

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Segurança do extrato aquoso das sementes de *Aleurites moluccana* (L.) Willd.
em ensaios *in vitro* e *in vivo*

PAMELLA FUKUDA DE CASTILHO

**Dourados - MS
2019**

PAMELLA FUKUDA DE CASTILHO

Segurança do extrato aquoso das sementes de *Aleurites moluccana* (L.) Willd.
em ensaios *in vitro* e *in vivo*

Área do CNPq: Ciências da Saúde: 04.00.00.00-1.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Doenças Crônicas e Infecto-Parasitárias

Orientador: Prof^a. Dr^a. Kelly Mari Pires de Oliveira

Dourados – MS

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C352s Castilho, Pamella Fukuda De

Segurança do extrato aquoso das sementes de *Aleurites moluccana* (L.) em ensaios in vitro e in vivo Willd. [recurso eletrônico] / Pamella Fukuda De Castilho. -- 2019.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Kelly Mari Pires de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Produtos naturais. 2. Citotoxicidade. 3. Genotoxicidade. 4. Mutagenicidade. 5. Noz da Índia.
I. Oliveira, Kelly Mari Pires De. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR PAMELLA FUKUDA DE CASTILHO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO “Doenças Crônicas e Infecto-Parasitárias”, REALIZADA NO DIA 02 de outubro de 2019.

Aos dois dias do mês de outubro do ano de 2019, às 09 horas, em sessão pública, realizou-se, na Sala 103 – Bloco C – FCS da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada “Segurança do extrato aquoso das sementes de *Aleurites moluccana* (L.) Willd. em ensaios *in vitro* e *in vivo*” apresentada pela mestranda PAMELLA FUKUDA DE CASTILHO, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos(as) professores(as) Prof^ª. Dr^ª. Kelly Mari Pires de Oliveira (Presidente/orientador), Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Paim Berti (membro titular), Prof. Dr. William Renzo Cortez Vega (membro titular), Prof^ª. Dr^ª. Adriana Araújo de Almeida Apolonio (membro suplente) e Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Gomes da Silva Dantas (membro suplente). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao(à) candidato(a) e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o(a) candidato(a) ter apresentado a sua Dissertação, no tempo previsto de 30 até 40 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do(a) candidato(a), no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido o(a) candidato(a) considerado(a) **APROVADA**, fazendo *jus* ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 02 de outubro de 2019.

Prof^ª. Dr^ª. Kelly Mari Pires de Oliveira _____

Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Paim Berti _____

Prof. Dr. William Renzo Cortez Vega _____

ATA HOMOLOGADA EM: ___/___/___, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e sempre: a Deus e a Maria, por terem me dado o dom da vida, intercedido por mim e guiado todos meus passos até hoje.

A minha família: Marcelo, Erika, Nicolle e Mitsue. Por tudo que sou, pelo o que me tornei, pelo amor, carinho e incentivo. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu futuro marido, Rafael, por todo amor que me dedica, pelos conselhos, pela ajuda, pelos ensinamentos, por ter me ajudado a ter um olhar humilde e grato. Obrigada por fazer a diferença na minha vida.

Ao Willian Gobatto, que sempre me ensinou e me apoiou tanto. Seguirei confiante, com a certeza que terei um anjo me acompanhando em cada passo que eu der.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Kelly Mari Pires de Oliveira, pela oportunidade, pela orientação, pelos ensinamentos, conselhos e carinho.

A minha amiga irmã Andreza, muito obrigada por todos esses anos de apoio, companheirismo e amizade. Quando me lembro dos melhores momentos que tive durante esses anos, você está ao meu lado em todos eles.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Aplicada: Adriana, Ana Paula, Bianca, Fernanda, Pedro, Renata, Wellinton, Larissa, Nathaly, Mateus, Stefanie, José, Rafaela e Welber, dividimos não só conhecimento.. dividimos amizade, parceria, risos, momentos, ter vocês comigo tornou esse trabalho muito mais leve. Em especial, a Fabiana, que teve papel fundamental em todo meu trabalho, desde a elaboração até a execução. Pela sua paciência, humildade, ensinamentos, pelo acolhimento e pela amizade.

A todos meus amigos que estão longe, mas que me apoiaram para que eu tivesse força para enfrentar todos os meus desafios e chegar até aqui.

Aos nossos parceiros: Laboratório de micologia médica (Maringá), Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LETOX) e Professora Claudia (UEMS).

Ao corpo docente, aos técnicos e a Faculdade Federal da Grande Dourados de uma forma geral.

E a todos que contribuíram para a realização do meu trabalho, para a construção do meu conhecimento e minha jornada acadêmica.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão da literatura

- Figura 1 – Estrutura do DNA após corrida eletroforética, similar a um “cometa” com cabeça e comprimento da cauda proporcional ao material lesionado. Fonte: GONTIJO; TICE, 2003..... 22
- Figura 2 – Classe de danos do DNA, com as 4 categorias que indicam o grau de lesão, sendo I: dano baixo, II: dano médio, 3: dano alto e 4: dano total. Fonte: BÜCKER; CARVALHO; ALVES-GOMES, 2006..... 22
- Figura 3 – Normocromáticos (A) e eritrócitos policromáticos (B) obtidos da medula óssea de ratos Wistar, a seta indica o eritrócito policromático micronucleado. Fonte: RABBANI; DEVI, 2010..... 23
- Figura 4 – Formação dos micronúcleos por agentes aneugênicos e clastogênicos..... 23
- Figura 5 – Eritrócito policromático (PCE) e eritrócitos normocromático (NCE). Fonte: Adaptado de ALMEIDA, 2012..... 24
- Figura 6 – Mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (frameshift). Fonte: www.esciencecentral.org..... 25
- Figura 7 – Mutações do tipo substituição de pares de base. Fonte: www.slideplayer.com.br..... 26
- Figura 8 – Redução química e colorimétrica do sal tetrazólio MTS em Formazan..... 28

Manuscrito I

- Figura 1 – Imagem ilustrativa de plantas da família Euphorbiaceae. **A:** *Hevea brasiliensis* (Fonte: www.ruralcentro.com.br); **B:** *Euphorbia milii* (Fonte: www.verdesdovale.com.br); **C:** *Euphorbia pulcherrima* (Fonte: www.plantasornamentais.com); **D:** Fruto tricoco (Fonte: www.botanicayjardines.com)..... 40
- Figura 2 – Imagem ilustrativa de *A. moluccana*. **A:** Árvore (Fonte: www.floridata.com); **B:** flores (Fonte: www.staticflick.com); **C:** Fruto e sementes (Fonte: www.tanglewoodconservatories.com)..... 42
- Figura 3 – Distribuição geográfica de *A. moluccana* nas regiões tropicais e subtropicais representada pela cor verde. Fonte: Missouri Botanical Garden, 42

2013.....

Manuscrito II

Figura 1 – Análise histopatológica dos órgãos das ratas tratadas a curto prazo com o EASAM. (H&E, obj. 20X e 40X). Setas indicam áreas com lesões por falsa via nos pulmões (espessamento da parede alveolar, infiltrado inflamatório mononuclear e células gigantes multinucleadas com imagens sugestivas de fibras vegetais)..... 82

Figura 2 – Análise histopatológica dos órgãos dos ratos tratados a curto prazo com EASAM. (H&E, obj. 20X e 40X). A seta indica área com lesão por falsa via nos pulmões (espessamento da parede alveolar, infiltrado inflamatório mononuclear e células gigantes multinucleadas com imagens sugestivas de fibras vegetais)..... 83

Figura 3 – Análise histopatológica dos órgãos dos animais que foram tratados durante os 28 dias e ficaram mais 14 dias em observação. (H&E, obj. 20X e 40X). Setas indicam áreas com lesões por falsa via nos pulmões (espessamento da parede alveolar, infiltrado inflamatório mononuclear células gigantes multinucleadas com imagens sugestivas de fibras vegetais)..... 84

Manuscrito III

Figura 1 – Viabilidade celular das linhagens não-tumoral (Vero) e tumorais (HeLa e SiHa) após 24h do tratamento com as diferentes concentrações do EASAM. A diferença estatística em relação ao controle foram determinadas pela ANOVA seguido do pós teste de Tukey * $P < 0,05$ vs Controle. Cada valor determina a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes..... 107

Figura 2 – Frequência dos MN-PCEs encontrados na medula óssea dos ratos Wistar fêmeas (a) e machos (b) após o tratamento com o controle negativo, EASAM e controle positivo. Dados expressos em médias \pm desvio padrão (n=5) do número de MN-PCEs. *Difere do controle positivo pelo teste de Tukey, $P < 0,05$. Um total de 2000 células foram analisadas em cada animal. MN-PCEs, eritrócitos policromáticos micronucleados..... 108

LISTA DE TABELAS

Revisão da literatura

Tabela 1. Diretrizes e princípios dos 3 métodos de avaliação de toxicidade oral aguda segundo a OECD.....	18
Tabela 2. Critérios para classificação de substâncias de acordo com o teste de toxicidade oral aguda segundo o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de produtos químicos.....	19
Tabela 3. Características e mutações adicionais das linhagens de <i>S. Typhimurium</i> utilizadas no teste de Ames.....	26

Manuscrito I

Tabela 1. Metabólitos secundários identificados em <i>A. moluccana</i>	46
--	----

Manuscrito II

Tabela 1. Constituintes e características do EASAM através do sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas.....	73
Tabela 2. Parâmetros fisiológicos: ganho de peso corporal e consumo de ração e água de ratos tratados por via oral com o EASAM.....	74
Tabela 3. Parâmetros fisiológicos: ganho de peso corporal e consumo de ração e água dos ratos que ficaram mais 14 dias em observação (satélite).....	76
Tabela 4. Peso e peso relativo dos órgãos (g/100g do peso corporal) dos animais tratados por via oral com o EASAM.....	77
Tabela 5. Parâmetros hematológicos de ratos tratados por via oral com o EASAM	79
Tabela 6. Parâmetros bioquímicos de ratos tratados via oral com o EASAM.....	80

Manuscrito III

Tabela 1. Potencial mutagênico do EASAM frente as linhagens TA 97a, TA 98, TA 100, TA102 e TA 1535 de <i>S. Typhimurium</i> com ativação metabólica (S+) e sem ativação metabólica (S-).....	104
Tabela 2. Número total de células com danos e classe de danos do sangue periférico de ratos fêmeas e machos Wistar após o tratamento com o controle negativo, ciclofosfamida ou EASAM no ensaio do cometa.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALT	Alanina aminostransferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CIVITOX	Centro Integrado de Vigilância Toxicológica
DAD	Detector de matriz de iodo
DL ₅₀	Dose letal mediana
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
EASAM	Extrato aquoso das sementes de <i>Aleurites moluccana</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agência Europeia de Medicamentos)
ENC	Eritrócito normocromático
EPC	Eritrócito policromático
ESI	Ionização por electropulverização
FDA	<i>Food and drug administration</i> (Administração de alimentos e medicamentos)
FORMAZAN	1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan <i>Globally Harmonised System of Classification and Labeling of Chemicals</i>
GSH	(Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos)
H&E	Corante hematoxilina-eosina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 <i>The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i> (Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano)
ICH	
MN-PCEs	Eritrócitos policromáticos micronucleados
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
LOEL	Menor dose com efeito observado
NOAEL	Dose com efeitos adversos não observáveis
NOEL	Dose de efeitos não observáveis

OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i> (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico)
PMDA	<i>Pharmaceuticals and Medical Devices Agency</i> (Agência de Produtos Farmacêuticos e Dispositivos Médicos)
SBMCTA	Sociedade Brasileira Mutagênese e Carcinogênese Ambiental
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SNC	Sistema nervoso central
UR	Equivalente de rotina
VCM	Volume corpuscular médio

Segurança do extrato aquoso das sementes de *Aleurites moluccana* (L.) Willd. em ensaios *in vitro* e *in vivo*

RESUMO

As plantas são utilizadas popularmente como alternativa a medicamentos, entretanto, muitas espécies vegetais não possuem sua toxicologia elucidada. A falta desses estudos em conjunto com a capacidade das plantas apresentarem efeitos adversos alertam para essa prática que pode colocar em risco a saúde de seus consumidores. *Aleurites moluccana*, pertence a família Euphorbiaceae e possui uma semente popularmente conhecida como “noz da Índia” que é utilizada como fonte de emagrecimento, entretanto, não há estudos que comprovem a segurança da sua ingestão. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial da toxicidade oral, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade em ensaios *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso das sementes de *Aleurites moluccana* (EASAM). No teste de toxicidade oral aguda uma dose de 2000 mg/kg de EASAM foi administrado oralmente uma única vez a ratas Wistar e foram observadas durante 14 dias. Para a toxicidade oral a curto prazo, cometa e micronúcleo os animais foram tratados durante 28 dias e foram estabelecidos um grupo controle negativo, três grupos teste tratados com as doses de 100; 50 e 25 mg/kg do EASAM e um grupo controle positivo tratado com ciclofosfamida para o ensaio de micronúcleo. Além disso, somente para a toxicidade oral a curto prazo foi adicionado um grupo satélite tratado com a dose de 100 mg/kg e seu controle negativo tratado com solução salina que foram mantidos em observação durante 14 dias após o término do experimento a fim de observar efeitos tóxicos tardios, persistentes ou reversíveis. Para o teste de Ames foram utilizadas as concentrações de 5000; 1500; 500; 150 e 50 µg/placa frente as linhagens TA97a, TA98, TA 100 e TA 1535 com e sem ativação metabólica e as mesmas concentrações foram utilizadas para o ensaio do MTS frente a células tumorais (Hela e SiHa) e não-tumorais (Vero). No teste de toxicidade oral aguda o EASAM apresentou uma $DL_{50} > 2000$ mg/kg sendo avaliado como

pouco tóxico. No teste de toxicidade oral a curto prazo, os animais que receberam as doses de 100, 50 e 25 mg/kg do EASAM não apresentaram alterações bioquímicas, hematológicas, histopatológicas e sinais clínicos de toxicidade. No teste do cometa e micronúcleo, as doses administradas do EASAM não causou danos ao DNA das células ou aumentou o número de micronúcleo nos eritrócitos dos animais quando comparado ao controle negativo. Além disso, as concentrações avaliadas do EASAM não apresentou potencial mutagênico *in vitro* pelo teste de Ames, pois o IM < 2. No ensaio de citotoxicidade, a dose de 5000 µg/placa do EASAM na maior concentração reduziu mais de 50% da viabilidade celular de todas as linhagens, e, nas menores concentrações, manteve a viabilidade das linhagens tumorais reduzidas (65 – 95%). De acordo com os resultados deste trabalho, o EASAM nas condições e concentrações avaliadas, não apresenta toxicidade oral aguda ou a curto prazo, potencial mutagênico *in vitro* e *in vivo* e genotóxico *in vivo*, mas demonstra um potencial antiproliferativo.

Palavras-chave: Produtos naturais, Citotoxicidade, Genotoxicidade, Mutagenicidade. Noz da Índia.

Safety of aqueous extract of *Aleurites moluccana* (L.) Willd seeds *in vitro* and *in vivo* assays

ABSTRACT

Plants are popularly used as an alternative to medicines, however, many plant species do not have their elucidated toxicology. The lack of these studies together with the ability of plants to have adverse effects warns of this practice that may endanger the health of their consumers. *Aleurites moluccana*, belongs to the Euphorbiaceae family and has a seed popularly known as "India nut" which is used as a source of weight loss, however, there are no studies proving the safety of its intake. In this sense, the objective of this work was to evaluate the potential of oral toxicity, cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity *in vitro* and *in vivo* assays of aqueous extract of *Aleurites moluccana* (EASAM) seeds. In the acute oral toxicity test the dose of 2000 mg/kg EASAM was orally administered once to Wistar rats and was observed for 14 days. For short term oral toxicity, comet and micronucleus the animals were treated for 28 days and was established a negative control group, three test groups treated with doses of 100; 50 and 25 mg/kg EASAM and a positive control group treated with cyclophosphamide for the micronucleus assay. In addition, only for short-term oral toxicity was added to a satellite group treated with the 100 mg/kg dose and its negative saline-treated control that was kept under observation for 14 days after the end of the experiment to observe late, persistent or reversible toxic effects. For the Ames test the concentrations of 5000 were used; 1500; 500; 150 and 50 µg/plate against TA97a, TA98, TA 100 and TA 1535 strains with and without metabolic activation and the same concentrations were used for the MTS assay against tumor (Hela and SiHa) and non-tumor (Vero) cells. In the acute oral toxicity test, the EASAM presented at LD₅₀ > 2000 mg/kg and was evaluated as little toxic. In the short-term oral toxicity test, animals receiving doses of 100, 50 and 25 mg/kg of EASAM showed no biochemical, hematological, histopathological alterations and clinical signs of toxicity. In the comet and micronucleus test, the administered doses of EASAM did not cause DNA damage to cells or increase the number of micronucleus in the erythrocytes of animals when compared to the negative control. In addition, the concentrations evaluated of EASAM did not show *in vitro* mutagenic potential by the Ames test, because the IM < 2. In the cytotoxicity assay, the 5000 µg/plate dose of EASAM at the highest concentration reduced the cell viability of all strains by more than 50%, and at the lowest concentrations maintained the viability of the reduced tumor strains (65 - 95%). According to the results of this work, EASAM at the evaluated conditions and concentrations does not present short term oral toxicity, *in vitro* and

in vivo mutagenic potential and in vivo genotoxic, but demonstrates an antiproliferative potential.

Keywords: Natural Products. Cytotoxicity. Genotoxicity. Mutagenicity. Noz da Índia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Família Euphorbiaceae.....	15
2.2 <i>Aleurites moluccana</i> (L.) Willd.....	15
2.3 Estudos toxicológicos.....	15
2.3.1 Toxicidade oral aguda.....	17
2.3.2 Toxicidade oral a curto prazo.....	19
2.3.3 Toxicidade genética.....	20
2.3.3.1 Teste do cometa.....	20
2.3.3.2 Teste do micronúcleo.....	22
2.3.3.3 Teste de Ames.....	24
2.3.4 Citotoxicidade e ensaio do MTS.....	27
3 OBJETIVOS.....	28
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
5 APÊNDICES.....	34
5.1 Manuscrito I: <i>Aleurites moluccana</i> (L.) Willd.: Características gerais, farmacológicas e fitoquímicas.....	35
5.2 Manuscrito II: Efeitos tóxicos agudo e a curto prazo do extrato aquoso de sementes de <i>Aleurites moluccana</i> (L.) Willd. em ratos.....	53
5.3 Manuscrito III: Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do extrato aquoso de sementes de <i>Aleurites moluccana</i> (L.) Willd. ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	85
6. CONCLUSÕES.....	109
7 ANEXOS.....	110
7.1 Aprovação do Comitê de ética no Uso de Animais (CEUA).....	111

1 INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas há séculos para alimentação e também como fonte de terapia natural. Essa última prática foi baseada no estudo empírico que se estabeleceu e foi passada para as gerações seguintes. Chegando ao cenário atual, onde o alto custo, as reações adversas e a insatisfação com a eficácia dos medicamentos sintéticos, acompanhado pela admiração do “mundo verde” e a crença errônea que todos produtos advindos de plantas são considerados seguros, contribuíram para a grande aceitação dos produtos naturais (EKOR, 2014).

A capacidade das plantas atuarem de forma similar a medicamentos está relacionada aos princípios ativos, os metabólitos secundários, que são produzidos para melhor adaptação da espécie e sobrevivência. Entretanto, esses metabólitos apesar de apresentarem um controle genético durante a sua produção, podem sofrer interações e apresentar efeitos adversos (NIERO et al., 2003).

Em meio a esse âmbito, a família Euphorbiaceae é uma das principais famílias da flora brasileira, contém diversos compostos biologicamente ativos, como: flavonoides, saponinas, terpenos, ésteres e alcaloides, tornando-a fonte de estudos (DE OLIVEIRA-JÚNIOR et al; MAVUNDZA et al., 2018). Dentro dessa família encontra-se a *Aleurites moluccana*, uma planta de porte médio, natural da Indo-Malásia, bem aclimatada em regiões tropicais, largamente explorada e utilizadas tradicionalmente na alimentação (HEYNE, 1987).

No uso medicinal, *A. moluccana* popularmente já foi descrita para o tratamento de diversas doenças: úlceras, asma, conjuntivite, gonorreia, inflamação, entre outros. Cientificamente, destacam-se as partes aéreas, sendo comprovada a atividade anti-inflamatória, antitumoral, antivirais, antibacteriana, analgésica e para cicatrização de feridas (CESCA et al., 2012; HOEPERS et al., 2015; QUINTÃO et al., 2011).

Outra parte de *A. moluccana* utilizada na medicina popular são as sementes, conhecidas também como “noz da Índia”. É consumida como fonte de emagrecimento e a recomendação do uso é contínua até a perda de peso desejável: inicialmente uma semente deve ser partida em oito pedaços e consumido um pedaço por dia, depois outra semente deve ser partida em quatro pedaços e consumido um pedaço por dia e assim sucessivamente, até o consumo de uma semente inteira ao dia, prometendo a perda de até 12 quilos em um mês.

Entretanto, em fevereiro de 2016 o Departamento de Toxicologia do Mato Grosso do Sul publicou uma nota técnica alertando sobre potencial tóxico da semente. Posteriormente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em fevereiro de 2017 proibiu a

fabricação, comercialização, distribuição e a importação da “noz da Índia” por indícios de toxicidade e a três óbitos relacionados com o consumo da semente, porém, essa decisão se baseou em evidências e não a comprovações científicas (CIVITOX-MS, 2016; ANVISA, 2017)

Há diversos estudos na literatura que asseguram o uso de plantas como fonte medicamentosa sob determinadas condições, entretanto, esses estudos não foram feitos para todas as plantas que são utilizadas, apresentando um risco à saúde da população que fazem uso rotineiro e especulativo destes produtos desconhecendo sua toxicologia, como tem sido o caso das sementes *A. moluccana*.

Neste sentido, elucidar as atividades biológicas e os dados toxicológicos, fornecendo dados confiáveis sobre essas plantas tornou-se alvo de diversos pesquisadores, instituições e agências governamentais. Considerando a falta de estudos sobre a semente de *A. moluccana* e o seu uso popular como fonte de perda de peso, o presente trabalho tem como objetivo assegurar a prática do uso da “noz da Índia”, empregando os modelos internacionalmente recomendados para avaliação da toxicidade oral aguda, toxicidade oral a curto prazo, genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família Euphorbiaceae

A revisão de literatura referente a família Euphorbiaceae encontra-se na forma de manuscrito, disponível no Apêndice 5.1 (páginas **39 – 41**) desta dissertação.

2.2 *Aleurites moluccana* (L.) Willd.

A revisão de literatura referente a *Aleurites moluccana* encontra-se na forma de manuscrito, disponível no Apêndice 5.1 (páginas **41 – 48**) desta dissertação.

2.3 Estudos toxicológicos

As plantas são utilizadas como fonte alternativa a medicamentos e a ação terapêutica que elas podem apresentar é atribuída aos seus metabólitos secundários. Os metabólitos secundários são controlados geneticamente, entretanto, interações bioquímicas, fisiológicas, ecológicas e até mesmo evolutivas podem causar alterações nessa produção e esses compostos podem então apresentar efeitos adversos (NIERO et al., 2003).

Quando somamos o fato do Brasil ser uma das maiores fontes de princípios ativos, com a utilização de plantas como fonte medicinal e a crença que produtos naturais não produzem efeitos tóxicos, temos um número preocupante de pessoas que são acometidas. O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) no ano de 2016 registrou 592 casos de intoxicação humana por plantas no país (SINITOX, 2018). Entretanto esse número pode ser ainda maior, primeiro pelo fato da notificação por eventos toxicológicos não ser obrigatória no Brasil e também por algumas notificações alegarem agente tóxico desconhecido (CAMPOS et al., 2016).

Nesse contexto, os estudos toxicológicos pré-clínicos surgem de forma preditiva, pois permitem avaliar os efeitos tóxicos da amostra e também vantajoso, pois possibilita o controle em relação as condições de exposição, grupo exposto e a determinação dos efeitos decorrentes da exposição aguda e crônica (SILVA et al., 2012).

Estes estudos que visam analisar a segurança e desenvolvimento de um novo fármaco são regulados por três principais agências: A americana, cuja entidade reguladora é a *Food and Drug Administration* (FDA), a europeia, cuja entidade reguladora é *European Medicines Agency* (EMA) e a asiática, cuja entidade reguladora é a *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency* (PMDA) entretanto, elas seguem critérios específicos que diferem conforme a sua região (DENNY; STEWART, 2013).

Para minimizar as diferenças e harmonizar a aplicação das diretrizes, os requisitos técnicos, os ensaios realizados e a sua interpretação, em 2008, essas três agências criaram um compêndio. Neste, foi estabelecido orientações e fornecido ferramentas necessárias para o desenvolvimento do ensaios toxicológicos pré-clínicos através do *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) (ICH, 2008). No âmbito brasileiro, a ANVISA, membro regular do ICH desde o ano de 2016, elaborou dentro dos requisitos necessários um guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos (ANVISA, 2013).

Assim os estudos incluídos avaliam a toxicidade por dose única (aguda), toxicidade por doses repetidas, genotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade e toxicidade reprodutiva, caso necessário, ensaios mais específicos podem ser requeridos. Com a condução desses ensaios, espera-se determinar se houve efeitos tóxicos nos órgãos-alvo, a relação dose-resposta, a dose segura a ser administrada, o intervalo terapêutico, a reversibilidade, persistência ou efeito tardio. Além da possibilidade de quantificar os biomarcadores hematológicos, bioquímicos, alterações fisiológicas, avaliações micro e macroscópicas, entre

outras informações que servirão de critério e orientação para os estudos clínicos (NUGENT; DUNCAN; COLAGIOVANNI, 2013).

Para a escolha dos métodos utilizados nos ensaios deve-se levar em conta as informações toxicológicas e a relevância que os dados obtidos possuem no estudo. O processo de seleção das espécies é efetuado em função das semelhanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas existentes entre os humanos e os respectivos modelos, além disso, a via de administração, o “n” da amostra, a seleção das doses são também decisões fundamentais para dar maior confiabilidade a pesquisa (EMA, 2007).

2.3.1 Toxicidade oral aguda

A forma de como conduzir os ensaios de toxicidade oral aguda sofreram alterações ao longo dos anos. O grande impasse que causou as discussões e alterações foi em relação ao “Teste DL₅₀”, que consistia em descobrir a dose que causa a morte de 50% do animais. Inicialmente, esse teste foi introduzido para avaliar substâncias que seriam administradas a seres humanos, como a *digitallis* e a insulina, mas gradativamente o teste foi tornando-se pré-requisito de várias agências reguladoras como a FDA e em 1981, a *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD) incorporou o teste DL₅₀ em sua diretriz de toxicidade oral aguda, sendo conhecida como OECD 401 (CRETON et al., 2010).

Porém, a quantidade de animais utilizada e principalmente a preocupação com o bem-estar animal levou ao refinamento dessa diretriz nos anos posteriores, e atualmente, existem três testes que são recomendados. O Teste De doses Fixas (OECD 420), o Método da Toxicidade Oral Aguda de Classe (OECD 423) e o Teste “*Up and Down*” (OECD 425). São três metodologias com características diferentes que podem ser observadas na Tabela 1 e a escolha do método deve ser feita com base na proposta científica e regulatória (CRETON et al., 2010).

Em síntese, os testes de toxicidade oral aguda tem como objetivo avaliar a toxicidade de uma amostra quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 h, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração. É utilizado como um rastreio inicial de toxicidade, permitindo estimar a dose letal (DL₅₀) e classificar a amostra (Tabela 2) de acordo com os critérios do *Globally Harmonised System* (GHS) (ANVISA, 2013; 2016).

Durante os 14 dias em que os animais estão em observação, deve-se monitorar o consumo de água, consumo de ração, peso e também todos os sinais clínicos, sugeridos por Malone e Robichaud (1962):

1. Estado consciente: atividade geral do animal dentro da caixa;
2. Atividade e coordenação do sistema motor: resposta ao toque, ao aperto da cauda, ao endireitamento e a força para agarrar;
3. Reflexos: Resposta ao estímulo auricular e corneal;
4. Atividades sobre o sistema nervoso central: tremores, convulsões, cauda em straub, sedação e/ou anestesia;
5. Atividade sobre o sistema nervoso autônomo: Observação de lacrimação, cianose, ptose, salivação e/ou piloereção;

Tabela 1. Diretrizes e princípios dos 3 métodos de avaliação de toxicidade oral aguda segundo a OECD.

	Teste de Dose Fixa OECD 420	Toxicidade aguda de classe OECD 423	Teste “Up and down” OECD 425
Dose	Fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg – 5 animais por dose	Fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg – 3 animais por dose	Dose inicial estimada (175 mg/kg) fator de progressão de 3.2 – 1 animal
Princípio	Identificar a menor dose que causa toxicidade evidente	Identificar a menor dose que cause letalidade	Estimar DL ₅₀
Objetivo	1. Estimar a faixa da DL ₅₀ ; 2. Observar os sinais da toxicidade oral aguda; 3. Orgãos-alvo.	1. Faixa estimada da DL ₅₀ ; 2. Sinais de Toxicidade oral aguda; 3. Orgãos-alvo.	1. Faixa estimada da DL ₅₀ ; 2. Sinais de Toxicidade oral aguda; 3. Orgãos-alvo.

