



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



JOYCE BEZERRA GUEDES

**ANÁLISE DA TOXICIDADE AGUDA E EM NÍVEL CELULAR DE *Hisbiscus*
sabdariffa L. (MALVACEAE)**

PICOS
2019

JOYCE BEZERRA GUEDES

**ANÁLISE DA TOXICIDADE AGUDA E EM NÍVEL CELULAR DE *Hibiscus
sabdarriffa* L. (MALVACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, *campus* Senador Helvídio Nunes de Barros como requisito para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Maria Mendes Marques Duque

PICOS

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Campus Senador Helvídeo Nunes de Barros
Biblioteca Setorial José Albano de Macêdo
Serviço de Processamento Técnico

G924a Guedes, Joyce Bezerra.

Análise da toxicidade aguda e em nível celular de hibiscus sabdariffa L. (MALVACEAE). / Joyce Bezerra Guedes. -- Picos, PI, 2019.

43 f.

CD-ROM: 4 ¾ pol.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura Plena em Ciências Biológicas). – Universidade Federal do Piauí, Picos, 2020.

“Orientador(A): Profa. Dra Márcia Maria Mendes Marques Duque.”

1. Plantas Medicinais. 2. Citotoxicidade. 3. Allium cepa L.
4. *Artemia salina*. I. Título.

CDD 615.882

Elaborada por Rafael Gomes de Sousa CRB 3/1163

JOYCE BEZERRA GUEDES

**ANÁLISE DA TOXICIDADE AGUDA E EM NÍVEL CELULAR DE *Hisbiscus*
sabdariffa L.**

Monografia aprovada em 16 / 12 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Márcia Maria Mendes Marques

Profa. Dra. Márcia Maria Mendes Marques Duque

Orientador – UFPI/CSHNB

Maria do Socorro Meireles de Deus

Profa. Dra. Maria do Socorro Meireles de Deus

Membro avaliador – UFPI/CSHNB

Leonardo Henrique Guedes de Morais Lima

Prof. Dr. Leonardo Henrique Guedes de Morais Lima

Membro avaliador – UFPI/CSHNB

DEDICATÓRIA

À Eliana e Josimar, pelo amor imensurável,
pelo exemplo de vida e por todo apoio e
incentivo durante essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradecer significa reconhecer o quanto precisamos dos que nos rodeiam; admitir que ninguém se faz sozinho. Agradeço a DEUS, meu grande mentor e consumidor de minha fé por todas as graças, luz e harmonia dispostas no meu caminho, mesmo quando eu não entendia os teus propósitos.

Agradeço de forma especial e com o maior amor que a condição humana nos permite sentir aos meus pais Josimar e Eliana, pois sei que mesmo em meio a tantas dificuldades e em meio a tantos olhares que sempre me cercaram, quatro olhos serenos se destacam e se dirigem a mim. A vocês Pai e Mãe o mais sincero obrigado por todo amor, pela doação integral e desmedida, pelo exemplo de vida, pela coragem imensurável e pela força que nos sustenta e mesmo em meio a tantas dificuldades que nos cercaram durante esse período, nunca me deixaram desistir, e por sempre acreditarem no meu potencial de ir cada vez mais longe. Obrigado por serem os melhores pais que eu poderia ter. Essa conquista é por vocês. Amo imensamente vocês!

Aos meus irmãos Jocivan e Geiciane, não apenas agradeço, mas também compartilho esse momento importante de minha vida acadêmica! Obrigada pela presença constante, pelo incentivo, companheirismo, por todo esforço em fazer com que esse dia chegasse, pela amizade e confiança, por todo amor e cuidado e por serem meu porto seguro. Amo muito vocês seus pirralhos!

Aos meus avós Jaci e Jeconias, Maria e Miguel e bisavós Sebastiana (*in memoriam*) e Antônio Louro, por me mostrarem na simplicidade e doação à sua família, o mais puro e verdadeiro sinônimo de dedicação e amor ao próximo. E, por serem para mim um exemplo que admirarei e amarei a vida inteira. E à todos os meus familiares que contribuíram de alguma forma para que esse momento chegasse. Meu muito obrigado!

Agradeço de forma especial a Andreza Larissa, minha pessoa no mundo, obrigada pela companhia indispensável, pelo carinho e atenção de sempre, por ser parceira na construção desse trabalho, por compartilhar comigo os melhores e os mais difíceis momentos durante essa caminhada, por estar presente e me apoiar quando mais precisei, por ser família, por me fazer sorrir até mesmo nos dias ruins. Enfim, obrigada por fazer parte da minha vida e por me deixar fazer parte da sua. Amo você!

Agradeço imensamente a minha orientadora, Professora Dra. Márcia Maria Mendes Marques, por aceitar me orientar nesse trabalho, por me acolher tão bem, por ser

paciente e compreensiva, por compartilhar seus conhecimentos e me proporcionar tanto aprendizado no decorrer dessa pesquisa, por suas contribuições valorosas para a melhor construção desse trabalho, a senhora é um exemplo de pessoa e profissional a ser seguido. Obrigada por contribuir tanto para a minha formação pessoal e profissional! À senhora toda minha gratidão e admiração.

Aos professores que compõe a banca examinadora, Profa. Dra. Maria do Socorro Meireles de Deus e Prof. Dr. Leonardo Henrique Guedes de Moraes Lima, obrigado por terem aceitado o convite, por suas valiosas observações sobre esse trabalho no intuito de torná-lo cada vez melhor, obrigado por todos os ensinamentos repassados no decorrer dessa caminhada e por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar no que fosse preciso. Aos demais mestres que fizeram parte dessa trajetória, obrigado por todos os ensinamentos, por assumirem tão bem o papel de ser professor, e inspirar milhares a ser como vocês.

Agradeço também as minhas companheiras de caminhada, (Paula Virgínia, Pâmela Vitória, Maria Eduarda, Aylla Oliveira e Mayara de Moura) que estiveram comigo desde sempre, obrigada por tudo, por cada dificuldade que superamos juntas, por cada momento de felicidade que compartilhamos, vocês sem dúvidas, tornaram essa jornada mais leve e prazerosa. Amo vocês! Agradeço de forma especial a Valtânia Oliveira, por estar presente desde o início dessa caminhada acadêmica, obrigada pela sua presença indispensável, por ser amiga/parceira em todos os momentos, pelas noites viradas de estudo, enfim, ter você por perto tornou esses dias melhores. Obrigada por tudo! Amo você!

À todos aqueles que contribuíram para a chegada desse momento, os meus sinceros agradecimentos, sem vocês essa conquista não seria possível. Muito obrigado!

RESUMO

Hibiscus sabdariffa L. (Malvaceae) é uma importante planta medicinal, conhecida popularmente no Brasil como “azedinha, azeda-da-guiné, vinagreira”. Suas flores são amplamente utilizadas como diurético, para tratamento de desordem gastrointestinal, infecções hepáticas, febre, hipertensão e antioxidante. Medicamentos de uso interno, como a flor de *H. sabdariffa* durante a industrialização são aditivadas por compostos químicos excipiente, com o intuito de manter as propriedades medicinais dos medicamentos, torná-los palatáveis, bem como protegê-los da ação de microrganismos. Com base nisso, objetivou-se nesse trabalho avaliar a toxicidade aguda e em nível celular das flores de *H. sabdariffa*, nas formas natural e industrializada, bem como seu efeito antimutagênico, por meio do sistema teste vegetal utilizando meristemas de raízes de *Allium cepa*, sendo considerado um ensaio eficiente para avaliação inicial de citotoxicidade, e por meio do bioensaio com sistema teste animal utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*, considerado um excelente teste para avaliação da toxicidade aguda. A avaliação com o sistema teste vegetal *A. cepa* mostrou que o *H. sabdariffa* natural e industrializado pertencente ao fabricante A não apresentaram citotoxicidade e quando expostos a substância clastogênica utilizada, apresentaram efeito protetor de danos e antimutagênico. O produto do fabricante B, mostrou-se citotóxico aos meristemas de *A. cepa* e associado a substância clastogênica potencializou seu efeito antiproliferativo, demonstrando também ação mutagênica. A avaliação da toxicidade aguda frente ao bioensaio *A. salina* mostrou, que as concentrações de *H. sabdariffa* natural não apresentaram toxicidade e os produtos A e B apresentaram toxicidade. Esses resultados apontam que a planta pode ser utilizada pela população para fins medicinais, sendo necessário cuidado ao consumi-la na forma industrializada.

Palavras-chave: Plantas medicinais; *Allium cepa*; Citotoxicidade; *Artemia salina*.

ABSTRACT

Hibiscus sabdariffa L. (Malvaceae) is an important medicinal plant, popularly known in Brazil as “sorrel, guinea sorrel, vinegar”. Its flowers are widely used as diuretic, for treatment of gastrointestinal disorder, liver infections, fever, hypertension and antioxidant. Medicines for internal use, such as the *H. sabdariffa* flower during industrialization are added by excipient chemical compounds, in order to maintain the medicinal properties of the medicines, make them palatable, and protect them from the action of microorganisms. Based on this, the objective of this work was to evaluate the acute and cellular toxicity of *H. sabdariffa* flowers, in natural and industrialized forms, through the plant test system using *Allium cepa* root meristems. initial evaluation of cytotoxicity, and by means of animal test system bioassay using the *Artemia salina* microcrustacean, considered an excellent test for acute toxicity evaluation. The evaluation with the plant test system *A. cepa* showed that the natural and industrialized *H. sabdariffa* belonging to manufacturer A did not present cytotoxicity and when exposed to the clastogenic substance used, showed damage protection and antimutagenic effect. The manufacturer B product was cytotoxic to *A. cepa* meristems and associated with clastogenic substance potentiated its antiproliferative effect, also demonstrating mutagenic action. The evaluation of acute toxicity against the *A. salina* bioassay showed that the natural *H. sabdariffa* concentrations showed no toxicity and the products A and B presented toxicity. These results indicate that the plant can be used by the population for medicinal purposes, and care should be taken when consuming it in the industrialized form.

