobiana de produtos naturais

Ao longo das últimas décadas, desde a descoberta das penicilinas naturais, o avanço da indústria farmacêutica levou ao surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo. Entretanto, a exposição aos antibacterianos desencadeou o aparecimento de resistência bacteriana contra essas

moléculas, limitando as opções terapêuticas dos processos infecciosos (CUNICO et al., 2004). A resistência a estas drogas encontrada em bactérias patogênicas de humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema em todos os países (DUARTE, 2006). Em decorrência do aumento da resistência, a busca por substâncias antibacterianas derivadas de plantas teve um grande impulso (COELHO et al., 2004).

O interesse dos pesquisadores pelas plantas para investigações de novos antimicrobianos é devido à variedade de substâncias químicas pertencente à diferentes classes de metabólitos secundários, tais como, cumarinas, flavonóides, terpenóides, alcalóides e taninos (COWAN, 1999). Os compostos antimicrobianos isolados das plantas superiores podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando direta ou indiretamente a síntese proteica em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas (SINGH; SHUKLA, 1984).

A utilização de produtos naturais ou seus derivados como agentes de controle de populações microbianas atrai também a indústria farmacêutica, já que os patógenos associados a doenças infecciosas estão cada dia mais resistentes às drogas tradicionalmente utilizadas em práticas clínicas (MESA-ARANGO et al. 2009). As bactérias têm capacidade genética de adquirir e transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos. Este problema vem alcançando proporções preocupantes e diante desta realidade a perspectiva para o uso de antibióticos é indefinida (NASCIMENTO et al., 2000; AMOROSO, 2002).

Os trabalhos relacionados a atividade antimicrobiana de plantas tiveram início na década de 1940. Em 1943, Osborn, pesquisando a atividade de 2.300 plantas superiores contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, verificou que plantas pertencentes a 63 gêneros continham substâncias que inibiam o crescimento de um ou de ambos os microrganismos. Embora vários estudos tenham avaliado e confirmado as propriedades antimicrobianas em diferentes extratos contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (PEDERSON, 1944), verificou-se também, que outros extratos estimulavam de modo acentuado, o crescimento de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*.

No Brasil, as pesquisas sobre substâncias antimicrobianas de origem vegetal tiveram início com Cardoso e Santos (1948) que avaliaram extratos de 100

diferentes plantas, indicadas em terapêutica como anti-inflamatórias ou cicatrizantes. Destas, apenas cinco extratos apresentaram atividade inibitória contra *S. aureus*, *E. coli* e *Proteus X-19*.

A partir de 1950 foram isolados os primeiros compostos de espécies vegetais: o diterpeno biflorinina, e o triterpeno maitenina. Outros compostos, os flavonoides com propriedades antimicrobianas efetivas contra *S. aureus* resistentes a metilicina (MRSA) foram isolados, como a primina, a miconidina, lapachol e derivados, a plumbagina, a xantoxilina, filantimida, luteolina, mirecetina (XU; LEE, 2001; ZACCHINO et al., 2001).

Os componentes de diferentes óleos essenciais também têm sido estudados por possuírem atividades biológicas. Alguns estudos mostram que monoterpenos apresentam efeitos prejudiciais à membrana celular bacteriana. Estudos de microscopia eletrônica em *E. coli* revelaram perda de material celular, coagulação de constituintes citoplasmáticos, além de estimular a perda de íons potássio e inibir a respiração celular, sugerindo ação letal relacionada a dano de membrana citoplásmica após exposição ao óleo de *Melaleuca alternifolia*, ação esta atribuída a presença do 4-terpinol (GUSTAFSON et al., 1998; SOUTHWELL et al., 1999; COX et al., 2000; CARSON et al. 2002). Por serem altamente hidrofóbicos, os monoterpenos interagem com a membrana celular dos microrganismos causando danos importantes na membrana a acabam provocando a lise celular (TURINA et al., 2006).

2.7 Genotoxicidade

Genotoxicidade é a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético de organismos a elas expostos. Os ensaios de genotoxicidade tem como objetivo detectar, investigar os mecanismos e avaliar os perigos de compostos mutagênicos e carcinogênicos para os seres humanos (SASAKI et al., 2000; SILVA et al. 2003; WASSON et al., 2008).

Os agentes genotóxicos podem ser definidos funcionalmente por possuírem a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Desta forma, as medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas (COMBES, 1992). A genética toxicológica tem o objetivo

de avaliar os efeitos genotóxicos em potencial, uma vez que estes são considerados pré-requisitos importantes para o desenvolvimento de efeitos adversos à saúde, como o câncer (RIBEIRO; MARQUES, 2003). Além disso, a indução de mutações em células germinativas pode resultar no aumento das frequências de doenças genéticas, ou, ainda introdução de novas doenças genéticas no conjunto gênico humano (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Os ensaios de genotoxicidade *in vitro* são ferramentas sensíveis para a detecção da genotoxicidade e da potencial carcinogenicidade de agentes químicos ou físicos (MCGREGOR et al., 2000; TICE et al., 2000; EISENBRAND et al., 2002). A correlação entre substâncias mutagênicas que também apresentam potencial carcinogênico está entre 50 e 90% e depende da estrutura dos agentes testados, dos testes empregados para a detecção dos efeitos dos agentes e da presença de um sistema de ativação metabólica de mamíferos (McCANN et al., 1975; WHITE; RASMUSSEN, 1996; WEISBURGER, 1999; MORTELMANS; ZEIGER, 2000; ZEIGER; MARGOLIN, 2000; BRAMBILLA; MARTELLI, 2004). O efeito genotóxico de uma substância pode ser avaliada por vários ensaios, entre eles o teste do micronúcleo (MCGREGOR et al., 2000; SILVA et al., 2002).

O teste do micronúcleo é um ensaio *in vitro* que avalia a potencialidade mutagênica de um composto, sendo essencial no estudo da mutagênese. Esse ensaio é um bioindicador de efeito clastogênico ou aneugênico, revelando a instabilidade genômica (IARMARCOVAI et al., 2009; LINDBERG et al., 2007; MUGHAL et al., 2010; THIERENS; VRAL, 2009). O ensaio é utilizado em cultura de células de forma bem simples, onde, após a exposição celular a agentes mutagênicos, micronúcleos são formados a partir de pequenos fragmentos de cromossomos acêntricos que não foram incorporados no núcleo ou por cromossomos inteiros que atrasaram na anáfase durante a divisão celular. Esses fragmentos, ou cromossomos atrasados, são envolvidos por membrana nuclear, durante a telófase, e aparecem como pequenos núcleos no citoplasma, além do núcleo principal (CEPPI et al., 2010; IARMARCOVAI et al., 2008; THIERENS; VRAL, 2009), apresentando perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou dano no aparelho mitótico não reparado previamente. Os danos causados no DNA são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular (BONASSI et al., 2007; FENECH, 2000; VALENTIN-SEVERIN et al. 2003).

Esses estudos de genotoxicidade representam um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; HARTMANN et al., 2001a; KISKINIS; SUTER, 2002), devendo ser realizados nos estágios iniciais desse desenvolvimento a fim de prognosticar uma potencial atividade genotóxica e/ou carcinogênica e para auxiliar na obtenção de novas estruturas químicas menos tóxicas (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; SNYDER; GREEN, 2001).

Diante disso, novas pesquisas sobre genotoxicidade e antígenotoxicidade poderiam vir a corroborar na avaliação da efetividade de algumas substâncias anticarcinogênicas, incluindo a grande variedade encontrada em plantas usadas na medicina popular. Contudo, os mecanismos específicos propriamente ditos da ação de anticarcinógenos, como por exemplo, fotoquímicos ainda encontram-se obscuros (PAOLINE; NESTLÉ, 2003).

A ausência de dados na literatura a respeito da citotoxicidade e da genotoxicidade do óleo essencial de *Croton tricolor* Klotzsch ex. Baill e e das premissas aqui apresentadas, avaliamos a atividade antimicrobiana e o potencial citotóxico e genotóxico do óleo essencial oriundos das folhas desta espécie vegetal frente a células eucariontes e procariontes.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar os efeitos antimicrobiano, citotóxico e genotóxico do óleo essencial das folhas de *Croton tricolor* Klotsch ex Baill (Euphorbiaceae).

3.2 Específicos:

- ❖ Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial das partes aéreas de *C. tricolor* sobre linhagens bacterianas de importância clínica.
- ❖ Caracterizar a atividade antibacteriana em bacteriostática ou bactericida.
- ❖ Avaliar o potencial citotóxico do óleo essencial das folhas de *C. tricolor* frente a eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O.
- ❖ Avaliar a atividade oxidante e anti-oxidante do óleo essencial das folhas de *C. tricolor* frente a eritrócitos humanos.
- ❖ Avaliação do potencial clastogênico e aneugênico do óleo essencial das folhas de *C. tricolor* através do Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Botânico

As folhas do *Croton tricolor* Klotsch ex Baill (Euphorbiaceae) foram coletadas na cidade de Jequié (13° 51' 28" S, 40° 5' 2" W) no Sudoeste da Bahia – Brasil, e encaminhadas para o Laboratório de Fitoterapia e Óleos Essenciais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. A identificação taxonômica foi realizada pela Dr^a Guadalupe E. L. de Macedo da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. A exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – HUESB com o seguinte número de referência HUESB 6494.