OECD: *Organisation for Economic Cooperation and Development*; LD₅₀: Dose letal mediana. Fonte: Adaptado de BOTHAM, 2004.

Tabela 2. Critérios para classificação de substâncias de acordo com o teste de toxicidade oral aguda segundo o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de produtos químicos.

	Extrema	Alta	Moderada	Pouca	Improvável
Toxicidade	Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3	Categoria 4	Categoria 5
Dose em mg/kg	≤ 5	> 5 - 50	> 50 - 300	> 300 - 2000	< 2000 - 5000

Fonte: Adaptada de ANVISA, 2016.

2.3.2 Toxicidade oral a curto prazo

Também abordada como toxicidade por doses repetidas, esse teste tem como objetivo avaliar o perfil de toxicidade da amostra através de administrações consecutivas aos animais por um tempo determinado. A escolha desse tempo é dependente da exposição humana à substância teste, mas usualmente, os protocolos recomendam a administração por 28 ou 90 dias (ANVISA, 2013; OECD, 2008b).

Da mesma forma da toxicidade oral aguda, os animais são monitorados quanto o consumo de água, ração, peso e os sinais clínicos sugeridos por Malone e Robichaud (1962). Também é recomendado que as administrações sejam feitas pontualmente no mesmo horário durante o experimento. Testes de toxicidade oral a curto prazo, devido o tratamento com a amostra ser prolongado, a avaliação toxicológica é mais completa, pois é possível analisar além das alterações fisiológicas e morfológicas, os dados hematológicos, perfil bioquímico e histopatologia, fornecendo informações dos efeitos tóxicos e até identificando seus órgãos-alvo (KOUADIO et al., 2014).

Além disso, os dados observados nesse estudo, devem permitir: a indicação da relação dose-resposta; a determinação da dose de efeitos não observáveis (NOEL); a determinação da dose de efeitos adversos não observáveis (NOAEL) e a administração com menor dose com efeito observado (LOEL) (ANVISA, 2013; OECD, 2008b).

Ainda, a adição do chamado “grupo satélite” ao ensaio, permite verificar se houve efeitos tóxicos tardios, persistentes ou reversíveis. Ao final dos 28 dias de tratamento, os demais grupos são submetidos a eutanásia e análises necessárias são feitas, mas o grupo satélite ainda fica em observação por mais 14 dias, sem tratamento, decorrido esses dias, é

feito a eutanásia, as análises e essas são comparadas também aos anteriores, permitindo a identificação de alguma variação (OECD, 2008b).

2.3.3 Toxicologia genética

A toxicologia genética é o ramo da ciência que estuda os agentes ou substâncias que podem danificar o DNA e os cromossomos da célula. Esses agentes são provenientes da poluição, como efluentes industriais, pesticidas e resultantes da incineração de lixos; da radiação, como exposição a raio-X; endógenos, como óxido nítrico e radicais livre de oxigênio; provenientes da dieta, gerados durante o preparo dos alimentos, e também resultantes dos metabólitos secundários, provenientes do metabolismo das plantas (DA FONSECA; PEREIRA, 2013).

Nesse âmbito, há dois termos que são muito abordados e que frequentemente são confundidos: genotoxicidade e mutagenicidade. A genotoxicidade é um termo usado na genética para descrever uma substância que tem efeito sobre o material da célula (DNA, RNA) afetando a sua integridade. Entretanto, esse efeito pode ser revertido pelos mecanismos existentes que protegem a integridade do genoma como o reparo direto, reparo por excisão de base, reparo por excisão de nucleotídeos, reparo por incompatibilidade e reparo de rupturas de fita única/dupla do DNA (EKER et al., 2009; NAGARATHNA et al., 2013).

Quando esses mecanismos não conseguem reverter o dano e ele é permanente, então a substância é denominada mutagênica. Podendo desenvolver o câncer e outros processos crônicos degenerativos, quando mutam células somáticas e serem herdáveis quando mutam células germinativas. Conclui-se que todo composto mutagênico é genotóxico, mas nem todo composto genotóxico é mutagênico (MAGDOLENOVA et al., 2014).

Existem vários ensaios que são capazes de detectar substâncias que potencialmente podem causar genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade. Esses ensaios podem ser conduzidos com metodologias *in vivo*, como o teste do cometa e do micronúcleo e também *in vitro*, como o teste de Ames e o ensaio do MTS. São amplamente utilizados na pesquisa científica e aceitos/recomendados por agências e corporações governamentais (ANVISA, 2013).

2.3.3.1 Teste de Cometa – Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)

O teste do cometa foi criado por Östling e Johanson em 1984, esta metodologia utilizava-se tampão neutro que permitia a detecção de danos causados somente no DNA de fita dupla, posteriormente, em 1988 Singh e colaboradores adaptaram a metodologia de forma

a utilizar uma solução de tampão com o pH acima de 13 que ampliou a detecção tanto para os danos na fita dupla quanto em fita simples, sítio álcali-lábeis, locais de reparo por excisão e crosslinks (COLLINS, 2014; OECD, 2014a)

Atualmente, o teste do cometa é teste um dos métodos mais rápido, sensível e confiável para avaliação de danos genotóxicos, podendo detectar até os danos mais baixos. Além disso, pode ser utilizada como amostra qualquer tipo de célula eucariótica obtida de sangue animal ou humano, células de hemolinfa de moluscos e insetos, espermatozoides, tecidos animais desagregados, levedura além de núcleos liberados do tecido vegetal. Ainda, é importante ressaltar que os danos analisados pelo cometa ainda são passíveis de correção e o ensaio também é usado em estudos de reparo do DNA (AZQUETA; COLLINS, 2013; MOHAMED et al., 2017).

O princípio do teste consiste em incorporar as células após o tratamento com a amostra na agarose, desnaturá-las, lisá-las e depois submetê-las a eletroforese com o pH alto, dessa maneira, qualquer fragmento de DNA que tenha sido danificado terá um peso menor e sairá da sua posição celular original e migrará junto com a corrente elétrica. Os fragmentos que são transportados pela eletroforese resultam em uma imagem que remete a um cometa, com cabeça e cauda, como pode ser observado na Figura 1, originando assim o termo ensaio do cometa (GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015).

A intensidade da migração, ou seja, o tamanho da cauda formada, refletirá a quantidade de material lesionado. Para visualização utiliza-se microscópios de fluorescência com auxílio de corantes fluorescentes como brometo de etídio, iodeto de propídio e *Syber Green*, ou podem ser analisados em microscopia óptica usando corantes como nitrato de prata ou Giemsa, a Figura 2 demonstra as classes de danos que os cometas podem ser classificados (BÜCKER; CARVALHO; ALVES-GOMES, 2006).

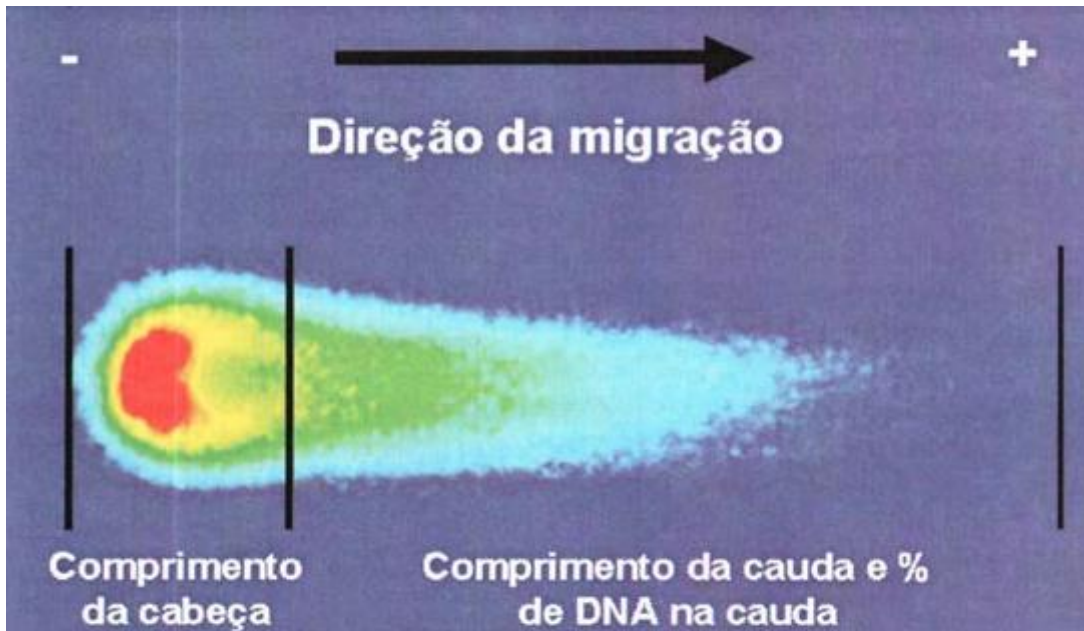


Figura 1 – Estrutura do DNA após corrida eletroforética, similar a um “cometa” com cabeça e comprimento da cauda proporcional ao material lesionado. Fonte: GONTIJO; TICE, 2003.

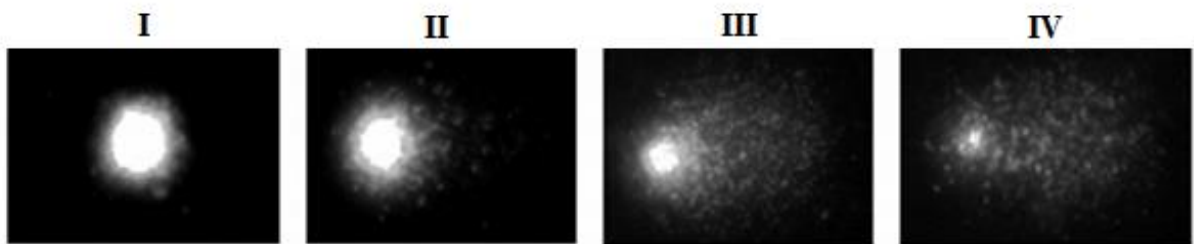


Figura 2 – Classe de danos do DNA, com as 4 categorias que indicam o grau de lesão, sendo I: dano baixo, II: dano médio, 3: dano alto e 4: dano total. Fonte: BÜCKER; CARVALHO; ALVES-GOMES, 2006.

2.3.3.2 Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo foi desenvolvido em 1971 por Schmid e colaboradores e posteriormente foi modificado por Heddle em 1983, é aplicado para avaliação dos agentes mutagênicos e eventualmente para aberrações cromossômicas, possui uma fácil interpretação e tornou-se um dos métodos mais desenvolvidos, sendo recomendado por agências e corporações governamentais para determinação de segurança de produtos (SPONCHIADO et al., 2016).

Os micronúcleos são pequenos núcleos, envoltos por camada nuclear localizados no citoplasma de células na fase de interfase (Figura 3). São formados por fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não se ligaram as fibras do fuso durante o processo de divisão celular e com isso não foram inclusos no núcleo das células filhas, indicando um dano no material celular. Os agentes que causam a sua formação podem ser: aneugênico, quando causam perda/separação ou clastogênicos quando fragmentam os cromossomos (Figura 4) (HEDDLE et al., 1983).

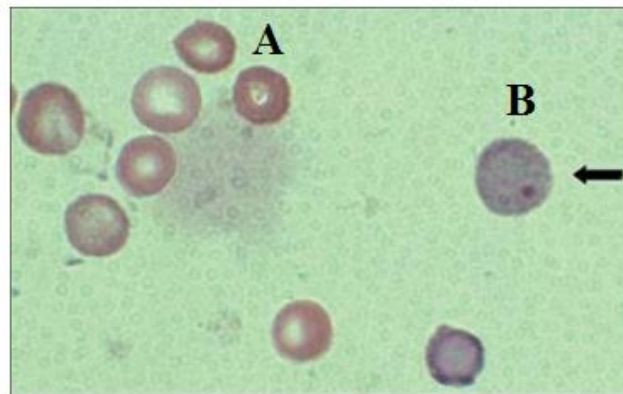
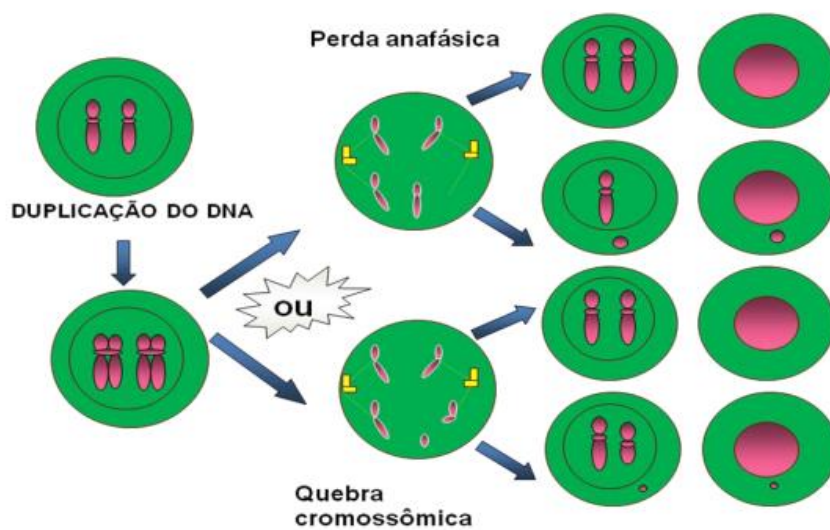


Figura 3- Eritrócitos normocromáticos (A) e policromáticos (B) obtidos da medula óssea de ratos Wistar, a seta indica o eritrócito policromático micronucleado. Fonte: RABBANI; DEVI, 2010.



Mecanismo de formação do Micronúcleo. Por Eneida de Moraes Marcilio Cerqueira

Figura 4 – Formação dos micronúcleos por agentes aneugênicos e clastogênicos.

No teste do micronúcleo, preferencialmente, deve-se utilizar células que estejam em elevadas e constantes taxas de divisão, como os eritrócitos, pois além de apresentarem alta rotatividade, são anucleados e diferenciam-se durante o processo de maturação celular em eritrócito policromático (EPC – eritrócito jovem, RNA positivo com presença do ribossomo) e normocromático (ENC – eritrócito maduro, RNA ausente e presença de hemoglobina). Após o processo de preparação e coloração das lâminas, é possível verificar a diferença entre eles como observado na Figura 5, permitindo avaliar se os micronúcleos formados são nas células jovens produzidas após o início do tratamento com a amostra ou nas células maduras que provavelmente foram produzidas antes do tratamento (RIBEIRO; SALVADORI; ARQUES, 2003).

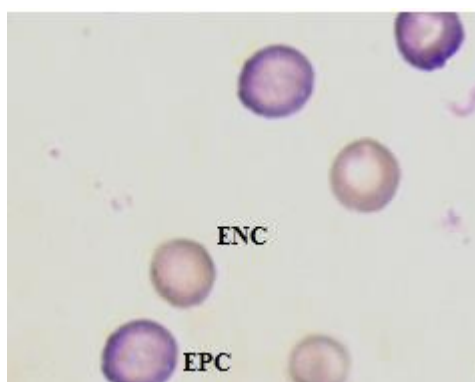


Figura 5 – Eritrócito policromático (EPC) e eritrócitos normocromático (ENC). Fonte: Adaptado de ALMEIDA, 2012.

Para análise dos resultados é feito uma contagem de 2000 células policromáticas verificando a frequência dos micronúcleos, a simples interpretação dos resultados é uma das vantagens do ensaio, além de ser financeiramente econômico, pode ser feita *in vitro* e *in vivo* e também permite avaliar a citotoxicidade (ARALDI et al., 2015)

2.3.3.3 Teste de Ames

Este método é um teste *in vitro* e utiliza linhagens de *Salmonella* Typhimurium, auxotróficas para histidina, que apresenta diferentes mutações no operon desse aminoácido, o que as torna incapazes de crescer na ausência do mesmo. O ensaio também pode ser encontrado como “Ensaio de reversão” pois, as novas mutações no local dessas mutações pré-existentes, ou nas proximidades dos genes, que acontecerá no caso da amostra ser mutagênica, podem restaurar a função do gene e permitir que as células sintetizem histidina e então estas

células recém-mutadas podem crescer na ausência de histidina e formar colônias (MARON e AMES, 1983).

Para ampliar a detecção do teste, adiciona-se ao mesmo o que é chamado de “fração S9” que são enzimas de metabolização provenientes de células do fígado de rato. A adição dessa fração permite identificar também os mutágenos de ação indireta, ou seja, os que serão mutagênicos após sua metabolização, além disso, há um controle negativo, que é geralmente o diluente da amostra e um controle positivo, um mutágeno conhecido, para dar mais confiabilidade ao teste (MARON E AMES, 1983).

As linhagens de *Salmonella* Typhimurium utilizadas nesse teste são derivadas da parental LT2 e são capazes de detectar dois tipos de mutação: deslocamento no quadro de leitura ou *frameshift* (Figura 6) e substituição por pares de base (Figura 7). Além disso, há mutações adicionais nessas linhagens que conferem maior sensibilidade ao teste e permite a confirmação dos seus genótipos (Tabela 3) (AMES; LEE; DURSTON, 1973).

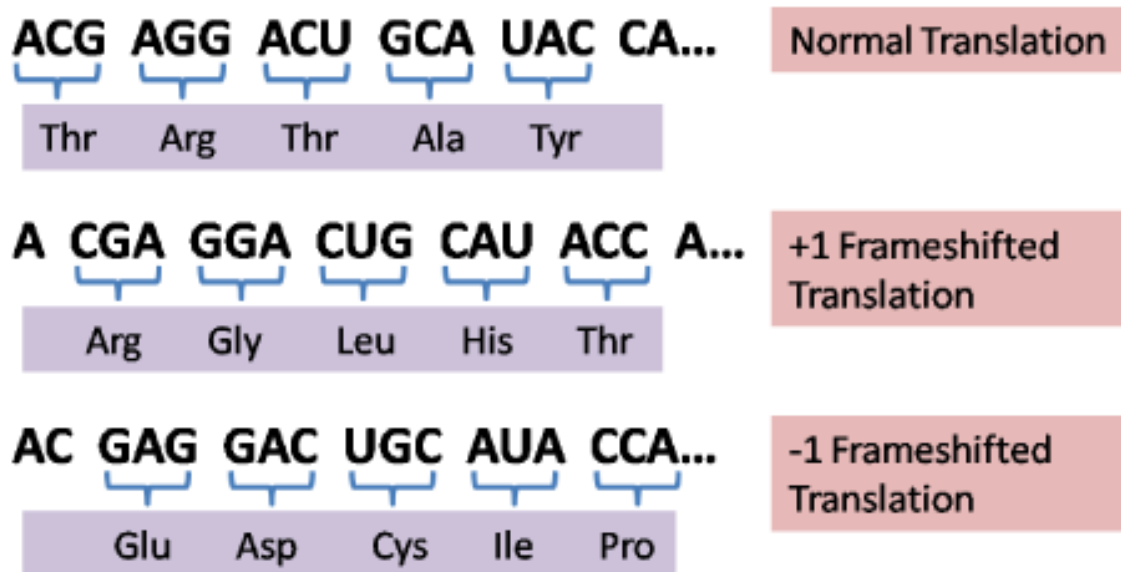


Figura 6 – Mutação do tipo deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*). Fonte: www.esciencecentral.org.

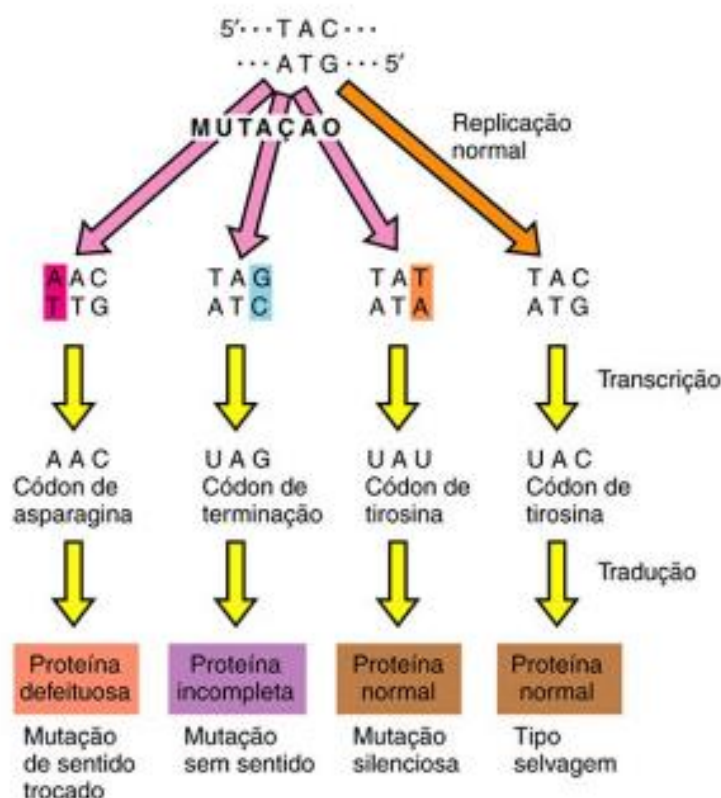


Figura 7 – Mutação do tipo substituição de pares de base. Fonte: www.slideplayer.com.br.

Tabela 3. Características e mutações adicionais das linhagens de *S. Typhimurium* utilizadas no teste de Ames.

Linhagem	Tipo de mutação	Mutação na parede celular	Plasmídeo
TA 97	Deslocamento do quadro de leitura (<i>frameshift</i>)	rfa	pKM101
TA 98	Deslocamento do quadro de leitura (<i>frameshift</i>)	rfa	pKM101
TA 100	Substituição de par de base	rfa	pKM101
TA 102	Substituição de par de base	rfa	pKM101 e pAQ1
TA 1535	Substituição de par de base	rfa	-
TA 1537	Deslocamento do quadro de leitura (<i>frameshift</i>)	rfa	-
TA 1538	Deslocamento do quadro de leitura (<i>frameshift</i>)	rfa	-

Rfa: mutações que causam deformidade na camada de lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular bacteriana, tornando-a mais permeável. pKM101: plasmídeo que aumenta o sistema de reparo do tipo *error-prone* e confere resistência a ampicilina. pAQ1: plasmídeo que amplia o número de sítios específicos para a mutagênese e confere resistência a tetraciclina.

Atualmente o teste de Ames é o teste *in vitro* amplamente reconhecido e indicado, fazendo parte de recomendações de grandes órgãos e corporações, como a ANVISA, OECD, SBMCTA, além disso, para um *screening* mutagênico as linhagens TA98 e TA100 com e sem ativação metabólica são as indicadas para testes preliminares, pois possuem capacidade de detectar grande parte dos agentes mutagênicos, já para testes gerais de mutagenicidade, deve-se utilizar também as linhagens TA97 e TA1537 e, quando necessário a linhagem TA1535 ou TA102 (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

2.4 Citotoxicidade e o Ensaio do MTS

Um composto é considerado potencialmente citotóxico quando pode induzir a morte celular ou apresentar efeitos negativos nas funções celulares (RISS; MORAVEC; NILES, 2011). As células podem responder de duas formas a um efeito tóxico: reversivelmente, quando é privada de nutrientes e fatores de crescimento ou irreversivelmente, quando as células se diferenciam, entram em apoptose ou senescência (FRESHNEY, 2001). Na avaliação da citotoxicidade, pode-se utilizar diferentes parâmetros, geralmente os ensaios que testam essa atividade, examinam *endpoints* que podem indicar: alteração morfológica e replicação das células, colapso da barreira de permeabilidade celular, efeitos nas membranas celulares das organelas e função mitocondrial reduzida (HODSGSON et al., 2004).

O ensaio MTS é um exemplo de teste que pode ser aplicado para avaliar a citotoxicidade, detecta somente células vivas e o sinal gerado é dependente do grau de ativação dessas células. O método tem como base um processo químico que pode ser observado na Figura 8. As células que estão vivas vão utilizar o MTS, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, um sal solúvel em água de coloração amarela, como substrato e vão reduzi-lo através da clivagem do anel pela atividade de desidrogenases mitocondriais, presentes e funcionais exclusivamente nas células vivas, a um produto de cor roxa e insolúvel em água, o sal formazan 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan. Desta forma, pode-se através da mudança de cor, visualizar as células metabolicamente ativas e viabilidade das amostras são mensuradas via espectrofotometria pelo leitor de ELISA (VELLONEN; HONKAKOSKI; URTTI, 2004).

. É um teste amplamente aplicado e um dos mais sensíveis quanto a exposição das células a substâncias tóxicas. É colorimétrico, e como característica dos mesmos, são rápidos e precisos (RISS et al., 2016). Além disso, possibilita empregar diferentes tipos de linhagens com características exclusivas, que permitem verificar a seletividade da amostra. Por exemplo, a utilização das linhagens HeLa e SiHa permitem verificar se a amostra possui

seletividade para células tumorais, já a linhagem Vero, obtidas do tecido epitelial dos rins de macacos, permite avaliar se há a ação sobre células saudáveis (BARBOSA et al., 2015).



Figura 8 – Redução química e colorimétrica do sal tetrazólio MTS em Formazan.

3 OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do extrato aquoso da semente de *Aleurites moluccana* (EASAM) em modelos *in vitro* e *in vivo*.

ESPECÍFICOS

- Realizar o *screening* fitoquímico do EASAM;
- Estimar a DL_{50} do EASAM através da metodologia de toxicidade oral aguda “*Up-and-Down Procedure*”;
- Avaliar o potencial tóxico sistêmico do EASAM através da metodologia de toxicidade oral por doses repetidas durante 28 dias, através dos parâmetros comportamentais, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos;
- Avaliar o potencial mutagênico *in vitro* e *in vivo* do EASAM através do Teste de Ames e Teste de Micronúcleo, respectivamente;
- Avaliar o potencial genotóxico *in vivo* do EASAM através do Teste do Cometa;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do EASAM através do Teste de Redução do MTS com as células HeLa, SiHa e VERO.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M.R. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade e expressão dos genes Tp53 e Ephx2 em ratos tratados com Caryocar villosum**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

AMES B.N; LEE F.D; DURSTON W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 70, p. 782–786, 1973.

Agência Nacional De Vigilância Sanitária - ANVISA. Dispõe sobre os critérios para classificação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira e para comparação da ação tóxica de agrotóxicos e afins no âmbito da Anvisa. Brasília, 10 de outubro de 2016.

Agência Nacional De Vigilância Sanitária - ANVISA. Dispõe sobre proibição do uso e venda de produtos que contenham noz da Índia e Chapéu de Napoleão utilizados para emagrecer, sementes são tóxicas e não têm registro na Agência. Brasília, 07 de fevereiro de 2017.

Agência Nacional De Vigilância Sanitária - ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 31 de janeiro de 2013.

ARALDI R.P.; MELO, T.C.; MENDES, T.B; JÚNIOR, P.L.S; NAKANONAZIMA, B.H.; ITO, E.T; CARVALHO, R.F.; SOUZA, E.B; STOCCO, R.C. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74-82, 2015.

AZQUETA, A.; COLLINS, A.R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 6, p. 949-968, 2013.

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

BARBOSA, B.S.; SANTOS, F.A.; PIMENTEL, M.M.L.; FERNANDES, D.P.; PREXEDES, E.A.; BEZERRA, M.B. Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.9, n.2, p. 334-347, 2015.

BÜCKER A.; CARVALHO W.; ALVES-GOMES J.A. Avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) exposto a benzeno. **Acta Amazônica**, v. 36, p. 357-364, 2006.

CAMPOS, S.C.; SILVA, C.G.; CAMPANA, P.R.; ALMEIDA, V.L. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.18, n.1, p.373-382, 2016.

CESCA T.G.; FAQUETI L.G.; ROCHA L.W.; MEIRA, N.A.; MEYRE-SILVA, C.; DE SOUZA, M.M.; QUINTÃO N.L.M.; SILVA R.M.L.; CECHINEL-FILHO, T.M.B. Bresolin Antinociceptive, anti-inflammatory and wound healing features in animal models treated with a semisolid herbal medicine based on *Aleurites moluccana* L. Willd. Euforbiaceae

standardized leaf extract Semisolid Herbal. **Journal of ethnopharmacology**, v. 143, p. 355-362, 2012.

BRASIL, Centro Integrado de Vigilância Toxicológica (CIVITOX). **Intoxicação pelo uso da noz da Índia**. Disponível em: <http://www.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/sites/88/2016/02/Nota-T%C3%A9cnica-001_2016_Noz-da-India.pdf>. Acesso em 15/11/2018. Mato Grosso do Sul, 2016.

COLLINS, A.; KOPPEN, G.; VALDIGLESIAS, V.; DUSINSKA M.; KRUSZEWSKI, M.; MØLLER, P.; ROJAS,E.; DHAWAN, A.; BENZIE, I.; COSKUN, E.; MORETTI, M.; SPEIT G.; BONASSI, S. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 759, n. 1, p. 27–39, 2014.