Keywords: Medicinal plants; *Allium cepa*; Cytotoxicity; *Artemia salina*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Flores de <i>Hibiscus sabdariffa</i> natural (A) e desidratadas (B).....	14
Figura 2: Coleta das raízes de <i>A. cepa</i>	20
Figura 3: Coleta e análise de <i>A. salina</i> vivos ou mortos.....	23
Figura 4: Reta de regressão obtida da correlação entre % mortalidade de <i>A. salina</i> versus a concentração do <i>H. sabdariffa</i> industrializado, pertencente ao (a) chá; (b) fabricante A; (c) fabricante B.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Índices mitóticos observados em tecidos meristemáticos de raízes de <i>Allium cepa</i> expostos, por 24 e 48h, nas três concentrações de chás de flores de <i>Hibiscus sabdariffa</i> , e aos dois produtos industrializados desta planta, referidos como Produto A e B. Para cada tratamento foram apresentados os valores significativos de χ^2	24
Tabela 2: Número de células indiferenciadas e em interfase, número de células em divisão e valores de índice mitótico obtidos para as células-raiz de <i>A. cepa</i> dos grupos tratamento controle negativo, controle positivo e tratamento simultâneo nas concentrações 0,02; 0,04 e 0,08 mg/mL da infusão de chá obtido das flores desidratadas de <i>H. sabdariffa</i>	25
Tabela 3: Número de células indiferenciadas e em interfase, número de células em divisão e valores de índice mitótico obtidos para as células-raiz de <i>A. cepa</i> dos grupos tratamento controle negativo, controle positivo e tratamento simultâneo nas concentrações 0,05; 0,1 e 0,2 mg/mL do produto industrializado de <i>H. sabdariffa</i> pertencente ao fabricante A.....	26
Tabela 4: Número de células indiferenciadas e em interfase, número de células em divisão e valores de índice mitótico obtidos para as células-raiz de <i>A. cepa</i> dos grupos tratamento controle negativo, controle positivo e tratamento simultâneo nas concentrações 0,05; 0,1 e 0,2 mg/mL do produto industrializado de <i>H. sabdariffa</i> pertencente ao fabricante B.....	27
Tabela 5: Número total de alterações celulares presentes nas células meristemáticas de raízes de <i>A. cepa</i> obtidos para os grupos tratamentos controle negativo, controle positivo e tratamento simultâneo dos produtos industrializados de <i>H. sabdariffa</i> , pertencente aos fabricantes A e B respectivamente.....	31
Tabela 6: Número total de alterações celulares presentes nas células meristemáticas de raízes de <i>A. cepa</i> obtidos para os grupos tratamentos controle negativo, controle positivo e tratamento simultâneo do Chá de <i>H. sabdariffa</i>	33
Tabela 7: Porcentagem de náuplios mortos de <i>A. salina</i> frente à concentração dos produtos industrializados e do chá de <i>H. sabdariffa</i>	34

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1.	Plantas medicinais	14
2.2.	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	14
2.3.	Sistema teste com <i>Allium cepa</i>	18
2.4.	Ensaio com <i>Artemia salina</i> Leach	19
3.	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1.	Obtenção de <i>H. sabdariffa</i>	20
3.2.	Teste em <i>Allium cepa</i>	20
3.2.1.	Concentrações e grupos tratamentos	20
3.2.2.	Obtenção das células meristemáticas das raízes de <i>A. cepa</i>	21
3.2.3.	Preparação e análise das lâminas.....	22
3.3.	Bioensaio em <i>Artemia salina</i>	22
3.3.1.	Preparação das concentrações	22
3.3.2.	Eclosão dos cistos de <i>A. salina</i>	23
3.3.3.	Avaliação da toxicidade frente a <i>A. salina</i>	23
3.4.	Análise dos dados	24
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1.	Testes em <i>Allium cepa</i>	25
4.2.	Bioensaio com <i>Artemia salina</i>	33
5.	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

A *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) é uma importante planta medicinal, originária da Índia, Sudão e Malásia, conhecida popularmente no Brasil como “azedinha, azeda-da-guiné, caruru-azedo, caruru-da-guiné, chá-da-Jamaica, pampolha, pampulha, papoula, papoula-de-duas-cores, quiabeiro-azedo, quiabo-azedo, quiabo-de-angola, quiabo-róseo, quiabo-roxo, rosélia e vinagreira” (MUKHTAR, 2007).

No Brasil, o uso de plantas medicinais com fins terapêuticos possui respaldo na tradição cultural indígena, além de ser uma opção economicamente viável (VOLPATO *et al.*, 2002). Neste sentido, o hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) tem exibido destaque na prevenção e terapia alternativa de diversas patologias, principalmente no tratamento contra excesso de peso. É frequente a apresentação dessa planta em diversos veículos de mídia social, especialmente os voltados a saúde e bem-estar, como auxiliar na redução de peso corporal, o que popularizou o uso do hibisco nos últimos tempos (GUIDINI, 2015). Suas flores são amplamente utilizadas como diurético, para tratamento de desordem gastrointestinal, infecções hepáticas, febre, hipertensão e antioxidante (VIZZOTTO; PEREIRA, 2008). São constituídas por altas concentrações de compostos fenólicos, ácidos orgânicos, esteroides, terpenóides, polissacarídeos e minerais. Dentre os compostos fenólicos, as antocianinas glicosiladas são as mais abundantes e consideradas os principais constituintes biologicamente ativos desta planta (JABEUR *et al.*, 2017).

Medicamentos, como a flor de *H. sabdariffa*, durante a industrialização são aditivadas por compostos químicos excipientes, que são aditivos inativos que não possuem propriedades terapêuticas e são adicionados com o intuito de manter as propriedades medicinais dos medicamentos, torná-los palatáveis, bem como protegê-los da ação de microrganismos (VASCONCELOS *et al.*, 2012). No entanto, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), em seus regulamentos técnicos, cita que estes aditivos levantam muitos questionamentos quanto aos seus potenciais efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos (BRASIL, 2007).

Entre os diferentes testes que avaliam a citotoxicidade de compostos, o uso de meristemas de raízes de *Allium cepa* são considerados um eficiente teste para o *screening* preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade de compostos químicos. Segundo Cuchiara *et al.* (2012), o teste de *Allium cepa* é considerado uma ferramenta útil para a pesquisa básica do potencial genotóxico e citotóxico de produtos químicos, substâncias complexas

como extratos de plantas, dejetos industriais e águas contaminadas. Dessa forma, torna-se relevante avaliar, por meio de bioensaios de avaliação de toxicidade usando *Allium cepa*, a citotoxicidade e genotoxicidade das flores de hibisco e assim, garantir segurança para quem utiliza essas flores para tratar e/ou curar doenças.

O bioensaio com *Artemia salina* Leach, (1819), também é um importante e eficaz teste na identificação de compostos bioativos, bem como toxicidade aguda de compostos naturais, trata-se de um bioensaio preliminar que pode ser utilizado no estudo de substâncias com atividade biológica a fim de avaliar suas possíveis interações com o organismo (FREITAS DE OLIVEIRA, 2008). Por ser um teste rápido e eficiente, é bastante utilizado em estudos como esse, para determinação do potencial de toxicológico de plantas.

Nesse contexto, objetivou-se nesse trabalho avaliar a toxicidade aguda e a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade das flores de *H. sabdariffa* nas formas natural e industrializada, bem como investigar seu efeito antimutagênico frente a substância clastogênica paracetamol a 400mg/L.

O presente trabalho está estruturado em quatro partes. A primeira consiste na revisão de literatura sobre os assuntos abordados na pesquisa; a segunda parte traz uma descrição detalhada da metodologia utilizada no desenvolvimento do trabalho; a terceira parte é composta pelos resultados e discussões das análises de toxicidade do *Hibiscus sabdariffa*, tendo como parâmetro de avaliação os bioensaios com *Artemia salina* e *Allium cepa* e a quarta parte consiste na conclusão do trabalho.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Plantas medicinais

O uso de plantas medicinais como forma de tratamento e/ou cura de diversas doenças vem crescendo exponencialmente. A sabedoria popular a respeito dos efeitos benéficos à saúde que algumas plantas possuem, para muitos, é o único meio de tratamento para enfermidades. Isso contribui diretamente para o aumento da utilização de plantas medicinais. Essa prática integra a medicina popular, constituindo saberes baseados em culturas antepassadas, onde as pessoas utilizam essas plantas como uma primeira alternativa para o tratamento de doenças, bem como também, para complementar tratamentos baseados no uso de fármacos (ELDIN, 2001). O *Hibiscus sabdariffa* L. é uma dessas plantas que vem sendo bastante utilizada, não só para uso alimentar, mas principalmente pelo seu potencial efeito curativo e amenizador de diversas doenças.