4.2 Produto Teste

O óleo essencial das folhas de *Croton tricolor* (Ct-OE) foi gentilmente cedido pelo Professor Dr. Baraquízio Braga do Nascimento Junior e pelo MsC. Fabrício Mendes Miranda da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

Segundo Miranda M. F. (2012) os componentes majoritários do Ct-OE são:

- (+)- α -pineno (6,58%)
- β -pineno (1,2%)
- β -felandreno (9,96%)
- p-cimeno (1,07)
- eucaliptol (5,62%)
- 4-terpinenil acetato (1,01%)
- β -elemeno (14,3%)
- cariofileno (5,18%)
- α -bergamotene (0,96%)

- humuleno (1,15%)
- γ -selineno (0,89%)
- β -selinene (3,17%)
- γ -elemeno (20,5%)
- (-)- β -elemeno (6,42%)
- óxido cariofileno (1,56%)
- (+)-ledeno (0,5%)
- viridifloreno (0,68%)
- β -guaieno (1,16%)
- trans-(Z)- α -bergamotol (0,69%)

4.3 Local da Pesquisa

Todos os testes de atividade antimicrobiana e os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia – Bioger (DBM/UFPB). O teste de genotoxicidade foi realizado com o apoio do Biotério Prof. Thomas George (CCS/UFPB).

4.4 Meios de Cultura

- Luria Bertani (LB): extrato de levedura (DIFCO) 10 g, tripton (DIFCO) 5 g, NaCl (VETEC) 10 g para 1 L.

O meio de cultura foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e esterilizado por autoclavação a 121 °C, 1 atm durante 15 minutos.

4.5 Bactérias

Foram utilizadas 6 linhagens bacterianas de *Escherichia coli*, uma da American Type Culture Collection (ATCC) e cinco isolados clínicos obtidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB além de 3 cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC:

- *E. coli* ATCC 25923
- *E. coli* 101
- *E. coli* 104
- *E. coli* 105
- *E. coli* 108
- *E. coli* 110
- *S. aureus* ATCC 25925
- *S. aureus* ATCC 25619
- *S. aureus* ATCC 8539

4.6 Inóculo Bacteriano

As linhagens bacterianas foram inoculados em caldo LB e incubados a 37°C por 24h. A cultura utilizada para os testes foi ajustada até o valor 0,5 da escala de McFarland que corresponde a $1-5 \times 10^6$ UFC/ml.

4.7 Eritrócitos Humanos

Os eritrócitos humanos (A, B, O), todos Rh +, foram oriundos de sangue que não pode mais ser utilizado para transfusão (sangue a ser descartado) obtido na Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB. A manipulação e o descarte do sangue foi realizado de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida Unidade. Os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa - CCS/UFPB.

4.8 Animais

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* albinos machos e fêmeas, linhagem Swiss pesando entre 25-35 g, todos provenientes do Biotério Prof. Thomas George da UFPB. Os animais foram aclimatados às condições do biotério local, por cerca de sete dias antes dos ensaios experimentais, sob temperatura (21 ± 2 C) e ciclos claro-escuro controlado de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*, sendo distribuídos nos diferentes grupos experimentais, ao acaso. O uso dos animais foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais - UFPB (CEUA/UFPB, N° 0206/11).

4.9 Preparação da amostra óleo essencial de *C. tricolor* para os ensaios farmacológicos

O Ct-OE foi solubilizado em DMSO (SIGMA) na concentração de 10 mg/mL.

4.10 Avaliação da atividade antibacteriana óleo essencial de *C. tricolor* frente a bactérias de importância clínica

A atividade antibacteriana do Ct – OE frente a células bacterianas foi avaliada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de microdiluição descrita por Eloff (1998). Nas placas de 96 orifícios foram adicionados 170 μ L de caldo LB e 30 μ L do OE na concentração inicial de (15 microlitros) no primeiro orifício e 100 μ L do caldo LB nos poços restantes (2-12). A partir da concentração inicial foram feitas diluições seriadas à razão de 2 nos orifícios de 1 a 12, sendo em seguida acrescentados 90 μ L de caldo LB e 10 μ L do inóculo bacteriano em todos os orifícios (1-12) chegando a um volume final de 200 μ L em cada poço. As análises foram realizadas em triplicata e incubadas a 35-37°C durante 24 horas. Posteriormente, foi realizada a primeira leitura dos resultados e em seguida adicionado 20 μ L de uma solução 0,01% (p/v) de resazurina sódica (SIGMA), preparada com a água destilada estéril. Nova incubação foi feita a 35-37°C por mais uma hora. A concentração inibitória mínima é menor concentração do Ct -

OE que promoveu a inibição do crescimento bacteriano, verificado pela manutenção da cor azul após a incubação com o indicador metabólico.

4.11 Caracterização da atividade antimicrobiana óleo essencial de *C. tricolor*

Para determinar se o Ct - OE possui ação bacteriostática ou bactericida, alíquotas da concentração que produziu inibição do crescimento, ou seja, da CIM, foram plaqueadas em placas de Petri contendo LB ágar e posteriormente foram incubadas em estufa a 37° C por 24 horas (MADIGAN; MARTINKO, 2004). Os resultados foram interpretados da seguinte forma:

- Ausência de crescimento bacteriano significa que o extrato possui ação bactericida;
- Presença de crescimento bacteriano significa que o extrato possui ação bacteriostática.

4.12 Avaliação citotóxica óleo essencial de *C. tricolor* em eritrócitos humanos

Para avaliação citotóxica do Ct - OE sobre eritrócitos humanos utilizou-se o teste de hemólise. Para isto, uma amostra de sangue (2 mL) tipo A, B e O foi misturado com NaCl 0,96 %, na proporção de 1:30, e centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido mais duas vezes e o sedimento da última centrifugação foi ressuspenso em uma concentração final de 0,5 % de eritrócitos. As amostras foram adicionadas até obter uma concentração final de 1,69 mg/ml, 3,35 mg/ml e 6,7 mg/ml a 2 mL da suspensão de eritrócitos. O controle negativo foi montado com suspensão de eritrócitos mais NaCl 0,96 % (0 % de hemólise) e o controle positivo com suspensão de eritrócitos mais 100 µL de Triton X-100 1% (100 % de hemólise). As amostras foram incubadas sob agitação lenta e constante (100 rpm) por 1h a 22 ± 2 °C. Decorrido este tempo foram centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria a 540 nm (RANGEL et al., 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem.

4.13 Avaliação do potencial oxidante e antioxidante óleo essencial de *C. tricolor* em eritrócitos humanos.

Para investigar o potencial oxidante do Ct - OE, diferentes concentrações (15, 7,5; 3,75 µL) foram diluídas em PBS (11,35 g NaH₂PO₄.2H₂O; 24,36 g Na₂HPO₄ e 7,18 g NaCl para 1 L; pH 7,4) suplementado com glicose (200 mg/dL), pH 7,6 e adicionadas a suspensões de eritrócitos (1 mL). Após um período de incubação de 1 h, sob agitação lenta e constante (100 rpm) por 1h a 22 ± 2 °C, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a porcentagem de metahemoglobina (metHb) em relação a hemoglobina (Hb) total foi quantificada por espectrofotometria a 630 nm e 540nm, respectivamente.

Para investigar o potencial antioxidante após a incubação das diferentes concentrações do Ct-OE frente a hemoglobina por 1 h, foi adicionado um agente oxidante, a fenilhidrazina (Ph) 1 mmol/L (SIGMA). As suspensões foram aeradas e mantidas sob agitação lenta e constante (100 rpm) por mais 20 minutos a 25 °C. Decorrido este tempo as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos, diluídas em tampão fosfato (9 g Na₂HPO₄.12H₂O, 5,7 g KH₂PO₄ para 1 L) e a porcentagem de metHb em relação a Hb total foi quantificada por espectrofotometria a 630 nm e 540nm. Os valores de metHb entre 1,5 e 2,0% foram considerados normais enquanto que valores acima de 5% foram considerados elevados (CAMARGO et al., 2007). A porcentagem de metHb formada foi comparada com os valores obtidos para a vitamina C (20 mmol/L), um comprovado agente antioxidante (WEFFORT-SANTOS, 2008).

4.14 Avaliação do potencial clastogênico e aneugênico óleo essencial de *C. tricolor* através do teste do micronúcleo *in vivo*

Os procedimentos experimentais para realização do teste de micronúcleo foram realizados de acordo com Schmid (1975). Grupos de três machos e três fêmeas de camundongos Swiss receberam por via oral o Ct-OE na dosagem máxima de 2000 mg/kg do peso do animal. O grupo controle negativo recebeu apenas o dispersante da amostra (água) e controle positivo recebeu ciclofosfamida a

50 mg/Kg de peso do animal (SIGMA). Vinte e quatro horas após o tratamento os animais foram anestesiados com xilazina (20mg/kg) e quetamina (150mg/kg), via intramuscular, e em seguida foram retiradas amostras de sangue da veia caudal para o preparo das lâminas e a contagem de micronúcleos.

Após a coleta, os animais sofreram eutanásia de acordo com a Resolução Nº 1.000/2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, com as recomendações da Associação Americana de Medicina Veterinária (AVMA, 2012).

As lâminas foram coradas com corante panótico e observadas ao microscópio óptico (ZEISS) no aumento de 1000x para a contagem dos micronúcleos. Foram avaliados pelo menos 2000 eritrócitos por animal (HAYASHI et al., 1994).