CRETON, S.; DEWHURST, I.C; EARL, L.K.; GEHEN, S.C.; GUEST, R.L.; HOTCHKISS, J.A.; INDANS, I.; WOOLHISER, M.I.; BILLINGTON, R. Acute toxicity testing of chemicals – Opportunities to avoid redundant testing and use alternative approaches. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 50-83, 2010.

DA FONSECA, C.A.; PEREIRA, D.G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 16, n. 7/8, p. 51-54, 2013.

DE OLIVEIRA-JÚNIOR, Raimundo Gonçalves et al. Antibacterial activity of terpenoids isolated from *Cnidioscolus quercifolius* Pohl (Euphorbiaceae), a Brazilian medicinal plant from Caatinga biome. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 24, p. 30-34, 2018.

DENNY, K.H.; STEWART, C.W. Acute, Sub-acute, Sub-Chronic and Chronic General Toxicity Testing for Preclinical Drug Development. **A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development**, v.1, p. 87-104, 2013.

EKER, A.P.M.; QUAYLE, C.; CHAVES, I.; VAN DER HORST, G.T.J. DNA repair in mammalian cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 6, p. 968–980, 2009.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Pharmacology**. v.4, n.177, 2014.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMA. Guidelines on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with medicinal products. Amstedã – Holanda, 2009.

FRESHNEY, I. Application of cell cultures to toxicology. **Cell Biology and Toxicology**, v.17, p. 213-230, 2001.

GONTIJO, A.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. **Mutagênese ambiental**, p. 173-200, 2003.

GUIDELINE, I. M. Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. ICH M3 (R2). In: **International Conference on Harmonization**, p. 303-312, 2008.

GUNASEKARANA, V.; RAJ, G.V.; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 9, n. 3, p. GE01, 2015.

HEDDLE, J.A. HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J.T.; NEWELL, G.W.; SALAMONE, M.F. A report os the environmental protection agency genotox program, **Mutation Research**, v. 123, p. 61-118, 1983.

HEYNE, K. Tumbuhan berguna indonesia. **Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Departemen Kehutanan**, v. 2, p. 1188-1189, 1987.

HODGSON, E.; LEBRANC, G.A.; MEYERS, S.A.; SMART, R.C. Introduction to Biochemical and Molecular Methods in Toxicology. In: HODGSON E (Ed.). **A textbook of modern toxicology**. 3 edition. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004, p. 13-22.

HOEPERS, S.M.; SOUZA, H.G.M.T; QUINTÃO, N.L.M.; SANTIN, J.R.; CECHINEL-FILHO, V.; SILVA, R.M.L.; COUTO, A.G.; SILVA, K.A.B.S. Topical anti-inflammatory activity of semisolid containing standardized *Aleurites moluccana* L. WILLD (EUPHORBIACEAE) leaves extract. **Journal of ethnopharmacology**, v. 173, p. 251-255, 2015.

KOUADIO J.H.; BLEYERE M.N.; KONE M.; DANO S.D. Acute and sub-acute toxicity of aqueous extract of *Nauclea latifolia* in Swiss mice and in OFA rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, vol. 13, no. 1, pp. 109–115, 2014.

MAGDOLENOVA, Z.; COLLINS, A.; KUMAR, A.; DHAWAN, A.; STONE, V.; DUSINSKA, M. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 3, p. 233-278, 2014.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C.A Hippocratic screen for pure or crude drugs materials. **Llordya**. v.25, n.4, p.320-331, 1962.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173 – 215, 1983.

MAVUNDZA, E. et al. Phytochemical screening of four South African poisonous medicinal plants of the family Euphorbiaceae. **South African Journal of Botany**, v. 115, p. 322, 2018.

MOHAMED, S.A.K.S.; UPRETI, S., RAJENDRA, S.V.; DANG, R. Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods. **Global journal of Pharmacy & pharmaceutical Science**, v. 1, n. 5, p. 1–6, 2017.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29 – 60, 2000.

NAGARATHNA, P.K.M.; WESLEY, M.J.; REDDY, P.S.; REENA, K. Review on genotoxicity, its molecular mechanisms and prevention. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 22, n. 1, p. 236–243, 2013.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.S.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N; CECHINEL-FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: Bresolin TMB, Cechinel Filho V. (org.) **Ciências**

Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Ed. Univali, p.10-56, 2003.

NUGENT, P.; DUNCAN, J.N.; COLAGIOVANNI, D. B. The Preparation of a Preclinical Dossier to Support an Investigational New Drug (IND) Application and First-in-Human Clinical Trial. *In* Faqi, A. S. **A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development.** 1ª Edição, Editora Elsevir, 2013, p 318-333.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents, Paris, 2008b.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. Guideline for Testing of Chemicals. Guideline 401: Acute Oral Toxicity. Paris, 1987.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Guideline 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. Paris, 2001a.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris, 2001b.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. Paris, 2008a.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. Report of the OECD expert meeting on the physical chemical properties of manufactured nanomaterials and test guidelines. No. 489, Paris, 2014a.

QUINTÃO, N. L. M.; MEYRE-SILVA, C.; SILVA, G. F.; ANTONIALLI, C. S.; ROCHA, L. W.; LUCINDA-SILVA, R. M.; MALHEIROS, A.; SOUZA, M. M.; CECHINEL-FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. B. *Aleurites moluccana* (L.) Willd. Leaves: Mechanical Antinociceptive Properties Of a Standardized Dried Extract And Its Chemical Markers. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine.** v. 2011, p. 10, 2011.

RABBANI, S.I.; DEVI, K.; KHANAM, S. Protective role of glibenclamide against nicotinamide-streptozotocin induced nuclear damage in diabetic Wistar rats. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 1, n. 1, p. 18, 2010.

RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F.; ARQUES, E.K. **Mutagênese ambiental.** Canoas: ed.ULBRA, 2003.

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.L. Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. *In*: **Mammalian Cell Viability.** Humana Press, 2011. p. 103-114.

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H.A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. Assay Guidance Manual. 2016.

SILVA, E.R.; DIEDRICH, D.; BOLZAN, R.C.; GIACOMELLI, S.R. Toxicological and pharmacological evaluation of *Discaria Americana* Gillies & Hook (Rhamnaceae) in mice. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.48, n.2, 2012.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS - SINTOX – Dados de Intoxicação – Dados Nacionais. Fiocruz – Brasil, 2016.

SOUSA-BARBOSA, B.; SANTOS, F.A.; PIMENTEL, M.M.L.; FERNANDES, D.P.; PREXEDES, E. A.; BEZERRA, M.B. Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, n. 2, p. 334-347, 2015.

SPONCHIADO, G.; ADAM, M.L.; SILVA, C.D.; SOLEY, B.S.; MELLO-SAMPAYO, C.; CABRINI, D.A, CORRER, C.J; OTUKI, M.F. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 178, p. 289-296, 2016.

VELLONEN, K.S.; HONKAKOSKI, P.; URTTI, A. Substrates and inhibitors of efflux protein interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v.23, p. 181-188, 2004.

5 APÊNDICES

5.1 Manuscrito I: *Aleurites moluccana* (L.) Willd.: características gerais, farmacológicas e fitoquímicas – Submetido a revista: Evidência – Ciência e Biotecnologia.

(Qualis B4 na área de Medicina II)

Link com as normas da revista:

<https://portalperiodicos.unoesc.edu.br/evidencia/about/submissions>

Aleurites moluccana (L.) Willd.: características gerais, farmacológicas e fitoquímicas

Pamella Fukuda de Castilho¹; Fabiana Gomes da Silva Dantas²; Kelly Mari Pires de Oliveira³

¹Mestranda em Ciências da Saúde pela Universidade Federal da Grande Dourados; Graduada em Biotecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados. Rodovia Dourados, Itahum Km 12, Cidade Universitária, Caixa Postal 364, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. E-mail: pamellafcastilho@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5723-0507>

²Doutora em Ciências da Saúde pela Universidade Federal da Grande Dourados; Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal da Grande Dourados. Rodovia Dourados, Itahum Km 12, Cidade Universitária, Caixa Postal 364, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. E-mail: fabi.bio@hotmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1651-9213>

³Doutora em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina e Universidade do Minho, Portugal; Mestre em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Dourados, Itahum Km 12, Cidade Universitária, Caixa Postal 364, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. E-mail: kpmoliveira@hotmail.com *Autor correspondente. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9897-7770>

Resumo

Aleurites moluccana, pertencente a família Euphorbiaceae que é uma das famílias mais abundantes e heterogêneas dentro das angiospermas, tendo destaque tanto na economia, quanto na ornamentação e na alimentação. *A. moluccana* é natural da Indo-Malásia, mas se introduziu em diversos países e no Brasil adaptou-se bem ao sul e ao sudoeste. É conhecida popularmente por diversos nomes, como: “Castanha Purgativa”, “Castenheira”, “Nogueira da Índia” e “noz da Índia”. Quanto a sua morfologia, é considerada uma árvore de porte médio e contém um fruto com

sementes grandes de aspecto áspero e oleoso. Seu clima favorável é o tropical, no entanto, se desenvolve também em regiões subtropicais e até mesmo secas, quanto ao solo é capaz de se estabelecer em solos barrosos, areia, encostas e até barrancos. A adaptação dessa planta a diversas condições é uma das explicações da sua ampla distribuição geográfica. *A. moluccana* teve uma vasta exploração e todas suas partes como as folhas, cascas, tronco, seiva, sementes são tradicionalmente utilizadas para diversos fins: alimentação, ornamentação, habitação. Além disso, uma área que *A. moluccana* tem grande destaque é na medicina popular. São múltiplos os relatos sobre seu potencial medicamentoso, como no tratamento de úlceras, conjuntivite, inflamação, cicatrização e analgésica. Devido a esse potencial relatado, essa planta tem se tornado objetivo de estudos sobre seus componentes químicos a fim de encontrar esses metabólitos secundários que possuem essas atividades farmacológicas.

Palavras-chave: Noz da Índia. Plantas medicinais. Atividades biológicas.

Aleurites moluccana (L.) Willd.: **General characteristics, pharmacology and phytochemical.**

Abstract

Aleurites moluccana, belonging to the Euphorbiaceae family, is one of the most abundant and heterogeneous families within the angiosperms, with emphasis on the economy, as well as on ornamentation and food. *A. moluccana* is native to Indo-Malaysia but has been introduced in several countries and in Brazil it has adapted well to the south and south-west. It is popularly known by several names, such as: “Castanha Purgativa”, “Castenheira”, “Nogueira da Índia” and “noz da Índia”. As for its morphology, it is considered a medium sized tree and contains a fruit with large seeds of rough and oily aspect. Its favorable climate is tropical, however, it also develops in subtropical and even dry regions, as the soil is able to settle in muds, sand, slopes and even ravines. The adaptation of this plant to various conditions is one of the explanations of its wide geographical distribution. *A. moluccana* had a vast exploration and all its parts such as leaves, bark, trunk, sap, seeds are traditionally used for various purposes: food, ornamentation, housing. In addition, an area that *A. moluccana* has great prominence is in folk medicine. There are multiple reports about

its drug potential, as in the treatment of ulcers, conjunctivitis, inflammation, cicatrization and analgesic. Due to this reported potential, this plant has become the objective of studies on its chemical components in order to find these secondary metabolites that have these pharmacological activities.

Keywords: *Noz da Índia. Medicinal plants. Biological activities.*

1 Introdução

Os recursos disponíveis aos homens que viveram séculos atrás eram provenientes da natureza, com a exploração e os conhecimentos empíricos as plantas começaram a ser utilizadas como matéria prima na produção de roupas, ferramentas, na alimentação e como fonte terapêutica, a fim de melhorar a qualidade de vida¹. Com o passar dos anos e com os avanços tecnológicos e científicos, essas plantas tornaram-se fonte de estudos, e quando possível, produtos ou subprodutos para diversos fins como farmacêuticos e alimentícios, contribuindo positivamente para população.

Em meio a esse âmbito, a família Euphorbiaceae é uma das principais família da flora brasileira, contém diversos compostos biologicamente ativos, como: flavonoides, saponinas, terpenos, ésteres e alcaloides, tornando-a fonte de estudos. Dentro dessa família encontra-se a *Aleurites moluccana*, uma planta de porte médio, natural da Indo-Malásia, bem aclimatizada em regiões tropicais, largamente explorada e utilizada tradicionalmente na alimentação, ornamentação e habitação².

No uso medicinal, *A. moluccana* popularmente já foi descrita para diversas doenças: úlceras, asma, conjuntivite, gonorreia, inflamação, entre outros, e cientificamente, destacam-se as partes aéreas, sendo comprovada a atividade anti-inflamatória, antitumoral, antivirais, antibacteriana, analgésica e para cicatrização de feridas^{3; 4; 5}.

Tendo em vista os estudos que já foram desenvolvidos com a *Aleurites moluccana* e as informações apresentadas pelos mesmos, a presente revisão tem como intuito reunir os aspectos gerais, farmacológicos e fitoquímicos de *A. moluccana*, tornando-se uma fonte de informações sobre essa planta.

2 Metodologia

O presente trabalho foi elaborado após um levantamento bibliográfico de artigos e revisões científicas publicadas nos idiomas de português ou inglês disponíveis nas seguintes bases de dados: PubMed, SciELO, ScienceDirect, e Scopus. As palavras-chave utilizadas foram: Euphorbiaceae, *Aleurites moluccana*, Noz da Índia, Plantas medicinais, Medicinal Plants. E os artigos contendo informações sobre *Aleurites moluccana* e a família Euphorbiaceae foram incluídos.

3 Família Euphorbiaceae

Descrita por Antoine Laurent Jussieu em 1824, a família Euphorbiaceae inclui aproximadamente 334 gêneros e 8000 espécies, no Brasil, existem em torno de 72 gêneros e 1.100 espécies e é considerada uma das principais famílias da flora brasileira⁶. Morfologicamente, apresentam variedade e complexidade, sendo encontradas como árvores, arbustos, ervas ou trepadeiras. Suas folhas podem ser alternas inteiras ou partidas. Possuem flores unissexuais, com inflorescências com vários graus de desenvolvimento, mas, comumente se apresentam do tipo ciátio⁶. O fruto é esquizocarpo, geralmente tricocos que se desenvolvem em sementes ricas em endosperma que na maioria das vezes são oleaginosos. É a única família a apresentar algumas espécies com a combinação de glândulas e látex e algumas sementes foram descritas como irritantes ao homem, podendo causar intoxicação pela sua ingestão (*Aleurites moluccana* e *Joannesia princeps*) e o látex ser corrosivo em contato com mucosas, principalmente dos olhos⁶.

Possui grande destaque na economia. Uma espécie nativa da Amazônia, *Hevea brasiliensis* (Figura 1A), conhecida como seringueira, é responsável por um de nossos ciclos econômicos. É a maior fonte de borracha natural e também é utilizada no transporte, indústria e material bélico⁷. *Manihot esculenta*, a mandioca, é rica em amido e possui uma raiz completa em termos nutricionais, sendo utilizada como base da alimentação brasileira e aplicada como suplemento para crianças com desnutrição e ainda é um subproduto de fácil acesso, baixo custo e tolerante a seca⁸. A família também movimenta uma grande quantia de dinheiro quando se trata do mercado de plantas ornamentais, devido a beleza das brácteas ou folhas, como por exemplo *Euphorbia pulcherrima* (Figura 1B), conhecida como bico-de-papagaio, de coloração verde e vermelha, símbolo no natal e a *Euphorbia milii* (Figura 1C),

popularmente chamada de coroa-de-cristo, de coloração rosa, vermelha, branca ou amarela que são cultivadas como cercas vivas⁶.

Além disso, estudos dos componentes da família revelaram a presença de variados compostos químicos biologicamente ativos: flavonoides, saponinas, terpenos, ésteres, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, taninos, lecitinas e glicoproteínas^{9; 10}. Essa variedade na composição química permite que a espécie seja detentora de diversas aplicações, uma das aplicações derivadas desses componentes são os óleos, que tem aplicações na indústrias de cosméticos, papeis, tecidos, perfumes, tintas, plásticos, sabões ou como lubrificantes de motores de alta rotação e turbinadas de aviões à jato⁶. Outra, é na medicina popular, sendo as Euphorbiaceae aplicadas em diversas enfermidades: diabetes, úlceras, diarreia, malária, febre, problemas estomacais, inflamações do fígado, rins e vesícula, câncer, colesterol, além do uso como cicatrizante, tônica, sedativa e ansiolítica^{11; 12}.

Entretanto, estudos encontrados na literatura alertam para o potencial tóxico que os constituintes dessa família podem apresentar, demonstrando que apesar das inúmeras utilidades que a planta possui no uso tradicional é necessário certificar-se sobre sua segurança biológica. As proteínas obtidas das sementes de *Croton tiglium* demonstraram potencial tóxico e atividade pró-inflamatória⁸ e o extrato aquoso de sementes de *Aleurites moluccana* apresentaram toxicidade oral aguda em ensaios *in vivo*¹³. Estes estudos, alertam sobre a utilização dos produtos naturais sem conhecimento da sua segurança.

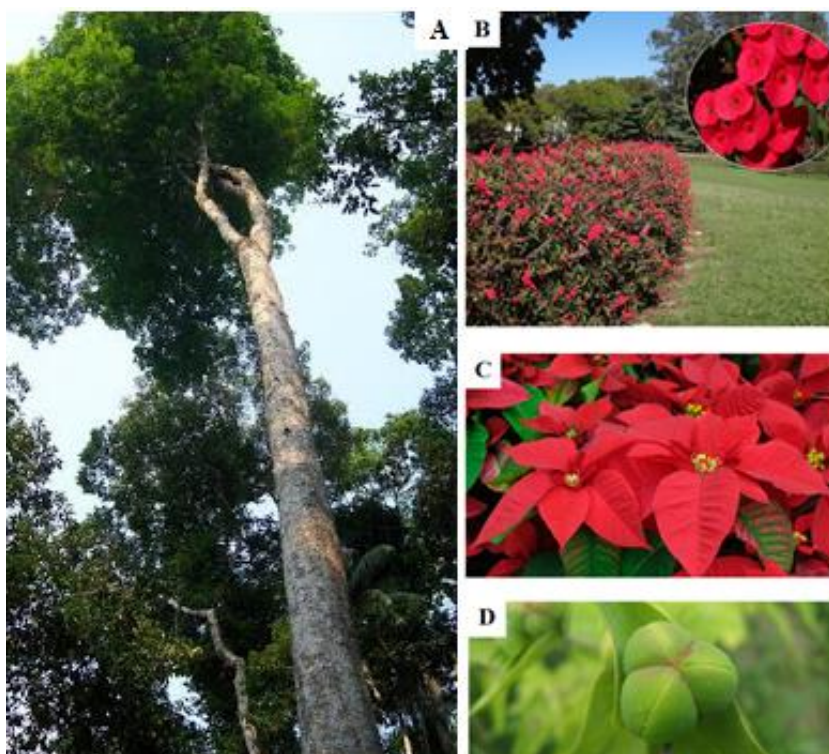


Figura 1. Imagem ilustrativa de plantas da família Euphorbiaceae. **A:** *Hevea brasiliensis* (Fonte: www.ruralcentro.com.br); **B:** *Euphorbia milii* (Fonte: www.verdesdovale.com.br); **C:** *Euphorbia pulcherrima* (Fonte: www.plantasornamentais.com); **D:** Fruto tricoco (Fonte: www.botanicayjardines.com).

4 *Aleurites moluccana* (L). Willd.

4.1 Características gerais

O gênero *Aleurites* possui 24 espécies: *A. ambinux*, *A. angustifolia*, *A. commutata*, *A. cordata*, *A. cordifolia*, *A. erratica*, *A. fordii*, *A. integrifolia*, *A. japonica*, *A. javanica*, *A. laccifera*, *A. lanceolata*, *A. lobata*, *A. moluccana*, *A. montana*, *A. peltata*, *A. pentaphylla*, *A. remyi*, *A. rockinghamensis*, *A. saponaria*, *A. triloba*, *A. trisperma*, *A. vernicia* e *A. verniciflua* que podem ser encontradas nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Pacífico e América do Sul, entre elas, está *Aleurites moluccana*. Descrita por Carlos Linneo e Carl Ludwig Willdenow em 1805, é popularmente conhecida como “Castanha Purgativa”, “Castanheira”, “Cróton das Moluscas”, “Nogueira”, “Nogueira Americana”, “Nogueira-brasileira”, “Nogueira Bancul”, “Nogueira Iguapé”, “Nogueira da Índia”, “Nogueira Litoral”, “Nogueira da Praia”, “Noz Candeia”, “noz da Índia”, “Noz das Moluscas”, “Pinhão das Moluscas” e “Saboneteira”¹⁴.

É uma árvore considerada de porte médio (Figura 2A), atingindo aproximadamente 20 metros de altura, apresenta uma casca de cor castanha-acizentada, folhas simples, alternadas e dispostas espiraladamente com uma cor branco-pulvurulenta quando jovem e verde quando adulta¹⁵. Possui flores pequenas, de coloração branca que se organizam em forma de panícula nas extremidades dos ramos (Figura 2B), enquanto os frutos podem medir entre 5 e 6 cm de comprimento, são semi-lenhosos em cápsula ovóide contendo duas sementes grandes de aspecto áspero e oleoso, envoltas por uma polpa carnosa (Figura 2C), são polinizadas por abelhas e a dispersão das sementes é feita por animais (zoocórica)¹⁴.

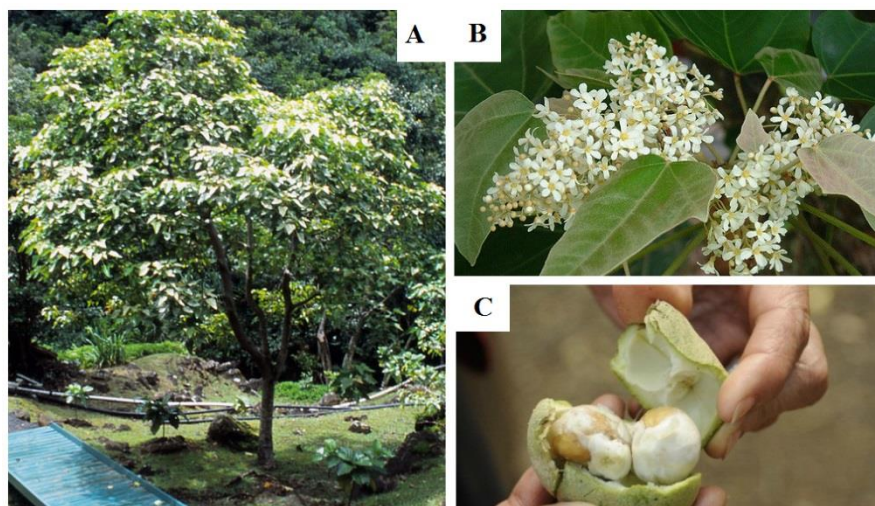


Figura 2. Imagem ilustrativa de *A. moluccana*. **A:** Árvore (Fonte: www.floridata.com); **B:** flores (Fonte: www.staticflickr.com); **C:** Fruto e sementes (Fonte: www.tanglewoodconservatories.com).

4.2 Distribuição geográfica e características edáfico-climáticas

A. moluccana é natural da Indo-Malásia, incluindo: Brunei, Camboja, China, Ilhas Cook, Fiji, Polinésia Francesa, Indonésia, Kiribati, Laos, Malásia, Ilhas Marshall, Myanmar, Nova Caledônia, Ilha Norfolk, Papua Nova Guiné, Filipinas, Samoa Ilhas Salomão, Tailândia, Tonga, Vanuatu e Vietnã. A espécie se introduziu com sucesso em diversos países, como: Antigua, Barbuda, Bahamas, Bangladesh, Barbados, Brasil, Cuba, República Dominicana, Granada, Guadalupe, Haiti, Índia, Jamaica, Japão, Quênia, Martinica, Montserrat, Antilhas Holandesas, Porto Rico, Sri Lanka, São Cristóvão e Névis, Santa Lúcia, São Vicente e Granadinas, Trinidad e Tobago, Uganda, Estados Unidos, destacando-se em regiões tropicais e subtropicais do globo, como pode-se observar na Figura 3¹⁶.



Figura 3. Distribuição geográfica de *A. moluccana* nas regiões tropicais e subtropicais representada pela cor verde. Fonte: Missouri Botanical Garden, 2013.

No Brasil, foi descrita como a primeira de sua espécie a ser cultivada, tornando-se bem adaptada ao sul e sudoeste. Além disso, é considerada uma espécie exótica invasora em território brasileiro, se sobressaindo diante as espécies nativas¹⁷. Quanto ao clima, *A. moluccana* tornou-se bem aclimatada nas regiões tropicais, mas também se desenvolve em regiões subtropicais e até mesmo regiões secas, prospera em regiões úmidas de até 1200 m acima do nível do mar. A precipitação anual varia de 640 a 4290 mm com uma média de 1940 mm e a temperatura entre 18°C e 28°C¹⁸. É adepta a variedades de solos, incluindo barro vermelho, terra de barro pedregoso, areia e calcário, podendo ser relativamente ácido a alcalinos com um intervalo de pH de 5 a 8. Ademais, possui capacidade de crescer em encostas e até barrancos íngremes¹⁶. Toda essa flexibilidade a temperatura, solo e clima contribuem para a ampla distribuição geográfica de *A. moluccana*.

4.3 Uso popular

A. moluccana é uma planta que teve uma ampla exploração e todas suas partes são tradicionalmente utilizadas: folhas, caule, cascas, seiva, óleo, flores e raízes, e todas elas se aplicam a diversas áreas, como na alimentação, ornamentação, habitação, composição de corantes, entre outros². Segundo autores¹⁶ a casca é utilizada na preservação de redes de pesca e no curtume, enquanto a madeira como um substrato eficaz para o cultivo de cogumelos e também como combustível, ou para fazer flutuadores/canoas de curta duração, já a seiva é utilizada para impermeabilizar superfícies e as folhas para compor guirlandas.

No entanto, um grande destaque que *A. moluccana* possui, é na medicina popular. Suas partes como casca e folhas principalmente, são preparadas através de infusões ou decocção e são utilizadas no tratamento de úlceras, febre, dor de cabeça, asma, conjuntivite, gonorreia, inflamação, hepatite, hiperlipidêmica, reumatismo, tratamento de tumores, intoxicações alimentares, antivirais, antibacteriana, gastroprotetora, analgésica, febre tifoide, diarreia sangrenta,

disenteria, cicatrização de feridas, erupções na pele, para sangramento interno e pós parto além da capacidade laxativa e sudorífera^{19; 3; 4; 17; 5.}

Outra parte utilizada popularmente como fonte de emagrecimento são as sementes de *A. moluccana*, também conhecidas como “noz da Índia”. A indicação popular é consumir a semente na sua forma *in natura*, partindo primeiro 1 semente em 8 pedaços e consumindo 1 pedaço por dia, depois, outra semente em 4 pedaços e consumindo em 4 dias e assim sucessivamente até obter a perda de peso desejável. Porém, em 2017 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu o consumo e comercialização da semente após evidências de toxicidade e óbitos relacionados ao consumo da mesma. Mas essa decisão foi baseada em relatos e não em comprovação mediante metodologias específicas. Este caso é um alerta para a utilização de produtos naturais como alternativa a drogas sem conhecimento da sua segurança.

4.4 Potencial biológico

O primeiro relato sobre *A. moluccana* na literatura foi no ano de 1921, através de uma carta, cujo autor Wayson comunicou sobre o potencial terapêutico dos ácidos graxos contidos no óleo de *A. moluccana* no tratamento da hanseníase. O autor trabalhou em uma combinação entre os ácidos graxos obtidos e o iodo que seria capaz de ser administrada por via subcutânea ou por injeções intramusculares aos acometidos²⁰. A partir de então, os estudos focaram principalmente as partes aéreas de *A. moluccana*, que demonstrou uma potencial fonte de compostos com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Os extratos hidroalcoólicos e a fração de hexano das folhas diminuíram a percepção da dor ao teste de contorção de camundongos²¹ enquanto o extrato etanólico apresentou atividade antinociceptiva frente a inflamação e dor neuropática⁵. Em adição o composto 2"-O-Ramnosilswertisina isolado das folhas também apresentou potencial antinociceptivo frente a ensaios *in vivo*^{22; 23} e uma suspensão oral formulada com extrato das folhas apresentou atividade anti-inflamatória em modelo de edema de pata em camundongos²⁴.

Um semissólido contendo de extrato seco das folhas de *A. moluccana* também apresentou atividade anti-inflamatória frente ao edema de orelha induzido pelo óleo de *Croton*⁴ além de potencial analgésico e cicatrizante para uso utópico em estudos pré-clínicos³. Autores²⁵ analisaram os constituintes da fração de

diclorometano das folhas de *A. moluccana* e avaliaram o composto α,β -amirenona frente modelos de inflamação e artrite os resultados demonstraram um potencial anti-inflamatório e antinociceptivo. Ademais, as folhas de *A. molucanna* também demonstraram ter atividade hipolipemiante frente a ratos com hipercolesterolemia induzida²⁶ além de interferir na atividade da lipase pancreática sugerindo um potencial anti-lipase²⁷.