O uso de plantas medicinais no Brasil é significativo, estudos realizados demonstram que a maioria das pessoas que procuram atendimento em unidades de saúde, afirmam fazer uso de plantas medicinais, porém sem nenhum conhecimento sobre a existência de possíveis efeitos tóxicos, além de não saber a forma correta de utilização, bem como não ter entendimento sobre a real ação terapêutica presente nessas plantas (ARNOUS *et al.*, 2005), boa parte da população brasileira, faz uso desse tipo de conhecimento, muitas vezes até de forma indiscriminada, o que faz com que essa parcela da população torne-se resistentes em acreditar que certos vegetais utilizados como amenizador de certas enfermidades, possam apresentar um perigo potencial de reações adversas e efeitos tóxicos ao organismo (MENDIETA *et al.*, 2014). Considerando a diversidade de plantas medicinais existentes, uma grande parte ainda não foram estudadas e, portanto, não se tem conhecimento a respeito de seus possíveis efeitos, tanto benéficos, quanto maléficis.

2.2. *Hibiscus sabdariffa*

Hibiscus sabdariffa L. (Malvaceae) é originária da Índia, do Sudão e da Malásia, sendo posteriormente levada para a África, Sudeste da Ásia e América central. É um

arbusto perene, que pode atingir cerca de 2 a 3m de altura, sendo cultivada devido ao interesse em suas folhas, cálices, sementes e fibras, que são utilizados na alimentação de animais, como fonte de fibras para a indústria de tecido e papel e para preparar bebidas com objetivos culinários e medicinais (MUKHTAR, 2007).

Na medicina tradicional, as flores de hibisco (Figura 1 A e 1 B), são utilizadas como diurético, para tratamento de desordem gastrointestinal, infecções hepáticas, febre e hipertensão (MONROY-ORTIZ; CASTILLOESPANA, 2007). Ensaios farmacológicos têm demonstrado uma gama de efeitos terapêuticos, como hepatoprotetor, antibacteriana (LIU, 2006), antioxidante (OLATUNDE; FAKOYA, 2005; RAMAKRISHNA *et al.*, 2008), anticolesterol (LIN, 2007), anticâncer (OLVERA-GARCIA, 2008), anti-hipertensivo (HERRERA-ARELLANO, 2007), dentre outros. Devido apresentar diversos efeitos terapêuticos benéficos à saúde o hibisco passou a ser muito explorada nos últimos anos, principalmente, por ser de baixo custo e fácil manuseio (SHERIF *et al.*, 2011; AHMED; ABOZED, 2015).

Figura 1: Flores de *Hibiscus sabdariffa* natural (A) e desidratadas (B)



(A)

Fonte: Google

Segundo Ramos (2006), a utilização do hibisco como alimento funcional é uma excelente medida preventiva, isso se dá, devido aos vários compostos que a planta possui, dentre eles destacam-se, substâncias bioativas, antioxidantes solúveis em água, flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas, betacaroteno, entre outros compostos, além disso é bastante rica em vitamina C, o que comprova a sua atribuição como alimento funcional. O mesmo tem apresentado também, grande destaque como tratamento alternativo de diversas patologias, principalmente no tratamento contra o excesso de peso (GUIDINI, 2015). Devido a isso, vem sendo bastante procurado e amplamente utilizado

por pessoas que acreditam nos efeitos positivos que essa planta apresenta, frente as enfermidades já mencionadas

Considerando a grande quantidade de enfermidades, nas quais o *H. sabdariffa* é utilizado como forma de tratamento, verificou-se a necessidade de estudos como esse, visando identificar potenciais efeitos que essa planta pode apresentar. O *H. sabdariffa* foi adquirida no comércio na sua forma flores desidratadas e na forma industrializada em pó ou acrescida de aditivos.

A comercialização de produtos naturais que passam por processos de industrialização, como é o caso da planta em questão, passam por processos de adição de compostos excipientes ou microingredientes sintéticos, estes são substâncias caracterizadas por não possuírem propriedades terapêuticas, os mesmos são acrescidos aos produtos naturais no seu processo de industrialização, com o intuito de tornar esses medicamentos aprazíveis ao paladar, e protegê-los, de certa forma, da contaminação por microrganismos. Os excipientes em geral são compostos heterogêneos, dos quais agem separadamente como moléculas simples ou em conjunto de misturas de complexos naturais, sintéticos e semissintéticos, que na sua maioria apresentam certa probabilidade de ocasionar efeitos adversos as suas propriedades (ARAÚJO; BORIN, 2012). Em seus estudos Oliveira (1999), afirma que, esses excipientes são utilizados apenas para garantir a estabilidade e as propriedades físico-químicas e organolépticas dos produtos farmacêuticos, pois os mesmos não possui em sua composição nenhum poder terapêutico.

Dentre as classes de excipientes sintéticos extensivamente utilizados para estes fins estão os conservantes, corantes, aromatizantes, edulcorantes, estabilizantes e antiumectantes (MOURA *et al.*, 2017). Adicionados durante a fabricação aos medicamentos, os conservantes são complexos químicos com a função de impedir a proliferação de microrganismos, e dessa forma evitar a deterioração do medicamento, que pode ser provocada, tanto por fungos (fungistática), como por bactérias (bacteriostática), estes são designados para o uso por meio de caráter eliminatório juntamente com base no regulamento do uso de substâncias com conservantes permitidos (HAYWOOD; GLASS, 2011).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) declara que as classes de excipientes, com ênfase as que foram mencionadas, apesar de autorizadas para uso pelo Ministério da Saúde, suscitam uma série de dúvidas quanto aos seus potenciais efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e oxidativos. Enfatiza também, a relevância e

urgência na realização de pesquisas que avaliem os efeitos tóxicos, em nível sistêmico e celular, decorrentes da exposição a produtos naturais acrescidos de microingredientes (BRASIL, 2007). Concordando com o que afirma a ANVISA, Konishi *et al.*, (2013) e Moura *et al.*, (2016) consideram que os estudos de avaliação de toxicidade de aditivos excipientes são imprescindíveis, devido serem importantes parâmetros na elaboração e/ou modificação de documentos que normatizam o uso de microingredientes pelas indústrias farmacêuticas.

A toxicidade causada pelos excipientes pode ocorrer em toda a população ou em grupos específicos. Na população em geral, a toxicidade se dá, em consequência ao tamanho excessivo da dose desses compostos, o que pode causar imunotoxicidade, alergia e intolerância. Em grupos específicos, por sua vez, a toxicidade ocorre, principalmente devido à predisposição genética ou idade dos pacientes, e em alguns casos, devido a presença de doenças crônicas. (TONAZIO *et al.*, 2011).

Levando em consideração as diversas funções que os excipientes provocam nos medicamentos, Gonçalves (2016), afirma que a segurança no uso desses excipientes está relacionada com as interações químicas, físicas e principalmente com a toxicidade que os mesmos podem apresentar, podendo possuir, mesmo em baixas concentrações, a capacidade de iniciar, propagar ou participar de reações químicas, que pode provocar a desestabilização, ou até mesmo degradação da forma do fármaco.

Atualmente, devido ao seu consumo estar associado a possíveis processos carcinogênicos e de toxicidade residual, há um constante debate relacionado à segurança no uso de conservantes químicos considerando, portanto, necessário investigar possíveis riscos que essas substâncias possam vir a apresentar, antes das mesmas serem comercializadas (MOREIRA *et al.*; ORTEGA RAMIREZ *et al.*, 2014).

Devido aos prejuízos que tais substâncias podem provocar no organismo das pessoas, é que faz-se necessário um estudo e investigação, antes de sua comercialização, à respeito dos efeitos tóxicos que esses excipientes possuem. Ao longo dos anos diversos modelos de testes estão sendo desenvolvidos, com o intuito de obter cada vez mais métodos de avaliação, que possam detectar o potencial risco citotóxico/genotóxico no organismo, sendo a citotóxica medida basicamente pela taxa de crescimento celular e podendo ser observada microscopicamente (FIGUEREDO, 2014).

2.3. Sistema teste com *Allium cepa*

Os bioensaios vegetais são considerados sensíveis e simples no monitoramento dos efeitos tóxicos em nível celular de compostos químicos (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; CAMPOS-VENTURA *et al.*, 2016). Dessa forma, segundo Bagatini *et al.*, (2007), o sistema teste *Allium cepa* L., é bastante utilizado na detecção dos efeitos citotóxicos que estão presentes em plantas medicinais, é por meio deste teste que as alterações cromossômicas nas plantas são observadas, tais alterações algumas vezes podem estar relacionadas à presença de agentes mutagênicos, na sua própria composição, ou até mesmo ao próprio metabolismo da planta. Anca e Romão (2016) afirma que, esse sistema teste é o mais eficaz na detecção dos efeitos citotóxicos, devido ao fato de que, na execução da técnica a substância que está sendo testada entra totalmente em contato com as raízes da cebola, permitindo, dessa forma que possam ser feitas análises, tanto de índice mitótico, como de divisão celular em diferentes concentrações.