4.15 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste *t* pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito antibacteriano do óleo essencial de *C. tricolor* frente a bactérias de importância clínica

O perfil de sensibilidade das linhagens bacterianas frente ao Ct-OE foi verificado pela determinação da CIM para cada cepa. O Ct-OE foi capaz de inibir o crescimento das linhagens bacterianas testadas, tanto Gram positivas quanto Gram negativas (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *C. tricolor* frente a cepas bacterianas

LINHAGEM BACTERIANA	CIM (mg/mL)
<i>S. aureus</i> ATCC 25925	6,7
<i>S. aureus</i> ATCC 25619	3,35
<i>S. aureus</i> ATCC 8539	1,67
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,67
<i>E. coli</i> 101	3,35
<i>E. coli</i> 104	3,35
<i>E. coli</i> 105	3,35
<i>E. coli</i> 108	3,35
<i>E. coli</i> 110	1,67

5.2 Caracterização da atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. tricolor*

A atividade antibacteriana do Ct-OE frente às linhagens de *S. aureus* e *E. coli* foi considerada bacteriostática, uma vez que após a inibição do crescimento na presença da concentração inibitória mínima do óleo essencial as bactérias foram capazes de retomar seu crescimento na ausência destes.

5.3 Avaliação do efeito hemolítico do óleo essencial de *C. tricolor* frente a eritrócitos humanos

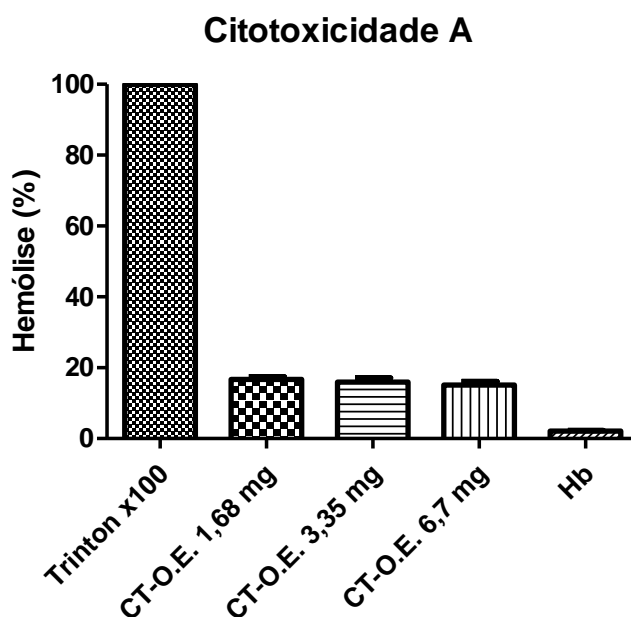
Na avaliação da citotoxicidade sobre eritrócitos humanos, observou-se que o Ct-OE foi capaz de provocar um baixo grau de hemólise tanto em eritrócitos humanos do sorotipo A (Gráfico 1) quanto em eritrócitos do sorotipo B (Gráfico 2) (Tabela 2).

Tabela 2: Porcentagem de hemólise promovida pelo óleo essencial de *C. tricolor*.

Tipo Sanguíneo	Hb*	Óleo Essencial de <i>C. tricolor</i> (mg/ml)			Triton X-100**
		1,69	3,35	6,7	
A	2.16	16.73	15.99	15.17	100
B	2.22	26.41	25.56	26.67	100
O	3.3	16.10	12.25	14.50	100

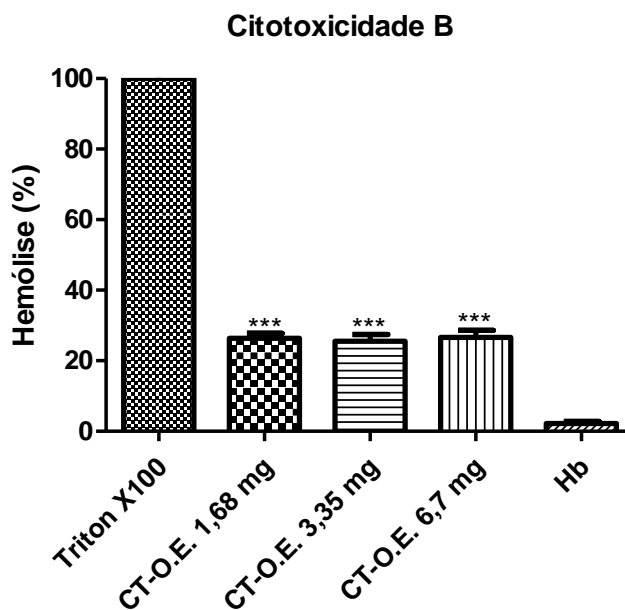
Valores expressos como média aritmética de três avaliações * controle negativo = suspensão de eritrócitos. ** controle positivo = Suspensão de eritrócitos com Triton X100

Gráfico 1 – Atividade citotóxica do Ct-OE nas concentrações de 1,69; 3,35 e 6,7 mg/ml frente a eritrócitos tipo A.



Como controle negativo foi utilizado uma suspensão de eritrócitos (Hb=Hemoglobina). Como controle positivo foi utilizado uma suspensão de eritrócitos + Triton X100. Os dados foram expressos como média \pm e.p.m analisados pelo teste *t*. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo.

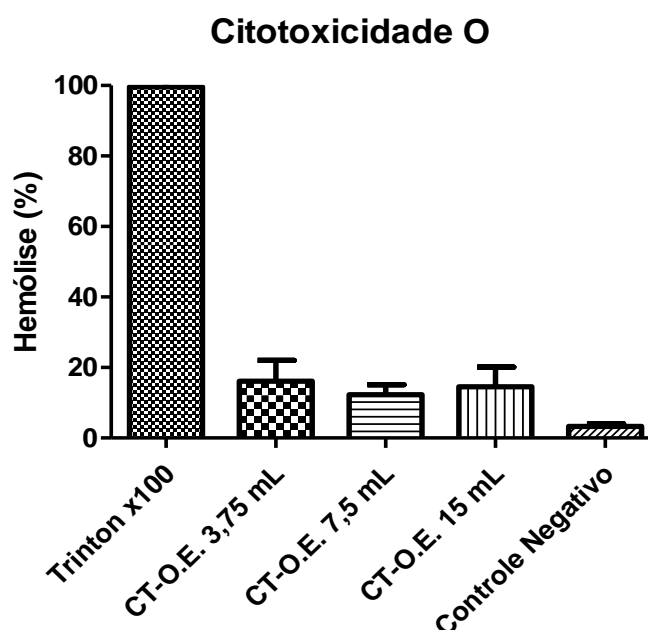
Gráfico 2 – Atividade citotóxica do Ct-OE nas concentrações de 1,69, 3,35 e 6,7 mg/ml frente a eritrócitos tipo B.



Como controle negativo foi utilizado uma suspensão de eritrócitos (Hb=Hemoglobina). Como controle positivo foi utilizado uma suspensão de eritrócitos + Triton X100. Os dados foram expressos como média \pm e.p.m analisados pelo teste *t*. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo.

O Ct-OE não demonstrou atividade hemolítica frente a eritrócitos tipo O (Gráfico 3), onde os valores expressos não foram significativamente diferentes ao controle negativo (Hb) (Tabela 2).

Gráfico 3 – Atividade citotóxica do Ct-OE nas concentrações de 1,69, 3,35 e 6,7 mg/ml frente a eritrócitos tipo O⁺.



Como controle negativo foi utilizado uma suspensão de eritrócitos (Hb=Hemoglobina). Como controle positivo foi utilizado uma suspensão de eritrócitos + Triton X100. Os dados foram expressos como média \pm e.p.m analisados pelo teste *t*. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo.

5.4 Avaliação do potencial oxidante óleo essencial de *C. tricolor* em eritrócitos humanos

O Ct-OE apresentou um discreto efeito oxidante nas três concentrações testadas quando observamos a quantidade de metahemoglobina formada em comparação com o controle negativo (Hb) (tabela 3).

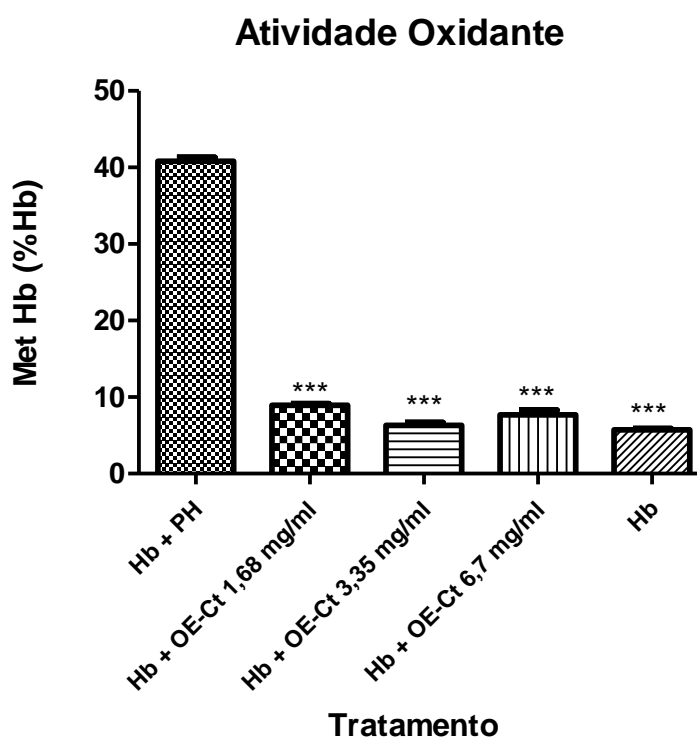
Tabela 3: Quantidade de metahemoglobina (metHb) formada na presença e na ausência do Ct - OE.