Apesar dos estudos serem voltados mais para as folhas, outros estudos também foram realizados com as demais partes de *A. moluccana*. O óleo apresentou atividade anti-inflamatória, capacidade de regeneração de epitélios corneais e não causou danos as células conjuntivas humanas^{28; 29} e extratos realizados com a planta inteira exibiram atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e inibiu seletivamente o crescimento do vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) demonstrando também um potencial antiviral^{30; 31}.

Já as sementes, a noz da Índia, foram testadas para bioensaios anti-obesidade mas não apresentou resultados relevantes³² e ainda, apresentou toxicidade oral aguda crônica em ratas Sprague-Dawley através de resultados histopatológicos e hematológicos¹¹ e citotoxicidade frente a linhagens celulares do tipo Raji e HepG2^{33; 34} alertando para a capacidade que a mesma planta de apresentar atividades desejáveis como a anti-inflamatória e analgésica e indesejáveis como toxicidade.

4.5 Estudos fitoquímicos

Os estudos fitoquímicos encontrados na literatura também tiveram como destaque as folhas de *A. moluccana*, o que já era esperado, já que as mesmas apresentaram promissoras atividades biológicas direcionando os pesquisadores a encontrar essas substâncias isoladas. Esses estudos fitoquímicos, identificaram compostos como: forbois, triterpenos, flavonoides, esteroides, ácidos e lignanas como pode ser observado na Tabela 1.

O primeiro estudo que isolou compostos de *A. moluccana* foi em 1968, a partir do extrato de petróleo, obteve-se α -amirina e moretenol das folhas, β -sisterol do caule e o triterpenóide moretenona das folhas e caule, esse último, descrito pela primeira vez como produto natural³⁵.

A partir das folhas, Autores^{36; 21; 22} identificaram com o extrato hidroalcoólico, o composto swersitina, descrito pela primeira vez na família Euphorbiaceae, n-hentriacontano, α -amirina, β -amirina, estigmasterol, β -sitosterol e campesterol da fração hexânica e o flavonoide c-glicosilado nomeado 2"-O-Ramosilswertisina do extrato alcoólico. Já os autores^{33; 34} isolaram 11 compostos, quatro trinorditerpenos e três trinodipertenos descritos pela primeira vez e 4 diterpenos conhecidos. Cinco megastigmanos foram isolados e descritos pela primeira vez no gênero *Aleurites*³⁷ (Tabela 1) e os autores²⁵ isolaram cinco triterpenos: α,β -amirenona, glutinol, e α,β -amirina da fração de diclorometano.

Já os estudos direcionados as cascas, isolaram um cumarinolignóide que foi chamado de moluccanin do extrato metanólico³⁸ e o ácido acetil aleuritólico do extrato hidroalcoólico³⁶. Ainda, o ácido atrárico e um diperteno nomeado espruacenol do extrato metanólico¹⁹ e a escopoletina, uma cumarina relatada pela primeira vez na espécie³⁹ além de mais 6 compostos isolados também descritos na Tabela 1 do extrato de diclorometano⁴⁰.

Ademais, um trabalho realizado com 7 plantas indígenas de Fiji, demonstrou que o principal ácido graxo encontrado na sementes de *A. moluccana* foi o ácido linoleico com alto teor de ácido graxo e rico em γ -tocoferol⁴¹. E um diéster de forbol nomeado 13-O-miristil-20-O-acetil-12-desoxiforbol foi isolado do extrato de benzeno do cerne de *A. moluccana* por autores⁴² que também descreveram pela primeira vez os compostos hentriacontano, 6,7-dimetoxicumarina, 5,6,7-trimetoxicumarina e β -sitostenona.

Tabela 1. Metabólitos secundários identificados em *A. moluccana*.

Composto	Parte da planta	Referência
α -amirina; moretenol; moretenona	Folhas	Hui e Ho, 1968 ³⁵
Swertisina	Folhas	Meyre-Silva et al., 1997 ³⁶
Mistura de α , β -amirina; β -sitosterol; campesterol; estigmasterol; n-hentriacontano	Folhas	Meyre-Silva et al., 1998 ²¹
2"-O-Ramosilswertisina	Folhas	Meyre-Silva et al., 1999 ²²

(5 β ,10 α)-12,13-dihidroxipodocarpa-8,11,13-trien-3-ona; (5 β ,10 α)-12-hidroxi-13-metoxipodocarpa-8,11,13-trien-3-ona; (5 β ,10 α)-13-hidroxi-12-metoxypodocarpa-8,11,13-trien-3-ona; (3 α ,5 β ,10 α)-13-metoxipodocarpa-8,11,13-trieno-3,12-diol; 12-hidroxi-13-metilpodocarpa-8,11,13-trien-3-ona; espruceanol; ent-3a-hidroxipimara-8, 15-dien-12-ona, ent-3b,14a-idroxipimara-7,9,15- trieno-12-ona	Folhas	Liu et al., 2007 ³³
Ácido moluccânico; éster metílico do ácido moluccânico; ácido 6,7-dihidroximolucânico	Folhas	Liu et al., 2008 ³⁴
Vómifoliol-9-O- β -apiofuranosil-(1''->6')- β -glucopiranosídeo; (6S, 9R)-roseida; debiloside; 3-oxo- α -ionol-O β -apiofuranosil- (1''->6')- β -glucopiranosídeo	Folhas	Da-Silva et al., 2012 ³⁷
Mistura α , β -amirenona; glutinol; α , β -amirina	Folhas	Quintão et al., 2014 ²⁵
Cumarinolignóide (moluccanin)	Cascas	Shamsuddin et al., 1988 ³⁸
Ácido acetil aleuritólico	Cascas	Meyre-Silva et al., 1997 ³⁶
Ácido atrárico e espruceanol	Cascas	Bittencourt, 2003 ¹⁹
Ácido 3-acetil-aleuritólico; escopoletina cumarina	Cascas	Prabowo et al., 2013 ³⁹
12-hidroxi-13-metoxi-8,11,13-podocarpatrien-3-ona; espruceanol; ácido 3-acetilaleuritólico; mistura de β -sitosterol e estigmasterol na proporção de 4:1	Cascas	Alimboyoguen et al.,2014 ⁴⁰
β -sisterol; moretenona;	Caule	Hui, Ho, 1968 ³⁵
Ácido linoleico (γ -tocoferol)	Sementes	Sotheeswaran et al., 1994 ⁴¹
13-O-miristil-20-O-acetil-12-deoxiforbol; 6,7-	Cerne	Satyanarayana et al., 2001 ⁴²

dimetoxicoumarina; 5,6,7-trimetoxicoumarina;
 β -itostenona

5 Conclusão

Esta revisão abordou aspectos gerais, farmacológicos e fitoquímicos de *A. moluccana* demonstrando que essa planta possui destaque cultural, ornamental, medicinal e econômico. Observou-se que os estudos biológicos e fitoquímicos tem como objetivo principal as folhas de *A. moluccana* pois essas já apresentaram potencial anti-inflamatório e analgésico. Porém, determinados pontos são escassos, como por exemplo os estudos toxicológicos, essa ausência deve estar relacionado com o fato de que o uso indicado é tópico, entretanto, óbitos e a possível intoxicação relacionada ao consumo oral da semente alerta para que mais pesquisas devem ser conduzidas com essa planta, especialmente, em relação a sua toxicologia.

Referências bibliográficas

1. Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front. Pharmacol.* 2014; 4 (177). doi:10.3389/fphar.2013.00177.
2. Heyne K. Tumbuhan berguna indonesia. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Departemen Kehutanan. 1987; 2:1188-1189.
3. Cesca TG, et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and wound healing features in animal models treated with a semisolid herbal medicine based on *Aleurites moluccana* L. Willd. Euforbiaceae standardized leaf extract: semisolid herbal. *J. ethnopharmacol.* 2012; 143(1):355-362.doi: 10.1016/j.jep.2012.06.051.
4. Hoepers SM, et al. Topical anti-inflammatory activity of semisolid containing standardized *Aleurites moluccana* L. WILLD (EUPHORBIACEAE) leaves extract. *J. ethnopharmacol.* 2015; 173: 251-255. doi: 10.1016/j.jep.2015.07.024.
5. Quintão NM, et al. *Aleurites moluccana* (L.) Willd. leaves: mechanical antinociceptive properties of a standardized dried extract and its chemical markers. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011. doi: 10.1155/2011/179890.
6. Souza VC, Lorenzi H. Botânica sistemática. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum; 2008. p. 640.

7. Ribeiro RNS, et al. Agro-environmental sustainability evaluation of productive agroforestry in tidal river foodplains Cametá Pará. *Acta Amaz.* 2004; 34(3). doi: 10.1590/S0044-59672004000300003 .
8. Li S, et al. The industrial applications of cassava: current status, opportunities and prospects. *J. Sci. Food Agric.* 2017; 97(8):2282-2290. doi: 10.1002/jsfa.8287.
9. De Oliveira-júnior RG et al. Antibacterial activity of terpenoids isolated from *Cnidocolus quercifolius* Pohl (Euphorbiaceae), a Brazilian medicinal plant from Caatinga biome. *Eur. J. Integr. Med.* 2018; 24: 30-34. Doi: 10.1016/j.eujim.2018.10.011.
10. MAVUNDZA, E. et al. Phytochemical screening of four South African poisonous medicinal plants of the family Euphorbiaceae. *S. Afr. J. Bot.* 2018; 115: 322. Doi: 10.1016/j.sajb.2018.02.168.
11. Innocent E, et al. Constituents of the essential oil of *Suregada zanzibariensis* leaves are repellent to the mosquito, *Anopheles gambiae* ss. *J. Insect Sci.* 2010; 10(1). doi: 10.1673/031.010.5701.
12. Özbilgin S, et al. In vivo wound-healing activity of *Euphorbia characias* subsp. *wulfenii*: Isolation and quantification of quercetin glycosides as bioactive compounds. *J. ethnopharmacol.* 2018. doi: 10.1016/j.jep.2018.06.015.
13. Orellana-Cuéllar LR, et al. Toxicidad aguda de *Aleurites moluccana* por via oral en ratas Sprague-Dawley. *CIMEL.* 2014; 19(1).
14. Lorenzi H. Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum. 2003; p. 368.
15. Orwa C, et al. Agroforestry database: a tree species reference and selection guide. Version 4.0. Nairobi, KE: World Agroforestry Centre ICRAF. 2009.
16. Elevitch CR, Manner HI. *Aleurites moluccana* (kukui). *Traditional trees of Pacific Islands: their culture, environment and use* Permanent Agriculture Resource; 2006. 41-56p.
17. Krisnawati H, Kallio M, Kanninen M. *Aleurites moluccana* (L.) Willd.: Ecology, silviculture and productivity: CIFOR; 2011.
18. Duke JA. *Medicinal plants of the Bible.* London: Trado-medic books. 1983.
19. Bittencourt, CMDS. Análise fitoquímica e farmacológica de plantas medicinais selecionadas da flora catarinense: *Aleurites moluccana*, *Bauhinia microstachya* e *Marrubium vulgare*. 2003. 180. Tese (Doutorado na área de Química orgânica) Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil.

20. Wayson JT. Use of oil of *Aleurites triloba* or *Aleurites moluccana* in the treatment of leprosy. *Arch Derm Syphilol.* 1921; 4(6): 818-818. doi: 10.1001/archderm.1921.02350250097009.
21. Meyre-silva C, et al. Preliminary phytochemical and pharmacological studies of *Aleurites moluccana* leaves [L.] Willd. *Phytomedicine.* 1998; 5(2): 109-113. doi: 10.1016/S0944-7113(98)80006-8.
22. Meyre-silva C, et al. Isolation of a C-glycoside flavonoid with antinociceptive action from *Aleurites moluccana* leaves. *Planta med.* 1999; 65(3): 293-294.
23. Quintão NM, et al. *Aleurites moluccana* and its main active ingredient, the flavonoid 2 "-O-rhamnosylswertisin, have promising antinociceptive effects in experimental models of hypersensitivity in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012; 102(2): 302-311. doi: 10.1016/j.pbb.2012.05.005.
24. Donald RM, et al. Development of an oral suspension containing dry extract of *Aleurites moluccanus* with anti-inflammatory activity. *Rev. bras. Farmacogn.* 2016; 26(1): p.68-76. doi: 10.1016/j.bjp.2015.06.011.
25. Quintão NM, et al. Contribution of α , β -Amyrenone to the Anti-Inflammatory and Antihypersensitivity Effects of *Aleurites moluccana* (L.) Willd. *Bio Med Res. Int.* 2014; 2014. doi: 10.1155/2014/636839.
26. Pedrosa RC, et al. Hypolipidaemic activity of methanol extract of *Aleurites moluccana*. *Phytother Res: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives.* 2002; 16(8): 765-768. doi: 10.1002/ptr.1046.
27. Ado MA, et al. Anti-and pro-lipase activity of selected medicinal, herbal and aquatic plants, and structure elucidation of an anti-lipase compound. *Molecules.* 2013; 18(12):14651-14669. doi: 10.3390/molecules181214651.
28. Said T, et al. Benefits and side effects of different vegetable oil vectors on apoptosis, oxidative stress, and P2X7 cell death receptor activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48(11): 5000-5006. doi: 10.1167/iovs.07-0229.
29. Said T, et al. Ocular burn: rinsing and healing with ionic marine solutions and vegetable oils. *Ophthalmologica.* 2009; 223(1): 52-59. doi: 10.1159/000172618.
30. Locher CP, et al. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *J ethnopharmacol.* 1995; 49(1): 23-32. doi: 10.1016/0378-8741(95)01299-0.

31. Locher CP, et al. Antiviral activity of Hawaiian medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Phytomedicine*, 1996; 2(3): 259-264. doi: 10.1016/S0944-7113(96)80052-3.
32. Yuliana ND, et al. Screening of selected Asian spices for anti-obesity-related bioactivities. *Food chem.* 2011; 126(4): 1724-1729. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.066.
33. Liu H, et al. Four New Podocarpane-Type Trinorditerpenes from *Aleurites moluccana*. *Helv Chim Acta*. 2007; 90(10): 2017-2023. doi: 10.1002/hlca.200790209.
34. Liu H, et al. Three novel 3, 4-seco-podocarpane trinorditerpenoids from *Aleurites moluccana*. *Tetrahedron Lett.* 2008; 49(35): 5150-5151. doi: 10.1016/j.tetlet.2008.06.088.
35. Hui HW, Ho CT. An examination of the Euphorbiaceae of Hong Kong. *Aust. J. Chem.* 1968; 21: 1675-7. doi: 10.1071/CH9682137.
36. Meyre-silva C, et al. A Triterpene and a Flavonoid Glycoside from *Aleurites moluccana L. Willd.* (Euphorbiaceae). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 16, p. 169-172, 1997.
37. Da-silva DB, et al. Megastigmanes from *Aleurites moluccana (L.) Willd.*(Euphorbiaceae). *Biochem Syst Ecol.* 2012; 40: 34-37. doi: 10.1016/j.bse.2011.09.014.
38. Shamsuddin T, et al. Moluccanin, a coumarinolignoid from *Aleurites moluccana*. *Phytochemistry.* 1988; 27(6): 1908-1909. doi: 10.1016/0031-9422(88)80480-1.
39. Prabowo WC. Isolation and Characterization of 3-Acetylaleuritolic Acid and Scopoletin from Stem Bark of *Aleurites moluccana (L. Willd.)*. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2013; 5(3):851-853.
40. Alimboyoguen AB, et al. Chemical constituents of the bark of *Aleurites moluccana L. Willd.* *J Chem Pharm Res.* 2014; 6(5): 1318-1320.
41. Sotheeswaran S, et al. Lipids from the seeds of seven Fijian plant species. *Food chem.* 1994; 49(1): 11-13. doi: 10.1016/0308-8146(94)90225-9.
42. Satyanarayana P, et al. A new phorbol diester from *Aleurites moluccana*. *Fitoterapia.* 2001; 72(3): 304-306. doi: 10.1016/S0367-326X(00)00314-2.

Conflito de interesse

O autor declara que não há conflitos de interesse.

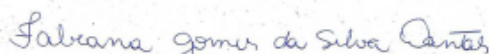
Declaração de acordo

O(s) autor(es) vem por meio desta declarar que o artigo intitulado *Aleurites moluccana* (L.) Willd.: características gerais, farmacológicas e fitoquímica submetido para publicação na presente revista, é um trabalho original, que não foi publicado ou está sendo considerado para publicação em outra revista, que seja no formato impresso ou no eletrônico e que a versão final do artigo foi revisada e aprovada por todos autores.

Assinaturas:



Pamella Fukuda de Castilho



Fabiana Gomes da Silva Dantas



Kelly Mari Pires de Oliveira

5.2 Manuscrito II: Efeitos tóxicos agudos e a curto prazo do extrato aquoso de sementes de *Aleurites moluccana* (L.) Willd. em ratos - Revista *Journal of Ethnopharmacology*
(Fator de impacto 3.115, Qualis A2 na área de Medicina II)

Link com as normas da revista: <https://www.elsevier.com/journals/journal-of-ethnopharmacology/0378-8741/guide-for-authors>

Efeitos tóxicos agudos e a curto prazo do extrato aquoso de sementes de *Aleurites moluccana* (L.) Willd. em ratos Wistar.

Pamella Fukuda de Castilho^a, Fabiana Gomes da Silva Dantas^b, Luis Henrique Almeida Castro^a, Ariany Carvalho dos Santos^a, Roosevelt Isaias Carvalho Souza^a, Silvia Aparecida Oesterreich^a, Claudia Andrea Lima Cardoso^c, Kelly Mari Pires de Oliveira^b

^a Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

^b Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

^c Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Dourados, MS, Brasil.

Autor correspondente: Kelly Mari Pires de Oliveira, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados – Itahum, Km 12. Caixa postal – 533, CEP 79.804-970, Dourados, MS, Brasil. Tel.: +55 67 3410-2320, kellyoliveira@ufgd.edu.br

Resumo:

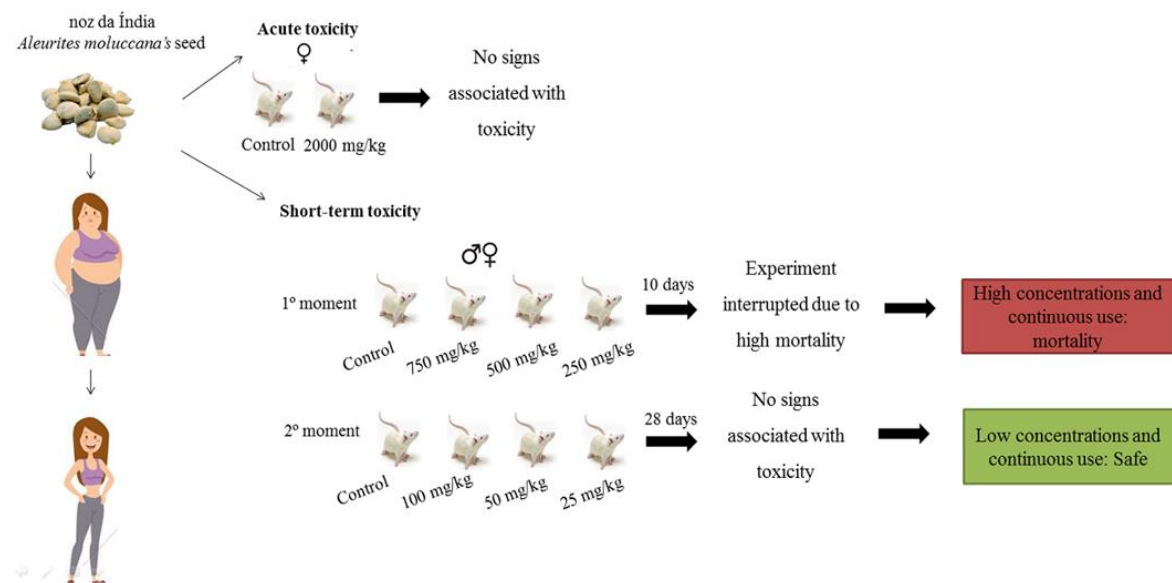
Relevância etnofarmacológica: Plantas medicinais são utilizadas para o emagrecimento, entre elas, estão as sementes de *Aleurites moluccana*, conhecidas popularmente como “noz da Índia”. No entanto, essa prática é fundamentada somente no conhecimento popular e não há estudos que comprovem a seguridade da sua ingestão.

Objetivo do estudo: Avaliar os efeitos tóxicos do extrato aquoso das sementes de *Aleurites moluccana* (EASAM) através dos testes de toxicidade oral aguda e a curto prazo.

Materiais e métodos: No teste de toxicidade oral aguda uma dose de 2000 mg/kg de EASAM foi administrada oralmente uma única vez a ratas Wistar e foram observadas durante 14 dias. Para a toxicidade oral a curto prazo foram estabelecidos 6 grupos com n=10 sendo 5 fêmeas e 5 machos, divididos em controle negativo, 3 grupos teste tratados com as doses de 100; 50 e 25 mg/kg, um grupo satélite tratado com a dose de 100 mg/kg e um grupo controle negativo do satélite tratado com solução salina. Esses últimos, foram mantidos em observação durante 14 dias após o término do experimento a fim de observar efeitos tóxicos tardios, persistentes ou reversíveis. Avaliações fisiológicas, bioquímicas, hematológicas e histopatológicas foram determinadas.

Resultados: Os resultados do teste de toxicidade oral aguda demonstraram que o EASAM possui uma $DL_{50} > 2000$ mg/kg. No teste de toxicidade a curto prazo, as doses estabelecidas inicialmente foram de 750, 500 e 250 mg/kg, após 10 dias de tratamento houve mortalidade de 20% dos animais e o experimento foi interrompido. Novas doses foram restabelecidas (100, 50 e 25 mg/kg) e os animais tratados não apresentaram alterações fisiológicas, bioquímicas, hematológicas, histopatológicas e nem sinais clínicos relacionados a toxicidade. Conclusão: Esses resultados demonstraram que apesar do extrato aquoso das sementes de *A. moluccana* não apresentar toxicidade oral aguda e baixas concentrações não exibiram sinais relacionados a toxicidade no tratamento a curto prazo, o uso contínuo em altas concentrações causaram mortalidade em ratos Wistar machos e fêmeas.

Resumo gráfico:



Palavras-chave: noz da Índia, toxicidade, semente, produtos naturais

1. Introdução

O sobrepeso é um problema de saúde mundial que envolve além da saúde, aspectos de beleza. De acordo com Cercato e colaboradores (2015) um dos meios utilizados pela população para emagrecer são as plantas medicinais. Os metabólitos secundários presentes nessas plantas, como flavonoides, alcaloides e terpenóides favorecem o emagrecimento atuando como hipolipidêmicos, antioxidantes e hipocolesterolêmico, reduzindo o consumo de

energia e aumentando o gasto energético (Yun, 2010). Entretanto, essa prática muitas vezes é fundamentada somente no conhecimento popular, na crença incorreta de que tudo que é natural é seguro.

Aleurites moluccana é uma planta de porte médio que pertence a família Euphorbiaceae, é nativa da Ásia, mas possui uma ampla distribuição geográfica devido sua capacidade de adaptação edáfico-climática. No Brasil adaptou-se as regiões do sul e sudoeste (Elevitch; Manner, 2006). De acordo com o conhecimento popular, suas folhas, cascas e o óleo são utilizadas para o tratamento de diversas doenças como úlceras, febre, dor de cabeça, asma, conjuntivite, gonorreia, inflamação, hepatite, reumatismo e para atividade antiviral, antibacteriana, gastroprotetora, analgésica, cicatrizante, além da capacidade laxativa e sudorífera (Cesca et al., 2012; Bittencourt et al., 2003; Hoepers et al., 2015; Quintão et al., 2011; Krisnawati et al., 2011).

Outra parte utilizada popularmente são as sementes, conhecidas como “noz da Índia”, essas, são consumidas como fonte de emagrecimento. A indicação é ingerir a semente *in natura* de forma contínua e aumentar gradativamente a quantidade até obter a perda de peso desejável. Entretanto, em fevereiro de 2016 o Centro Integrado de Vigilância Toxicológica do estado do Mato Grosso do Sul – Brasil (CIVITOX-MS) publicou uma nota técnica alertando sobre potencial tóxico da semente. Posteriormente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), proibiu o uso e a comercialização da noz da Índia no Brasil por indícios de toxicidade e a três óbitos relacionados com o seu consumo. Porém, essa decisão foi baseada em evidências e não a comprovações científicas.

Os estudos farmacológicos realizados são conduzidos principalmente com as folhas e cascas de *A. moluccana*. Esses, demonstraram a atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, antibacteriana, anti-lipase, hipolipemiante, antiviral e cicatrizante (Ado et al., 2013; Cesca et al., 2012; Hoepers et al., 2015; Locher et al., 1995, 1996; Pedrosa et al., 2002; Quintão et al., 2011, 2012). Já os estudos fitoquímicos evidenciaram a presença de compostos biologicamente ativos como forbóis, triterpenos, flavonoides, esteroides, ácidos e lignanas nas folhas (Da-Silva et al., 2012; Hui, Ho, 1968; Liu et al., 2007, 2008; Meyre-Silva et al., 1997, 1998, 1999; Quintão et al., 2014) e compostos fenólicos, terpenóides, ácidos e lactonas nas cascas (Alimboyoguen et al., 2014; Bittencourt, 2003; Meyre-Silva et al., 1997; Prabowo et al., 2013; Shamsuddin et al., 1988).

Entretanto, sobre a semente as informações estão voltadas para a botânica (Souza, Lorenzi, 2008) e a produção de biodiesel (Kibazohi, Sangwan, 2011). E até onde sabemos não há informações suficientes sobre suas atividades biológicas e que assegurem seu consumo,

desta forma, o presente trabalho tem como objetivo apresentar um *screening* químico e avaliar a toxicidade aguda e a curto prazo do extrato aquoso das sementes de *A. moluccana*.

2. Material e métodos

2.1 Material vegetal e preparação do extrato

As sementes frescas de *Aleurites moluccana* foram obtidas comercialmente na cidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Para o preparo do extrato aquoso 200g de semente foram trituradas no liquidificador com 1000 mL de água destilada durante 2 min. Essa mistura ficou durante 72 h em uma incubadora de bancada com agitação orbital (Quimis, Brasil) a 24 °C e após esse período foi filtrada com papel filtro de celulose e liofilizada. O produto obtido foi um pó de cor bege com um rendimento de aproximadamente 10% que foi armazenado a 4 °C até posterior análises.

2.2 Determinação de compostos fenólicos

O teor dos compostos fenólicos foi determinado de acordo com o método descrito por Djeridane e colaboradores (2006). 100 µL da solução aquosa de extrato (1 mg.mL⁻¹) foram adicionados a 1000 µl de água ultrapura e 500 µL do reagente de Folin – Ciocalteu (1/10) em água. Após 1 min, foram adicionados 1500 µL de Na₂CO₃ (20% m/v). A mistura final foi agitada e depois incubada durante 2h no escuro. A absorbância foi lida por espectrofotômetro (FENTO 700 PLUS) ($\lambda = 760$ nm). O ácido gálico (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado como padrão em concentrações variando de 5 a 1000 µg.mL⁻¹. O resultado foi expresso em mg de ácido gálico por g do extrato aquoso liofilizado.

2.3 Determinação de flavonoides

Os flavonoides totais foram determinados espectrofotometricamente de acordo com o método descrito por Djeridane e colaboradores (2006). 1000 µl de solução metanólica a 2% de AlCl₃ foi adicionado a 1000 µL do extrato aquoso da planta diluído em água (1 mg.mL⁻¹), foi incubado por 15 min e a absorbância da mistura final foi lida por espectrofotômetro (FENTO 700 PLUS) ($\lambda = 430$ nm). Rutina (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado como padrão em concentrações variando de 1 a 50 µg.mL⁻¹. O teor de flavonoides foi expresso em mg de rutina por g do extrato aquoso liofilizado.

2.4 Análise UHPLC-DAD-ESI/MS/MS

A cromatografia foi realizada em um Cromatógrafo Líquido LC-20A Prominence (Shimadzu Co., Kioto, Japão) composto por: desgaseificador a vácuo, auto-amostrador, bomba binária e detector de matriz de diodo (DAD). Este instrumento foi equipado com uma coluna Shim-pack XR-ODS (2,0 x 75 mm, 2,2 μm) da Shimadzu Co. Para as fases móveis foi utilizado 0,1% ácido fórmico, v/v (A) e acetonitrila (B), respectivamente. O gradiente foi programado como segue: 0 min, 3% B; 8 min, 3% de B; 30 min, 25% de B; 60 min, 80% de B; 70 min, 3% B. A taxa de fluxo foi ajustada em 0,30 mL.min⁻¹. O volume de injeção foi de 5 μL e a temperatura da coluna foi mantida em 40 °C. O sistema UHPLC foi acoplado a um quadrupolo-tempo de voo (micrOTOF-QTM, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha), equipado com uma fonte de ionização por electropulverização (ESI). Os parâmetros para análise foram ajustados usando o modo iônico positivo, com espectros adquiridos em uma faixa de massa de m/z 50 a 1200 Da. Os valores ótimos dos parâmetros ESI-MS foram: tensão capilar, 4,5 kV; temperatura do gás de secagem, 200 °C; fluxo de gás de secagem, 9,0 L.min⁻¹; pressão de gás de nebulização, 4 bar. Além disso, experimentos automáticos de MS/MS foram realizados ajustando os valores de energia de colisão como segue: m/z 100, 20 eV; m/z 500, 30 eV; m/z 1000, 35 eV, usando nitrogênio como gás de colisão. Os dados do MS foram processados através do software Data Analysis 4.4 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

2.5 Estudo Toxicológico

Os ensaios toxicológicos foram conduzidos de acordo com os protocolos estabelecidos pela *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OCED). Para os ensaios de toxicidade oral aguda foi utilizada a diretriz 425 (OCED, 2008a) e para os ensaios de toxicidade de curto prazo a diretriz 407 (OCED, 2008b).