As agências de pesquisa internacionais adotam esse sistema teste como um instrumento de avaliação de enorme sensibilidade para análise da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da substância de interesse, uma vez que, os resultados obtidos através dele demonstram uma semelhança satisfatória aos resultados que seriam obtidos através de sistemas teste animal e em cultura de células. (HERRERO *et al.*, 2011; LACERDA *et al.*, 2014; BIANCHI *et al.*, 2015; CAMPOS-VENTURA; MOURA *et al.*, 2016, SANTANA *et al.*, 2016).

Portanto, graças a elevada sensibilidade que possui, baixo custo, rapidez e facilidade de manipulação e utilização de amostras sem tratamento prévio, é que o teste em *Allium cepa* é considerado uma prática e importante ferramenta na pesquisa do potencial genotóxico e citotóxico de produtos químicos e substâncias, como extratos de plantas, dejetos industriais e águas contaminadas. (CUCHIARA *et al.*, 2012). É um teste amplamente utilizado, quando se trata de avaliar efeitos citotóxicos em plantas medicinais, sendo importante destacar que, na maioria das vezes, a presença de agentes mutagênicos detectados por meio desse teste, estão relacionados ou a composição do produto, ou até mesmo ao próprio metabolismo da planta. (BAGATINI *et al.*, 2007).

Além disso, os testes com *A. cepa* são muito utilizados para estudos citotóxicos, pelo fato de possuir uma enorme eficácia, pois as raízes meristemáticas permanecem

constantemente em contato com a substância a ser testada, o que permite que a análise da divisão celular possa ser feita em várias concentrações. (ANCIA; ROMÃO, 2016)

2.4. Ensaio com *Artemia salina* Leach

É imprescindível a realização de testes de toxicidade em plantas medicinais, na busca pela identificação de substâncias ativas, pois torna-se uma forma de alerta à população acerca do uso indiscriminado dessas plantas, e busca uma terapêutica eficaz para proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes. Considerado como uma das ferramentas que são mais comumente utilizadas para avaliar a toxicidade, a *Artemia salina* é um ensaio biológico que tem sido utilizada como um organismo alvo para detectar compostos bioativos em extratos de plantas (ALVES *et al.*, 2000).

Artemia salina Leach é um microcrustáceo pertence ao filo Arthropoda, classe Crustácea (VEIGA; VITAL, 2002).

Esse bioensaio foi proposto inicialmente por Michael, Thompson e Abramovitz (1956), foi considerado uma boa ferramenta para iniciar investigações de possíveis atividades biológicas de plantas (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

Considerando a sua sensibilidade elevada e o uso de técnicas simples para realização dos testes, pois o mesmo não necessita de nenhum equipamento especial, nem de condições laboratoriais específicas, é que o bioensaio com *A. salina* ainda hoje é amplamente utilizado em teste de toxicidade (SIQUEIRA *et al.*, 1998). Após Meyer *et al.*, (1982), definir que concentrações com valores de $CL_{50} < 1000 \text{ mg.L}^{-1}$ indicam toxicidade em *Artemia salina*, pesquisadores que trabalham com produtos naturais passaram a fazer uso dessa referência, para avaliar previamente extratos de plantas (JIMÉNEZ *et al.*, 2001).

Portanto, devido ao fácil manuseio e rapidez para realização do teste, é que este bioensaio permite uma rápida avaliação de toxicidade que adota como padrão o parâmetro vivo ou morto dos náuplios, após o determinado período de exposição (AZEVEDO; CHASIN, 2003)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção de *H. sabdariffa*

As flores de *H. sabdariffa* desidratadas foram adquiridas em ervanário na cidade de Teresina, Piauí, Brasil, especializado na comercialização de produtos naturais.

As flores em pó na forma industrializada, foram obtidas em uma farmácia do município de Picos, Piauí, Brasil. Os produtos industrializados oriundos de dois laboratórios farmacêuticos (LF), serão discriminados na presente pesquisa como A e B.

3.2. Teste em *Allium cepa*

3.2.1. Concentrações e grupos tratamentos

Para determinação das concentrações de *H. sabdariffa*, foi utilizado como parâmetro a forma de preparo e ingestão indicada nos rótulos de cada produto. Assim, para o preparo da infusão de chá, foram utilizadas 20 gramas das flores secas para um litro de água fervente, definindo-se para estudo as concentrações: 0,02; 0,04 e 0,08 g.mL. Em relação aos produtos industrializados referentes aos laboratórios A e B, a concentração sugerida nos rótulos é de 10 gramas de pó da fruta para 200 mL de água (um copo de água) e assim, as concentrações foram: 0,05; 0,1 e 0,2 g.mL. A solução clastogênica utilizada foi preparada com 400mg de paracetamol em 1 litro de água (0,4 mg.ml⁻¹), (PINHO *et al.*, 2010).

Neste estudo foram usados os seguintes tratamentos:

- Controle negativo – somente água destilada.
- Controle positivo – água destilada associada a paracetamol a 0,4 mg.ml⁻¹.
- Infusão de chá – extrato aquoso nas concentrações de 0,02; 0,04 e 0,08 mg.mL⁻¹.
- Produto A – forma industrializada do fabricante A extrato aquoso nas concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2 g.mL.
- Produto B – forma industrializada do fabricante B, extrato aquoso nas concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2 g.mL.

- Tratamento simultâneo – extrato aquoso (flores desidratadas e forma industrializada em pó) associado com paracetamol ($0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$), nas concentrações anteriormente descritas.

3.2.2. Obtenção das células meristemáticas das raízes de *A. cepa*

Para as avaliações da toxicidade, inicialmente, bulbos de cebolas foram colocados em frascos aerados com água destilada, à temperatura ambiente ($\pm 27^\circ\text{C}$), até a obtenção de raízes de 2,0 cm de comprimento (Figura 2). Para análise de cada amostra (tratamento) foi estabelecido um grupo experimental com cinco bulbos de cebola. Antes de colocar as raízes em contato com a suas respectivas amostras, algumas raízes foram coletadas e fixadas para servirem de controle do próprio bulbo. Em seguida, as raízes restantes foram postas em seus respectivos tratamentos por 24 horas, sendo este procedimento denominado de tempo de exposição 24 horas.

Figura 2: Coleta das raízes de *A. cepa*



Fonte: Autora (2019).

Após 24 horas, algumas raízes foram tiradas e fixadas. Feito este procedimento, as raízes restantes de cada bulbo foram devolvidas a seus respectivos tratamentos onde permaneceram por mais 24 horas, o que se denominou de tempo de exposição 48 horas. Após este período, raízes novamente foram coletadas e fixadas. Os tempos de exposição 24 e 48 horas foram escolhidos com o intuito de avaliar a ação do *H. sabdariffa* desidratado e industrializado em mais de um ciclo celular. A fixação das raízes se deu em

Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 24 horas. Em cada coleta, retirou-se, em média, três raízes por bulbo.

3.2.3. Preparação e análise das lâminas

As lâminas, 03 por bulbo, foram feitas seguindo o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002), e analisadas em microscópio óptico em objetiva de 400x. Para cada cebola utilizada foi analisado 1.000 células, totalizando 5.000 células para cada controle, tempo de exposição 24 horas e tempo de exposição 48 horas de todo tratamento em análise. Assim, para cada concentração da planta analisou-se um total de 15.000 células.

Para a avaliação da citotoxicidade dos produtos de *H. sabdariffa* foram observadas e apurado o número de células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. A partir desta análise determinou-se o índice mitótico (IM) por meio da seguinte equação: (número total de células em mitose ÷ número total de células analisadas) x 100. A genotoxicidade foi avaliada através da frequência de alterações de fuso mitótico, e a mutagenicidade por meio do número de micronúcleos observados.

3.3. Bioensaio em *Artemia salina*

3.3.1. Preparação das concentrações

Foram pesadas 100 mg das flores industrializadas e desidratadas e em seguida foi adicionado 100 ml de solução de sal marinho sintético. As soluções foram mantidas em constante agitação para completa homogeneização. Ao final do processo obteve-se uma concentração de 1000 mg.L⁻¹ de soluções de cada produto. A partir dessa concentração, foram realizadas diluições seriadas e obteve-se as concentrações de 500 mg.L⁻¹, 250 mg.L⁻¹, 125 mg.L⁻¹ e 62,5 mg.L⁻¹. Todo o processo foi repetido igualmente para ambos os produtos industrializados e natural. O controle foi preparado utilizando apenas solução salina para ter certeza de que a morte dos náuplios seria provocada pela toxicidade dos compostos, e não por falta de algum recurso durante a realização do teste. Os testes foram realizados em triplicata.

3.3.2. Eclosão dos cistos de *A. salina*

O teste de toxicidade frente a *Artemia salina* foi feito segundo o protocolo proposto por Meyer *et al.*, (1982) e Paredes (2016), com algumas modificações.

Inicialmente, foi preparada a água salina. Pesou-se 30 g de sal marinho e diluiu-se em 1 L de água potável.

A água foi mantida à temperatura ambiente, sob agitação e aeração constante, com recepção de luz artificial de 100 W, em equipamento fabricado de garrafa pet e acrescentado 0,3g de cistos de *Artemia salina*, que permaneceram por um período de 48 horas até a eclosão dos náuplios (larvas).