Tratamento	metHb (%Hb)
Hb + Phenilhidrazina*	41.57 \pm 0.95
Hb + OE-Ct 1,68 mg/ml	8.917 \pm 0.14
Hb + OE-Ct 3,35 mg/ml	6.127 \pm 0.35
Hb + OE-Ct 6,7 mg/ml	7.687 \pm 0.37
Hb*	5.717 \pm 0.1

Valores expressos como média \pm e.p.m. * controle positivo = Suspensão de eritrócitos com Triton X100. * controle negativo = suspensão de eritrócitos. Hb = hemoglobina

Apesar disso, a quantidade de metHb formada foi muito inferior quando comparada com o controle positivo (Ph) (Gráfico 4). Quando tratado com fenilhidrazina, um comprovado agente oxidante, verificou-se que a quantidade de metahemoglobina formada foi de mais de 40% em relação a hemoglobina. Desta forma, o Ct - OE apresenta-se como um fraco agente indutor de oxidação.

Gráfico 4 – Atividade oxidante do Ct-E nas concentrações de 1,69, 3,35 e 6,7 mg/ml..



Como controle positivo foi utilizado a Ph + Hb (Ph= Fenilhidrazina). Os dados foram expressos como média \pm e.p.m analisados pelo teste *t*. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo.

5.5 Avaliação do potencial antioxidante óleo essencial de *C. tricolor* em eritrócitos humanos

Quando os eritrócitos foram pré-incubados com o óleo essencial e expostos em seguida a fenilhidrazina (Ph) observou-se que a quantidade de metHb formada foi menor quando comparado ao controle positivo (Hb+Ph) (Tabela 4). Esse efeito antioxidante mostrou-se ainda mais relevante, pois o efeito protetor sobre os eritrócitos na presença de fenilhidrazina foi significativamente maior que o efeito apresentado pela vitamina C, antioxidante padrão. Não houve diferença significativa

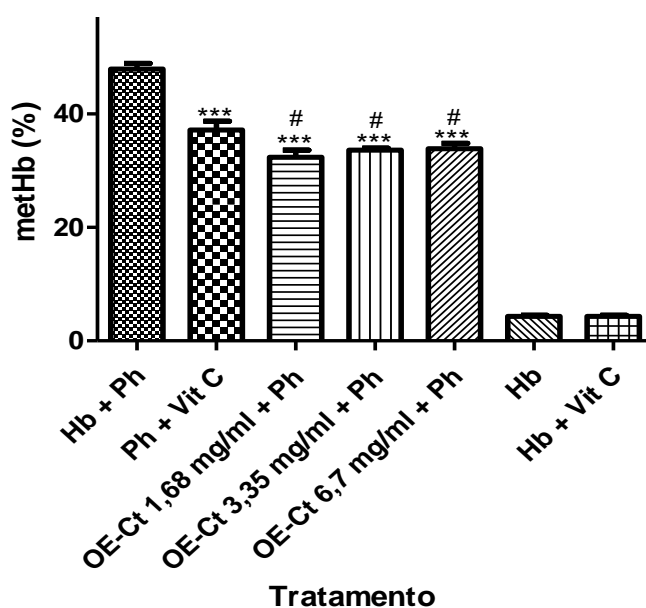
entre as concentrações testadas do óleo essencial e também entre a solução de eritrócitos e a solução de eritrócitos tratadas com vitamina C. O efeito antioxidante do Ct - OE não se apresentou dependente de concentração (Gráfico 5).

Tabela 4 - Quantidade de metahemoglobina (metHb) formada na presença e na ausência do óleo essencial de *C. tricolor* e do agente antioxidante padrão.

Tratamento	metHb (%)	metHb (%)
Hb + Ph*	47.95 ± 0.56	47.95 ± 0.56
Hb + OE-Ct 1,68 mg/ml + Ph	37.19 ± 0.89	32.40 ± 0.70
OE-Ct 1,68 mg/ml + Ph	32.40 ± 0.70	
Hb + OE-Ct 3,35 mg/ml + Ph	33.61 ± 0.22	33.89 ± 0.55
OE-Ct 6,7 mg/ml + Ph	33.89 ± 0.55	
Hb + Vit C	4.330 ± 0.12	4.313 ± 0.11
Hb + Vit C	4.313 ± 0.11	

Valores expressos como média ± e.p.m. *Controle positivo = Suspensão de eritrócitos (Hb) com Fenilhidrazina (Ph). ** Tratamento com vitamina C (vit. C), antioxidante padrão. ***Controle negativo = suspensão de eritrócitos (Hb).

Gráfico 5 – Efeito do Ct-OE na proteção da formação de metHB em eritrócitos humanos (n=3).



As colunas e barras representam a média ± e.p.m. Teste "t", * $p < 0,05$ comparado a fenilhidrazina; # $p < 0,05$ comparado a fenilhidrazina + vitamina C.

5.6 Investigação do potencial clastogênico e aneugênico do óleo essencial de *C. tricolor* através do teste do micronúcleo em eritrócitos de roedores *in vivo*

A presença de micronúcleos em eritrócitos de camundongos no controle positivo não foi influenciada pelo sexo, então os dados foram agrupados para determinar a média de micronúcleos, para calcular o erro padrão da média e para avaliar as diferenças entre os grupos.

Os resultados obtidos mostraram que o Ct-OE na concentração de 2000 mg/kg não induziu um aumento significativo no número de micronúcleos em relação ao controle negativo e que apenas a ciclofosfamida (controle positivo) induziu um significativo aumento na quantidade de micronúcleos (Tabela 5 e Figura 1 a 3).

Tabela 5 - Frequência de eritrócitos micronucleados em eritrócitos de sangue periférico de camundongos Swiss machos e fêmeas.

Tratamento	Eritrócitos micronucleados (%)
Controle Negativo	12 ± 5,67
Ct-OE 2000 mg/kg	2,28 ± 0,23
Ciclofosfamida (50mg/Kg)*	43,5 ± 5,89

Valores expressos como média ± e.p.m. *Controle positivo = Ciclofosfamida

Figura 1: Teste de micronúcleo (óleo essencial de *C. tricolor* na concentração de 2000 mg/kg)



Foto: Ferreira, S.B.

Figura 2 - Eritrócitos de camundongos tratados com ciclofosfamida (50mg/kg) - controle positivo.

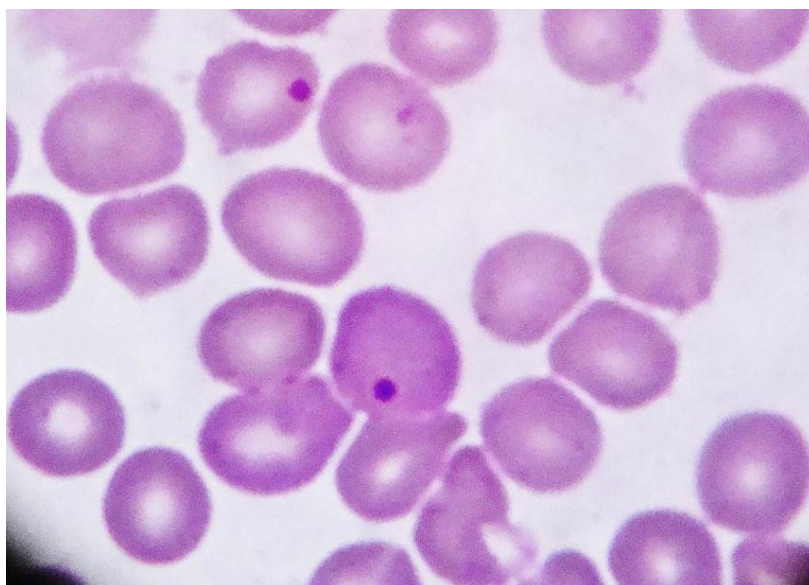


Foto: Almeida Filho, G. G.

Figura 3 - Eritrócitos de camundongos - controle negativo.

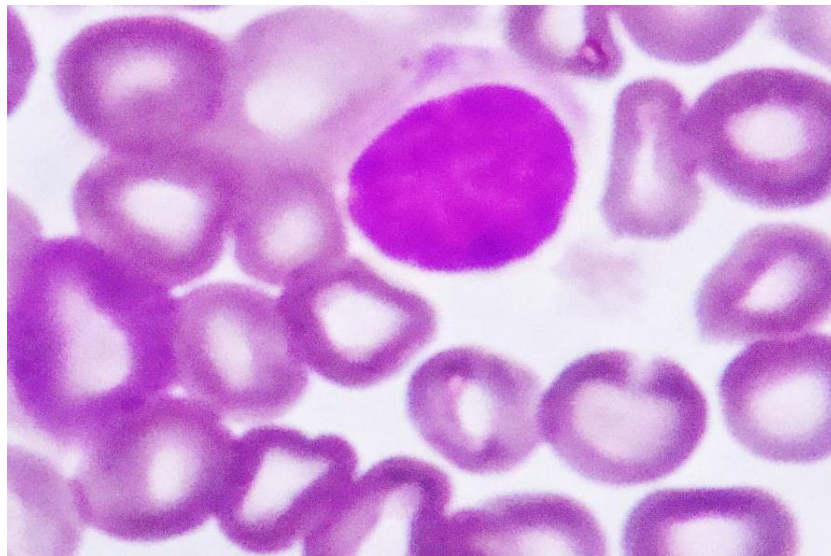


Foto: Almeida Filho, G. G.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi verificado a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Croton tricolor* frente a linhagens bacterianas de *S. aureus* e *E. coli* ATCC e cepas clínicas e, pela primeira vez, investigados seus efeitos citotóxico e genotóxico em células eucarióticas e procarióticas. A citotoxicidade foi avaliada através dos efeitos antibacterianos, hemolíticos e oxidantes e a genotoxicidade através dos efeitos clastogênico e aneugênicos. Os resultados mais relevantes deste estudo foram a atividade bacteriostática frente às cepas Gram positivas e Gram negativas, baixa atividade hemolítica frente a eritrócitos humanos do sistema ABO, discreto efeito oxidante e efeito antioxidante superior ao da vitamina C. Pode-se ressaltar ainda ausência de efeitos clastogênico e aneugênicos no teste *in vivo*.