2.5.1 Animais

Setenta ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar de ambos sexos (40 fêmeas e 30 machos) com idade entre 45 e 60 dias e peso semelhantes foram utilizados no presente estudo. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados e mantidos em uma caixa de polipropileno com 5 animais por caixa. Depois foram alocados no biotério da Faculdade de Ciências da saúde e ficaram em temperatura (22 ± 2 °C), umidade (40 - 60%) e luminosidade (ciclo claro-escuro de 12 h) controladas e com livre acesso a água e ração. O experimento só deu início após a aclimação dos animais. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório

definidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal da Grande Dourados (protocolo nº 28/2017). Para administração oral nos animais a amostra foi diluída em água. A escolha do extrato aquoso foi devido o uso popular da semente, que é consumida *in natura*.

2.5.2 Toxicidade oral aguda

Para a toxicidade oral aguda, dois grupos experimentais foram estabelecidos com o n=5 ratas Wistar: controle negativo, tratado com solução salina e grupo teste tratado com EASAM. Antes de iniciar a gavagem, cada animal foi previamente identificado, mantido em jejum durante 8 h e pesado. O extrato foi administrado via única e oral através de gavagem na dose de 2000 mg/kg a primeira rata que foi monitorada periodicamente durante as primeiras 5 h a fim de verificar alguma alteração, e após intervalos sequenciais de 48 h a mesma dose foi administrada a segunda rata e assim sucessivamente até completar 5 ratas tratadas. Em paralelo, foi administrada a solução salina para as ratas do controle negativo.

Após completar as 5 ratas tratadas de cada grupo, os animais foram observados uma vez por dia durante 14 dias. O consumo de ração, água e o peso de cada animal foi anotado, além disso, os animais foram analisados segundo o *screening* hipocrático proposto por Malone e Robichaud (1962). Após 14 dias, os animais foram submetidos a eutanásia com isoflurano (inalação) seguido de exsanguinização. Os órgãos (coração, pulmão, baço, fígado, rim, útero e ovário) foram removidos, pesados e examinados macroscopicamente para observar quaisquer alterações.

2.5.3 Toxicidade oral a curto prazo

6 grupos foram estabelecidos para os machos e para fêmeas, com um n=5 animais tratados via gavagem durante 28 dias: 1. Controle negativo, tratados oralmente com solução salina 2. Grupo teste tratados oralmente com 100 mg/kg do EASAM; 3. Grupo teste tratados oralmente com 50 mg/kg do EASAM; 4. Grupo teste tratados oralmente com 25 mg/kg do EASAM; 5. Satélite, tratados oralmente com 100 mg/kg do EASAM e 6. Controle negativo do satélite, tratados oralmente com solução salina. Esses dois últimos, que foram mantidos em observação durante 14 dias após o término do experimento a fim de observar efeitos tóxicos tardios, persistentes ou reversíveis.

Durante os 28 dias de tratamento, todos animais foram observados em relação ao estado de saúde e evidências de toxicidade, bem como o *screening* hipocrático (Malone; Robichaud, 1962). Além disso, a quantidade de ração (g) e água (mL) consumida foi anotada bem como o peso do animal (g) no dia. Após o período de 28 dias, com exceção do grupo satélite e controle do satélite, os animais foram submetidos a eutanásia com isoflurano seguido de exsanguinação. O sangue foi coletado para proceder as análises bioquímicas e hematológicas.

2.5.3.1 Análises hematológicas e bioquímicas

Ao final dos estudos, os animais foram submetidos a eutanásia e duas amostras de sangue foram retiradas de cada animal. Uma amostra de sangue foi tratada com ácido etilenodiamino tetra-acético de potássio (EDTA) para os índices hematológicos e uma segunda amostra de sangue foi coletada para preparação de soro e análises bioquímicas. As amostras foram enviadas para o Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados HU-UFGD para as análises.

A análise hematológica foi feita com o aparelho Sysmex XN-3000 e os parâmetros determinados foram: leucócitos, eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, índice hematócrito, plaquetas, monócitos, linfócitos, basófilos e neutrófilos. A análise bioquímica foi feita com o aparelho COBAS INTEGRA® 400 plus e os parâmetros determinados foram: glicose, colesterol total, colesterol HDL, triglicerídeos, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, ureia, creatinina, albumina e proteínas totais.

2.5.3.2 Análises histopatológicas

Após a eutanásia, os órgãos internos: coração, pulmão, baço, fígado, rim, útero, ovário, epidídimo e testículo de cada animal foram removidos, pesados em uma balança analítica e rapidamente armazenados para o processamento da análise histopatológica. Além desses órgãos internos, o encéfalo de um animal por grupo também foi removido para avaliação histopatológica. Todos fragmentos dos órgãos foram fixados em formalina tamponada a 10% e somente os testículos em solução de Bouin. Após a fixação, estes tecidos foram clivados, desidratados em etanol absoluto, diafanizados em xileno, embebidos em parafina e cortes com espessura de 5 µm foram corados com hematoxilina-eosina (H&E). A análise histopatológica consiste na observação microscópica, analisando a integridade dos tecidos, degeneração, necrose, apoptose ou infiltração de leucócitos que são sinais indicativos de toxicidade.

2.7 Análise estatística

Os resultados foram apresentados em média \pm desvio padrão. Para toxicidade oral aguda, foi utilizado para análise dos resultados o Teste T de Student. Já para a toxicidade oral a curto prazo, a análise dos grupos tratados foi determinada pela Análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo pós teste de Dunnett. O nível de significância considerado foi de $P < 0.05$. O programa utilizado para proceder as análises foi o GraphPad Prism software versão 5.0 do Windows.

3. Resultados e discussão

Plantas medicinais são utilizadas popularmente para o emagrecimento, como no caso das sementes de *A. moluccana*, ou “noz da Índia”. No entanto, a literatura não relata estudos toxicológicos suficientes que assegurem seu consumo. *A. moluccana* pertence à família Euphorbiaceae, reportada com potencial tóxico. A ausência de dados toxicológicos dessa semente associada a capacidade de produtos naturais apresentarem efeitos adversos alertam para estudos que forneçam informações confiáveis sobre a composição, atividade biológica e efeitos toxicológicos da “noz da Índia”.

No presente estudo, o extrato aquoso das sementes de *A. moluccana* apresentou teores de $247,62 \pm 64,98$ mg/g de compostos fenólicos e $71,33 \pm 1,02$ mg/g de flavonoides. Esses compostos, possuem destaque entre os metabólitos secundários, pois estão relacionados com atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e também antioxidante (Daglia, 2012). Porém, em altas concentrações e utilização crônica, podem desencadear efeitos tóxicos (Da Silva et al., 2015). A quantidade de compostos e a forma de uso da planta determina se o efeito desses metabólitos secundários serão benéficos ou não, ressaltando a importância de estudos para verificar a maneira adequada de consumo.

O potencial tóxico das sementes de *A. moluccana* foi associado a presença de forbóis, saponinas e triterpenos (CIVITOX-MS, 2016; Orellana-cuellar, 2014). Análises fitoquímicas do caule e folhas já evidenciaram a presença destes compostos (Hui e Hoi, 1968; Meyre-Silva et al., 1997; Satyanarayana et al., 2001) e estudos já demonstraram a sua propriedade tóxica (Li et al., 2010; Rojas e Diaz, 2012). No presente trabalho, não houve a identificação de forbóis, saponinas e triterpenos, porém, não podemos afirmar que esses metabólitos não estejam presentes, já que foram identificados em outras partes da planta. Os compostos identificados pela cromatografia líquida acoplada a espectrofotometria de massa do EASAM foram três flavonas e um glicosídeo (Tabela 1). O glicosídeo, neriifolin, é

relatado na literatura como um cardiotoxico (Tsai et al., 2018) entretanto, o EASAM não apresentou nenhum resultado que pode ser associado a essa atividade.

No ensaio de toxicidade oral aguda, o procedimento adotado foi o preconizado pela OECD *Guideline 425*, “*Up and Down Procedure*” e a dose estabelecida foi de 2000 mg/kg. Após 3 horas de administração, dois animais apresentaram ataxia seguido de anestesia, indicando atividade sobre o sistema nervoso central (Malone e Robichaud, 1962). Essa atividade pode estar relacionada com algum constituinte da família Euphorbiaceae, já que outros estudos demonstraram efeitos sobre o sistema nervoso central corroborando com esse resultado (Amaechina e Omogbai, 2014; Bigoniya et al., 2013; Dhanapal Venkatachalam e Kumar, 2018). Além disso, as flavonas apigenina e isovitexina encontradas no EASAM já foram relatadas como sedativas em modelos *in vivo* (Gazola et al, 2015; Santos et al., 2006). Aproximadamente 30 minutos depois do início dos sintomas, eles desapareceram e os animais sobreviveram até o final do período de observação e não apresentaram mais nenhum sintoma clínico, sendo assim, a DL₅₀ estabelecida foi maior que 2000 mg/kg segundo os critérios da OECD (2008a).

Em relação aos parâmetros que devem ser considerados para análise da toxicidade oral aguda, não houve diferença significativa no peso dos órgãos (g) e no peso relativo (g/100g) bem como não foi identificado nenhuma outra alteração macroscópica. Quanto aos parâmetros fisiológicos, somente o consumo de ração e água apresentaram diferença significativa, entre o controle e o grupo tratado com 2000 mg/kg EASAM (Tabela 2). Segundo Jahn e Guzel (1997) essas mudanças na dieta podem evidenciar toxicidade local ou sistêmica, em adição, um surto de intoxicação aguda por sementes de uma planta do gênero *Aleurites* já foi relatado por Lin e colaboradores (1996). A família Euphorbiaceae demonstra efeitos tóxicos agudos que levam a alterações nos órgãos, perda de peso, mudanças comportamentais e até a morte, alertando para o potencial dos constituintes da mesma (Meireles et al., 2016; Rajeh et al., 2012; Ojokuku et al., 2015). Mas, de acordo com os resultados e os critérios do *Globally Harmonised System* (GHS) o EASAM foi considerado pouco tóxico, sendo classificado como uma substância Classe 5, por sua dose letal (DL₅₀) estar acima de 2000 mg/kg (Arthur et al., 2011).

Para uma melhor análise toxicológica, é essencial avaliar o perfil da toxicidade por doses repetidas. Esse método, permite analisar os efeitos da amostra sobre o sistema nervoso central, imunológico, endócrino e reprodutivo. Fornecendo informações dos efeitos tóxicos e até identificando seus órgãos-alvo, de acordo com as alterações morfológicas e fisiológicas dos órgãos como os dados hematológicos, perfil bioquímico e histopatologia

(Koualdiu et al., 2014). A determinação de quais doses utilizar para toxicidade oral a curto prazo é dependente dos resultados obtidos na toxicidade oral aguda (ANVISA, 2013). Com isso, as doses estabelecidas para a toxicidade oral a curto prazo foram de 750, 500 e 250 mg/kg, porém com 10 dias de tratamento, o ensaio teve que ser interrompido visando o bem estar animal e as recomendações dos órgãos reguladores.

O protocolo de toxicidade oral a curto prazo utilizado no trabalho foi baseado no protocolo “*Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents*”, *Guideline 407* (OECD, 2008b). O experimento teria duração de 28 dias e decorrido os dias as análises seriam realizadas. No segundo dia de tratamento os animais começaram a exibir sinais clínicos de toxicidade, como: comprometimento da atividade geral, não apresentavam resposta ao aperto da cauda, não tinham tônus corporal, sem estímulos auriculares e corneais, ataxia e anestesia. Esses sintomas apareciam aproximadamente 10 a 30 min após a administração e alguns animais morriam em seguida e outros amanheciam mortos. Outros trabalhos realizados com plantas da família Euphorbiaceae em concentrações semelhantes, entre 250 a 1000 mg/kg e em modelos animais, também observaram efeitos tóxicos após o tratamento contínuo (Ansah et al., 2011; Athmouni et al., 2018; Sawagodo et al., 2018). Esses resultados, evidenciam o potencial tóxico acumulativo dos constituintes encontrados na família e advertem para o uso em altas concentrações.

No segundo dia de tratamento os animais que receberam as doses de 750 e 500 mg/kg começaram a exibir sinais clínicos de toxicidade, como: comprometimento da atividade geral, não apresentavam resposta ao aperto da cauda, não tinham tônus corporal, sem estímulos auriculares e corneais, ataxia e anestesia. Nos animais que receberam a dose de 250 mg/kg esses sinais foram observados a partir do 7º dia de tratamento, demonstrando um efeito dose-dependente. Esses sintomas apareciam aproximadamente 10 a 30 min após a administração e alguns animais morriam em seguida e outros em até 18 horas. Outros trabalhos realizados com plantas da família Euphorbiaceae em concentrações semelhantes, entre 250 a 1000 mg/kg e em modelos animais, também observaram efeitos tóxicos após o tratamento contínuo (Ansah et al., 2011; Athmouni et al., 2018; Sawagodo et al., 2018). Esses resultados, evidenciam o potencial tóxico acumulativo dos constituintes encontrados na família e advertem para o uso em altas concentrações.

De acordo com as recomendações, é desejável encontrar um intervalo de doses que demonstre a dose que não apresentará efeitos adversos observados (NOAEL) e a dose que induzirá efeitos tóxicos mas não morte ou sofrimento severo (OECD, 2008b). Com isso, o experimento foi interrompido devido a alta mortalidade e as doses reajustadas.

As doses restabelecidas foram de 100; 50 e 25 mg/kg, e para verificar os efeitos tóxicos tardios, persistentes ou reversíveis um grupo satélite recebeu a dose de 100 mg/kg (OECD, 2008b). Durante o experimento os animais estavam ativos, respondiam aos estímulos e não apresentaram nenhum sinal clínico, não houve mortes e os parâmetros obtidos foram considerados dentro da normalidade para a espécie (Lapchik; Mattaraia, 2009; Lima et al., 2014). Apesar de haver alguns parâmetros que apresentaram diferença significativa entre o controle e o tratamento, os resultados, que devem ser analisados de forma integrativa não demonstraram efeitos atribuídos a toxicidade nas novas concentrações.

Os parâmetros fisiológicos dos animais tratados com EASAM durante a toxicidade oral a curto prazo estão apresentados na Tabela 2 e 3. As fêmeas tratadas com 100 mg/kg do EASAM bem como as fêmeas satélites apresentaram uma diminuição significativa no consumo de ração quando comparada ao controle. Os machos tratados com 50 mg/kg do EASAM apresentaram uma diminuição significativa no consumo de água. Apesar dessa diferença encontrada na dieta entre os animais que receberam tratamento e o controle ser significativa, se fosse decorrente de efeitos adversos, outros marcadores biológicos envolvidos como hematócrito, ureia e ácido úrico também apresentariam alterações (Campbell et al., 2009) em relação aos valores de referência, o que não ocorreu, como pode ser visto nas Tabelas 5 e 6. Com isso esse resultado apresentou-se como um fato isolado e não foi atribuído a um efeito tóxico do EASAM. Também houve um aumento significativo de ganho de peso dos machos satélite quando comparado ao seu controle no período dos 14 dias após o término do tratamento, representado na Tabela 3. Segundo Traesel e colaboradores (2016) algum fator externo pode ter contribuído especificadamente para esse grupo como a luta pelo domínio de caráter hierárquico ou por serem machos característicos.

A Tabela 4 apresenta o peso (g) e o peso relativo (g/100g) dos órgãos vitais e reprodutivos dos animais tratados. Em relação aos machos, não houve diferença significativa entre o controle e quaisquer dose do tratamento. Para as fêmeas, as tratadas com 25 mg/kg do EASAM apresentaram diminuição significativa do peso relativo do rim em relação ao controle. De acordo com Gowda e colaboradores (2010) um dano neste órgão aumentaria a produção de marcadores renais eficazes como a ureia, creatinina e ácido úrico, o que não ocorreu no presente estudo como pode-se observar na Tabela 6. Também não houve uma relação dose-resposta já que os tratamentos de 50 mg/kg e 100 mg/kg não apresentaram quaisquer alterações. Outro aumento significativo foi no peso absoluto do pulmão das fêmeas que receberam a maior dose quando comparado ao controle. Danos pulmonares como resposta inflamatória ou citotoxicidade são marcadas por alterações nos neutrófilos, macrófagos e na

fosfatase alcalina (Pauluhn et al., 1999) bem como por alterações histopatológicas (Cunha et al., 2009). Os achados no presente estudo demonstraram que não houve alterações nos marcadores (Tabelas 5 e 6), porém as alterações histopatológicas (Figura 1) indicaram uma pneumonia associada a falsa via devido a gavagem, não caracterizando um efeito tóxico (Boas et al., 2018).

O sistema hematopoiético é um dos parâmetros mais sensíveis para investigar a toxicidade em humanos e animais. O sangue é o principal carreador de nutrientes e corpos estranhos, por este motivo, componentes do sangue como eritrócitos, plaquetas e hemoglobina são as primeiras expostas a compostos tóxicos (Adewale et al., 2016). A administração do EASAM nas condições testadas não apresentou efeito adverso nos parâmetros hematológicos quando comparada ao controle negativo, como pode ser visto na Tabela 5, além disso, os valores encontrados são considerados normais para a espécie (Lapchik; Mattaraia, 2009; Lima et al., 2014).

Outro parâmetro importante para avaliação toxicológica de determinada substância são os bioquímicos, sua quantificação permite determinar o efeito tóxico em diferentes tecidos, podendo ser sistêmico ou local (OECD, 2008b). Por exemplo, o aumento das enzimas ALT e AST estão diretamente relacionado com um dano hepático (Ramaiah., 2011) e da ureia e creatinina com uma lesão pulmonar (Gowda et al., 2010). Neste trabalho, quantificamos os níveis séricos dos analitos que permitiram avaliar os biomarcadores metabólicos, função hepática, função renal, os eletrólitos e as proteínas (Tabela 6). Não houve diferença entre o tratamento e o controle, bem como discrepância aos valores de referência.

A histopatologia dos órgãos após o tratamento é de extrema importância para a associação dos resultados no estudo toxicológico. No presente estudo foram encontradas apenas alterações pulmonares compatíveis com falsa via e caracterizadas pelo espessamento da parede alveolar por infiltrado inflamatório mononuclear, hiperemia e células gigantes multinucleadas com imagens sugestivas de fibra vegetal. Tais alterações foram observadas em ambos os sexos e estão representadas nas Figuras 1 e 2. Estas lesões não foram consideradas de importância toxicológica, pois ocorreram tanto no tratamento quanto no controle negativo e estão relacionadas com o processo de manipulação do animal (gavagem) (Boas et al., 2018; Taylor; McInnes, 2012).

Ademais, o grupo satélite e o seu controle, que tem seus resultados apresentados nas Tabelas de 2 a 6 e Figura 3, estabelecidos a fim de verificar os efeitos tóxicos persistentes, tardios ou reversíveis, também não apresentaram nenhum resultado que pôde ser associado com o efeito tóxico causado por EASAM.

4. Conclusão

Os resultados demonstraram que o extrato aquoso das sementes de *A. moluccana* apesar de apresentar uma $DL_{50} > 2000$ mg/kg e administrado em baixas concentrações a curto prazo não apresentarem alterações fisiológicas, bioquímicas, hematológicas, histopatológicas e nem sinais clínicos relacionados a toxicidade, em altas concentrações e uso contínuo causaram mortalidade nos animais.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Contribuição dos autores

Pamella Fukuda de Castilho realizou a parte prática, análise de dados e preparação do manuscrito. Fabiana Gomes da Silva Dantas na concepção do manuscrito e desenvolvimento do manuscrito. Luis Henrique Almeida Castro auxiliou na parte experimental com os animais. Ariany Carvalho dos Santos e Roosevelt Isaias Carvalho Souza conduziram as análises histopatológicas. Claudia Andrea Lima Cardoso realizou as análises químicas. Silvia Aparecida Oesterreich participou do design experimental e apoio laboratorial. Kelly Mari Pires de Oliveira participou do design experimental e concepção do manuscrito.

Agradecimentos

Agradecemos a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Referências

ADEWALE, O.B. et al. Evaluation of acute and subacute toxicity of aqueous extract of *Crassocephalum rubens* leaves in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 188, p. 153-158, 2016.

ADO, M.A. et al. Anti-and pro-lipase activity of selected medicinal, herbal and aquatic plants, and structure elucidation of an anti-lipase compound. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 14651-14669, 2013.

ALIMBOYOGUEN A.B et al. Chemical constituents of the bark of *Aleurites moluccana* L. Willd. **Journal of Chemical & Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 5, p. 1318-1320, 2014.

AMAECHINA, F.; OMOGBAI, E. Effects Of The Aqueous Extract Of The Euphorbia Hirta On The Blood Pressure Of Normotensive Albino Wistar Rats: 77. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 115, p. 24, 2014.

ANSAH, C.; OPPONG, E.; WOODE, E. Subacute oral toxicity assessment of *Alchornea cordifolia* (Schumacher and Thonn) Müll Arg (Euphorbiaceae) extract in rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 5, p. 587-594, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 31 de janeiro de 2013.

ARTHUR, F.K.N. et al. Evaluation of acute and subchronic toxicity of *Annona Muricata* (Linn.) aqueous extract in animals. 2011.

ATHMOUNI, K.; EL FEKI, A.; AYADI, H. Hepatotoxic effects of Euphol-rich fractions from *Euphorbia bivonae*—Relevance to cytotoxic and anti-tumor activities. **Pathophysiology**, 2018.

BERENGUER-RIVAS, C.A et al. Acute oral toxicity of *Azadirachta indica* (Neem Tree). **Rev. Cubana Plant Med.** v.18, p. 502–507, 2013.

BIGONIYA, P.; AGRAWAL, S.; VERMA, N.K. Potential wound healing activity of *Euphorbia hirta* Linn total flavonoid fraction. **Int J Pharm Sci Rev Res**, v. 22, n. 2, p. 149-56, 2013.

BITTENCOURT, C.M.D.S. Análise fitoquímica e farmacológica de plantas medicinais selecionadas da flora catarinense: *Aleurites moluccana*, *Bauhinia microstachya* e *Marrubium vulgare*. 2003. 180. Tese (Doutorado na área de Química orgânica) Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil.

BOAS, G.R.V. et al. Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from guavira fruits (*Campomanesia pubescens* (DC) O. BERG) in experimental models of acute and short-term toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 1-12, 2018.

BRASIL, Centro Integrado de Vigilância Toxicológica (CIVITOX). **Intoxicação pelo uso da noz da Índia**. Disponível em: <<http://www.saude.ms.gov.br/wp->

content/uploads/sites/88/2016/02/Nota-T%C3%A9cnica-001_2016_Noz-da-India.pdf>. Acesso em 15/11/2018. Mato Grosso do Sul, 2016.

CAMPBELL, M.A. et al. Reduced water intake: Implications for rodent developmental and reproductive toxicity studies. *Birth Defects Res. Part B - Dev. **Reprod. Toxicol.***, v. 86, p. 157–175, 2009.

CARLIER, J. et al. The principal toxic glycosidic steroids in *Cerbera manghas* L. seeds: Identification of cerberin, neriifolin, tanghinin and deacetyltanghinin by UHPLC–HRMS/MS, quantification by UHPLC–PDA-MS. *Journal of chromatography B*, v. 962, p. 1-8, 2014.

CERCATO, Luana M. et al. A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: is there potential for obesity treatment?. *Journal of ethnopharmacology*, v. 176, p. 286-296, 2015.

CESCA, T.G. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and wound healing features in animal models treated with a semisolid herbal medicine based on *Aleurites moluccana* L. Willd. Euforbiaceae standardized leaf extract: semisolid herbal. *Journal of ethnopharmacology*, v. 143, n. 1, p. 355-362, 2012.

CUNHA, L.C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Braz. J. Pharmacogn.*, v. 19, p. 403–411, 2009.

DA SILVA, D.B. et al. Megastigmanes from *Aleurites moluccana* (L.) Willd (Euphorbiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 40, p. 34-37, 2012.

DA SILVA, L.R. et al. Flavonoides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. *Acta toxicológica argentina*, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

DHANAPAL VENKATACHALAM, S.T.B.; KUMAR, S. Sedative activity of ethanolic and aqueous extracts of *Euphorbia hirta*. *Seeds*, v. 9, p. 12, 2018.

DJERIDANE, A. et al. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, v. 97, p. 654–660, 2006.

ELEVITCH, C.R; MANNER, H.I. *Aleurites moluccana* (kukui). **Traditional trees of Pacific Islands: their culture, environment and use Permanent Agriculture Resource**, p. 41-56, 2006.

FIGUEIRINHA, A. et al. *Cymbopogon citratus* leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chemistry*, v. 110, p. 718–728, 2008.

GAZOLA, A.C. et al. Involvement of GABAergic pathway in the sedative activity of apigenin, the main flavonoid from *Passiflora quadrangularis* pericarp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 158-163, 2015.

GOWDA, S. et al. Markers of renal function tests. **North American journal of medical sciences**, v. 2, n. 4, p. 170, 2010.

HOEPERS, S.M. et al. Topical anti-inflammatory activity of semisolid containing standardized *Aleurites moluccana* L. WILLD (EUPHORBIACEAE) leaves extract. **Journal of ethnopharmacology**, v. 173, p. 251-255, 2015.

HUI H.W.; HO, C.T. An examination of the Euphorbiaceae of Hong Kong. **Australian Journal of Chemistry**, v. 21, p. 1675-7, 1968.

IBRAHIMA, R.M et al. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *Securigera securidaca* flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 134-141, 2015.

KOUADIO J.H. et al. Acute and sub-acute toxicity of aqueous extract of *Nauclea latifolia* in Swiss mice and in OFA rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 1, p. 109-115, 2014.

JAHN, A.I.; GÜNZEL, P.K. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment?. **Reproductive toxicology**, v. 11, n. 2-3, p. 171, 1997.

KAUR P, BANSAL MP. Effect of experimental oxidative stress on steroidogenesis and DNA damage in mouse testis. **J Biomed Sci**, v. 11, p. 391-397, 2004.

KIBAZOHI, O.; SANGWAN, R. S. Vegetable oil production potential from *Jatropha curcas*, *Croton megalocarpus*, *Aleurites moluccana*, *Moringa oleifera* and *Pachira glabra*: assessment of renewable energy resources for bio-energy production in Africa. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 3, p. 1352-1356, 2011.

KRISNAWATI, H.; KALLIO, M.; KANNINEN, M. *Aleurites moluccana* (L.) Willd.: Ecology, silviculture and productivity. **CIFOR**, 2011.

KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R. J. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. **Food Chemistry**, v. 97, p. 109-114, 2006.

LAPCHIK. V.B.V.; MATTARAIA, V.G.M.; KO, G.M, 2009. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. Editora Atheneu Rio.

LI, C. et al. Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 620-625, 2010.

LIMA. C.M. et al.. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia plena**, 2014.

LIN, T. et al. Two outbreaks of acute Tung Nut (*Aleurites fordii*) poisoning. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 87-92, 1996.

LIU, H. et al. Four New Podocarpane-Type Trinorditerpenes from *Aleurites moluccana*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 90, n. 10, p. 2017-2023, 2007.

LIU, H. et al. Three novel 3, 4-seco-podocarpane trinorditerpenoids from *Aleurites moluccana*. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 35, p. 5150-5151, 2008.

LOCHER, C.P. et al. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 49, n. 1, p. 23-32, 1995.

LOCHER, C.P. et al. Antiviral activity of Hawaiian medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). **Phytomedicine**, v.2, n.3, p. 259-264, 1996.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A Hippocratic screen for pure or crude drugs materials. **Llordya**. v. 25, n.4, p.320-331, 1962.

MEIRELES, D.R.P. et al. Toxicity and antitumor efficacy of *Croton polyandrus* oil against Ehrlich ascites carcinoma cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p. 751-758, 2016.

MEYRE-SILVA, C. et al. A Triterpene and a Flavonoid Glycoside from *Aleurites moluccana* L. Willd. (Euphorbiaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 16, p. 169-172, 1997.

MEYRE-SILVA, C. et al. Preliminary phytochemical and pharmacological studies of *Aleurites moluccana* leaves [L.] Willd. **Phytomedicine**, v. 5, n. 2, p. 109-113, 1998.

MEYRE-SILVA, C. et al. Isolation of a C-glycoside flavonoid with antinociceptive action from *Aleurites moluccana* leaves. **Planta medica**, v. 65, n. 03, p. 293-294, 1999.