3.3.3. Avaliação da toxicidade frente a *A. salina*

Após a eclosão dos cistos, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, as larvas de microcrustáceos (n=10) foram transferidas para os tubos nos quais estavam presentes os extratos em diferentes concentrações (Figura 5). Os tubos foram deixados em temperatura ambiente e sob iluminação por 24 horas. Após esse período, foram analisados para registrar a quantidade de náuplios vivos e mortos. O número de larvas mortas em relação à concentração dos extratos foi utilizado para calcular os valores da CL₅₀. Sendo assim, diante dos valores da CL₅₀ (concentração que mata 50% dos náuplios) obtidos, os produtos testados foram classificados quanto à toxicidade.

Figura 3 – Coleta e análise de *A. salina* vivos ou mortos



Fonte: Autora (2019)

3.4. Análise dos dados

Para a análise estatística dos resultados obtidos no teste de toxicidade em *A. cepa* foi utilizado o teste do Qui-quadrado (χ^2), $p < 0.05$.

Em relação ao bioensaio frente a *A. salina*, foi calculada a porcentagem de mortes em cada concentração e controle. Através de regressão linear foi determinada a CL_{50} obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração dos extratos aquosos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Testes em *Allium cepa*

A partir dos resultados demonstrados na Tabela 1, verifica-se que as três concentrações das infusões de chá de *Hibiscus sabdariffa* e do produto A, em 24 e 48 horas, não causaram redução da divisão celular nos meristemas de raízes de *A. cepa* quando comparados aos índices mitóticos obtidos para os seus respectivos controles ($p < 0.05$). Assim, a infusão de chá e o produto industrializado A, nas condições avaliadas, não foram citotóxicos. No entanto, as três concentrações analisadas do produto B, causaram, em 24 e 48 horas, significativa redução da divisão celular dos meristemas de raízes ($p < 0.05$).

Tabela 1 – Índices mitóticos observados em tecidos meristemáticos de raízes de *Allium cepa* expostos, por 24 e 48h, nas três concentrações de chás de flores de *Hibiscus sabdariffa*, e aos dois produtos industrializados desta planta, referidos como Produto A e B. Para cada tratamento foram apresentados os valores significativos de χ^2 .

	TR	TE/IM		
		0 h	24 h	48 h
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	(mg/mL ⁻¹)			
Chá	0,02	18,2	19,6	16,7
	0,04	15,3	16,8	13,5
	0,08	16,5	17,5	14,3
Produto A	0,05	17,0	16,1	15,2
	0,1	17,8	15,3	15,0
	0,2	19,7	17,5	14,3
Produto B	0,05	21,2	5,0*	3,4*
	0,1	19,9	9,5*	5,4*
	0,2	18,7	7,3*	4,8*

TE: tempo de exposição; IM: índice mitótico; TR: tratamento. Valores seguidos de asteriscos diferem significativamente pelo teste χ^2 ao nível de 5%. Fonte: Autora (2019).

Nas tabelas 2 e 3, são apresentados, o número de células em interfase e em diferentes fases da divisão celular, e os valores de índice mitóticos obtidos a partir de células meristemáticas de raízes de *A. cepa* analisados no grupo tratamento simultâneo, controle negativo – água destilada e controle positivo – água destilada + paracetamol.

Tabela 2: Número de células indiferenciadas e em interfase, número de células em divisão e valores de índice mitótico obtidos para as células-raiz de *A. cepa* dos grupos tratamento controle negativo, controle positivo e tratamento simultâneo nas concentrações 0,02; 0,04 e 0,08 mg/mL⁻¹ da infusão de chá obtido das flores desidratadas de *H. sabdariffa*.

C (g/ml)	TE	TCII	P	M	A	T	TCD	IM (%)
	CN	4280	512	103	61	44	720	16,82
0,02	24h	4304	484	101	65	46	696	16,17
	48h	4403	401	110	47	39	597	13,55
	CP	4478	389	86	32	15	522	10,44
	CN	4223	589	86	61	41	777	18,39
0,04	24h	4296	534	73	51	46	704	16,38
	48h	4311	492	93	49	55	689	15,98
	CP	4413	420	90	42	35	587	11,74
	CN	4291	526	64	58	61	709	16,52
0,08	24h	4322	497	67	60	54	792	15,68
	48h	4341	460	71	62	66	659	15,18
	CP	4470	389	62	43	36	530	10,60

TCII – Total de células em interfase e indiferenciadas; TE – Tempo de Exposição; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo; IM – Índice Mitótico; TCD – Total de células em divisão; P – Prófase; M – Metáfase; A – Anáfase; T – Telófase. Valores seguidos de asteriscos diferem significativamente pelo teste χ^2 dos valores obtidos para o seu respectivo controle negativo. Fonte: Autora (2019).

Tabela 3: Número de células indiferenciadas e em interfase, número de células em divisão e valores de índice mitótico obtidos para as células-raiz de *A. cepa* dos grupos tratamento controle negativo, controle positivo e tratamento simultâneo nas concentrações 0,05; 0,1 e 0,2 mg/mL⁻¹ do produto industrializado de *H. sabdariffa* pertencente ao fabricante A.

C (g/ml)	TE	TCII	P	M	A	T	TCD	IM (%)
0,05	CN	4388	407	81	52	72	612	12,24
	24h	4434	402	116	8	40	566	11,32
	48h	4371	456	124	12	37	629	12,58
	CP	4475	406	72	21	26	525	10,50
0,1	CN	4262	557	86	51	44	738	14,76
	24h	4321	502	83	53	41	679	13,58
	48h	4358	490	79	38	35	642	12,84
	CP	4503	382	63	30	22	497	9,94
0,2	CN	4268	604	50	41	37	732	14,64
	24h	4288	521	83	57	51	712	14,24
	48h	4359	496	60	49	36	641	12,82
	CP	4523	320	63	51	43	477	9,54

TCII – Total de células em interfase e indiferenciadas; TE – Tempo de Exposição; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo; IM – Índice Mitótico; TCD – Total de células em divisão; P – Prófase; M – Metáfase; A – Anáfase; T – Telófase. Valores seguidos de asteriscos diferem significativamente pelo teste χ^2 dos valores obtidos para o seu respectivo controle negativo. Fonte: Autora (2019).

A partir dos resultados descritos nas Tabelas 2 e 3, observou-se que os índices de divisão celular obtidos no tratamento simultâneo, para os tempos de exposição de 24 e 48 horas do chá e produto industrializado do fabricante A, não diferiram estatisticamente entre si quando comparadas ao controle e, portanto, não potencializaram o efeito antiproliferativo provocado pela substância clastogênica, diminuindo dessa forma, o efeito citotóxico induzido pela mesma.

Na Tabela 4 são apresentados os índices mitóticos obtidos para os grupos tratamentos controle negativo – água destilada, controle positivo – água destilada + paracetamol e tratamento simultâneo do produto B. Nos resultados apresentados, observa-se que o índice de divisão celular nos tempos de exposição de 24 e 48 horas das três doses do tratamento simultâneo apresentam diferenças significativas dos índices mitóticos observados em seus respectivos controles, sugerindo uma potencialização do efeito antiproliferativo ocasionado pela substância clastogênica sendo, portanto, citotóxico.

Tabela 4: Número de células indiferenciadas e em interfase, número de células em divisão e valores de índice mitótico obtidos para as células-raiz de *A. cepa* dos grupos tratamento controle negativo, controle positivo e tratamento simultâneo nas concentrações 0,05; 0,1 e 0,2 mg/mL⁻¹ do produto industrializado de *H. sabdariffa* pertencente ao fabricante B.

C (g/ml)	TE	TCII	P	M	A	T	TCD	IM (%)
	CN	4100	566	145	89	100	900	21.95
0,05	24h	4341	486	77	21	75	659	13.18*
	48h	4257	536	104	23	80	743	14.86*
	CP	4336	521	73	39	31	664	13,28
	CN	4096	683	96	69	56	904	22.07
0,1	24h	4109	622	150	32	87	891	17.82*
	48h	4228	632	93	9	38	772	15.44*
	CP	4216	612	85	31	56	784	15,68
	CN	4000	813	74	54	59	1000	25
0,2	24h	4362	513	64	10	51	638	14.62*
	48h	4253	564	79	38	66	747	17.56*
	CP	4219	556	102	75	48	781	15,62

TCII – Total de células em interfase e indiferenciadas; TE – Tempo de Exposição; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo; IM – Índice Mitótico; TCD – Total de células em divisão; P – Prófase; M – Metáfase; A – Anáfase; T – Telófase. Valores seguidos de asteriscos diferem significativamente pelo teste χ^2 dos valores obtidos para o seu respectivo controle negativo. Fonte: Autora (2019).

Segundo Herrero *et al.*, (2012), índices mitóticos significativamente inferiores aos índices dos seus respectivos controles, como os obtidos para o produto B no tratamento simultâneo (Tabela 4), podem indicar a presença de agentes cuja ação tóxica compromete o crescimento e o desenvolvimento dos organismos expostos. Quando ocorre a inibição da proliferação celular ocasionada por compostos citotóxicos em tecidos de intensa proliferação celular e que apresentam desempenho normal, causam enormes prejuízos ao organismo, inibindo ou limitando a reposição de células, interferindo na produção de proteínas o que pode resultar no mal funcionamento do órgão onde está localizada.

Sales *et al.*, (2016) enfatizam que quando essa inibição da divisão em tecidos normais é extrema, deve-se principalmente a ação de agentes que interferem na integridade e correto funcionamento do fuso nuclear durante a mitose, ocasionando um desarranjo cromossômico considerável.