Óleos essenciais são misturas complexas de compostos orgânicos voláteis, lipofílicas e odoríferas, que apresentam inúmeros constituintes e podem ser extraídos dos vegetais de diversas formas. Nos últimos anos tem se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas, visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas (FILHO & YUNES, 1997). Muitas plantas já são conhecidas empiricamente pelas suas potencialidades, o que facilita a seleção das espécies a serem exploradas. Estudos envolvendo a ação antimicrobiana dos óleos essenciais podem ter vários interferentes, como a volatilidade do óleo, insolubilidade em água, dificuldade de difusão em ágar e complexidade química, por esses e vários outros fatores não é possível comparar diretamente resultados entre autores, visto que não existe uma padronização para a técnica a ser utilizada neste tipo de ensaio (NASCIMENTO et al., 2007).

De acordo com Miranda (2012), o óleo essencial das folhas de *Croton tricolor* é constituído principalmente de monoterpenóides e sesquiterpenóide, dentre seus constituintes, verifica a presença majoritária de γ -elemeno (20,5%).

Neste trabalho, a atividade antimicrobiana do Ct-OE sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas determinada pelo método de microdiluição, o qual determina a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento bacteriano (CIM). Os valores de CIM foram determinados pela leitura visual após revelação com resazurina sendo considerada como positiva para os poços que

permaneceram com a coloração azul e negativa os que obtiveram coloração vermelha (SALVAT et al., 2001). O Ct-OE demonstrou efeito bacteriostático para as linhagens bacterianas de *S. aureus* e *E. coli* apresentado uma CIM variando entre 6,7 mg/mL e 1,67 mg/mL. A CIM do composto foi maior para as cepas *S. aureus* (3,35 - 6,7 mg/ml), enquanto que para as cepas de *E. coli* não ultrapassou o valor de 3.35 mg, demonstrando uma maior resistência das cepas Gram positivas testadas.

Cavalcante e colaboradores (2005) testaram o óleo essencial de *C. argyrophyloides* frente a cepas de *S. aureus* e *E. coli*, encontrando CIM de até 50 mg/mL uma concentração muito superior a observada neste estudo.

Em seu estudo, Angélico (2011) testou óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* em cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *S. aureus* multirresistente, *E.coli*, *Klebsiela pneumoniae* e *Bacillus cereus* utilizando o método de difusão em ágar. O estudo verificou que o óleo essencial não apresentou atividade antibacteriana para as cepas de *P. aeruginosa*, *S. aureus* multirresistente e *E. coli* na concentração máxima testada, 100 mg/mL apresentando ação na concentração de 100 mg/mL apenas para algumas cepas de *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *B. cereus*.

As diferenças com respeito às técnicas empregadas para investigação da ação de compostos de plantas e uma grande variação encontrada na composição química de algumas preparações que vegetais podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas (SIVROUPOULOU et al., 2005). Não existe também um consenso sobre os níveis de inibição aceitáveis para compostos de plantas, quando comparados com antibióticos padrões, visto que alguns autores consideram somente resultados similares aos dos antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibição superiores, da ordem de miligramas (RIBEIRO, 2008).

Os componentes de diferentes óleos essenciais também têm sido estudados por possuírem atividades biológicas. Alguns estudos mostram que monoterpenos apresentam efeitos prejudiciais à membrana celular bacteriana. Estudos de microscopia eletrônica em *E. coli* revelaram perda de material celular, coagulação de constituintes citoplasmáticos, além de estimular a perda de íons potássio e inibir a respiração celular, sugerindo ação letal relacionada a dano de membrana

citoplásmica após exposição ao óleo de *Melaleuca alternifolia*, ação esta atribuída a presença do 4-terpinol (GUSTAFSON et al., 1998; SOUTHWELL et al., 1999; COX et al., 2000; CARSON et al. 2002). Por serem altamente hidrofóbicos, os monoterpenos interagem com a membrana celular dos microrganismos causando danos importantes na membrana a acabam provocando a lise celular (TURINA et al., 2006).

A detecção de atividade citotóxica de um fitoterápico constitui uma medida prioritária, uma vez que vários compostos químicos podem ser capazes de causar efeitos tóxicos. A determinação do potencial citotóxico em eritrócitos humanos constitui um modelo experimental *in vitro* eficaz para investigar os efeitos tóxicos e protetores de uma grande variedade de substâncias, visto que, a ocorrência de hemólise no eritrócito pode ser diretamente correlacionada com o efeito tóxico das substâncias testadas (BRANDÃO et al., 2005).

O teste de hemólise é preconizado pela Organização Mundial de Saúde no seu manual de controle de qualidade de produtos vegetais (1998), e também é encontrado como parte dos ensaios toxicológicos recomendados no Guia para Avaliação da Segurança de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2003). Esse teste é comumente utilizado para estudos de citotoxicidade em células eucarióticas, pois é de baixo custo, dinâmico, fácil de aplicar, oferece informação sobre o efeito do extrato sobre a membrana celular e necessita de reagentes e equipamentos rotineiros (SILVA, 2012).

Não há relatos na literatura de estudos que avaliaram a citotoxicidade de *Croton tricolor*, sendo este trabalho pioneiro na determinação da citotoxicidade frente a eritrócitos humanos.

O Ct-OE demonstrou um efeito hemolítico maior em eritrócitos sorotipo B (26,21%) quando comparado com o sorotipo A (15,96%), não se apresentando dependente de concentração, uma vez que os valores obtidos nas diferentes concentração do composto não foram significativamente diferentes (Tabela 1).

No entanto, o Ct-OE apresentou baixa toxicidade frente a eritrócitos do tipo A (Gráfico 1) e B (Gráfico 2) quando comparado ao controle positivo (Triton X100), mesmo quando submetidos a uma elevada concentração do óleo, sendo assim, não possui a capacidade de causar danos na membrana plasmática eritrocitária que levaria ao rompimento e conseqüentemente morte da célula.

A membrana eritrocitária apresenta moléculas que atuam como antígenos determinantes das tipagens sanguíneas. As diferenças estruturais entre as tipagens sanguíneas são altamente complexas, uma vez que são considerados mais de 200 antígenos. O sistema ABO é o mais conhecido entre os 19 caracterizados (LEE et al., 1998) e o mais importante na medicina transfusional (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003). Neste sistema, o parâmetro de classificação utilizado é a porção antigênica constituída de monossacarídeos presentes na superfície da membrana eritrocitária, sendo que: o sorotipo A apresenta o antígeno N-acetilgalactosamina, o sorotipo B a galactose, o sorotipo AB apresenta ambos os antígenos e o sorotipo O carece de antígenos específicos.

Para o sangue tipo O, o CT-OE apresentou um grau de hemólise menor que os obtidos para os sorotipos A e B, onde nas mesmas concentrações, o óleo não causou lise celular significativa (gráfico 3). A diferença no grau de hemólise entre os diferentes tipos sanguíneos pode ser devida a presença de diferentes antígenos N-acetilgalactosamina (sangue tipo A) e galactose (sangue tipo B) na superfície dos eritrócitos que modificam a biointeração e o efeito.

Um estudo realizado por Meireles et. al. (2013) mostrou que o óleo essencial das folhas de *Croton polyandrus* apresentou uma concentração capaz de causar 50% de hemólise (CH₅₀), numa concentração média de 141µg/ml. Este valor é cerca de 10 vezes menor que a concentração do Ct-OE que causou maior nível de hemólise, onde esse índice não chegou a ultrapassar 30%, demonstrando que o Ct-OE possui uma menor citotoxicidade frente a eritrócitos quando comparado a espécie *C. polyandrus* pertencente ao mesmo gênero.

Através da hemólise, ocorre a liberação de hemoglobina livre no plasma, o que pode acarretar em sérios danos a órgãos vitais como o fígado, os rins e o coração (CARVALHO et al., 2007), tornando-se extremamente necessário a verificação desta atividade em extratos de plantas.

Diante disso, o resultado encontrado neste estudo conduz a uma avaliação preliminar da toxicidade do Ct-OE. Esse dado é muito importante para verificar a segurança desse composto, visto que o mesmo é utilizado popularmente, e que a presença de toxicidade restringe seu uso

No metabolismo normal, nosso organismo produz espécies reativas de oxigênio (EROs) que possuem funções importantes na regulação do crescimento

celular, inflamação e na sinalização intracelular. Apesar dessas ações, as EROs e os radicais livres causam oxidação de proteínas, lipídeos insaturados, DNA, além de estarem envolvidas em enfermidades como arteriosclerose, câncer e no processo de envelhecimento (GARDNER, 1997; ARBOS et al., 2008). Para que ocorra um equilíbrio quanto a presença desses agentes, o corpo humano possui um sistema antioxidante que neutraliza essas substâncias. O estresse oxidativo ocorre quando a produção de radicais livres e EROs supera o sistema antioxidante, o que leva a necessidade de suplementação artificial com substâncias antioxidantes a fim de reestabelecer a homeostasia (BLOOMER; GOLDFARB; MCKENZIE, 2006).

O uso de antioxidantes sintéticos tem diminuído, devido a suspeita de atividade promotora de carcinogênese, bem como devido à rejeição de aditivos sintéticos em alimentos (CARVALHO, 2004). Nesse contexto, a procura por substâncias antioxidantes naturais tem aumentado nas últimas décadas, em especial os produtos naturais extraídos de plantas medicinais.

São várias as metodologias utilizadas para determinar a capacidade antioxidante de uma substância. Os eritrócitos podem ser considerados como sequestradores de radicais livres, pois eles podem fornecer proteção antioxidante não só para si, mas também para outros tecidos e órgãos do corpo (MENDIRATTA, 1998; SIEMS, 2000). Apesar de possuir uma forma muito eficaz e potente sistema antioxidante, o ferro, no estado ferroso, da hemoglobina é exposto continuamente a altas concentrações de oxigênio levando à sua oxidação lenta para metahemoglobina (metHb, também conhecido como ferrihemoglobina). Ao contrário de sua forma reduzida, metHb é incapaz de ligar ou transportar oxigênio. Em condições normais, o nível de metHb em eritrócitos é mantida com menos de 1% do total de hemoglobina (MANSOURI; LURIE, 1993).

Nesse estudo, verificamos que o Ct - OE promoveu um leve aumento da oxidação da hemoglobina após sua exposição por lise das membranas eritrocitárias. Entretanto, quando comparamos ao controle positivo (Ph), verificamos que o nível de oxidação atingido foi cinco vezes menor, mesmo utilizando uma alta concentração do óleo essencial (6,7 mg/ml), mostrando um fraco potencial oxidante. Podemos observar também que não houve diferença significativa entre as três concentrações do óleo volátil utilizadas (1,68; 3,35 e 6,7 mg/ml), demonstrando que

esse índice é a máxima capacidade que o composto tem de causar um dano oxidativo.

Os eritrócitos humanos constituem um eficiente sistema que pode ser utilizado como um modelo experimental *in vitro* para investigar o potencial antioxidante de extratos vegetais a partir da quantificação da metHb formada (CLARO et al., 2005; ARBOS et al., 2008). Deve-se ter em mente, entretanto, que atividades antioxidantes observadas em eritrócitos não necessariamente refletem as atividades antioxidantes no organismo como um todo. Além disso, existem variações genéticas entre os indivíduos que resultam em expressão gênica alterada levando a efeitos variados e potencialmente indesejados na atividade antioxidante (ARBOS et al. 2008).

Os resultados obtidos da avaliação da atividade antioxidante demonstraram que o Ct - OE protegeram os eritrócitos da ação oxidativa da fenilhidrazina, um reconhecido agente oxidante, em todas as concentrações testadas, além de apresentar uma atividade antioxidante maior que a vitamina C, um comprovado agente antioxidante, reduzindo significativamente o nível de metahemoglobina formada após a exposição à fenilhidrazina. A fenilhidrazina age sobre os eritrócitos de duas formas, reage com a hemoglobina, oxidando o ferro de Fe^{2+} para Fe^{3+} da hemoglobina levando a formação de metahemoglobina, além disso, seu radical fenilhidrozil pode formar radicais altamente reativos como O_2 e H_2O_2 (MISRA; FRIDOVICH, 1976; HASHMI; SALEEMUDDIN, 1996; FERRALLI et al, 2000). Já a vitamina C intracelular age como um doador de elétrons para uma oxidorreductase transmembranar, que tem como função de proteger a membrana celular da oxidação por compostos reativos (HALLIWELL, 1996; CARR; FREI, 1999).

Os mecanismos de atuação dos antioxidantes podem ser diferenciados. Consistem na inativação de radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução de hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres ou produtos de decomposição (SHAHIDI; NACZK, 1995).

Alguns estudos realizaram a investigação da atividade antioxidante de terpenos. Foi verificado que o citral, um monoterpene, é capaz de sequestrar o radical livre O_2^{**} e inibir a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) (RABBANE et al., 2006; LEE et al., 2008). Morais et al. (2006) realizaram testes *in vitro* e observaram

que o óleo essencial de *Croton tricolor* possui atividade antioxidante agindo na redução da peroxidação lipídica. Devido a complexa composição química dos óleos essenciais é de se esperar que as substâncias que o compõem apresentem diferentes formas de agir, ocasionando um efeito sinérgico na ação antioxidante do óleo volátil.

Para alertar sobre riscos potenciais como o câncer e desordens genéticas existem diversos testes que avaliam a genotoxicidade de medicamentos, assim como de plantas utilizadas na medicina popular. Entretanto, as informações, se disponíveis, são dispersas e escassas (RUIZ et al., 1996). Uma maneira de se estudar os efeitos genotóxicos em uma população, é conduzir estudos de monitoramento, utilizando parâmetros biológicos pertinentes, com manifestação à curto prazo, com os ensaios de micronúcleos, que podem identificar danos no DNA e/ou nos cromossomos resultantes da exposição. A informação obtida pode ser usada como um aviso precoce do risco potencial para desenvolver à longo prazo, problemas de saúde (AU, 1991).

As alterações no material genético podem ser identificadas através de testes de mutagenicidade. Atualmente existe um grande número de testes, com modelos tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo que o organismo de prova varia desde vírus, bactérias, fungos, plantas e insetos a mamíferos, incluindo o homem (DE FLORA, 1998). Dentre os testes que analisam mutações cromossômicas em mamíferos, destaca-se o teste de micronúcleos, que é um teste rápido e simples, e detecta quebras e perdas cromossômicas (HAYASHI et al., 1994).

O micronúcleo é um tipo de cromatina que pode surgir tanto da disjunção anômala dos cromossomos, devido a anormalidades do fuso, quanto pela quebra de cromossomos. Ele é formado pelo desenvolvimento de um novo envoltório de sistema de membrana ao redor da cromatina que não se moveu para os pólos durante a anáfase (GROVER; SATWINDERJEET, 1999).

A sensibilidade do teste do micronúcleo é comparável à da análise de quebras e trocas cromatídicas (KLIESCH; ADLER, 1980). Sendo que o ensaio do micronúcleo apresenta uma grande vantagem sobre as demais técnicas, a de não requerer cultivo celular, bem como preparações metafásicas (TITENKO-HOLLAND et al., 1998).

Neste estudo, o CT-OE não aumentou a frequência de eritrócitos micronucleados de sangue periféricos de camundongos, sugerindo que o mesmo não possui efeito genotóxico (clastogênico e/ou aneugênico) in vivo, característica importante para sua aplicabilidade na terapia popular.

Efeito semelhante foi encontrado por Rodrigues et. al. (2010), onde utilizou o teste do micronúcleo da medula óssea de ratos wistar para avaliar a atividade genotóxica do extrato *Croton cajucara* Benth. Esse trabalho demonstrou que o tratamento com o extrato vegetal não provocou efeitos genotóxicos nos eritrócitos.

Dessa forma, pode-se sugerir que o Ct-OE não interfere na divisão nuclear dos eritroblastos da medula, quebrando cromossomos ou interferindo no fuso, não se apresentando genotóxico.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos na investigação dos efeitos biológicos do óleo essencial das folhas de *Croton tricolor* Klotsch ex Bail (Ct-OE), pode-se concluir que:

- ❖ O Ct-OE apresentou atividade antibacteriana contra as linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* ATCC e amostras clínicas.
- ❖ A atividade antibacteriana demonstrada pelo Ct-OE foi caracterizada como bacteriostática.
- ❖ O Ct-OE provocou um baixo efeito hemolítico nos eritrócitos sorotipo A⁺ e B⁺, mas não causou danos a membrana celular de eritrócitos sorotipo O⁺.
- ❖ O Ct-OE apresentou um leve aumento dos níveis de metahemoglobina, exibindo, portanto, uma fraca ação pro-oxidante e um efeito antioxidante superior ao da vitamina C em eritrócitos humanos.
- ❖ Nos ensaios de genotoxicidade *in vivo*, o Ct-OE na concentração de 2000mg/kg não induziram danos cromossômico estrutural e/ou numérico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDELGALEIL, S. A. M.; ABBASSY, M. A.; BELAL, A. S.; RASOUL, M. A. A. A. Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemia judaica* L. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5947-5950, 2008.

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C., Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciência**, v. 27, n. 007, p. 336-346, 2002.

ANGELIS, R. C. Fome oculta: impacto para a população do Brasil. São Paulo, **Atheneu**, 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Brasília, 2003.

ARBOS, K. A.; CLARO, L. M.; BORGES, L.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORTSANTOS, M. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nutrition Research**, v. 28, p. 457-463, 2008.

AU, W.W. Cytogenetic assays in monitoring human exposure and prediction of risk. **Environ Mutagen Carcinogen Teratogen**, p. 236-245, 1991.

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

BAJPAI, V. K.; SHUKLA, S.; KANG, S. C. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. **Bioresource Technology**, doi: 10.1016/j.biortech, 2008.

BAILEY, A. E. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 5th ed. **New York**, v. 3, 1996.

BARROSO, G. M. Sistemática de Angiospermas no Brasil. **Editora da Universidade de São Paulo**, 1991.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, v. 219, p. 561-571, 2004.

BENIGNI, R. Structure activity relationship studies of chemical mutagens and carcinogens mechanistic investigations and prediction approaches. **Chemical Reviews.**, v.105, p.1767-1800, 2005.

BERRY, P. E.; HIPPI, A. L., WURDACK, K. J.; VAN EE, B. W.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and *trnL-trnF* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, p. 1520–1534, 2005.

BLOOMER, R. J.; GOLDFARB, A. H.; MCKENZIE, M. J. Oxidative stress response to aerobic exercise: Comparison of antioxidant supplements. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.38, n.6, p.1098-1105, 2006.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; , BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M. R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Oxford, **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625 - 631, 2007.

BOYOM, F. F.; KEUMEDJIO, F. DONGMO, P. M. J.; NGADJUI, B. T.; AMVAMZOLLO, P. H.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M.. Essential oils from *Croton zambesicus* Muell.Arg. growing in Cameroon. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 215–217, 2002.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Failure of the standard battery of short-term tests in detecting some rodent and human genotoxic carcinogens. **Toxicology**, n. 196, p. 1-19, 2004.

BURNS, W. G; BOTTINO, J. P. **Genética**. 6a edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, p. 207, 1991.

CAPASSO, R; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71p.58-65, 2000.

CARR, A.; FREI, B. Does vitamina C act as a pro-oxidant under physiological conditions? Bethesda, **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 13, p. 1007-1022, 1999.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tee tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 46, p. 1914-1920, 2002.

CARUZO, M. B. R. Estudo taxonomico e biogeografico do genero Croton L. (Euphorbiaceae) no Estado de Sao Paulo, Brasil. **Dissertação de Mestrado do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, São Paulo, SP, 2005.

CARVALHO, E. B.; BORGES, E. L.; CARLOS, L. M. B.; SILVA, M. A. M.; MAGALHÃES, S. M. M.; GOMES, F. V. B. A. F.; CARVALHO, M. J. C.; QUIXADÁ, A. T. S.; PITOMBEIRA, M. H. S. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 149-152, 2007.

CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, **Tecmedd**, 2004.

CATUNDA JÚNIOR, F. E. A. Estudo químico dos óleos essenciais de espécies do gênero *Croton*. **Monografia** (Lic. Plena em Química). Universidade Estadual do Ceará, 2003.

CEPPI, M.; BIASOTTI, B.; FENECH, M.; BONASSI, S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. Amsterdam, **Mutation Research**, v. 705, n. 1, p. 11 - 19, 2010.

CLARO, L. M.; LEONART, M. S.; COMAR, S. R.; NASCIMENTO, A. J. Effect of vitamins C e E on oxidative process in human erythrocytes. **Cell Biochem. Funct.** v. 24, p. 531-535, 2005.

CLARO, L. M.; LEONART, M. S.; COMAR, S. R.; NASCIMENTO, A. J. Effect of vitamins C and E on oxidative process in human erythrocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 24, p. 531-535, 2006.

COMBES, R. D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**, v. 24, p. 950-954, 1992.

COMPORTI, M. Protection of erythrocytes against oxidative damage and autologous immunoglobulin G (IgG) binding by iron chelator fluor-benzoil-yridoxal hidrazone. Oxford, **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 1365-1373, 2000.

CORDEIRO, I.; CARNEIRO-TORRES, D. Euphorbiaceae. In: BARBOSA, M. R. V.; SOTHERS, C.; MAYO, S.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L.; MESQUITA, A. C. **Checklist das plantas do Nordeste Brasileiro: Angiospermas e Gymnospermas**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 71–74. 2006.

COUTINHO, H. D. M.; MATIAS, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E. S.; GUEDES, G. M. M.; SANTOS, F. A. D.; COSTA, J. G. M.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.. Enhancement of the norfloxacin antibiotic activity by gaseous contact with the essential oil of *Croton zehntneri*. **Pharmacognosy**, v. 2, p. 362-364, 2010.

COVARRUBIAS, L.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, D.; SCHNABEL, D.; SALAS-VIDAL, E.; CASTRO-OBREGÓN, S. Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? **Developmental Biology**, v. 320, p. 1-11, 2008.

COX, S.D. The mode of antimicrobial action of essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 170-175, 2000.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural Products in Drug Discovery and Development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A. Estudo de óleos essenciais de plantas do Nordeste brasileiro. **Ciência Cultural**, v. 28, p. 180, 1976.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.

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

FERNANDES, L. R.; ANTUNES, A. S. Informações estratégicas sobre plantas medicinais obtidas a partir de base de dados em linha mimeo. Rio de Janeiro, **Escola de Química**, UFRJ, 2000.

FERRALI, M.; SIGNORINI, C.; BAMBAGIONI, S.; ROSSI, V.; POMPELLA, A.;

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. Chicago, **Cereal Food Word**, v. 45, n. 5, p. 208-213, 2000.

GARDNER, A. M. Apoptotic vs nonapoptotic cytotoxicity induce by hydrogen peroxide. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 22, p. 73-83, 1997.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, v. 21:: 263-27. 2004.

GONÇALVES, L. A.; BARBOSA, L. C. A.; AZEVEDO, A. A.; CASALI, V. W. D.; GRAYER, R. J.; CHASE, M. W.; SIMMONDS, M. S. J. A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: an appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie de Pflanzen". **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 369-393, 1999.

GOLLAPUDI, B. B.; KRISHNA, G. Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. **Mutation Research**, v. 455, p. 21-28, 2000.

GROVER, I. S.; SATWINDERJEET, K. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, p. 183-188, 1999.

GURGEL, L. A.; SIDRIM, J. J. C.; MARTINS, D. T. *In vitro* antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **J Ethnopharmacol**, v. 97, p. 409-12, 2005.

GUSTAFSON, J. E. Effects of tea tree oils on *Escherichia coli*. **Lett Appl Microbiol**, v. 26, p. 194-198, 1998.

KARTAL, M. Intellectual property protection in the natural product drug discovery, traditional herbal medicine and herbal medicinal products. **Phytotherapeutic Research**, v. 21, p. 113-119, 2007.

KLIESCH, U., ADLER, I. D. Sensitivity comparison of chromosome analysis and micronucleus test in mouse bone marrow. **Mutation Research**, v. 74, p. 160, 1980.

HALLIWELL, B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? London, **Free Radical Research**, v. 25, n. 5, p. 439-454, 1996.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University Press**, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine, 4th. Oxford, **Clarendon**, 2007.

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, R.; MARTUS, H.J.; FJALLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of the alkaline Comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 843-858, 2001a.

HASHMI, A.; SALEEMUDDIN, M. Phenylhydrazine causes sulfhydryl oxidation and protein aggregation in hemoglobin-free human erythrocyte membranes. Marrickville, **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 40, n. 3, p. 543-550, 1996.

HAYASHI, M.; TICE, R. R.; MACGREGIR, J. T. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 312, p. 293-304, 1994.

HENRIQUES, A. T.; SIMÕES-PIRES, C.; APEL, M. A. Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas In: YUNES, R. A. & FILHO, V. C. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**; Editora UNIVALI, Itajaí, p. 221, 2009.

KISKINIS, E.; SUTER, W.; HARTMANN, A. High throughput Comet assay using 96-well plates. **Mutagenesis**, v. 17, p. 37-43, 2002.

KORDALI, S.; ÇAKIR, A.; ÖZER, H.; ÇAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and ρ -cymene. **Bioresource Technology**, doi: 10.1016/j.biortech.2008.04.048, 2008.

IARMARCOVAI, G.; CEPPI, M.; BOTTA, A.; ORSIÈRE, T.; BONASSI, S. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. Amsterdam, **Mutation Research**, v. 659, n. 3, p. 274 - 283, 2009.

LAVABRE, M. Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais. 2 ed. Rio de Janeiro: **Record**, 1993.

LEE, H. J.; JEONG, H. S.; KIM, D. J.; NOH, Y. H.; YUK, D. Y.; HONG, J. T. Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF-kappa B activation in RAW264.7 cells. **Arch Pharmazie Research**, v. 3, p. 342-349, 2008.

LIMA, L. R. Estudos taxonomicos em *Croton secao Lamprocroton* (Mull.Arg.) Pax. (Euphorbiaceae). **Tese de Doutorado do Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2006.

LINDBERG, H. K.; WANG, X.; JARVENTAUS, H.; FALCK, G. C.; NORPPA, H.; FENECH, M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. Amsterdam, **Mutation Research**, v. 617, n. 1 - 2, p. 33 - 45, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, **Instituto Plantarum**, 2002.

MACDONALD-WICKS, L. K.; WOOD, L. G.; GARG, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal of Science of Food Agriculture**, v. 86, p. 2046-2056, 2006.

MCGREGOR, J.T.; CASCIANO, D.; MÜLLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutation Research**, v. 455, p. 3-20, 2000.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIRO, V. F.; GRYNBERG, N. F.; MAGWA, M. L.; GUNDIDZA, M.; GWERU, N. Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*. **Journal Ethnopharmacol**, v. 103, p. 85-89, 2002.

MANSOURI, A.; LURIE, A. A. Concise review: methemoglobinemia. **American Journal of Hematology**, v. 42, p. 7-12, 1993.

MARASCHIN, M.; VEPOORTE, R.. Engenharia do metabolismo secundário. Brasília, **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 23, p. 24-28, 1999.

MARTINS, R. T. Receptores opioides até o contexto atual. **Revista Dor**, v. 13, n. 1, p. 75-79, 2012.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais**. 2 ed. Imprensa Universitária-UFC, 2000.

MEIRELES, D.R.P.; FERNANDES, H.M.B.; GONZAGA, J.C.O.; BRITO, M.T.B.; PITA, J.C.L.R.; TAVARES, J.F.; SILVA, M.S.; CASTELLO BRANCO, M.V.S. Avaliação da citotoxicidade e toxicidade aguda do óleo essencial de *Croton polyandrus* spreng. (euphorbiaceae). XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2013. Porto Alegre – RS. Resumos. Porto Alegre: SBTOX, 2013.

WEBSTER, G. L. A Provisional Synopsis of the Sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon**, v. 42, p. 793-823, 1993.

MCCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B. N. Detection of carcinogens and mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 72, n. 12, p. 5135-5139, 1975.

MENDIRATTA, S.; QU, Z. C.; MAY, J. M. Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood. **Free Radic Biol Med**, v. 24, p. 789-97, 1998.