OJOKUKU, S.A. et al. Acute toxicity effect of *Croton penduliflorus* (Euphorbiaceae) Seed Oil. **Nigerian quarterly journal of hospital medicine**, v. 25, n. 2, p. 80-85, 2015.

ORELLANA-CUÉLLAR, L.R. et al. Toxicidad aguda de *Aleurites moluccana* por via oral en ratas Sprague-Dawley. **Ciencia e Investigación Medico Estudiantil Latinoamericana**, v. 19, n. 1, 2014.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. Paris, 2008a.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents, Paris, 2008b.

PAULUHN, J. et al. Two-week inhalation toxicity of polymeric diphenylmethane-4, 4'-diisocyanate (PMDI) in rats: analysis of biochemical and morphological markers of early pulmonary response. **Inhalation toxicology**, v. 11, n. 12, p. 1143-1163, 1999.

PEDROSA, R.C. et al. Hypolipidaemic activity of methanol extract of *Aleurites moluccana*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, vol. 16, n.8, p. 765-768, 2002.

PRABOWO, W.C. Isolation and Characterization of 3-Acetylaleuritolic Acid and Scopoletin from Stem Bark of *Aleurites moluccana* (L. Willd). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 851-853, 2013.

QUINTÃO, N.M. et al. *Aleurites moluccana* (L.) Willd. leaves: mechanical antinociceptive properties of a standardized dried extract and its chemical markers. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

QUINTÃO, N.M et al. *Aleurites moluccana* and its main active ingredient, the flavonoid 2"-O-rhamnosylswertisin, have promising antinociceptive effects in experimental models of hypersensitivity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 102, n. 2, p. 302-311, 2012

QUINTÃO, N.M. et al. Contribution of α , β -Amyrenone to the Anti-Inflammatory and Antihypersensitivity Effects of *Aleurites moluccana* (L.) Willd. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

RAJEH, M.A.B. et al. Acute toxicity impacts of *Euphorbia hirta* L extract on behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*. **Pharmacognosy research**, v. 4, n. 3, p. 170, 2012.

RAMAIAH, S.K. Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. **Clinics in laboratory medicine**, v. 31, n. 1, p. 161-172, 2011.

ROJAS J.; DÍAZ, D. Evaluación de la toxicidad del extracto metanólico de hojas de *Passiflora edulis* Sims (maracuyá), en ratas. **An Fac Med**, v. 70, n. 3, p. 175-80, 2012.

SANTOS, K.C. et al. Sedative and anxiolytic effects of methanolic extract from the leaves of *Passiflora actinia*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 565-573, 2006.

SATYANARAYANA, P. et al. A new phorbol diester from *Aleurites moluccana*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 3, p. 304-306, 2001.

SAWADOGO, S. et al. In Vivo Evaluation of *Jatropha curcas* L (Euphorbiaceae) Leaves Acute and Subacute Toxicity in Mice. **Journal of Scientific Research**, v. 10, n. 2, p. 187-193, 2018.

SHAMSUDDIN, T. et al. Moluccanin, a coumarinolignoid from *Aleurites moluccana*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 6, p. 1908-1909, 1988.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**. Nova Odessa, São Paulo. Instituto Plantarum, p. 640, 2008.

TAYLOR, R.; MCINNES, E., 2012. Background Lesions in Laboratory Animals: a Color Atlas.

TRAESEL, G. K. et al. Oral acute and subchronic toxicity studies of the oil extracted from pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 224-231, 2016.

TSAI, J. et al. Extracts of *Cerbera manghas* L. effectively inhibit the viability of glioblastoma cell lines and their cancer stemloids in vitro and in mouse xenograft model. **Journal of functional foods**, v. 48, p. 283-296, 2018.

Yun, J.W. Possible anti-obesity therapeutics from nature. A review. **Phytochem.** v. 71, 1625–1641, 2010.

Tabela 1. Constituintes e características do EASAM através do sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas.

Compostos	TR (min)	Compostos identificados	[M + H] ⁺	MS	Referências
1	42,1	6-C-pentosyl-8-C-hexosyl apigenin	565	505 [(M+H) - 60], 475 [(M+H) - 90], 383 (aglycone + 113), 353 (aglycone + 83)	Figueirinha et al., 2008
2	42,4	Isovitexin	433	435, 343 [(M+H) - 90], 313 [(M+H) - 120], 100	Ibrahima et al., 2015
3	44,3	6-C-pentosyl-8-C-pentosyl luteolin	551	533[(M+H)-H ₂ O], 491 [(M+H) - 60] ,461 [(M+H) - 90]	Figueirinha et al., 2008
4	57,81	Neriifolin	535	-	Carlier et al., 2014

TR: Tempo de retenção; [M + H]⁺: Massa do composto + 1 hidrogênio.

Tabela 2. Parâmetros fisiológicos: ganho de peso corporal e consumo de ração e água de ratos tratados por via oral com o EASAM.

	Toxicidade aguda		Toxicidade a curto prazo					Controle do Satélite
	Controle	2000 mg/kg	Controle	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg	Satélite	
Fêmeas								
Peso inicial (g)	204.00 ± 4.04	196.40 ± 5.38	136.40 ± 23.43	142.20 ± 29.30	131.40 ± 24.17	142.25 ± 28.54	172.75 ± 19.45	152.6 ± 30.36
Peso final (g)	222.00 ± 4.40	225.40 ± 5.98	186.80 ± 14.26	182.00 ± 22.71	195.20 ± 8.56	180.75 ± 19.17	212.50 ± 30.77	227.6 ± 41.75
Ganho de peso (g)	20.20 ± 4.79	29.00 ± 5.01	50.40 ± 15.95	39.80 ± 8.86	63.80 ± 24.76	38.50 ± 16.37	39.75 ± 11.43	52.00 ± 17,42
Ganho de peso (%)	8.98 ± 2.05	12.84 ± 2.05	27.25 ± 9.20	22.70 ± 7.98	32.61 ± 12.28	21.92 ± 10.21	18.25 ± 3.15	26.04 ± 10.40
Consumo de ração g/dia	88.31 ± 6.46	76.52 ± 10.64*	83.07 ± 14.63	73.42 ± 8.99	80.39 ± 13.85	66.35 ± 11.11*	67.50 ± 8.49*	136.07 ± 18.14
Consumo de água mL/dia	186.40 ± 21.11	158.65 ± 13.31**	184.82 ± 53.79	131.87 ± 11.82	151.07 ± 36.55	140.78 ± 30.68	130.67 ± 15.80	19.03 ± 7.58
Machos								
Peso inicial (g)			235.00 ± 25.94	229.40 ± 16.43	231.80 ± 22.58	234.40 ± 16.20	236 ± 15.85	234.6 ± 14.2
Peso final (g)			298.20 ± 35.16	288.60 ± 16.81	297.20 ± 25.14	308.20 ± 23.48	301,8 ± 26.60	304.80 ± 9.94
Ganho de peso (g)			63.20 ± 35.16	59.20 ± 17.29	65.40 ± 19.23	73.80 ± 18.73	67.4 ± 32.78	70.2 ± 13.78
Ganho de peso			21.05 ± 3.04	20.39 ± 5.54	21.89 ± 5.43	23.71 ± 5.14	21.64 ± 9,31	22.99 ± 4.39

Consumo de ração g/dia	112.67 ± 17.05	110.67 ± 15.58	110.46 ± 11.82	116.75 ± 19.44	106.39 ± 10.32	114.46 ± 6.12
Consumo de água mL/dia	223.75 ± 49.59	188.57 ± 24.88	164.10 ± 14.39**	206.42 ± 29.87	182.67 ± 26.90	210.17 ± 25.12

Valores expressos em média ± desvio padrão (n=5). * P < 0.05 vs controle; ** P < 0.01 vs controle. Para toxicidade aguda foi utilizado o Teste T de Student's e para a toxicidade a curto prazo ANOVA/Dunnet's.

Tabela 3. Parâmetros fisiológicos: ganho de peso corporal e consumo de ração e água dos ratos que ficaram mais 14 dias em observação (satélite).

	Peso inicial (g) (29° dia)	Peso final (g) (48° dia)	Ganho de peso (g)	Ganho de peso (%)	Consumo de ração (g)	Consumo de água (mL)
Fêmeas						
Controle	204.60 ± 12.56	212.80 ± 11.68	7.60 ± 3.00	3.58 ± 1.50	81.91 ± 6.14	164.28 ± 19.07
Satélite	208.75 ± 28.50	213.25 ± 27.80	4.50 ± 1.11	2.11 ± 0.75	66.28 ± 7.47**	178.21 ± 19.69
Machos						
Controle	308.40 ± 13.30	316.60 ± 8.20	8.20 ± 4.79	2.59 ± 1.54	112.78 ± 5.46	206.07 ± 17.94
Satélite	300.80 ± 25.97	324.00 ± 25.63	18.60 ± 7.17*	5.85 ± 2.36	112.71 ± 8.77	208.21 ± 18.86

Valores expressos em média ± desvio padrão (n =5). P < 0.05 vs controle; ** P < 0.01 vs controle (ANOVA/Dunnet's)

Tabela 4. Peso e peso relativo dos órgãos (g/100g do peso corporal) dos animais tratados por via oral com o EASAM.

		Toxicidade Aguda			Toxicidade a curto prazo				
		Controle	2000 mg/kg	Controle	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg	Satélite	Controle do Satélite
Fêmeas									
Coração	g	0.6699 ± 0.02	0.7181 ± 0.05	0.6060 ± 0.05	0.6064 ± 0.04	0.5992 ± 0.02	0.6317 ± 0.08	0.7007 ± 0.07	0.6457 ± 0.03
	g/100g	0.3186 ± 0.02	0.2991 ± 0.01	0.3246 ± 0.01	0.3364 ± 0.02	0.3075 ± 0.01	0.3484 ± 0.02	0.3300 ± 0.01	0.3044 ± 0.02
Fígado	g	8.6275 ± 0.48	9.3010 ± 1.11	6.4845 ± 0.62	6.2872 ± 0.85	6.2420 ± 0.74	6.5465 ± 0.44	6.6575 ± 1.26	6.5619 ± 0.61
	g/100g	4.1333 ± 0.54	3.8488 ± 0.22	3.4666 ± 0.07	3.4662 ± 0.35	3.1944 ± 0.31	3.6503 ± 0.33	3.1027 ± 0.24	3.085 ± 0.25
Baço	g	0.5481 ± 0.05	0.5813 ± 0.09	0.4728 ± 0.04	0.4460 ± 0.04	0.4829 ± 0.04	0.4598 ± 0.04	0.4992 ± 0.05	0.4723 ± 0.05
	g/100g	0.2586 ± 0.04	0.2448 ± 0.02	0.2535 ± 0.01	0.2465 ± 0.02	0.2472 ± 0.01	0.2546 ± 0.008	0.2351 ± 0.01	0.2218 ± 0.02
Rim	g	0.8382 ± 0.05	0.9184 ± 0.05	0.7725 ± 0.06	0.6624 ± 0.07	0.7359 ± 0.06	0.7305 ± 0.04	0.7897 ± 0.13	0.7967 ± 0.04
	g/100g	0.4078 ± 0.03	0.3734 ± 0.02	0.4151 ± 0.03	0.3654 ± 0.02*	0.3769 ± 0.02	0.4066 ± 0.02	0.3682 ± 0.01	0.3744 ± 0.006
Pulmão	g	1.2191 ± 0.13	1.2781 ± 0.06	1.0807 ± 0.07	1.2367 ± 0.12	1.3884 ± 0.36	1.9258 ± 0.70***	1.3707 ± 0.06	1.1299 ± 0.08
	g/100g	0.5676 ± 0.03	0.5447 ± 0.08	0.5796 ± 0.03	0.6924 ± 0.12	0.7166 ± 0.20	1.0492 ± 0.35	0.6539 ± 0.08	0.5311 ± 0.03
Ovário	g	0.0734 ± 0.01	0.0847 ± 0.01	0.0874 ± 0.02	0.0764 ± 0.01	0.0729 ± 0.01	0.0821 ± 0.02	0.1186 ± 0.02	0.1190 ± 0.03
	g/100g	0.0377 ± 0.006	0.0320 ± 0.007	0.0468 ± 0.01	0.0400 ± 0.007	0.0370 ± 0.004	0.0445 ± 0.008	0.05 ± 0.01	0.054 ± 0.01
Útero	g	0.4386 ± 0.03	0.4234 ± 0.04	0.3344 ± 0.07	0.3916 ± 0.15	0.3700 ± 0.10	0.3165 ± 0.08	0.4047 ± 0.03	0.3865 ± 0.13
	g/100g	0.1952 ± 0.03	0.1931 ± 0.04	0.1782 ± 0.03	0.2080 ± 0.06	0.1884 ± 0.04	0.1721 ± 0.03	0.1916 ± 0.01	0.1792 ± 0.05
Machos									
Coração	g			0.8398 ± 0.08	0.8819 ± 0.07	0.8453 ± 0.10	0.8397 ± 0.05	0.8701 ± 0.09	0.8576 ± 0.07
	g/100g			0.2846 ± 0.03	0.3053 ± 0.01	0.2843 ± 0.02	0.2744 ± 0.02	0.2744 ± 0.03	0.2707 ± 0.02
Fígado	g			9.4427 ± 1.59	8.8412 ± 0.60	9.3219 ± 0.91	10.0925 ± 0.72	9.5737 ± 1.19	9.4055 ± 0.56
	g/100g			3.1546 ± 0.29	3.0640 ± 0.13	3.1406 ± 0.21	3.289 ± 0.20	2.9953 ± 0.18	2.9687 ± 0.08
Baço	g			0.6273 ± 0.09	0.5830 ± 0.06	0.6260 ± 0.07	0.5850 ± 0.03	0.6365 ± 0.06	0.6543 ± 0.08
	g/100g			0.2101 ± 0.01	0.2022 ± 0.02	0.2108 ± 0.08	0.1905 ± 0.007	0.1994 ± 0.005	0.2068 ± 0.02
Rim	g			1.1052 ± 0.12	1.1216 ± 0.12	1.1518 ± 0.14	1.1947 ± 0.06	1.1579 ± 0.13	1.1785 ± 0.11
	g/100g			0.3710 ± 0.01	0.3891 ± 0.04	0.3870 ± 0.02	0.3897 ± 0.02	0.3624 ± 0.02	0.3719 ± 0.02
Pulmão	g			1.3828 ± 0.27	1.3809 ± 0.11	1.4103 ± 0.16	1.4760 ± 0.24	1.7092 ± 0.18	1.4649 ± 0.07
	g/100g			0.4600 ± 0.03	0.4797 ± 0.04	0.4754 ± 0.04	0.4979 ± 0.06	0.5419 ± 0.09	0.4634 ± 0.03
Testículo	g			1.2671 ± 0.44	1.5012 ± 0.10	1.5997 ± 0.09	1.6392 ± 0.05	1.5119 ± 0.10	1.5603 ± 0.04
	g/100g			0.4330 ± 0.15	0.5204 ± 0.02	0.5403 ± 0.03	0.5464 ± 0.05	0.4770 ± 0.05	0.4931 ± 0.01
Epidídimo	g			0.3454 ± 0.06	0.3349 ± 0.04	0.3653 ± 0.02	0.3477 ± 0.02	0.3625 ± 0.04	0.3686 ± 0.03
	g/100g			0.1166 ± 0.02	0.1164 ± 0.01	0.1234 ± 0.01	0.1135 ± 0.01	0.1140 ± 0.01	0.1164 ± 0.009

Valores expressos em média \pm desvio padrão (n = 5). * P < 0.05 vs controle; ** P < 0.01 vs controle; *** P < 0.001 vs controle. (ANOVA/Dunnet's).

Tabela 5. Parâmetros hematológicos de ratos tratados por via oral com o EASAM.

	Toxicidade a curto prazo						Valor de referência
	Controle	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg	Satélite	Controle satélite	
Fêmeas							
Leucócitos (/mm ³)	7286 ± 1752	7360 ± 2156	7530 ± 1500	7002 ± 2201	6695 ± 1531	5914 ± 2512	4.0-10.2 ¹
Eritrócitos (milhão/mm ³)	8.94 ± 0.21	8.38 ± 0.31	8.67 ± 0.1	8.86 ± 0.36	8.83 ± 0.55	8.49 ± 0.24	5.4-8.5 ¹
Hemoglobina (g/dL)	15.74 ± 0.45	14.9 ± 0.87	15.22 ± 0.7	15.45 ± 0.40	15.35 ± 0.71	15.00 ± 0.40	11.5-16 ¹
Hematócrito (%)	50.18 ± 1.52	47.17 ± 2.39	48.9 ± 2.21	49.27 ± 1.98	49.6 ± 2.84	47.82 ± 1.24	37-49 ¹
VCM (fL)	56.08 ± 0.64	56.23 ± 1.01	56.35 ± 0.7	55.62 ± 1.15	56.19 ± 0.87	56.32 ± 0.55	49.1-62.5 ²
HCM (pg)	17.58 ± 0.29	17.75 ± 0.49	17.53 ± 0.25	17.45 ± 0.41	17.39 ± 0.3	17.66 ± 0.26	16.6-18.9 ²
CHCM (g/dL)	31.31 ± 0.31	31.52 ± 0.49	31.08 ± 0.09	31.33 ± 0.56	30.95 ± 0.59	31.33 ± 0.25	29.9-34.9 ²
Plaquetas (.10 ³ /mm ³)	1006 ± 134	1012 ± 120	911 ± 162	1005 ± 188	933 ± 65	1093 ± 267	757-1476 ²
Largura de Distribuição de Células Vermelhas (%)	15.60 ± 0.64	13.62 ± 0.93	14.8 ± 1.28	15.20 ± 1.51	14.9 ± 1.50	14.14 ± 0.73	12.7-18.2 ²
Monócitos (%)	0.20 ± 0.10	0.66 ± 0.59	0.24 ± 0.21	0.66 ± 0.59	0.13 ± 0.09	0.2 ± 0.14	0.6-7.9 ²
Linfócitos (%)	87.94 ± 0.10	90.15 ± 3.34	86.84 ± 3.53	87.55 ± 2.18	84.15 ± 4.09	83.24 ± 3.15	57.9-90 ²
Basófilos (%)	0.44 ± 0.08	0.50 ± 0.12	0.50 ± 0.16	0.80 ± 0.49	0.40 ± 0.18	0.22 ± 0.14	0.00-0.40 ²
Neutrófilos (%)	10.12 ± 1.17	5.47 ± 3.69	10.68 ± 3.63	6.85 ± 2.82	13.65 ± 3.53	13.94 ± 2.38	5.4-37.5 ²
Machos							
Leucócitos (/mm ³)	7770 ± 1602	8074 ± 1159	88.68 ± 864	8108 ± 2777	8270 ± 1649	8358 ± 1381	4.0-10.2 ¹
Eritrócitos (milhão/mm ³)	9.31 ± 0.18	9.8 ± 0.49	9.55 ± 0.48	9.24 ± 0.37	9.55 ± 0.38	9.15 ± 0.11	5.4-8.5 ¹
Hemoglobina (g/dL)	16.00 ± 0.6	16.86 ± 0.5	16.50 ± 0.70	16.18 ± 0.75	16.12 ± 0.52	15.72 ± 0.38	11.5-16 ¹
Hematócrito (%)	51.24 ± 2.02	54.02 ± 2.01	52.90 ± 1.80	51.46 ± 2.48	52.58 ± 2.37	51.26 ± 0.52	37-49 ¹
VCM(fL)	55.01 ± 1.16	55.12 ± 1.55	55.40 ± 1.60	55.67 ± 1.22	55.01 ± 0.74	56.02 ± 0.33	49.1-62.5 ²
HCM (pg)	17.17 ± 0.36	17.20 ± 0.48	17.26 ± 0.24	17.50 ± 0.3	16.87 ± 0.23	17.17 ± 0.21	16.6-18.9 ²
CHCM (g/dL)	31.19 ± 0.35	31.19 ± 0.37	31.14 ± 0.46	31.41 ± 0.28	30.66 ± 0.64	30.65 ± 0.45	29.9-34.9 ²
Plaquetas (.10 ³ /mm ³)	1030 ± 68	915 ± 108	865 ± 65	897 ± 138	968 ± 43	944 ± 80	757-1476 ²
Largura de Distribuição de Células Vermelhas (%)	17.24 ± 0.3	17.44 ± 1.11	17.04 ± 1.12	15.94 ± 0.87	17.9 ± 0.6	17.12 ± 0.50	12.7-18.2 ²
Monócitos (%)	0.28 ± 0.11	0.14 ± 0.04	0.16 ± 0.04	0.17 ± 0.04	0.2 ± 0.08	0.12 ± 0.08	0.6-7.9 ²
Linfócitos (%)	82.26 ± 1.99	83.82 ± 4.12	85.56 ± 2.57	83.88 ± 2.82	84.58 ± 2.75	84.76 ± 2.56	57.9-90 ²
Basófilos (%)	0.32 ± 0.11	0.6 ± 0.13	0.36 ± 0.10	0.3 ± 0.08	0.28 ± 0.04	0.3 ± 0.1	0.00-0.40 ²
Neutrófilos (%)	15.8 ± 1.82	14.48 ± 3.75	12.74 ± 2.17	13.96 ± 2.55	13.42 ± 3.04	13.12 ± 2.32	5.4-37.5 ²

Valores expressos em média ± desvio padrão (n=5). * P < 0.05 vs controle; ** P < 0.01 vs controle; (ANOVA/Dunnet's).¹ (Lapchik et al., 2009).²(

Lima et al. 2014).

Tabela 6. Parâmetros bioquímicos de ratos tratados via oral com o EASAM.

Toxicidade a curto prazo							
	Controle	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg	Satélite	Controle do Satélite	Valores de referência
Fêmeas							
Glicose (mg/dL)	151.16 ± 45.84	95.4 ± 9.76	144.04 ± 44.58	125.82 ± 37.22	108.05 ± 27.27	121.76 ± 14.86	85-132 ¹
Colesterol total (mg/dL)	66.74 ± 11.98	61.8 ± 13.65	60 ± 7.34	65.77 ± 13.83	54.25 ± 16.63	62.40 ± 6.15	46-92 ¹
HDL colesterol (mg/dL)	67.84 ± 11.45	62.4 ± 11.92	58.48 ± 6.76	65.35 ± 13.08	52.25 ± 14.88	58.00 ± 4.33	37-59 ¹
Triglicerídeos	38.84 ± 7.29	40.12 ± 9.56	43.06 ± 6.14	44.77 ± 10.89	36.60 ± 8.93	42.38 ± 10.85	58-106 ¹
Alanina aminotransferase	30.22 ± 6.06	27.62 ± 3.59	37.54 ± 8.13	31.55 ± 2.46	31.35 ± 2.46	30.16 ± 2.58	17-50 ¹
Aspartato aminotransferase	90.44 ± 18.52	130.42 ± 32.02	87.8 ± 12.99	90.57 ± 39.34	75.47 ± 5.71	84.52 ± 13.00	39-93 ¹
Uréia	49.68 ± 5.90	43.22 ± 5.13	46.40 ± 7.97	42.47 ± 24.54	43.77 ± 4.64	47.06 ± 4.76	32-54 ¹
Creatinina	0.48 ± 0.18	0.40 ± 0.06	0.39 ± 0.04	0.3 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.47 ± 0.04	0.2-05 ²
Albumina	4.77 ± 0.08	4.52 ± 0.29	4.66 ± 0.26	4.42 ± 0.26	4.69 ± 0.07	4.67 ± 0.13	3.3-49 ¹
Proteínas totais	6.6 ± 0.10	6.56 ± 0.32	6.70 ± 0.31	6.62 ± 0.23	6.92 ± 0.17	6.76 ± 0.23	6.3-8.6 ¹
Ácido úrico	3.40 ± 0.79	2.13 ± 0.24	3.52 ± 0.09	3.33 ± 1.04	3.40 ± 0.29	2.75 ± 0.54	1.2-3.4 ²
Fosfatase alcalina	83.20 ± 13.21	62.75 ± 7.22	80.50 ± 15.30	80.66 ± 11.26	57.00 ± 6.48	50.25 ± 2.94	51-116 ²
Machos							
Glicose (mg/dL)	191.42 ± 71.22	178.86 ± 31.47	179.18 ± 54.11	191.52 ± 72.38	146.64 ± 34.32	232.6 ± 61.10	85-132 ¹
Colesterol total (mg/dL)	61.20 ± 11.42	51.60 ± 9.93	53.60 ± 9.39	54.00 ± 7.56	61.8 ± 5.03	56.68 ± 10.15	46-92 ¹
HDL colesterol (mg/dL)	62.20 ± 10.02	53.82 ± 9.48	56.00 ± 7.92	57.00 ± 6.84	58.60 ± 3.82	54.34 ± 8.78	37-59 ¹
Triglicerídeos	45.20 ± 9.00	35.14 ± 6.03	42.06 ± 9.94	41.44 ± 7.85	55.98 ± 13.49	63.10 ± 17.95	58-106 ²
Alanina aminotransferase	35.86 ± 6.77	36.24 ± 4.57	31.78 ± 6.82	31.44 ± 2.18	34.54 ± 12.96	51.54 ± 32.12	17-50 ¹
Aspartato aminotransferase	83.64 ± 15.75	83.64 ± 14.89	77.04 ± 11.30	86.16 ± 21.70	91.56 ± 36.51	128.06 ± 68.43	39-93 ¹
Uréia	43.38 ± 6.18	39.70 ± 3.91	40.36 ± 5.05	41.18 ± 4.53	37.02 ± 3.17	42.20 ± 6.49	32-54 ¹
Creatinina	0.38 ± 0.02	0.36 ± 0.04	0.38 ± 0.02	0.39 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.2-05 ²
Albumina	4.50 ± 0.10	4.68 ± 0.19	4.74 ± 0.10	4.62 ± 0.17	4.58 ± 0.12	4.54 ± 0.18	3.3-4.9 ¹
Proteínas totais	6.44 ± 0.22	6.60 ± 0.28	6.60 ± 0.12	6.42 ± 0.33	6.60 ± 0.12	6.62 ± 0.17	6.3-8.6 ¹
Ácido úrico	3.00 ± 0.60	3.80 ± 0.79	3.35 ± 0.53	3.13 ± 0.67	3.30 ± 0.63	3.40 ± 0.30	1.0-3.2 ²
Fosfatase alcalina	110.00 ± 4.24	116.00 ± 2.16	98.66 ± 3.29	113.33 ± 2.62	98.66 ± 6.94	117.00 ± 9.20	56-153 ²

Valores expressos em média \pm desvio padrão (n=5). * P < 0.05 vs controle; ** P < 0.01 vs controle; *** P < 0.001 vs controle. (ANOVA/Dunnet's).¹ (Lapchik et al., 2009). ² (Lima et al., 2014).

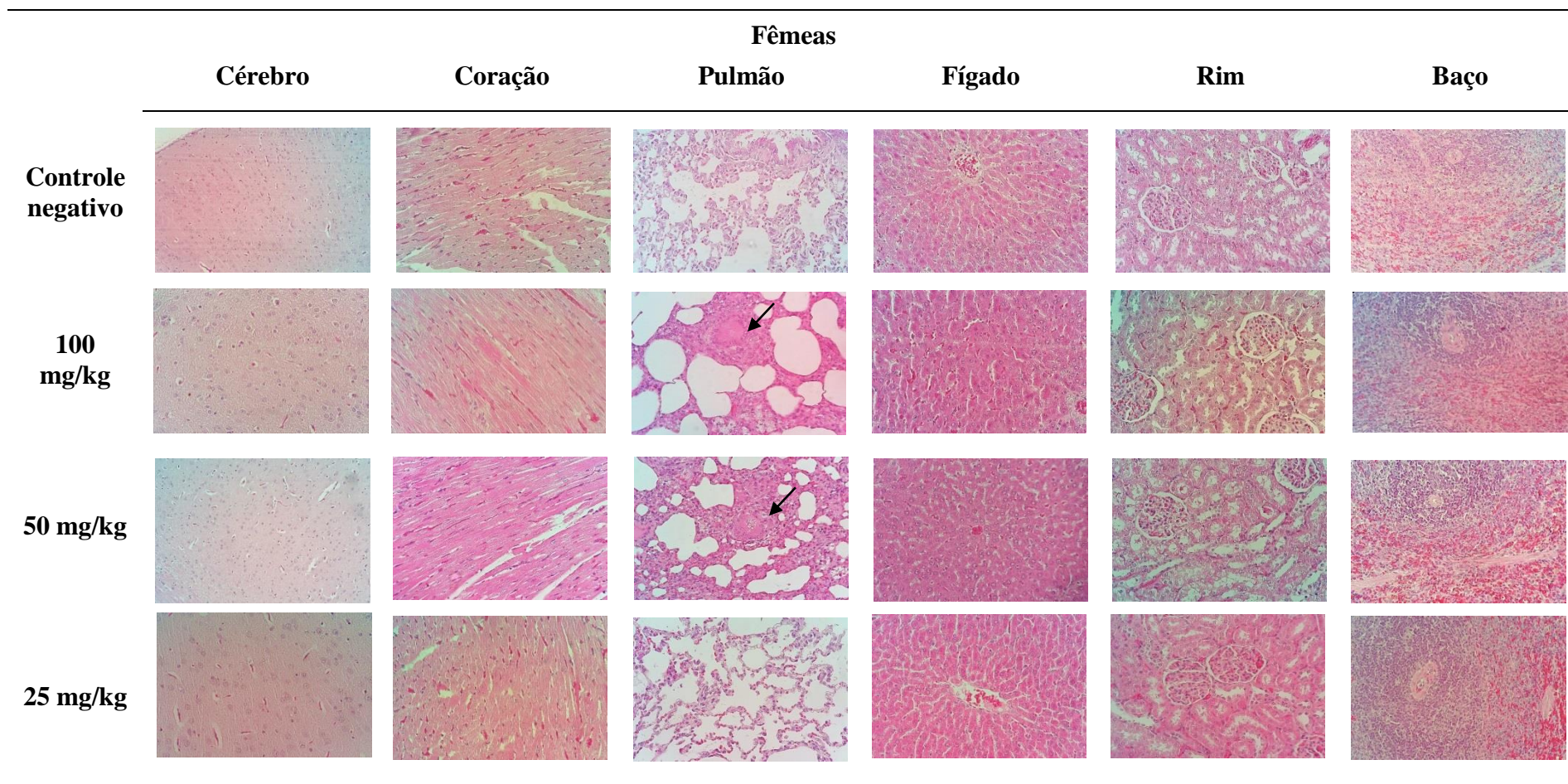


Figura 1. Análise histopatológica dos órgãos das ratas tratadas a curto prazo com o EASAM. (H&E, obj. 20X e 40X). Setas indicam áreas com lesões por falsa via nos pulmões (espessamento da parede alveolar, infiltrado inflamatório mononuclear e células gigantes multinucleadas com imagens sugestivas de fibras vegetais).