Os resultados mostram que os índices mitóticos obtidos para os tratamentos simultâneos, nas concentrações analisadas e nos tempos de exposição avaliados do produto A, não apresentaram diferenças estatísticas significativas para os seus respectivos controles negativos. Dessa forma, o produto avaliado nessas condições de estudo, não inibiu a divisão celular e, portanto, não potencializou o efeito antiproliferativo ocasionado pelo paracetamol. Considerando a ação ocasionada por essa substância, o produto A agiu como um protetor das alterações no ciclo celular ocasionado por ela, modulando os danos que a mesma causa.

Quanto aos resultados referente ao produto B, nas três concentrações e nos dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, observa-se que os índices mitóticos apresentam diferenças estatísticas em relação ao controle negativo. Essas diferenças apontam para uma ação potencializadora do efeito antiproliferativo ocasionado pelo paracetamol, aumentando dessa forma, a citotoxicidade provocada pelo composto mutagênico, e descartando, portanto, um possível efeito protetor por parte do produto B.

De acordo com Sales *et al.* (2016), levando em consideração que o princípio celular é formar novas células iguais a célula-mãe, produzir células com alterações na estrutura, ou apresentando distorções no número de cromossomos, interferem no funcionamento celular, tornando a mesma inviável, tendo como consequência a sua eliminação dos tecidos que apresentam desempenho normal, podendo dessa forma, acarretar efeito antiproliferativo significativo. A substância clastogênica tem como característica a capacidade de interferir no ciclo celular, ocasionando efeitos

antiproliferativos, bem como alterações a nível de cromossomos. Portanto, condições desse tipo, em que há a associação de uma substância clastogênica com produtos adicionados de compostos excipientes, que também possui uma grande capacidade de inibir a divisão celular, podem ser usadas para explicar os resultados de citotoxicidade e potencialização do efeito clastogênico causado pelo paracetamol, no produto industrializado pertencente ao fabricante B, em seu tratamento simultâneo.

A Tabela 5, apresenta uma comparação entre as alterações celulares obtidas para os grupos tratamento controle negativo, controle positivo e simultâneo, observadas em ambos os produtos A e B, nos diferentes tempos de exposição.

Os resultados, mostram que no produto A em associação com *H. sabdariffa*, nas diferentes concentrações analisadas, o número de alterações cromossômicas não apresenta diferenças significativas quando comparadas aos seus respectivos controles negativo. Portanto, considerando as condições estudadas, pode se sugerir um efeito antimutagênico das concentrações de *Hibiscus sabdariffa* analisadas, obtidas do produto pertencente ao fabricante A, frente a ação da substância clastogênica, tendo em vista que o mesmo impediu o aumento do número de aberrações cromossômicas observadas, após a exposição a esse composto. Diferentemente do produto B, que nas diferentes concentrações analisadas, apresentou número de alterações nos tempos de exposição de 24 e 48 horas, significativamente maiores das apresentadas em seus respectivos controles negativo, mantendo dessa forma o efeito mutagênico causado pelo paracetamol.

Tabela 5: Número total de alterações celulares presentes nas células meristemáticas de raízes de *A. cepa* obtidos para os grupos tratamentos controle negativo, controle positivo e tratamento simultâneo dos produtos industrializados de *H. sabdariffa*, pertencente aos fabricantes A e B respectivamente.

C (g/ml)	TE	PA	MA	APP	PMN	TAC
0,05	CN	5	8	11	0	24
	24h	3	9	13	0	25
	48h	2	7	11	0	20
	CP	8	11	13	3	35
0,1	CN	0	9	8	0	17
	24h	1	7	10	1	18
	48h	0	7	11	0	18
	CP	5	7	13	4	29
0,2	CN	0	7	9	1	17
	24h	3	5	9	1	18
	48h	4	8	7	2	21
	CP	5	9	10	4	28

Continua na página seguinte:

Tabela 5: Número total de alterações celulares presentes nas células meristemáticas de raízes de *A. cepa* obtidos para os grupos tratamentos controle negativo, controle positivo e tratamento simultâneo dos produtos industrializados de *H. sabdariffa*, pertencente aos fabricantes A e B respectivamente.

C (g/ml)	TE	PA	MA	APP	PMN	TAC
0,05	CN	5	5	7	0	17
	24h	7	6	10	0	23*
	48h	7	8	10	1	26*
	CP	7	7	11	0	25
0,1	CN	4	3	6	1	14
	24h	6	7	4	1	18*
	48h	6	9	7	1	23*
	CP	6	8	8	1	23
0,2	CN	4	7	4	1	16
	24h	5	7	5	2	19
	48h	8	6	7	2	23*
	CP	7	8	4	1	20

TE – Tempo de exposição; PA – Prófase em atraso; MA – Metáfase com aderência; APP – Anáfase com ponte ou perda; PMN – Prófase com micronúcleo; TAC – Total de alterações celulares. Valores seguidos de asteriscos diferem significativamente pelo teste χ^2 dos valores obtidos para o seu respectivo controle negativo. Fonte: Autora (2019).

Na avaliação das alterações celulares obtidas para o *Hibiscus sabdariffa*, na sua forma natural (Tabela 6) mostram que, assim como nos resultados observados no produto A, o índice mitótico de cada concentração analisada, nos diferentes tempos de exposição, não apresentam diferenças significativas quando comparados aos seus respectivos controles negativo, dessa forma, pode-se afirmar que a infusão de chá de hibisco, obtido das flores naturais, além de agir como modulador de danos celulares, apresenta também efeito antimutagênico às raízes de *A. cepa* expostas a substância clastogênica.

Tabela 6: Número total de alterações celulares presentes nas células meristemáticas de raízes de *A. ceapa* obtidos para os grupos tratamentos controle negativo, controle positivo e tratamento simultâneo do Chá de *H. sabdariffa*.

C (g/ml)	TE	PA	MA	APP	PMN	TAC
0,02	CN	5	4	5	0	14
	24h	3	4	7	0	14
	48h	3	3	9	0	15
	CP	4	6	11	2	23
0,04	CN	3	6	4	0	13
	24h	3	7	4	1	15
	48h	4	4	6	0	14
	CP	5	7	9	3	24
0,08	CN	0	7	5	1	13
	24h	5	6	3	2	16
	48h	3	4	6	2	15
	CP	5	7	9	3	24

TE – Tempo de exposição; PA – Prófase em atraso; MA – Metáfase com aderência; APP – Anáfase com ponte ou perda; PMN – Prófase com micronúcleo; TAC – Total de alterações celulares. Valores seguidos de asteriscos diferem significativamente pelo teste χ^2 dos valores obtidos para o seu respectivo controle negativo. Fonte: Autora (2019)

4.2. Bioensaio com *Artemia salina*

O *Hibiscus sabdariffa* na sua forma industrializada e natural na forma de infusão de chá, foram submetidos ao bioensaio de letalidade frente a *Artemia salina*, utilizando como parâmetro a metodologia descrita por Meyer *et al.*, e PAREDES *et al.*, (2016), com modificações.

Na Tabela 9, estão demonstrados as médias e desvio padrão da porcentagem de náuplios mortos, frente as concentrações de 1000, 500, 250, 125 e 62,5 mg.L⁻¹, dos

produtos A e B na sua forma industrializada, e natural de *Hibiscus sabdariffa*. Utilizando esses dados, foi gerada uma reta de regressão linear, no programa Excel, e a partir daí obter a equação da reta ($y=ax+b$) e dessa forma, poder determinar a CL_{50} (concentração letal capaz de provocar a mortalidade de 50% dos náuplios).

Testes que avaliam a toxicidade são elaborados com o intuito de avaliar possíveis efeitos causados pelo uso de compostos que contém em sua constituição, substâncias tóxicas, que podem desencadear efeitos contrários aos esperados, nos sistemas biológicos (BAROSA, 2003). Trata-se de bioensaios muito utilizados em estudos de substâncias com atividade biológica, com o objetivo de avaliar interações que tais substâncias podem ter com o organismo. (FREITAS DE OLIVEIRA, 2008). Dentre estes ensaios biológicos, o teste utilizando *Artemia salina* é bastante eficaz na determinação de compostos bioativos, principalmente em extratos de plantas (MEYER *et al.*, 1982; NOLDIN *et al.*, 2003), sendo utilizado também na avaliação da toxicidade geral, citotoxicidade, e atividade inseticida (LEITE *et al.*, 2009), possuindo uma boa correlação com outros testes que avaliam toxicidade oral aguda *in vivo*. (PARRA *et al.*, 2001).

Tabela 7: Porcentagem de náuplios mortos de *A. salina* frente à concentração dos produtos industrializados e do chá de *H. sabdariffa*.