MIRANDA, F.M. Avaliação da proteção solar e da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais do caule e das folhas do *croton tricolor klotzsch ex. Baill.* **Dissertação de Mestrado em Química Analítica**, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2012.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The oxidation of Phenylhydrazine: superoxide and mechanism. Washington, **Biochemistry**, v. 15, p. 681-687, 1976.

MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO. Produtos Naturais estudos químicos e biológicos. Fortaleza, **UECE**, 2007.

MORAIS, S. M.; CATUNDA J.; F. E. A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS NETO, J.S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton no nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, p. 907-910, 2006a.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; BERTINI, L. M.; OLIVEIRA, C. L. L.; RODRIGUES, J. R. B.; CARDOSO, J. H. L. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **J Am Mosq Control Assoc.**, v. 22, p. 161-164, 2006.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mut. Res.** v. 455, p. 29-60, 2000.

MOTSEI, M. L.; LINDSEY, K. L.; VAN STANDEN, J.; JAGER, A. K. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 235-241, 2003.

MUGHAL, A.; VIKRAM, A.; RAMARAO, P.; JENA, G. B. Micronucleus and comet assay in the peripheral blood of juvenile rat: Establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DNA damage. Amsterdam, **Mutation Research**, v. 700, n. 1 - 2, p. 86 - 94, 2010.

NASCIMENTO P. F. C.; NASCIMENTO A. C.; RODRIGUES C. S. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, 2007.

NORDBERG, J.; ARNÉR, S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biol Med**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NOVAIS, T.S.; COSTA, J.F.O.; DAVID, J.L.P.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14:: 05- 08. 2003.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 16(1):: 77-82. 2006.

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

PALMEIRA, J.; SEBASTIÃO, F.n lerodane diterpenes from *Croton* species: Distribution and a Compilation of their and ¹³C NMR. Brasil, **Natural Product Communications**, v. 4, n. 1, p.319-344, 2006.

PIO-CORREA, M. Dicionario de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, **Imprensa Nacional**, v. 5, 1974.

RABBANI, S. I.; DEVI, K.; KHANAM, S.; ZAHRA, N. Citral, a component of lemongrass oil inhibits the clastogenic effect of nickel chloride in mouse micronucleus test system. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19 p. 108-113, 2006.

RAMOS, S. J.; FERNANDES, L. A.; MARQUES, C. C. L.; SILVA, D. D.; PALMEIRA, C. M.; MARTINS, E. R. Produção de matéria seca e óleo essencial de menta sob diferentes doses de fósforo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n.1, p. 9-12, 2005.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, p. 981-990, 2012.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. Rio Grande do Sul, **Mutagênese Ambiental**, p. 21-27, 2003.

RIBEIRO, C. M. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia. **Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas**, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008. Disponível em: <http://www.btdt.ufpa.br//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=459>. Acesso em: 11 maio 2009.

RODRIGUES, G.R. Efeito da administração do extrato aquoso do *Croton cajucara* benth sobre parâmetros oxidativos e a Expressão do NF- κ B em fígado de ratos diabéticos. **Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 981-991, dez. 2010.

ROVER JÚNIOR, L; HÖEHR, N. F; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). Brasil, **Journal Of Brazilian Chemical Society**, n. 18, p.11-33, 2007.

SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R. H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Screening of some plants from North Argentin for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 293-297, 2001.

SANTOS, M. J.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Biologia reprodutiva de duas espécies de *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) em Caatinga, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 2, p. 361-373, 2005.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, M. G.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of

essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SASAKI, Y. F.; SEKIHASHI, K.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; SAGA, A.; ISHIDA, K.; TSUDA, S. The comet assay with multiple mouse organs: Comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP carcinogenicity database. London, **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 6, p. 629 - 799, 2000.

SAUTER, I. S.; SANTOS, J. C.; APEL, M. A.; CIBULSKI, S. P.; ROEHE, P. M.; VON POSER, G. L.; ROTT, M. B. Amoebicidal activity and chemical composition of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) essential oil. **Parasitology Research**, v. 109, n. 5, p. 1367-1371, 2011.

SCHWARTSMANN, G. Vinho e oncogênese. In: **Simpósio Internacional Vinho E Saúde**, Bento Gonçalves. Anais Bento Gonçalves: IBRAVIN, EMBRAPA, p. 29, 2005.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food phenolics: souces, chemistry, effects and applications. Lancaster, **Technomic Publishing Co,Inc.**, p. 331, 1995.

SHU, Y. Z. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. **Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SIEMS, W. G.; SOMMERBURG, O.; GRUNE, T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. **Clinical Nephrology**. v. 53, p. 9-17, 2000.

SILVA, C. G. V.; ZAGO, H. B.; JUNIOR, H. J. G. S.; DA CAMARA, C. A. G.; OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; SCHWARTZ, M. O. E.; LUCENA, M. F. A.. Composition and insecticidal activity of the essential oil of *Croton grewoides* Baill. Against Mexican bean weevil (*Zabrotes subfasciatus* Boheman). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 2, p. 179-182, 2008.

SILVA, J. Biomonitoramento de regiões mineradoras de carvão do Rio Grande do Sul – avaliação da genotoxicidade através de roedores nativos. **Tese (Doutorado em Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora alcance, p. USER, V.; PERES, W.; POSSA MARRONI, N.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by Comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 941-947, 2002.

SILVA, V. A. Avaliação citotóxica e genotóxica de *Mimosa tenuiflora* (Wild.) Poir (Mimosaceae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal da Paraíba Paraíba - Brasil, 2012.

SILVA, V. A., OLIVEIRA, C. R. M; FREITAS, A. F. R; COSTA, M. R. M; PESSÔA, H. L. F; PEREIRA, M. S. V. Antimicrobial efficacy of the extract of *Croton sonderianus* Müll. on bacteria that cause dental caries. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 40, n. 2, p. 69-72, 2011.

SIMÔES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia da planta ao medicamento**; Editora da UFRGS, Porto Alegre; Florianópolis, p. 379-380, 2007.

SINITOX, Casos, Óbitos e Letalidade de Intoxicação Humana por Agente e por Região. Brasil, 2009. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/b3.pdf>. Acesso em: 24 out. 2012.

SIVROUPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial activity of mint essential oils. **J. Agric. Food Chem**, v. 43, p. 2384-2388, 1995.

SIZER, F. S.; WHITNEY, E. N. **Nutrição: conceitos e controvérsias**. 8. ed. Barueri, Manole, 2003.

SNYDER, R. D.; GREEN, J. W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, v. 488, p. 151-169, 2001.

SOUTHWELL, I. A. The search for optimally bioactive Australian tea tree oil. **Acta Horticulturæ**, v. 334, p. 265-275, 1999.

SUÁREZ, A. I.; OROPEZA, M.; VÁSQUEZ, L.; TILLET, S.; COMPAGNONE, R. S.; Chemical composition of the essential oil of *Croton gossypifolius* from Venezuela. **Natural Product Communications**, v. 6, p. 97-98, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: TAIZ, L.; THIERENS, H.; VRAL, A. The micronucleus assay in radiation accidents. Roma, **Annali dell' Istituto Superiore di Sanità**, v. 45, n. 3, p. 260 - 264, 2009.

TURINA, A. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, p. 101-113, 2006.

ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Ed. Artmed, 3ªed, p. 309-332, 2006.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell/gel comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol. Mutagen**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TITENKO-HOLAND, N.; JACOB, R. A.; SHANG, N.; BALARAMAN, A.; SMITH, M. T. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. **Mutation Research**, v. 417, p. 101-114, 1998.

TRIGO, J. R.; LEAL, I. R.; MATZENBACHER, N. I.; LEWINSOHN, T. M. Chemotaxonomic value of pyrrolidine alkaloids in southern Brazil *Senecio* (SENECIONEAE: ASTERACEAE). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 1011-1022, 2003.

VALENTIN-SEVERIN, I.; HEGARAT, L. L.; LHUGUENOT, J. C. BON, A. M. L.; CHAGNON, M. C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. Amsterdam, **Mutation Research**, v. 536, n. 1-2, p. 79 - 90, 2003.

VEIGA, J. V. F., PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-28, 2005.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; MELLO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 464-471, 2008.

VIEIRA, P. R. N.; CORDEIRO, R.; BRILHANTE, R. S. N.; MORAES, S. M; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Croton argyrophylloides* e *Croton zehntneri* frente a cepas de *Trichophyton rubrum*. **47º CBQ. Iniciação Científica**, Natal- RN, 2007.

VILELA, J.D. **Revista Paulista de Medicina**, v. 89, p. 115, 1977.

YAYLI, N.; YASAR, A.; GULEC, C.; USTA, A.; KOLAYLI, S.; COSKUNCELEBI, K.; KARAOGLU, S. Composition antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. **Phytochemistry**, v. 66 p. 1741-1745, 2005.

WASSON, G. R.; MCKELVEY-MARTIN, J.; DOWNES, C, S. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. Swansea, **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 153 - 162, 2008.

WEBSTER, G. L. A provisional synopsis of the section of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon**, v. 42, p. 793-823, 1993.

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

WEISBURGER, J. H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now **Mutation Research** v. 437, p. 105-112, 1999.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Versão: 25/11/2008. <http://delta-intkey.com>.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. SOS-chromotest results in a boader context empirical relationships between genotoxic potency, mutagenic potency and carcinogenic potency. **Environ. Mol. Mutagen**, v. 27, n. 4, p. 270-305, 1996.

ZEIGER, E.; MARGOLIN, B.H. The proportions of mutagens among chemicals in commerce. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** v. 32, p. 219-225, 2000.