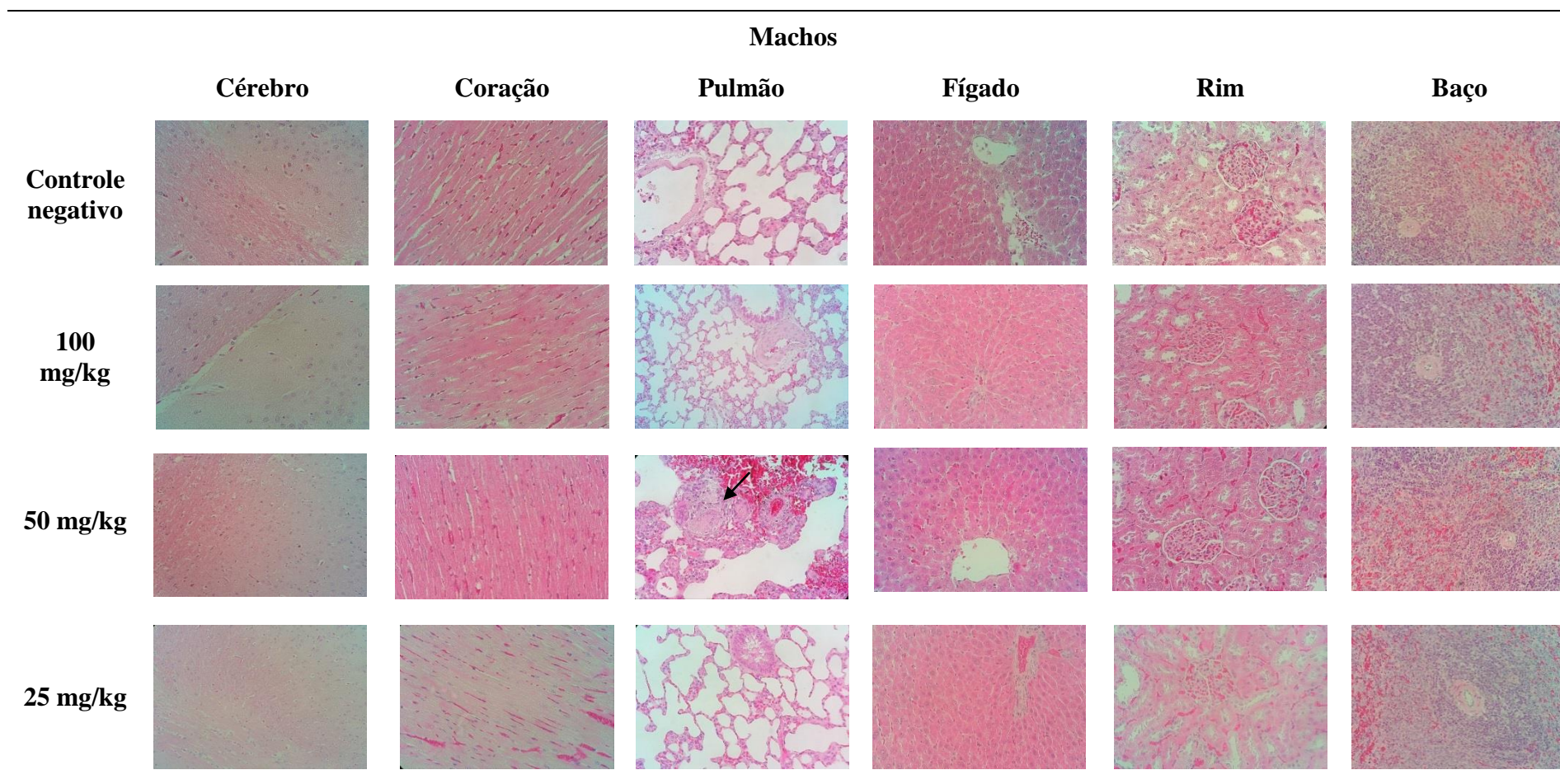


Figura 2. Análise histopatológica dos órgãos dos ratos tratados a curto prazo com o EASAM. (H&E, obj. 20X e 40X). A seta indica área com lesão por falsa via nos pulmões (espessamento da parede alveolar, infiltrado inflamatório mononuclear e células gigantes multinucleadas com imagens sugestivas de fibras vegetais).

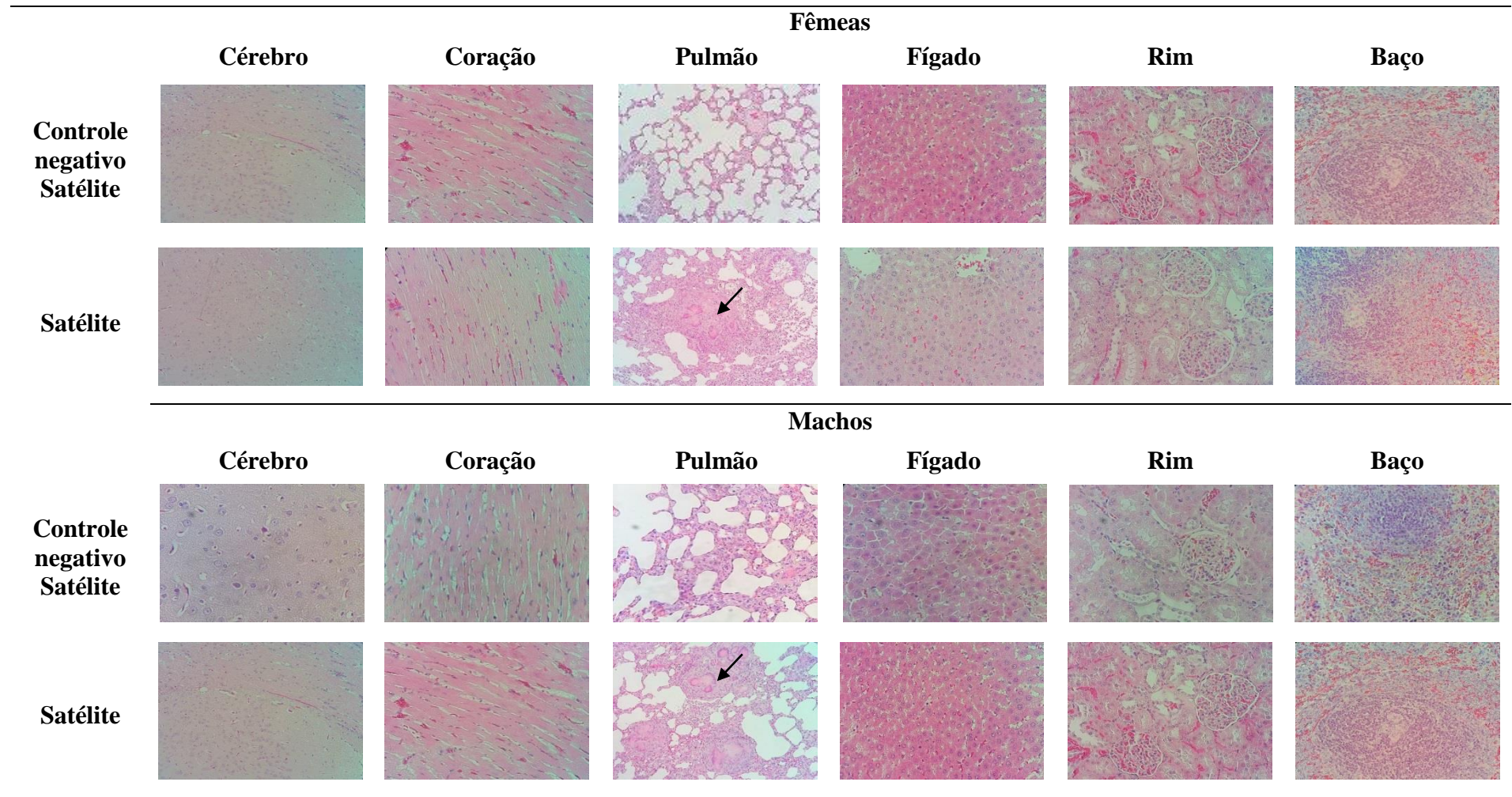


Figura 3. Análise histopatológica dos órgãos dos animais que foram tratados durante os 28 dias e ficaram mais 14 dias em observação. (H&E, obj. 20X e 40X). Setas indicam áreas com lesões por falsa via nos pulmões (espessamento da parede alveolar, infiltrado inflamatório mononuclear células gigantes multinucleadas com imagens sugestivas de fibras vegetais).

5.2 Manuscrito III: Citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade do extrato aquoso de sementes de *Aleurites moluccana* (L.) Willd. ensaios *in vitro* e *in vivo* - Revista Regulatory Toxicology and Pharmacology.

(Fator de impacto 2.996, Qualis A2 na área de Medicina II)

Link com as normas da revista: <https://www.elsevier.com/journals/regulatory-toxicology-and-pharmacology/0273-2300/guide-for-authors>

1 Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do extrato aquoso das sementes de *Aleurites*
2 *molucana* (L.) Willd. em ensaios *in vitro* e *in vivo*

3

4 Pamella Fukuda de Castilho^a, Fabiana Gomes da Silva Dantas^b, Silvia Aparecida Oesterreich^a,
5 Kelly Mari Pires de Oliveira^{b*}

6

7 ^a Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS,
8 Brasil. pamellafcastilho@gmail.com; silviaoesterreich@ufgd.edu.br.

9 ^b Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados,
10 Dourados, MS, Brasil. kellyoliveira@ufgd.edu.br.

11

12

13

14 Abbreviations: ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; DNA, Ácido
15 Desoxirribonucleico; EASAM, Extrato Aquoso das Sementes de *Aleurites moluccana*; MN-
16 PCES, Eritrócitos Policromáticos Micronucleados; MTS, (3 [4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-
17 carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenilo]-2H-tetrazólio); PCE, Eritrócito Policromático.

18

19

20 *Autores correspondente: Faculdade de Ciências Ambientais e Biológicas, Universidade
21 Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados – Itahum, Km 12. Dourados, MS, Brasil.
22 Phone.: +55 67 3410-2320, e-mail: kellyoliveira@ufgd.edu.br

23

24

25

Resumo

26
27 Sementes de *Aleurites moluccana*, “noz da Índia”, são popularmente utilizadas para
28 emagrecimento e estudos para avaliação toxicológica e validação do uso seguro são
29 necessários. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e
30 mutagênico e do extrato aquoso das sementes de *Aleurites moluccana* (EASAM) em ensaios
31 *in vitro* e *in vivo*. Para os ensaios *in vitro*, o potencial mutagênico foi avaliado pelo teste de
32 Ames na presença e ausência da ativação metabólica e o potencial citotóxico pelo ensaio do
33 MTS frente linhagens tumorais e não-tumorais. Para os ensaios *in vivo*, o potencial
34 mutagênico foi avaliado pelo teste do micronúcleo utilizando células hematopoiéticas da
35 medula óssea e o genotóxico pelo teste do cometa utilizando células de sangue periférico. Os
36 resultados demonstram que o EASAM não apresentou potencial mutagênico *in vivo* e *in vitro*
37 e genotóxico *in vivo*. Quanto ao potencial citotóxico, o EASAM na maior concentração
38 reduziu a viabilidade celular de todas as linhagens a menos de 50%, e, nas menores
39 concentrações, manteve a viabilidade das linhagens tumorais reduzidas (65 – 95%). De
40 acordo com os resultados deste trabalho, o EASAM nas condições e concentrações avaliadas,
41 não apresentou potencial genotóxico *in vivo* e mutagênico *in vitro* e *in vivo*, entretanto,
42 observou-se potencial antiproliferativo nas concentrações testadas.

43

44 Palavras-chave: Produtos naturais; noz da Índia, teste de Ames; micronúcleo; cometa.

45

46

47

48

49

50

51 1. Introdução

52 Produtos naturais são considerados fonte inesgotável para obtenção de substâncias
53 com potencial terapêutico. O uso de plantas para fins medicinais é uma prática que integra os
54 aspectos populares e as propriedades químicas que são fundamentadas na estrutura e
55 princípios ativos (Yun, 2010). De acordo com a Organização Mundial da Saúde milhões de
56 pessoas utiliza como fonte de cuidados primários com a saúde e, até mesmo único, as plantas
57 (OMS, 2013). Na literatura há dados que confirmam a atividade biológica e segurança dessas
58 plantas utilizadas como medicinais (Fratoni et al., 2018; Saleem et al., 2019) bem como
59 outros que demonstraram possíveis efeitos adversos (Prinsloo et al., 2018; George, 2011).

60 Considerando este último fato, estudos e diretrizes alinharam-se para padronizar testes
61 que avaliam a toxicologia das plantas para o desenvolvimento de medicamentos. Entre esses
62 testes, destacam-se os estudos que avaliam a capacidade dos produtos naturais na indução de
63 danos ao material genético e, incluem um teste de mutação gênica em bactéria, o teste de
64 micronúcleo em células hematopoiéticas de roedores e um segundo ensaio *in vivo*, como o
65 ensaio do cometa (ANVISA, 2013). Os resultados obtidos nos estudos, podem então,
66 esclarecer sobre a toxicologia das plantas utilizadas e assim fundamentar o seu consumo.

67 *Aleurites moluccana* (L.) Willd., pertence a família Euphorbiaceae e é considerada
68 uma planta medicinal. Suas cascas, folhas e o óleo também são utilizados popularmente para
69 o tratamento de inúmeras doenças, como: úlceras, conjuntivite, inflamações, febre, gonorreia,
70 (Hoepers et al., 2015; Krisnawati et al., 2011). Quanto aos estudos farmacológicos, esses
71 estão direcionados para suas partes áreas, as folhas, que já demonstraram potencial anti-
72 inflamatória e analgésico (Cesca et al., 2012; Quintão et al., 2011). Além disso, uma parte que
73 tem chamado atenção em *A. moluccana* são suas sementes, conhecidas como “noz da Índia”,
74 que estavam sendo ingeridas pela população para emagrecer, mas que foram relatadas com
75 potencial tóxico (CIVITOX-MS, 2016) e associada à três óbitos (ANVISA, 2017).

76 Em 2017 a ANVISA proibiu o uso e comercialização da noz da Índia após o
77 conhecimento dos fatos, porém, até o momento não há comprovações científicas. Assim,
78 considerando a ausência desses estudos e o conhecimento de que os produtos naturais podem
79 apresentar efeitos adversos, o nosso trabalho teve como objetivo avaliar o potencial tóxico do
80 extrato aquoso das sementes de *Aleurites moluccana* através dos estudos de citotoxicidade,
81 genotoxicidade e mutagenicidade em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

82

83 2. Material e métodos

84

85 2.1 Material vegetal e preparo do extrato

86 As sementes frescas de *Aleurites moluccana* foram obtidas comercialmente na cidade
87 de São Paulo, São Paulo, Brasil. Para o preparo do extrato aquoso 200g de semente foram
88 trituradas no liquidificador com 1000 mL de água destilada durante 2 min. Essa mistura ficou
89 durante 72 h uma incubadora de bancada com agitação orbital (Quimis, Brasil) a temperatura
90 ambiente e após esse período foi filtrada com papel filtro de celulose. O filtrado foi liofilizado
91 e o produto obtido foi um pó de cor bege com um rendimento de aproximadamente 10%. A
92 amostra foi armazenada em um recipiente e refrigerada a 4 °C até posterior análises.

93

94 2.2 Testes *in vitro*

95

96 2.2.1 Teste de Ames

97 O potencial mutagênico *in vitro* foi avaliado pelo Teste de Ames através do método
98 de microsuspenção descrito por Kado e colaboradores (1983) e de acordo com os protocolos
99 estabelecidos pela *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OCED)
100 *Guideline 471* (OECD, 1997). O ensaio foi conduzido na presença e ausência da

101 metabolização exógena, obtida a partir do fígado de ratos Sprague-Dawley e preparada antes
102 de cada teste e com as linhagens de *Salmonella* Typhimurium TA97a, TA98, TA100, TA102
103 e TA1535 padronizadas de modo a obter uma suspensão celular de 10^8 células por mL.

104 Para o teste foram adicionados 50 μ L de tampão fosfato 0,2 M ou a fração S9, 5 μ L
105 do EASAM nas concentrações de 5000, 1500, 500, 150 e 50 μ g/placa e 50 μ L da suspensão
106 bacteriana em cada tubo teste. Os tubos foram pré-incubados por 90 min a 37 °C. Após o
107 tempo de incubação, 2 mL de top ágar foram adicionados em cada tubo e em seguida a
108 mistura foi vertida em placas de ágar mínimo. As placas foram incubadas a 37 °C por 48-66 h
109 e as colônias revertentes contadas. Como controle positivo no ensaio com fração foi utilizado
110 2-aminoantraceno (2-ANTR) (0,63 μ g/placa) para todas as linhagens. No ensaio sem a fração,
111 foram utilizados a nitrofenilenodiamina (10 μ g/placa) para linhagem TA98 e TA97a e azida
112 sódica (2,5 μ g/placa) para as linhagens TA100 e TA1535. Água destilada esterilizada foi
113 utilizada como controle negativo. Todos os reagentes utilizados como positivos foram
114 adquiridos da Sigma Aldrich. Os ensaios foram realizados em triplicata.

115

116 2.2.2 Teste de citotoxicidade

117 A citotoxicidade foi avaliada via atividade mitocondrial utilizando o reagente
118 colorimétrico pelo método de redução do reagente MTS (3 [4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-
119 carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenilo]-2H-tetrazólio) (Promega, Fitchburg, USA) de acordo
120 com a metodologia descrita por Capoci et al., 2015. Foram utilizadas linhagens tumorais
121 HeLa ATCC CCL-2TM e SiHa ATCC HTB-35TM, provenientes de adenocarcinoma humano de
122 colo de útero e carcinoma cervical infectadas por HPV-16, respectivamente e linhagem
123 celular não-tumoral VERO ATCC CCL-81TM, de células de rim de macaco verde africano,
124 *Cercopithecus aethiops*.

125 As linhagens HeLa e SiHa foram cultivadas em meio Eagle's modificado por
126 Dulbecco's (DMEM, Gibco,EUA) e a linhagem VERO em meio RPMI 1640, ambos
127 suplementados com 10% de soro bovino fetal (Gibco, EUA) e 1% de
128 penicilina/estreptomicina (P/S, Gibco, EUA). Após 80% de confluência, as células foram
129 ajustadas para 2×10^5 células/mL e 200 µl foram inoculadas em placas de 96 poços. Após 24h
130 de incubação, os poços foram lavados três vezes e as células foram tratadas com EASAM nas
131 concentrações de 5000, 1500, 500, 150, 50 µg/mL. Após 24 horas de incubação a 37 °C e 5%
132 de CO₂, foi realizada a leitura da microplaca mensurando a densidade ótica a 490 nm
133 (Biochrom, Holliston, MA, USA). O ensaio foi realizado em triplicata.

134

135 2.3 Testes *in vivo*

136

137 2.3.1 Animais e tratamentos

138 Para os testes do cometa e micronúcleo foram utilizados setenta ratos (*Rattus*
139 *novergicus*) da linhagem Wistar de ambos sexos (40 fêmeas e 30 machos) com idade entre 45
140 e 60 dias e peso semelhantes. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade
141 Federal da Grande Dourados e mantidos em uma caixa de polipropileno com 5 animais por
142 caixa. Depois foram alocados no biotério da Faculdade de Ciências da saúde e ficaram em
143 temperatura (22 ± 2 °C), umidade (40 - 60%) e luminosidade (ciclo claro-escuro de 12 h)
144 controladas e com livre acesso a água e ração. O experimento só deu início após a aclimação
145 dos animais. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os
146 cuidados com animais de laboratório definidas pelo Conselho Nacional de Controle de
147 Experimentação Animal e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal
148 da Universidade Federal da Grande Dourados (protocolo nº 28/2017).

149 Cinco grupos com um n=10 sendo 5 fêmeas e 5 machos foram estabelecidos: 1.
150 Controle negativo: tratados durante 28 dias com administração do veículo por via oral; 2, 3 e
151 4 Grupos teste: os animais foram subdivididos em três grupos tratados (100mg/kg, 50mg/kg e
152 25mg/kg), o tratamento ocorreu por via oral durante 28 dias com uma das doses de EASAM;
153 5. Controle positivo: os animais foram tratados com ciclofosfamida administrada via
154 intraperitoneal em concentração de 20 mg/kg, 24 horas antes da eutanásia.

155

156 2.3.2 Teste do micronúcleo

157 O ensaio foi conduzido de acordo com os protocolos estabelecidos pela *Organisation*
158 *for Economic Cooperation and Development Guideline* 474 (OECD, 2016a) depois do
159 tratamento contínuo de 28 dias dos animais. Após a eutanásia, cada animal teve seu fêmur
160 direito retirado. As extremidades do fêmur foram cortadas para exposição da medula óssea. O
161 canal medular foi lavado com 1 mL de soro bovino fetal e foi coletado em um microtubo e
162 centrifugado durante 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi
163 utilizado para confecção do esfregaço. Decorrido 24 horas, fixou-se as lâminas em metanal
164 PA durante 10 minutos. Após, realizou-se a coloração com Giemsa, lavada com água
165 destilada e armazenada.

166 Para análise, um total de 2000 eritrócitos policromáticos (PCEs) por animal foram
167 analisados em microscópio óptico no aumento de 100x. Cada PCE foi observado a fim de
168 verificar a presença ou ausência do micronúcleo.

169

170 2.3.2 Teste do cometa

171 O ensaio foi conduzido de acordo com os protocolos estabelecidos pela *Organisation*
172 *for Economic Cooperation and Development Guideline* 489 (OECD, 2016b) depois do
173 tratamento contínuo de 28 dias dos animais. Após a eutanásia, amostras de sangue periférico

174 foram retiradas através da punção caudal em cada animal. Quarenta microlitros da amostra
175 foram adicionados em microtubos heparinizados, seguidamente foram adicionados 120 μ L de
176 agarose de baixo ponto de fusão e homogeneizados. As amostras produzidas foram
177 distribuídas em lâminas previamente com agarose padrão, e toda etapa foi conduzida em
178 ambiente protegido da luz por tratar-se de experimentação fotossensível. As lâminas foram
179 armazenadas em um refrigerador (3°C) por 20 minutos para solidificação da agarose.
180 Decorrido esse tempo, as lamínulas foram retiradas e as lâminas submergidas em solução de
181 lise por 2 horas a 3°C. Após o processo de desnaturação, as lâminas foram imersas em
182 solução tampão e submetidas a corrida eletroforética por 20 minutos a 4°C com 300 mA e 25
183 V. Feito esse processo, as lâminas foram retiradas e imersas em solução de neutralização em
184 três ciclos por 5 minutos. Por fim, as lâminas foram fixadas em álcool etílico por 10 minutos e
185 mantidas em refrigerador 4°C até as análises.

186 Anteriormente a leitura, as lâminas foram coradas com 100 μ L de brometo de etídio.
187 A leitura foi realizada em microscópio de epifluorescência, equipado com filtro de excitação
188 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Foram observadas 100 células por animal e os danos
189 no DNA foram classificados em: classe 0, sem dano; classe 1, cauda com até o diâmetro do
190 nucleoide; classe 2, cauda com duas vezes o diâmetro do nucleoide e classe 3, cauda longa,
191 comprimento superior a 2 vezes o diâmetro do nucleoide. Além disso, calculou-se o escore e a
192 frequência de danos de cada amostra.

193

194 2.4 Estatística

195 Para o teste de Ames, os resultados foram analisados pelo programa estatístico Salanal
196 (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, EUA, versão 1.0,
197 do Research Triangle Institute, RTP, EUA), adotando o modelo de Bernstein e colaboradores
198 (1982).

199 Para análise dos demais resultados, o teste de análise de variância (one-way ANOVA)
200 foi utilizado, seguido do pós teste de Tukey. O nível de significância foi considerado como P
201 <0,05. As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prisma versão
202 5.01, para Windows.

203

204 2.4 Estatística

205 Para o teste de Ames, os resultados foram analisados pelo programa estatístico Salanal
206 (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, EUA, versão 1.0,
207 do Research Triangle Institute, RTP, EUA), adotando o modelo de Bernstein e colaboradores
208 (1982). Para análise dos demais resultados, o teste de análise de variância (one-way ANOVA) foi
209 utilizado, seguido do pós teste de Tukey. O nível de significância foi considerado como P <0,05.
210 As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism versão 5.01, para
211 Windows.

212

213 3. Resultados

214

215 3.1 Teste de Ames

216 Os resultados estão representados na Tabela 1. O EASAM não apresentou
217 mutagenicidade *in vitro* nas condições testadas. De acordo com o número de colônias
218 revertentes, nenhuma das concentrações avaliadas exibiram mutagenicidade frente as
219 linhagens TA97a, TA98, TA100, TA102 e TA1535 na presença e na ausência da ativação
220 metabólica. Ainda, o índice mutagênico não foi igual ou superior a dois e não houve uma
221 relação dose-resposta. Entretanto, algumas concentrações aumentaram significativamente (P
222 <0.05 e p<0.01) as colônias revertentes quando comparada ao controle negativo, sugerindo

223 um potencial a tornarem-se mutagênicas. Ambos controles, positivo e negativo, tiveram o
224 número de colônias revertentes dentro do esperado, validando o teste.

225

226 3.2 Teste de citotoxicidade

227 O ensaio de redução do MTS foi utilizado para avaliar o potencial citotóxico do
228 EASAM e os resultados estão na Figura 1. Os compostos são considerados citotóxicos quando
229 reduz a viabilidade celular em 50% ou mais. Somente a concentração de 5000 µg/mL do
230 EASAM foi capaz de inibir em mais de 50% do crescimento das linhagens celulares, sendo
231 35,18%; 37,18% e 40,95% para HeLa, SiHa e Vero, respectivamente. Já nas demais
232 concentrações a viabilidade das linhagens tumorais manteve-se entre 58 - 95% e a linhagem
233 não-tumoral 61 - 100%.

234

235 3.3 Teste do micronúcleo

236 No teste de micronúcleo foram analisadas as médias de frequência de eritrócitos
237 policromáticos micronucleados (MN-PCEs) nos animais tratados de ambos os sexos. Os
238 resultados estão expressos na Figura 2 e demonstram que a frequência de MN-PCEs nas
239 células tanto das fêmeas (a) quanto dos machos (b) tratados no grupo controle positivo
240 apresentou um aumento significativo quando comparado com o grupo controle negativo. Já na
241 comparação dos grupos tratados com as diferentes concentrações do EASAM com controle
242 negativo não houve diferença significativa. Os resultados obtidos neste ensaio demonstraram
243 que o EASAM nas diferentes concentrações utilizadas não foram mutagênicos.

244

245 3.4 Teste do cometa

246 A Tabela 2 demonstra os resultados obtidos no ensaio do cometa após o tratamento
247 com as concentrações de 100, 50 e 25 mg/kg do EASAM durante os 28 dias. Pode-se observar

248 que tanto as células periféricas das fêmeas quanto dos machos Wistar não apresentaram
249 genotoxicidade, visto que o escore e a frequência de danos no DNA dos animais tratados não
250 foram estatisticamente diferente em comparação ao grupo controle negativo. Além disso, o
251 grupo controle positivo apresentou o escore de 127,00 e 122,40 e o grupo controle negativo o
252 escore de 5,40 e 7,80 para fêmeas e machos, respectivamente, e houve diferença significativa
253 entre os grupos em comparação.