MORTALIDADE %					
Produto	1000ppm	500ppm	250ppm	125ppm	62,6ppm
Chá	63,3±5,7	50±10	46,6±5,7	40±10	3,3±10
Produto A	_____	_____	70± 0	70± 0	70± 0
Produto B	46,6±11,5	40±17,3	96,6±5,7	43,3±5,7	33,3±15,2

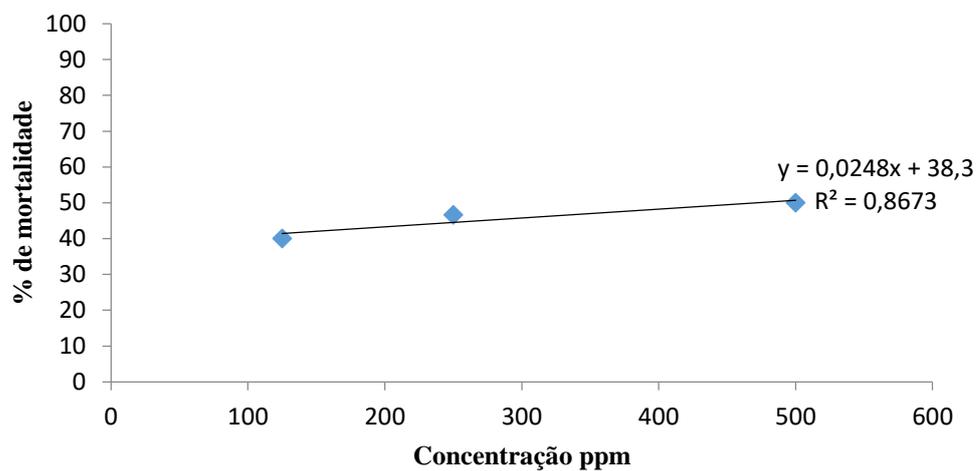
_____ Não foi possível determinar. Fonte: Autora (2019).

A Figura 6, apresenta a reta de regressão linear, obtida por meio da correlação entre a concentração de *Hibiscus sabdariffa*, industrializado e natural na forma de flores

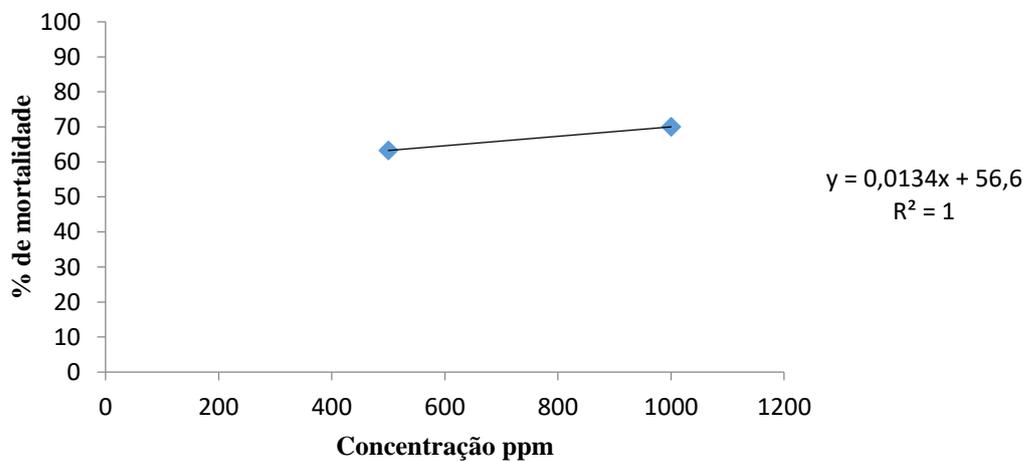
desidratadas, e o percental de letalidade de *Artemia salina*. A título de adequação, alguns valores extremos da concentração em estudo, foram retirados.

Figura 4: Reta de regressão obtida da correlação entre % mortalidade de *A. salina* versus a concentração do *H. sabdariffa* industrializado, pertencente ao (a) chá; (b) fabricante A; (c) fabricante B.

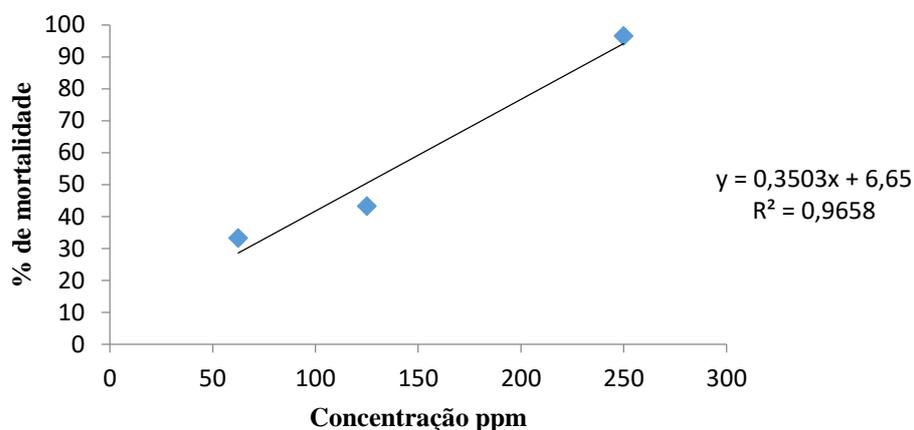
(a)



(b)



(c)



Meyer *et al.*, (1982), afirma que em avaliações de toxicidade de compostos ativos, utilizando *A. salina* que apresentarem o valor da CL_{50} inferior a $1000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ considera-se esse composto como tóxico. Os resultados apresentados nos gráficos acima mostram que, para o hibisco industrializado pertencente ao fabricante A, não foi possível determinar a CL_{50} , pois essa concentração fica abaixo da menor concentração testada, ou seja $CL_{50} < 62,5 \text{ ppm}$. Obteve-se $CL_{50} = 123,75 \text{ ppm}$ para o produto B e CL_{50} de $417,7 \text{ ppm}$ para a infusão de chá. Por apresentarem uma CL_{50} abaixo de 1000 mg.L^{-1} , esses produtos apresentam compostos biologicamente ativos. (SANTOS; DAIVID; DAIVID, 2011).

De acordo com DOLABELA (1997), compostos que possui uma $CL_{50} < 80 \text{ mg.L}^{-1}$, são tidos como altamente tóxicos, os que apresentam CL_{50} entre 80 mg.L^{-1} e 250 mg.L^{-1} , são considerados moderadamente tóxicos e com um $CL_{50} > 250 \text{ mg.L}^{-1}$, possuem baixa ou nenhuma toxicidade. Levando em consideração os parâmetros apresentados, os resultados mostram que o *Hibiscus sabdariffa* industrializado pertencente aos fabricantes A e B, apresentam moderada toxicidade. A infusão de chá apresenta baixa ou nenhuma toxicidade frente ao bioensaio com *A. salina*, pois os valores da CL_{50} permaneceram acima de 250 mg.L^{-1} .

O bioensaio com *A. salina*, é tido como um teste eficaz na determinação de atividade em produtos bioativos, sendo usado também como um ensaio prévio para identificação de atividade antitumoral (ARCANJO *et al.*, 2012). Em estudos para determinar a toxicidade preliminar, o mesmo teve sua eficácia comprovada quando o mesmo produto testado, foi submetido posteriormente a testes de toxicidade com camundongos portadores de carcinoma, e apresentou atividade antitumoral, o que comprovou que compostos moderadamente tóxicos em *A. salina*, apresentam atividade antitumoral

significante (SILVA; LIMA, 2008). Estudos iniciais de avaliação toxicológica com *A. salina* são bastante realizados, justamente pelo fato de sua eficácia como teste inicial, ser comprovada, quando submetidos a análises posteriores. Essa eficácia dá segurança aos testes de toxicidade preliminar realizados com esse bioensaio, pois asseguram os resultados obtidos, fornecendo confiabilidade a estudos como esse.

5. CONCLUSÃO

Nas condições estudadas, as concentrações de *Hibiscus sabdariffa* analisadas na forma natural e industrializada, pertencente ao fabricante A, não apresentaram citotoxicidade, quando expostos ao bioensaio com *Allium cepa*. Quando foram expostos simultaneamente à substância clastogênica utilizada, apresentaram efeito protetor de danos causados por essa substância demonstrando ação antimutagênica, controlando de forma eficaz tanto o efeito inibidor da divisão celular, como as alterações a nível cromossômico. O produto industrializado do fabricante B mostrou citotoxicidade frente ao sistema teste vegetal *A. cepa* e quando associado ao paracetamol potencializou o efeito citotóxico e mutagênico nas células meristemáticas da raiz de *A. cepa*, induzindo um alto efeito antiproliferativo. Dessa forma, podemos afirmar que, o *Hibiscus sabdariffa* produzido pelo fabricante B é constituído de compostos que alteram seus efeitos, ocasionando alterações no ciclo celular, que pode interferir diretamente no organismo daqueles que fazem uso desse produto.

A avaliação da toxicidade frente ao bioensaio com *A. salina*, mostrou que as concentrações de *H. sabdariffa* testadas, na forma natural não apresentaram toxicidade, e os produtos industrializados A e B apresentaram toxicidade. Portanto, esses resultados apontam que a planta pode ser utilizada pela população para fins medicinais, porém é necessário um pouco de cuidado ao consumi-la na forma industrializada, tendo em vista que alguns compostos excipientes adicionados ao produto, no processo de industrialização, podem ser responsáveis pelo aumento da toxicidade desses produtos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, T.M.A. *et al.* Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, (1), p. 367-373, 2000.
- ANCIA, J. P; ROMÃO, N. F. Análise da atividade citotóxica e mutagênica do extrato aquoso das partes aéreas de *Uncaria tomentosa* em teste de *Allium cepa*. **South American Journal of Basic Education**, Technical and Technological. Paraná/RO, v. 3, (2), 2016.
- ARAÚJO A. C. F.; BORIN M. F. Influência de excipientes farmacêuticos em reações adversas a medicamentos. **Revista. Brasília Med**, Brasília, v. 49, (4), p. 267-278, 2012.
- ARNOUS, A. H, SANTOS, A.S, BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse pelo cultivo comunitário. **Espaço saúde**, v. 6 (2), p. 01-06, 2005
- ARCANJO, D. D. R. *et al.*, Bioactivity evaluation against Artemiasalina Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, (3), p. 505-509, 2012.
- AHMED, Z. S.; ABOZED, S. S. Functional and antioxidant properties of novel snack crackers incorporated with *Hibiscus sabdariffa* by-product. **J. Adv. Res.**, 2014.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. 1ª ed. São Carlos: Rima, 2003
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, (3), p. 444-447, 2007
- BIANCHI; MANTOVANI, M.S.Y; MARIN –MORALES, M.A. Analysis of the genotoxic potential flow concentration sofmalathion on the *Allium cepa* cell Sandra the patomatiss sueculture. **Journal of Enverionmental Science**, Pequim, v.36, p.102-111, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2015.03.034>,
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA**. Resolução da diretoria colegiada RDC nº. 05, de 15 de Janeiro de 2007. Brasília: ANVISA. Available from: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.pdf. 2007
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES. M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, (5): p. 722-725, 2008.
- CAMPOS-VENTURA, B.; MARIN MORALES, M.A.; DESKS. Micronuclei and chromosome aberrations derived from action of Atrazine herrations in *Allium cepa*

meristematic cells.SDRPJ, **Jornal of Earth Sciences Environmental Studies**, v.1, (1), p.s/n,.<http://dx.doi.org>, 2016.

CARVALHO, C. A. de. *et al.* Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* miers-Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, (1), p. 51-58, 2009.

CUCHIARA, C.C.; BORGES, C.S.; BOBROWSKI, V.L. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Revista de Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, Paraíba, v.6, (1), p.33-38, 2012.

ELDIN S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na atenção primária a saúde**. São Paulo: Manole; 2001.

FIGUEREDO, C. A. V.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, (2), p. 381-400, 2014.

GONÇALVES L.A. A. **Alergias a alimentos ou a derivados usados como excipientes em medicamentos**. 64 f. Tese (Mestre em Ciências Farmacêutica.s). Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2016.

GUIDINI, V. G. A. C. **Avaliação bioquímica e genotóxica do tratamento de *Hibiscus sabdariffa* L. em ratos neonatos tratados com glutamato monossódico** / Ana Carla Guidini Valentini Gheller. – 2015.

HERRERA-ARELLANO, A. et al. Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. **Planta Medica**, v.73, (1), p.6-12, 2007.

HERRERO, O. *et al.* Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of *Allium cepa* test. **Mutation Reserch**, Amsterdam, v. 743, (1), p. 24-34, 2012.

JABEUR, I. *et al.* *Hibiscus sabdariffa* L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. **Food Research International**, v. 100, (!), p. 717-723, 2017.

JIMÉNEZ, G.; *et al.* Biological *screening* of plants of the venezuelan amazons. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, (1), p. 77-83, 2001.

KONISHI, Y.; HAYASHI, S. M.; FUKUSHIMA, S. Regulatory forum opinion piece*: supporting the need for international harmonization of safety assessments for food flavoring substance. **Toxicologic Pathology**, v. 42, (6), p. 949-953, 2014.

LACERDA, L. P.; MALAQUIAS, G.; PERON, A. P. Antiproliferative action of aqueous extracts of *Hymenaeastigonocarpa* Mart. (Fabaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, (3), p.1147-1150, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201420130163>.

- LEITE, J. J. G. *et al.* Chemical composition toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea Americana* (avocado) seed extracts. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical** v. 42, (2), p. 110-113, 2009.
- LIN, T.L. *et al.* *Hibiscus sabdariffa* extract reduces serum cholesterol in men and women. **Nutrition Research**, v.27, p.140-145, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531707000280>>. Acesso em: 12 fev. 2018. doi: 10.1016/j.nutres.2007.01.007
- LOPES, C.R. *et al.* **Folhas de chá**. Viçosa: UFV, 2005.
- LIU, J.Y. *et al.* The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl4-induced liver brosis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, (1), p. 336-343, 2006.
- MALAQUIAS, G; *et al.* Utilização na medicina popular, potencial terapêutico e toxicidade em nível celular das plantas *Rosmarinus officinalis L.*, *Salvia officinalis L.* e *Mentha piperita L.* (Família *Lamiaceae*). Revista. **Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, (3), p. 50-68, 2014.
- MENDIETA, M. C. *et al.* Plantas tóxicas: importância do conhecimento para realização da educação em saúde. **Revista Enfermagem**. UFPE online, Recife, v. 8, (3): p. 680-6, 2014.
- MEYER, B.N. *et al.* A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, (1), p.31-34, 1982.
- MEYER, B. N., *et al.* A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, (1), p. 31-34, 1982.
- MONROY-ORTIZ, C.; CASTILLO-ESPANA, P. **Plantas medicinales utilizadas en el estado de morelos**. México: Uaem, p. 405, 2007.
- MOURA, A.G. *et al.* Cytotoxicity of Cheese and Cheddar Cheese food flavorings on *Allium cepa L* root meristems. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, (2), p. 439-443, 2016.
- MUKHTAR, M.A. The effect of feeding rosella (*Hibiscus sabdariffa*) seed on broiler chicks performance. **Research Journal Animal and Veterinary Science**, v.2, (1), p.21-23, 2007. Disponível em: <<http://www.insipub.com/rjavs/2007/2123.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2018.
- OLATUNDE, F.E.; FAKOYA, A. Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers of *Hibiscus sabdariffa L.* **Molecular Nutrition and Food Research**, v.49, (1), p. 1120-1128, 2005. Disponível em:<<http://onlinelibrary.wiley.com.ez50.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1002/mnfr.200500084/pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2018. doi: 10.1002/mnfr.200500084.

- OLIVEIRA PG, STORPIRTIS S. Toxicidade de excipientes: carência de informação nas bulas de medicamentos disponíveis no mercado brasileiro. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, p. 71, 1999.
- OLVERA-GARCIA, V. *et al.* *Hibiscus sabdariffa* L. extracts inhibit themutagenicity inmicosuspension assay and the prolifetarian of HeLa cells. **Journal of Food Science**, v.73, (1), p.75-81, 2008.
- ORTEGA-RAMIREZ, L. A. *et al.* Potential of medicinal plants as antimicrobialandantioxidanta gents in Food industry: a hypothesis. **Journal Food Sci.**2014feb;79(2):p129-37.doi:101111/1754-3841.12341.Epub2014jan21.Prenesti, E.; Berto, S.; Daniele, P. G.; Toso, S. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chemistry*, v. 100, (2), p. 433-438, 2007.
- PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDINÃS, I. G.; BUELA, L. I. **Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts.***Phytomedicine*, v. 8, (5), p. 395-400, 2001.
- RAMAKRISHNA, B.V. *et al.* Antioxidant activities of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces and fruit extracts. **Journal of Food Science and Technology**, v.45, (1), p.223-227, 2008.
- RAMOS, D. D. *et al.* Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas. **Revista Ciência Rural**, v.41, (8), 2006.
- SALES, I. M. S. *et al.* Toxicity at the cellular level of artificial synthetic flavorings. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 38, (1), p. 297-303, 2016.
- SANTANA, G. M. *et al.* Antimitotic and antimutagenic action of the *Hymenaea stigonocarpa* bark on dividing cells. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 76, (1), p. 520 -525, 2016.
- SILVA, C. B.; LIMA, V. L. M. Avaliação da atividade antitumoral em extrato de *Indigofera suffruticosa* Mill.2008. **Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.
- SIQUEIRA, J. M. *et al.* Estudo Fitoquímico de *Unonopsis lindmanii annonaceae*, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Rev. Química Nova** 21(5). 1998.
- TONAZIO L. *et al.* Reações adversas dos adjuvantes farmacêuticos presentes em medicamentos para uso pediátrico. **HU Revista**, v. 37, (1), p. 63-8, 2011.
- VASCONCELOS P., A. F., ROLIM, L. A.; PEIXOTO, M. S. Influência dos excipientes multifuncionais no desempenho dos fármacos em formas farmacêuticas. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 93, (2), p. 136-145, 2012.

VEIGA, L. F.; VITAL, N.; Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. **Artes Gráficas e Indústria**, São Paulo, p.111-122. 2002.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. **Clima Temperado: Hibisco: do uso ornamental ao medicinal**. 2010. Disponível em: [Link]. Acesso em: 12 fev. 2018.

VOLPATO, G. T. *et al.* Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do *Diabetes mellitus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, (1), p. 35-45, 2002.



TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA “JOSÉ ALBANO DE MACEDO”

Identificação do Tipo de Documento

- () Tese
() Dissertação
(x) Monografia
() Artigo

Eu, JOYCE BEZERRA GUEDES, autorizo com base na Lei Federal nº 9.610 de 19 de Fevereiro de 1998 e na Lei nº 10.973 de 02 de dezembro de 2004, a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar, gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação ANÁLISE DA TOXICIDADE AGUDA E EM NÍVEL CELULAR DE *Hisbiscus sabdariffa* L. (MALVACEAE) de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, pela internet a título de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Picos-PI 29 de março de 2019

Joyce Bezerra Guedes

Assinatura

Joyce Bezerra Guedes

Assinatura