254

255 4. Discussão

256

257 Produtos naturais são utilizados tradicionalmente para promover a saúde e na literatura
258 podemos encontrar diversos trabalhos que comprovem seus efeitos terapêuticos. No entanto,
259 esses produtos também podem ser prejudiciais, fundamentando a necessidade de estudos
260 toxicológicos como testes de genotoxicidade e citotoxicidade. Após refinamentos para
261 determinar quais testes são apropriados, órgãos reguladores chegaram a uma bateria de
262 ensaios, dos quais, os realizados nesse trabalho estão fortemente recomendados (OECD,
263 2015). No nosso estudo, o extrato aquoso das sementes de *Aleurites moluccana* (EASAM),
264 popularmente consumidas para perda de peso, foi avaliado em ensaios *in vitro* e *in vivo* para
265 mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade.

266 O teste de Ames é provavelmente considerado o principal e mais importante teste
267 quando falamos sobre *screening* carcinogênico para aprovação regulamentar, apresentando
268 uma previsão positiva de aproximadamente 90% (Zeiger, 2019). O teste avalia o potencial *in*
269 *vitro* da amostra em causar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou
270 substituição de pares de base e também permite verificar se a amostra tem ação direta ou
271 indireta através da metabolização exógena (fração S9) que é adicionada ao ensaio (Ames,
272 1983). O nosso trabalho foi o primeiro estudo que avaliou o potencial mutagênico das

273 sementes de *Aleurites moluccana*. Os resultados estão apresentados na Tabela 1 e pode-se
274 observar que apesar do aumento das colônias revertentes ter sido significativo em algumas
275 concentrações, não houve índice de mutagenicidade maior que dois e nem dose resposta,
276 sendo assim, o EASAM não foi considerado mutagênico de forma direta e/ou indireta frente
277 as concentrações e linhagens analisadas.

278 A avaliação da viabilidade celular permite verificar se um composto afeta as funções
279 e/ou induz a morte celular, caracterizando-se como citotóxico (Riss et al., 2011). Um dos
280 testes que determinam a viabilidade celular é o teste do MTS, que fundamenta-se na redução
281 enzimática pelas desidrogenases celulares do sal tetrazólio ao formazan, ocasionando uma
282 mudança colorimétrica, quantificada por espectrofotometria (Mavrova et al., 2016). Neste
283 trabalho o potencial citotóxico do EASAM foi avaliado pelo teste do MTS empregando
284 linhagens celulares não-tumorais e tumorais. Os resultados na Figura 1 demonstram que a
285 concentração de 5000 µg/mL diminuiu mais de 50% da viabilidade das três linhagens
286 celulares avaliadas, sendo a maior redução nas linhagens tumorais HeLa (35,18%) e SiHa
287 (37,18%). O EASAM demonstrou ter uma atividade maior frente as linhagens tumorais, pois,
288 mesmo nas menores concentrações a viabilidade celular estava reduzida, enquanto para a
289 linhagem não-tumoral, a concentração de 500 praticamente não reduziu a viabilidade (95,5%)
290 e nas concentrações de 150 e 50 a viabilidade manteve-se em 100%. As sementes da família
291 Euphorbiaceae são descritas como oleaginosas, sendo que na maioria delas o ácido linoleico é
292 o principal constituinte (Silva et al., 2014). Em adição, estudos já demonstraram a atividade
293 deste ácido contra linhagens celulares tumorais (Igarashi; Miyazawa, 2000; Cheng et al.,
294 2019). De acordo com Giakoumis e Sarakatsanis (2018) o ácido linoleico também é o
295 composto majoritário das sementes de *A. moluccana* e os resultados obtidos no presente
296 trabalho, corroboram com os achados anteriores da atividade deste ácido contra linhagens
297 tumorais e demonstra que o EASAM pode ser um potencial antiproliferativo.

298 Durante o processo de divisão celular a perda de cromossomos inteiros ou fragmentos
299 que não migraram para o núcleo principal e não foram incluídos no núcleo das células filhas,
300 originam o que chamamos de micronúcleo (Heddle et al., 1983). A partir desse conhecimento,
301 desenvolveu-se o teste do micronúcleo, que permite verificar se determinada amostra causa
302 dano cromossômico nas células. Preferencialmente, as células utilizadas são as que estão em
303 altas e constantes taxas de divisão, como os eritrócitos, sendo os policromáticos (eritrócitos
304 jovens) os avaliados (Araldi et al., 2015). A elevada frequência de eritrócitos policromáticos
305 micronucleados (MN-PCEs) indicam o dano cromossômico (Fenech, 2000). No nosso
306 trabalho, os grupos que receberam o controle positivo, tiveram um aumento significativo na
307 frequência de MN-PCEs, como já esperado, pois a ciclofosfamida é um composto
308 conhecidamente mutagênico (Tolouei et al., 2018). Já a frequência dos MN-PCEs dos grupos
309 que receberam o EASAM, em quaisquer das concentrações, foi semelhante a do controle
310 negativo, demonstrando que nas condições avaliadas, o EASAM não apresentou potencial
311 mutagênico *in vivo* (Figura 2a e 2b).

312 Outro teste que avalia o dano genético de uma amostra é o teste do cometa. A
313 associação entre o teste do cometa e o teste do micronúcleo é considerada padrão ouro,
314 apresentando diversas vantagens, como: alta sensibilidade, poder estatístico, rapidez, baixo
315 custo além da versatilidade (Araldi et al., 2015). O ensaio baseia-se no movimento do DNA
316 danificado contido no nucleóide em direção ao ânodo, quando submetido a eletroforese,
317 produzindo uma estrutura semelhante a um cometa (Gunasekarana et al., 2015) onde o
318 tamanho da cauda é proporcional ao dano celular (Parasuraman et al., 2011). O teste avalia o
319 potencial genotóxico da amostra e é aplicado como um biomarcador para predição de
320 suscetibilidade genética e identificação de danos ao DNA que podem levar a
321 carcinogenicidade (Kang et al., 2013). De acordo com os resultados do presente trabalho, o
322 EASAM não apresentou potencial genotóxico nas células dos ratos em nenhuma das

323 concentrações avaliadas para ambos os sexos, pois não houve diferença significativa no
324 escore e frequência de danos ao DNA quando comparado aos animais do controle negativo.
325 Além disso, o grupo de animais tratados com o controle positivo apresentou valores maiores
326 de lesões nas células quando comparado ao grupo controle negativo, confirmando a validação
327 dos parâmetros (Tabela 2).

328 Por fim, os resultados obtidos do nosso estudo, demonstrou que o EASAM não
329 apresenta potencial mutagênico, genotóxico e citotóxico *in vitro* e *in vivo* nas concentrações e
330 condições avaliadas, mas apresenta um potencial antiproliferativo.

331 Referências bibliográficas

332 ANVISA, 2013. Agência Nacional De Vigilância Sanitária - Guia para a condução de estudos
333 não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de
334 medicamentos. Brasília, Brasil.

335 ANVISA, 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Dispõe sobre proibição do uso e
336 venda de produtos que contenham Noz da Índia e Chapéu de Napoleão utilizados para
337 emagrecer, sementes são tóxicas e não têm registro na Agência. Brasília, Brasil.

338 Ames, B.N., 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and
339 degenerative diseases. *Science*. 221, 1256–1263. Doi: 10.1126/science.6351251.

340 Araldi, R.P. et al., 2015. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a
341 review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 72, 74-82. Doi: 10.1016/j.biopha.2015.04.004

342 CIVITOX, 2016. Centro Integrado de Vigilância Toxicológica - Brasil (CIVITOX).
343 Intoxicação pelo uso da Noz da Índia. Disponível em:<[http://www.saude.ms.gov.br/wp-
344 content/uploads/sites/88/2016/02/Nota-T%C3%A9cnica-001_2016_Noza-da-India.pdf](http://www.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/sites/88/2016/02/Nota-T%C3%A9cnica-001_2016_Noza-da-India.pdf)>.
345 Acesso em 15/08/2019. Mato Grosso do Sul, Brasil.

346 Capoci, I.R.G. et al., 2015. Propolis is an efficient fungicide and inhibitor of biofilm
347 production by vaginal *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative
348 Medicine*. 2015. Doi: 10.1155/2015/287693.

349 Cesca, T.G. et al., 2012. Antinociceptive, anti-inflammatory and wound healing features in
350 animal models treated with a semisolid herbal medicine based on *Aleurites moluccana* L.
351 Willd. Euforbiaceae standardized leaf extract: semisolid herbal. *Journal of
352 ethnopharmacology*. 143, 1, 355-362. Doi: 10.1016/j.jep.2012.06.051.

353 Cheng, G. et al., 2019. Anticancer activity of polymeric nanoparticles containing linoleic
354 acid-SN38 (LA-SN38) conjugate in a murine model of colorectal cancer. *Colloids and
355 Surfaces B: Biointerfaces*. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.06.020.

- 356 Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and*
357 *Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 455, 1-2, 81-95. Doi: 10.1016/S0027-
358 5107(00)00065-8.
- 359 Fratoni, E. et al., 2018. Antiproliferative and toxicological properties of drimanes obtained
360 from *Drimys brasiliensis* stem barks. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 103, 1498-1506. Doi:
361 10.1016/j.biopha.2018.04.103.
- 362 George, P., 2011. Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants-An
363 overview. *Journal of applied pharmaceutical science.* 1, 6, 40-44.
- 364 Giakoumis, E.G. et al., 2018. Estimation of biodiesel cetane number, density, kinematic
365 viscosity and heating values from its fatty acid weight composition. *Fuel.* 222, 574-585. Doi:
366 10.1016/j.fuel.2018.02.187.
- 367 Gunasekarana, V. et al., 2015. A comprehensive review on clinical applications of comet
368 assay. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR.* 9, 3, GE01. Doi:
369 10.7860/JCDR/2015/12062.5622.
- 370 Heddle, J.A. et al., 1983. A report os the environmental protection agency gene-tox program,
371 *Mutation Research.* 123, 61-118. Doi: 10.1016/0165-1110(83)90047-7.
- 372 Hoepers, S.M. et al., 2015. Topical anti-inflammatory activity of semisolid containing
373 standardized *Aleurites moluccana* L. WILLD (EUPHORBIACEAE) leaves extract. *Journal of*
374 *ethnopharmacology.* 173, 251-255. Doi: 10.1016/j.jep.2015.07.024.
- 375 Igarashi, M., Miyazawa, T., 2000. Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic
376 fatty acids on cultured human tumor cells. *Cancer letters.* 148, 2, 173-179. Doi:
377 10.1016/S0304-3835(99)00332-8.
- 378 Kado, N.Y. et al., 1983. A simple modification of the Salmonella liquid-incubation assay
379 Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutation Research Letters.* 121,
380 1, 25-32. Doi: 10.1016/0165-7992(83)90082-9.

- 381 Kang, S.H. et al., 2013. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of
382 carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. *Journal of*
383 *cancer prevention*. 18, n. 4, p. 277, 2013. Doi: 10.15430/JCP.2013.18.4.277.
- 384 Krisnawati, H. et al., 2011. *Aleurites moluccana* (L.) Willd.: Ecology, silviculture and
385 productivity. CIFOR.
- 386 Mavrova, A.T. et al., 2016. Synthesis, anticancer activity and photostability of novel 3-ethyl-
387 2-mercapto-thieno [2, 3-d] pyrimidin-4 (3H)-ones. *European journal of medicinal chemistry*.
388 123, 69-79. Doi: 10.1016/j.ejmech.2016.07.022.
- 389 Nandhakumar, S. et al., 2011. Evaluation of DNA damage using single-cell gel
390 electrophoresis (Comet Assay). *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. 2, 2, 107.
391 Doi: 10.4103/0976-500X.81903.
- 392 OECD, 1997. OECD Guideline for The Testing of Chemicals. TG 741: Bacterial Reverse
393 Mutation Test. Paris, France.
- 394 OECD, 2016b. OECD Guideline for The Testing of Chemicals. TG 474: In vivo mammalian
395 Erythrocyte Micronucleus Test. Paris, 2016b.
- 396 OECD, 2016a. OECD Guideline for The Testing of Chemicals. TG 489: In vivo mammalian
397 Alkaline Comet Assay. Paris, 2016a.
- 398 OECD, 2015. OECD Guideline Document on Revision to OECD Genetic Toxicology Test
399 Guidelines. Genetic Toxicology Guidance Document: Second Commenting Round second
400 Commenting Round.
- 401 OMS - Organização Mundial de Saúde. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional -
402 2014-2023. Disponível em:
403 http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098_spa.pdf Acesso em: 05
404 Ago. 2019.

- 405 Parasuraman S., 2011. Toxicological screening. Journal of pharmacology &
406 pharmacotherapeutics. 2, 2, 74. Doi: 10.4103/0976-500X.81895.
- 407 Prinsloo, G. et al., 2018. The use of plants containing genotoxic carcinogens as foods and
408 medicine. Food and chemical toxicology. 116, 27-39. Doi: 10.1016/j.fct.2018.04.009.
- 409 Quintão, N.M. et al., 2011. *Aleurites moluccana* (L.) Willd. leaves: mechanical
410 antinociceptive properties of a standardized dried extract and its chemical markers. Evidence-
411 Based Complementary and Alternative Medicine. 2011. Doi: 10.1155/2011/179890.
- 412 Riss, T.L. et al., 2011. Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting
413 mechanism of cell death. In: Mammalian Cell Viability. Humana Press, 103-114. Doi:
414 10.1007/978-1-61779-108-6_12.
- 415 Saleem, H. et al., 2019. Pharmacological, phytochemical and in-vivo toxicological
416 perspectives of a xero-halophyte medicinal plant: *Zaleya pentandra* (L.) Jeffrey. Food and
417 Chemical Toxicology. Doi: 10.1016/j.fct.2019.05.043.
- 418 Silva, S.I. et al., 2014. Seed oils of Euphorbiaceae from the Caatinga, a Brazilian tropical dry
419 forest. Biomass and bioenergy. 69, 124-134. Doi: 10.1016/j.biombioe.2014.07.010.
- 420 Tolouei, S.E.L. et al., 2018. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic evaluation of *Alibertia edulis*
421 (rich.) a. Rich. ex DC: an indigenous species from Brazil. Drug and chemical toxicology. 1-8.
422 Doi: 10.1080/01480545.2018.1488862.
- 423 Yun, J.W., 2010. Possible anti-obesity therapeutics from nature. A review. Phytochem., 71,
424 1625–1641. Doi: 10.1016/j.phytochem.2010.07.011.
- 425 ZEIGER, E., 2019. The test that changed the world: The Ames test and the regulation of
426 chemicals. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 841, 43-
427 48. Doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.05.007.
- 428

429 Tabela 1 – Potencial mutagênico do EASAM frente as linhagens TA 97a, TA 98, TA 100,
 430 TA102 e TA 1535 de *S. Typhimurium* com ativação metabólica (S+) e sem ativação metabólica
 431 (S-).

Concentração (µg/placa)	TA 97a	TA 98	TA 100	TA 102	TA 1535
S9 (-)					
0 ^a	140 ± 1	18 ± 2	78 ± 6	367 ± 3	12 ± 1
50	149 ± 13 (1.06)	14 ± 4 (0,79)	110 ± 2 (1.40)**	464 ± 8 (1.26)**	10 ± 1 (0.83)
150	156 ± 10 (1.11)	14 ± 1 (0,79)	111 ± 1 (1.41)**	482 ± 3 (1.31)**	9 ± 1 (0.77)
500	116 ± 5 (0.82)	15 ± 1 (0.83)	104 ± 1 (1.32)**	581 ± 11 (1.58)**	8 ± 1 (0.70)
1500	182 ± 2** (1.30)	14 ± 1 (0.81)	123 ± 2 (1.56)**	640 ± 10 (1.74)**	8 ± 1 (0.72)
5000	161 ± 6* (1.15)	16 ± 1 (0.88)	90 ± 1 (1.15)	598 ± 5 (1.62)	8 ± 1 (0.71)
C+	748 ± 9 ^b	259 ± 7 ^b	658 ± 11 ^c	1056 ± 21 ^d	226 ± 9 ^b
S9 (+)					
0 ^a	185 ± 10	20 ± 1	106 ± 4	488 ± 24	10 ± 1
50	163 ± 2 (0.88)	19 ± 1 (0.93)	118 ± 1* (1.11)	392 ± 12 (0,8)	14 ± 1* (1.42)
150	204 ± 1(1.10)	23 ± 1 (1.12)	107 ± 9 (1.00)	758 ± 14 (1.55)*	13 ± 1* (1.25)
500	152 ± 2 (0.82)	15 ± 1 (0.72)	89 ± 1 (0.84)	638 ± 2 (1.3)*	13 ± 1* (1.32)
1500	188 ± 4 (1.01)	15 ± 2 (0.75)	114 ± 2 (1.07)	727 ± 21 (1.48)*	13 ± 1* (1.25)
5000	191 ± 5 (1.03)	16 ± 1 (0.80)	128 ± 3 ** (1.20)	592 ± 8 (1.21)	11 ± 1 (1.09)
C+	892 ± 6 ^e	287 ± 5 ^e	701 ± 7 ^e	1152 ± 17 ^d	259 ± 4 ^e

432

433 Valores expressos pela média de revertentes/placa ± desvio padrão. ^a0: água destilada usada
 434 como diluente do extrato; Controle Positivo (C +): ^b4-nitro-o-phenylenediamine (10
 435 µg/placa); ^cAzida sódica (2.5 µg/placa); ^dMitomicina C (0.5 µg/placa); ^e2AA- aminoantraceno
 436 (2,5 µg/placa). Diferença significativa (ANOVA): * P < 0.05; ** P < 0.01.

Tabela 2 – Número total de células com danos e classe de danos do sangue periférico de ratos fêmeas e machos Wistar após o tratamento com o controle negativo, ciclofosfamida ou EASAM no ensaio do cometa.

Grupos	Total de células com danos	Classe de danos				Score
		0	1	2	3	
Fêmeas						
Controle negativo	4,60 ± 1,53 ^a	95,40 ± 1,53	3,80 ± 1,85	0,80 ± 0,37	0,00 ± 0,00	5,40 ± 1,25 ^a
Ciclofosfamida	78,80 ± 1,39 ^b	21,20 ± 1,39	37,40 ± 2,09	34,60 ± 1,60	6,80 ± 1,46	127,00 ± 4,54 ^b
EASAM 25 mg/kg	7,80 ± 0,66 ^a	92,20 ± 0,66	7,40 ± 0,81	0,40 ± 0,24	0,00 ± 0,00	8,20 ± 0,58 ^a
EASAM 50 mg/kg	7,60 ± 0,68 ^a	92,40 ± 0,68	6,20 ± 0,58	0,80 ± 0,58	0,60 ± 0,24	9,60 ± 0,75 ^a
EASAM 100 mg/kg	8,20 ± 1,02 ^a	91,80 ± 1,02	5,00 ± 1,34	2,60 ± 1,12	0,60 ± 0,60	12,00 ± 2,59 ^a
Machos						
Controle negativo	5,80 ± 1,20 ^a	94,20 ± 1,20	3,80 ± 0,73	2,00 ± 0,95	0,00 ± 0,00	7,80 ± 2,00 ^a
Ciclofosfamida (CP)	79,20 ± 0,86 ^b	20,80 ± 0,86	38,60 ± 2,38	38,00 ± 3,70	2,60 ± 0,87	122,40 ± 3,40 ^b
EASAM 25 mg/kg	8,40 ± 1,21 ^a	91,60 ± 1,21	6,40 ± 0,68	1,80 ± 0,66	0,20 ± 0,20	10,60 ± 2,11 ^a
EASAM 50 mg/kg	9,00 ± 0,89 ^a	91,00 ± 0,89	6,00 ± 0,63	1,80 ± 0,58	1,20 ± 1,73	13,20 ± 2,39 ^a
EASAM 100 mg/kg	8,60 ± 1,33 ^a	91,40 ± 1,33	6,80 ± 0,58	1,20 ± 0,80	0,60 ± 0,24	11,00 ± 2,41 ^a

Valores expressos como média ± erro padrão, n = 5. Controle negativo: Solução salina; Ciclofosfamida 20 mg/kg, ip.; EASAM: Extrato aquoso das sementes de *Aleurites moluccana*. Classe 0, sem danos; classe 1, cauda do cometa menor que o diâmetro do nucleóide; classe 2, cauda do

cometa uma ou duas vezes o diâmetro do nucleóide; classe 3, cauda do cometa com mais do dobro do diâmetro do nucleóide. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,05$); ANOVA/Tukey.

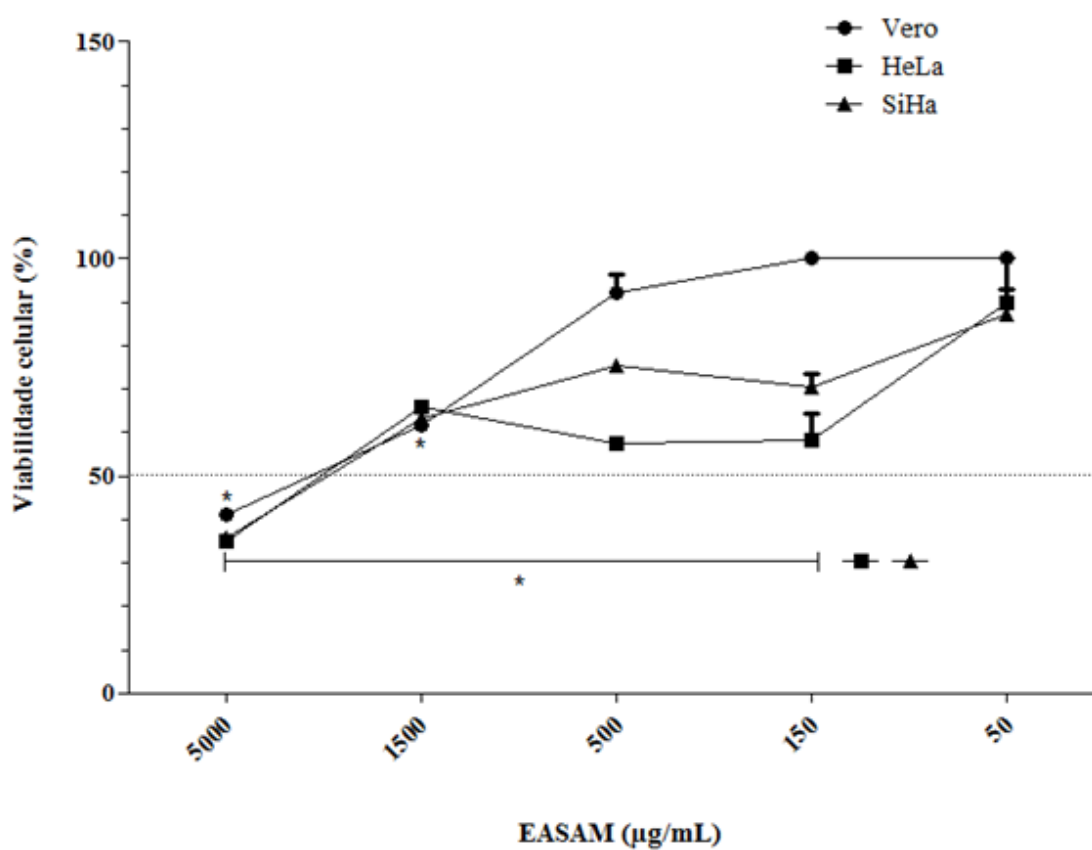


Fig. 1 - Viabilidade celular das linhagens não-tumoral (Vero) e tumorais (HeLa e SiHa) após 24h do tratamento com as diferentes concentrações do EASAM. A diferença estatística em relação ao controle foram determinadas pela ANOVA seguido do pós teste de Tukey * $P < 0,05$ vs Controle. Cada valor determina a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

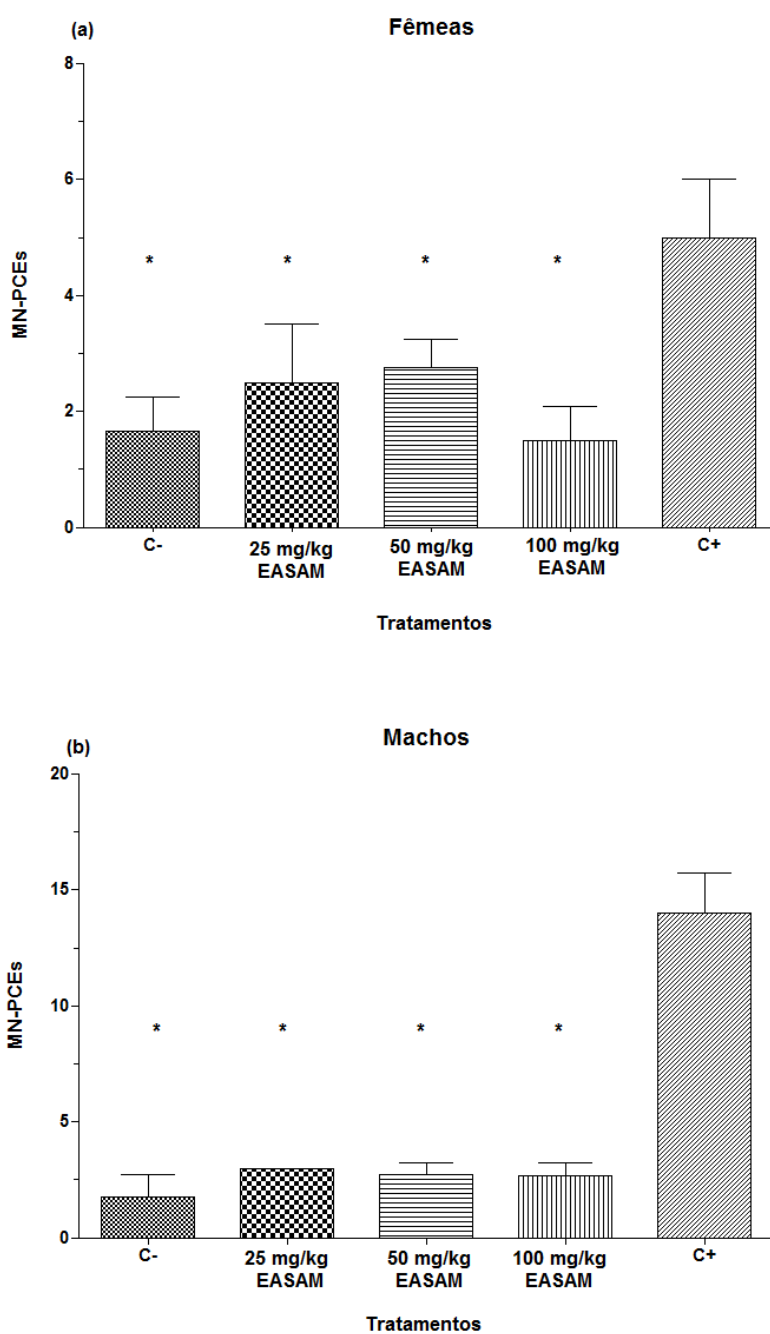


Fig. 2 - Frequência dos MN-PCEs encontrados na medula óssea dos ratos Wistar fêmeas (a) e machos (b) após o tratamento com o controle negativo, EASAM e controle positivo. Dados expressos em médias \pm desvio padrão ($n=5$) do número de MN-PCEs. *Difere do controle positivo pelo teste de Tukey, $P < 0,05$. Um total de 2000 células foram analisadas em cada animal. MN-PCEs, eritrócitos policromáticos micronucleados.

6. CONCLUSÕES

- *A. moluccana* possui destaque cultural, ornamental, econômico e principalmente na medicina popular. Cientificamente os estudos se voltaram para as suas folhas que possui diversos metabólitos secundários já isolados e que apresentam potencial anti-inflamatório e analgésico. Porém, estudos sobre sua toxicologia são escassos e esses se tornam necessários uma vez que *A. moluccana* possui uma semente que é ingerida popularmente como fonte de emagrecimento;
- O *screening* fitoquímico da semente apresentou compostos do tipo flavonas e glicosídeos;
- *A. moluccana* apresentou uma $DL_{50} > 2000$ mg/kg, sendo classificado como pouco tóxico;
- No teste de toxicidade oral a curto prazo, o EASAM administrado em baixas concentrações a curto prazo não apresentou alterações fisiológicas, bioquímicas, hematológicas, histopatológicas e nem sinais clínicos relacionados a toxicidade mas em altas concentrações e uso contínuo causou mortalidade nos animais;
- Nos testes de mutagenicidade *in vitro* e genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* as doses administradas do EASAM não apresentou danos ao material genético;
- No teste de citotoxicidade, o EASAM demonstrou potencial antiproliferativo frente as linhagens tumorais.

7. ANEXOS

7.1 Parecer de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 16 de janeiro de 2018.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da toxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* do óleo das sementes de *Aleurites moluccana* (L.) Willd.", registrada sob o protocolo de nº 28/2017, sob a responsabilidade de *Kelly Mari Pires de Oliveira e Pamella Fukuda de Castilho* – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 18/08/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	18/01/2018 a 30/12/2018
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i>
Nº de animais	70 Wistar
Peso/idade	50 dias
Sexo	Wistar 30 machos e 40 fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados- UFGD

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA