

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

ANTONIA SIMONE SOARES DA SILVA

**AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO EXTRATO
ETANÓLICO de *Schinopsis brasiliensis* EM ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS**

PICOS – PI

2017

ANTONIA SIMONE SOARES DA SILVA

**AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO EXTRATO
ETANÓLICO de *Schinopsis brasiliensis* EM ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS**

Monografia apresentada como pré-requisito para obtenção do grau de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros.

Orientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

PICOS – PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí

Biblioteca José Albano de Macêdo

S586a Silva, Antonia Simone Soares da

Avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica do extrato etanólico *Schinopsis brasiliensis* em ensaios pré-clínicos / Antonia Simone Soares da Silva– 2018.

CD-ROM : il.; 4 ¾ pol. (46 f.)

Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí, Picos, 2019.

Orientador(A): Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

1. Plantas Medicinais. 2. Toxicologia 3. Viabilidade Celular-Mutações. I. Título.

CDD 581.634

ANTONIA SIMONE SOARES DA SILVA

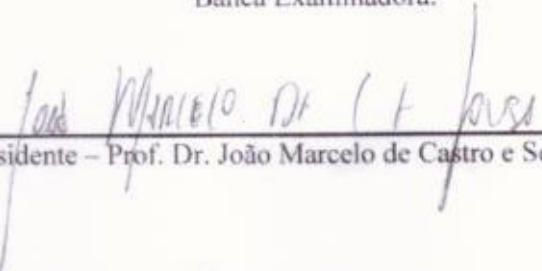
**AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO EXTRATO
ETANÓLICO *Schinopsis brasiliensis* EM ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS**

Monografia apresentada como pré-requisito para obtenção do grau de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, à Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros.

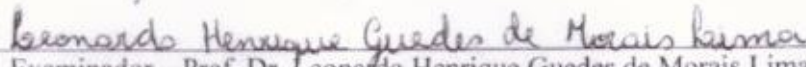
Orientador: Prof.Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

Aprovado em: 08/12/17

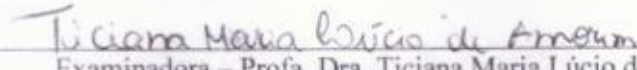
Banca Examinadora:



Presidente – Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa – UFPI



Examinador – Prof. Dr. Leonardo Henrique Guedes de Moraes Lima – UFPI



Examinadora – Profa. Dra. Ticiano Maria Lúcio de Amorim – UFPI

À minha família pelo amor, dedicação, educação e apoio integral em todos os momentos, e sem os quais meus passos não seriam os mesmos. Em especial aos meus pais Francisco Pereira da Silva e Santana Soares da Silva, pelo imenso amor, carinho, compreensão e incentivo.

AGRADECIMENTO

Como na vida não conquistamos nada sozinhos, esse é o momento de agradecer a todos que contribuíram durante o desenvolvimento desse trabalho e de toda minha vida acadêmica.

Toda honra e toda glória ao meu bom Deus, sempre presente em minha vida.

Aos meus amos pais, Francisco Pereira da Silva e Santana Soares da Silva que sempre me incentivaram a trilhar no caminho do bem e sempre na busca de novos conhecimentos, sou grata por em determinados momentos abdicarem de algo deles por mim. E as minhas irmãs Silvana e Erasma, a minha sobrinha Rayssa pela amizade e constantes incentivos, em especial ao meu irmão Marcos Antonio da Soares da Silva (*In memoriam*), foi a pessoa crucial na escolha do meu curso.

Ao Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa pela orientação, por todo apoio, pelos incentivos constantes, pela paciência, disponibilidade e principalmente pelos ensinamentos transmitidos e exemplo de competência. Agradeço também pela amizade que construímos, posso dizer que a minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem a sua pessoa.

Agradeço à Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, aos administradores, funcionários e a todo corpo docente do curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, pelas experiências compartilhadas.

Aos meus companheiros de laboratório, a todos os meus amigos sobreviventes nesses anos de universidade, pela amizade, alegrias compartilhadas e noites em claro que passamos juntos trocando conhecimentos, e às minhas duas famílias LAOH (Liga Acadêmica de Oncologia e Histologia) e LACA (Liga Acadêmica de Anatomia Humana), por todos os momentos vivenciados, certamente foram essenciais na minha vida.

Agradeço às minhas amigas irmãs Bruna Marques, Cassia França, Lilian Sousa e Maryanna Barreto que convivem diariamente comigo, por todo apoio, carinho, afeto e companheirismo durante toda essa minha jornada acadêmica, que sempre me incentivaram.

Aos Brotinhos, Luiza Maíra, Ana Régia, Rennan Sousa e Flávio Augusto por todo o companheirismo, carinho e irmandade construída nesses quatro anos, afinal somos os sobreviventes da turma 2013.2.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.
Simone de Beauvoir

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- FIGURA 1:** Casca, sementes e folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl..... **15**
- FIGURA 2:** Cistos (A) e o processo de crescimento e diferenciação (B) do microcrustáceo *Artemia salina*..... **18**
- FIGURA 3:** Fotomicrografia de eritrócitos policromáticos em medula óssea de *Mus musculus* (1000x)..... **19**

ARTIGO CIENTÍFICO

- FIGURA 1:** Atividade tóxica do extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* em diferentes concentrações ($\mu\text{g/ml}$) por meio do bioensaio de letalidade em *Artemia salina* (BSLB) utilizando o tempo de exposição de 24 h..... **30**
- FIGURA 2:** Efeito do extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* Engl na viabilidade de células sanguíneas de *Mus musculus*, determinado por exclusão de azul de Tripán em diferentes tempos de exposição. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da amostra (DMSO puro). O quimioterápico ciclofosfamida (20 mg/kg) foi usado como controle positivo (CP)..... **31**
- FIGURA 3:** Avaliação mutagênica do extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* em células de sangue periférico de *Mus musculus*..... **32**

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

TABELA 1: Espécies do gênero <i>Schinopsis</i> com seus nomes populares.....	14
---	----

ARTIGO CIENTÍFICO

TABELA 1: Avaliação da ação mutagênica e citotóxica do extrato etanólico de <i>Schinopsis brasiliensis</i> em células de medula óssea de <i>Mus musculus</i> por meio do teste de micronúcleos (MN)–.....	32
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1 Plantas medicinais e a importância dos produtos naturais	12
2.1.1 O gênero <i>Schinopsis</i> e a Espécies de <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.....	13
2.2. Importância dos testes toxicogenéticos.....	15
2.2.1 Utilização do Testes de Letalidade de <i>Artemia salina</i>	16
2.2.3 Utilização de células de roedores.....	17
REFERÊNCIAS.....	20
1 ARTIGO CIENTÍFICO.....	24
1.1 INTRODUÇÃO.....	25
1.2 METODOLOGIA.....	26
1.2.1 Obtenção do extrato etanólico de <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.....	26
1.2.2 Bioensaio letalidade em <i>Artemia Salina</i>	26
1.2.3 Ensaio toxicogenéticos utilizando sistema teste animal.....	27
1.2.3.1 Obtenção e acondicionamento dos animais, grupo tratamentos e procedimento de administração realizados nos camundongos.....	27
1.2.3.2 Avaliação da viabilidade celular utilizando o corante Azul de Tripan.....	28
1.2.3.3 Teste do Micronúcleo via célula sanguíneas e de medula óssea de camundongos preparação e análise de lâminas.....	28
1.2.4 Análise estatística para os dados obtidos com animais.....	28
1.3 RESULTADOS.....	29
1.3.1 Bioensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i>	29
1.3.2 Avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade em células sanguíneas de <i>Mus musculus</i>	30
1.4 DISCUSSÃO.....	31
1.5 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO GERAL

Dentre os diversos reinos, o reino vegetal é o que vem contribuindo de forma significativa com substâncias terapêuticas e farmacológicas no tratamento de doenças que acometem os seres humanos, representando um reservatório importante de composto terapêutico (MOREIRA, 2009). O uso de plantas medicinais em tratamento de doenças é uma prática milenar, tão antiga quanto à espécie humana (SILVA, 2013). O conhecimento sobre ervas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades, isso gera uma riqueza de conhecimentos tradicionais acumulados na população, que se tornou não apenas cultural, mas também algo social. Nos países em desenvolvimento a população acaba optando pelo uso das plantas medicinais, por serem mais acessíveis comparadas às drogas farmacêuticas (MACIEL; PINTO e; JUNIOR, 2001).

Os estudos científicos relacionados às ervas medicinais vêm crescendo constantemente no Brasil, por estas plantas terem uma grande diversidade biológica e potencial para a cura de várias patologias, assim vêm despertando a atenção da comunidade científica nacional e internacional, pois aqui se encontra uma das mais ricas floras do mundo. (SOUZA e FELFILI, 2005).

Dentre as espécies de plantas ditas como medicinais no Brasil, está a espécie *Schinopsis brasiliensis* Engl conhecida popularmente como braúna do sertão ou baraúna, pertence à família Anacardiaceae, constituída por aproximadamente 600 espécies agrupadas em cerca de 76 gêneros bastante promissores na busca de substâncias bioativas. Sua estrutura como árvore pode atingir até 12 metros de altura e 20 a 60 cm de diâmetro, típico da caatinga nordestina. Sua utilidade vai do uso da madeira até o consumo como erva medicinal, para tratamento de diversos tipos de diabetes, depressão, câncer, doenças cardíacas, derrame e osteoporose. (MONTANARI e BOLZANI, 2001). Sendo que na medicina popular são utilizadas desde as folhas até a casca. Diversos estudos apontam uma maior eficácia na casca da *S. brasiliensis*, sendo utilizada como anti-inflamatório para alívio de alguns sintomas e doenças, como gripe, febre, tosse, diarreia e disenteria (SILVA, 2013).

O uso milenar, constante e indiscriminado, apontou que no decorrer do tempo determinados compostos químicos constituintes de partes anatômicas das plantas medicinais apresentaram efeitos tóxicos e perigosos à saúde humana. Através de pesquisa foi possível mostrarem que muitas ervas medicinais possuem substâncias potencialmente agressivas às células e conseqüentemente ao organismo humano, e acreditam que o uso deve ser feito com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (MOREIRA, 2009).

A nível celular, diversas substâncias isoladas de espécies vegetais utilizadas como fitofármacos mostraram atividades citotóxicas e/ou genotóxicas e evidenciaram em alguns estudos incidências de neoplasia (JUNIOR, 2005). Pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicas no Brasil vem crescendo no decorrer dos anos, e assim vem chamando a atenção para o controle de vendas dessas ervas em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (JUNIOR e PINTO, 2005; SANTOS, 2017).

Portanto, para assegurar que a utilização das plantas medicinais seja segura e eficiente para a população, necessita-se investir em pesquisas científicas que avaliem os efeitos benéficos bem como os efeitos toxicológicos de diversos compostos presentes nas determinadas espécies vegetais utilizadas na medicina popular. A braúna (*Schinopsis brasiliensis*) foco do presente estudo é bastante utilizada pela população brasileira no tratamento de várias patologias como osteoporose, gripe, febre, micoses e impotência (SILVA, 2013).

Diante do exposto e visto que a braúna (*S. brasiliensis*) é uma planta de grande utilização popular para tratamento de patologias com incidências na sociedade brasileira, esse trabalho teve como finalidade avaliar o potencial tóxico, citotóxico e mutagênico do extrato da entrecasca da referida espécie em diferentes concentrações, utilizando os testes de letalidade com *Artemia salina* e estudos *in vivo* com células sanguíneas de *Mus musculus*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas medicinais e a importância dos produtos naturais

As plantas medicinais vêm desempenhando um papel importante e significativo dentro da história do sistema de saúde em todo mundo. E ao longo de todos esses anos, estudos mostram que as espécies vegetais ditas como medicinais são utilizadas para tratamento e cura de doenças. No entanto, os cientistas passaram a observar que havia a necessidade de saber qual constituinte presente naquela erva medicinal que promovia aquela reação benéfica em nosso organismo como fonte terapêutica, e assim o foco nas pesquisas referentes às plantas medicinais tomaram um importante rumo em todo o mundo, pois esse estudo foi recolhido para demonstrar o imenso potencial de plantas utilizadas em vários sistemas tradicionais (SILVA, 2013).

Existe, atualmente, um grande interesse da medicina em relação aos medicamentos de origem vegetal, muitos acreditam que as drogas derivadas de plantas se devem principalmente a crença de que a “Medicina verde”, além de serem mais acessíveis para a população em países em desenvolvimento, os medicamentos de origem vegetal podem ser menos agressivos do que as drogas sintéticas caras, em que muitas das quais causam efeitos negativos (SINGH e RAGHAV, 2012). Com o avanço dos estudos, pode-se evidenciar que a etnofarmacologia tem contribuído crescentemente para a saúde humana, evidenciando ser uma ferramenta importante da descoberta de produtos naturais em ação terapêutica (FERRAZ, 2005).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, dentre outros, tem sido objeto de estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de teste pré-clínicos com animais e muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998). Fatores como a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares e obtenção de exames e medicamentos que favorecem o uso de plantas medicinais por essa população (MOREIRA, 2009).

É notável o consumo de plantas medicinais também nos países mais ricos. Na Alemanha, onde se consome metade dos extratos vegetais comercializados em toda a Europa (cerca de US\$ 3,5 bilhões do total de US\$ 7 bilhões, ou US\$ 42,90 *per capita*, em valores de 2010), plantas medicinais são utilizadas pela população para tratar resfriados (66%), gripe (38%), doenças do trato digestivo ou intestinal (25%), dores de cabeça (25%), insônia (25%),

úlceras estomacal (36%), necrosismo (21%), bronquite (15%), doenças de pele (15%), fadiga e exaustão (12%) (VEIGA JUNIOR et al., 2011). Neste contexto, as plantas são valiosas fontes de novos compostos ativos e com baixa toxicidade (NEWMAN et al., 2003).

Por fim, o mercado farmacêutico mundial foi estimado em 505 bilhões de dólares, em 2004. Este valor exemplifica a importância econômica do setor industrial farmacêutico e, portanto, a dos produtos naturais, uma vez que segundo Newman et al., (2000) não há dúvidas da influência destes no processo de descobrimento de novas drogas. Desta forma o Brasil não deve abdicar de sua vocação para os produtos naturais, visto que possui a maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta e é detentor da maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Segundo Calixto (2003) "esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade".

2.1.1 O gênero *Schinopsis* e a espécie *Schinopsis brasiliensis* Engl

O gênero *Schinopsis* é constituído por 14 espécies (Tabela 1) conhecidas devido à utilização de suas madeiras nos meios rurais e urbanos para curtimento de couro ou na indústria madeireira devido à resistência à degradação por umidade, ataque de insetos e radiação ultravioleta (WILLIAMS et al., 2001). Assim, em virtude da sua estrutura e constituição química, espécies desse gênero sofrem menos ataques de vários organismos deterioradores, principalmente de fungos e cupins. A resistência à deterioração pode ser atribuída à presença de taninos e substâncias fenólicas complexas, que são tóxicas aos organismos xifófagos (CARDOSO, 2007).

Tabela 01: Espécies do gênero *Schinopsis* com seus nomes populares.

Espécies	Nome comum
<i>S. balansae</i> Engl.	Quebracho, Quebracho Vermelho, Quebracho Colorado, Chaqueno e Quebracho Colorado, Santafesino.
<i>S. balansae</i> var. <i>pendla</i> Tortorelli	-
<i>S. brasiliensis</i> Engl	Barauna, Quebracho, Soto, Barauva, Brauna, Brauna Parda, Brauna-do-sertão, Chamacoco, Chamucoco, Pau Preto e Yvyrau
<i>S. brasiliensis</i> var. <i>glabra</i> Engl.	-
<i>S. cornuta</i> Loes	-
<i>S.</i> Engl	-
<i>S. glabra</i> (Engl) Buril. Ex. Mey	-
<i>S. haenkeana</i> Engl. syn. <i>S. lorentzii</i> var. <i>marginata</i> (Engler Carb.)	Quebracho Colorado, Soto, Orko Quebracho, Tiquira, Quebracho Montano, Quebracho, Crespo e Schinopsis
<i>S. heterophylla</i> Ragon & J. Castigl	-
<i>S. lorentzii</i> (Griseb.) Engler syn.	Quebracho Vermelho, Quebracho Colorado Santiagueno, Paad, Paaj, Maasit, Taining.
<i>S. marginata</i> Engl.	-
<i>S. pearcei</i> Engl.	-
<i>S. peruviana</i> Engl.	-
<i>S. ssp</i>	Barauva, Brauna, Quebracho Hembra.

- Não encontrado. Fonte: Moreira (2009).

Entre as espécies da família Anacardiaceae e gênero *Schinopsis* encontra-se uma árvore endêmica do Brasil chamada *Schinopsis brasiliensis* Engl (Figura 01). É popularmente conhecida como baraúna, braúna, quebracho e chamacoco (BRAGA, 1960; PRADO et al., 1995; CARDOSO et al., 2005). Diferentes partes de *S. brasiliensis*, como as folhas, a casca, o caule e a fruta, são utilizadas na medicina popular como agentes antiinflamatórios para várias doenças, como gripe, febre, tosse, diarreia, impotência e osteoporose (ALMEIDA et al., 2005; ALBUQUERQUE, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007). A *S. brasiliensis* também é usada como antisséptico natural para tratar feridas e micoses superficiais (SARAIVA, 2007), bem como para o tratamento de zoonoses veterinárias (CARDOSO, 2001).

Figura 1: Casca, sementes e folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl.



Fonte: www.arvoresdobiomacerrado.com.br. 2017.

S. brasiliensis é uma árvore característica da caatinga e uma planta xerófita, heliófita, totalmente decídua durante o período seco, florescendo em épocas variáveis de um ano para o outro, o mesmo ocorrendo com sua frutificação e maturação dos frutos. Ocorre sempre em solos de várzea ricos em cálcio e nutrientes, bem suprido de matéria orgânica e umidade em profundidade (VALENTE, 2009).

Na medicina popular o caule, casca do caule, folhas, frutos e resina da baraúna são usados no tratamento de fraturas, inflamações em geral, impotência sexual, tosse, gripe e diarreia (ALBURQUERQUE et al. 2007). Segundo Agra (2007) a forma de uso e o modo de administração da casca do caule em um litro de água com açúcar, assim forma como uma espécie de xarope caseiro, tomando de três a quatro vezes ao dia até os sintomas desaparecerem ou a outra forma que se dar por um punhado da casca do caule em um litro de água, tomando como chá. No entanto, essa forma de uso e o modo de administração variam muito de região para região e é dependente da parte da planta usada. (CARDOSO, 2007; SILVA et al. 2008).

O uso de plantas medicinais para fins fitofarmacológico por parte da população é questionável e perigoso no que diz respeito à toxicidade de planta e de seus compostos bioativos. Assim, são necessários estudos toxicológicos para se conhecer melhor os benefícios e os efeitos adversos que plantas como, por exemplo, a *Braúna* podem trazer para o organismo humano.

2.2 A IMPORTÂNCIA DOS TESTES TOXICOGENÉTICOS

A fim de descobrir os efeitos adversos de infusões medicinais, é importante realização de testes que assegurem que as plantas medicinais tenham fins terapêuticos, e assim se possa chegar à substância para novos medicamentos vegetais. Os testes toxicogenéticos possuem papéis importantes e fundamentais nas fases precoces do desenvolvimento de novos fármacos, sendo que adianta os riscos e, portanto, reduzem as possibilidades de que um novo fármaco promissor falhe em etapas mais avançadas. Assim, proporciona a segurança de que a saúde do ser humano não seja colocada em risco (CUNNINGHAM, 2000; DORATO e BUCKLEY, 2006).

No decorrer dos anos é notório o crescimento de ensaios toxicológicos, tornando menos dispendiosos e mais eficazes na previsão dos efeitos adversos a saúde humana. De fato, há cada vez mais interesses em estudar e evidenciar a importância dos ensaios toxicológicos durante as pesquisas e desenvolvimento de novos fármacos. (DORATO e BUCKLEY, 2006).

2.1. Utilização do Teste de Letalidade de *Artemia Salina*

O uso de extratos de plantas medicinais para alívio de dores e cura de algumas doenças, cresce mundialmente. Esses estudos estão sendo feitos para assegurar a população de que o consumo não seja prejudicial aos órgãos do indivíduo por consumo em dosagens erradas e, assim, para estabelecer a toxicidade de novos produtos naturais, diversos ensaios estão sendo utilizados na procura dessa estabilidade (FERRÃO, 2017).

A avaliação de citotoxicidade é indispensável para considerar uma substância ou tratamento seguro. Compostos bioativos são quase sempre tóxicos em altas doses, portanto, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido durante o fracionamento de extratos. O ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural (RUIZ et al., 2005), se

popularizando como bioensaio principalmente a partir da década de 90 (LHLLIER et al., 2006).

O teste de citotoxicidade com *Artemia salina* é um método simples na pesquisa toxicológica (MEYER et al., 1982) onde os cistos dos microcrustáceos (Figura 2. A) são de baixo custo, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco, possuindo uma boa correlação tanto com testes de toxicidade aguda oral *in vivo* (PARRA et al., 2001), quanto com linhagem de células humanas (CARBALHO et al., 2002). O ensaio determina valores de concentração letal média (CL₅₀), em µg/mL, de compostos e extratos, sendo que inúmeras substâncias ativas conhecidas apresentam citotoxicidade por este teste (MEYER et al., 1982)..

Figura 02: Cistos (A) e o processo de crescimento e diferenciação (B) do microcrustáceo *A. salina*



Fonte: <<https://br.pinterest.com/pin/551479916862349905>>.

2.2.3 Utilização de Células De Roedores

Ensaio com células de roedores vêm apresentando benefícios em relação aos outros, entre as quais podem ser citadas sensibilidade, custo e confiabilidade. Esses testes podem ser feitos em qualquer população de células, desde que esteja passando constantemente por divisão, sendo a medula óssea de mamíferos uma das regiões mais adequadas, visto que as células levam de 22 a 24 horas para completar um ciclo de divisão (HEDDLE, 1973).

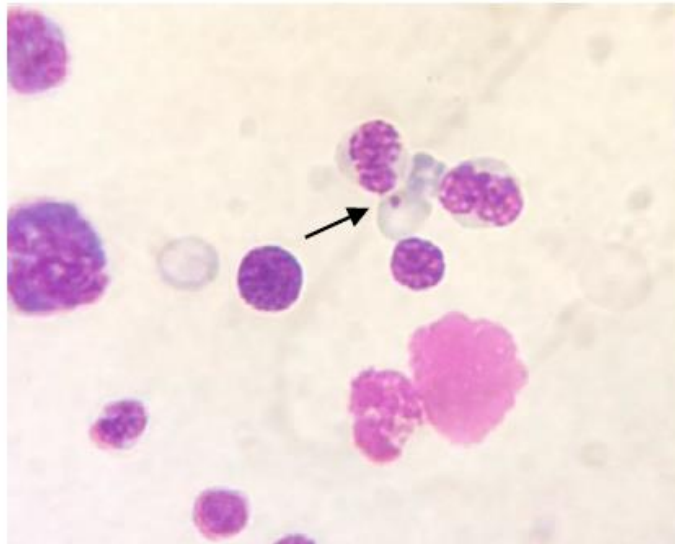
Alguns vegetais podem conter compostos químicos com a capacidade de causar mutações na estrutura do DNA, por isso, há a necessidade de estudar esses compostos bem como que tipos de mutações são capazes de induzir. Para roedores como *Mus musculus*, o teste de micronúcleo é um dos mais utilizados. Este teste em medula óssea é de fácil manuseio, e está sempre à procura de detectar e quantificar a ação mutagênica ou anti-mutagênica de agentes indutores, tendo uma grande aceitação pelas agências internacionais e

instituições governamentais como uma importante bateria de testes a procura de registros de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001).

O teste de micronúcleo se fundamenta na ocorrência de quebras cromossômicas ou falhas na ligação de cromossomos ao fuso, de modo que o processo de maturação destas células, quando ocorre a expulsão do núcleo, esta não faz de modo integral, permanecendo no citoplasma estruturas resultantes destes eventos os micronúcleos. O teste de micronúcleo em eritrócitos policromáticos de roedores é utilizado para avaliação do potencial de um dado agente em induzir danos cromossômicos (MEIRLES et al., 2013; SANTOS, 2015).

Micronúcleos (MN) são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que, durante a divisão celular, falham em se ligar às fibras do fuso e, assim, não são incluídos no núcleo das células filhas (Figura 3). Detectam, portanto, a ação de agente aneugênicos e de agentes clastogênicos. Em eritrócitos apresentam forma arredondada e medem cerca de 1/10 a 1/5 do diâmetro do eritrócito (RIBEIRO, 2003).

Figura3: Fotomicrografia de eritrócito policromático micronucleado em medula óssea de *Mus Musculus* (1000X).



Fonte: Santos, 2015.

O referido teste em eritrócitos policromáticos (PCE), que são eritrócitos jovens, foi pioneiramente proposto por Schmid, Matter e Von Ledebuir (1971) e posteriormente modificado por Heddle (1973). Assim, na condução do teste de micronúcleo em eritrócitos policromáticos, é fundamental conhecer a dinâmica de maturação de linhagem que origina os

eritrócitos. A primeira célula da linhagem eritroblástica, formada a partir da célula indiferenciada, é o pró-eritroblasto. Este, após quatro divisões origina os eritroblastos, que passam por uma só divisão e dão origem às células nas quais o núcleo é expulso e que se diferenciam primeiramente em eritrócitos policromáticos e, posteriormente, em eritrócitos normocromáticos (NCE) (HOLLAND et al., 2008; VASQUEZ et al., 2010)

O teste de micronúcleo em eritrócitos de camundongos apresenta muitas vantagens, como: micronúcleos são observados em células de intérfase, dispensando procedimentos de cultura; teste é realizado de baixo custo, a análise é simples e as estruturas são facilmente identificadas; teste detecta a ação de agentes aneugênicos e clastogênicos. Adicionalmente à genotoxicidade, o teste de micronúcleo propicia também a avaliação da citotoxicidade de uma dada substância através do cômputo da relação $PCE/PCE+NCE$ (VILAR et al., 2008; BORGES et al., 2011). Porém apresenta algumas limitações, tais como: micronúcleos são observados apenas em células que passaram anteriormente por uma divisão, eventos de não disjunção mitótica não são detectados, quebras que promovem rearranjos cromossômicos sem a ocorrência de fragmentos não são expressas.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”/ Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n.2, p. 383–395, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **J. Ethnobiol. Ethnomed.** 2(30): 1-10. 2006.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **J. Ethnopharmacol.** 114: p. 325-354, 2007.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R.; SILVA, T. C. L.; AMORIM, E. L. C.; MAIA M. B. S.; Albuquerque UP. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **J. Arid Environ.** 62(1): 127-142. 2005.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste: Especialmente do Ceará.** 4ª. Ed. Editora Universitária UFRN, Fortaleza, Brazil, p. 540. 1960.
- CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D.; A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC biotechnology.** v. 2, n. 1, p. 17, 2002.
- CARDOSO, M. P. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Schinopsis brasiliensis* (Anacardiaceae). **Master's Degree Dissertation, Chemistry Institute**, Federal University of Bahia, Brazil, p.106, 2001.
- CARDOSO, M. P. **Estudo Fitoquímico do Caule de *Schinopsos Brasiliensis* Engl. (Anacardeacea).** 2007. 227f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. **Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova.** v. 21, n.1, p.99-105, 1998.
- CHOY, W.N. Regulatory genetic toxicology test. in: n.n. (ed), genetic toxicology and cancer risk assessment. **marcel dekker, inc, new york** . p. 93- 113, 2001.
- FERRÃO, A. S. **Citotoxicidade e mutagenicidade do extrato hidroalcoólico de *Poincianella pyramidalis* em sistema teste animal e vegetal.** Monografia. Universidade Federal do Piauí, Picos, p . 15-16, 2017.
- HEDDLE, J. A. D. **Rarid in vitro test for chromossoonal damage mutat.** res. 18, p.187- 190, 1973.

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BAONASSI, S; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S; AND FENECH, M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project prospective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res.*, **659**, p.93-108. 2008.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, C. A. Plantas medicinais: Cura segura? *Quim. nova*. vol. 28, no. 3, 519- 528, 2005.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M.; Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Rev Bras Farmacogn*, v. 16, p. 158-163, 2006.

MACIEL, M. M. A.; PINTO, C. A.; JUNIOR, V. F. V. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. nova*, vol. 25, p.429-438, 2001.

MEIRELES, J.R.C.; OLIVEIRA, S.V.; COSTA-NETO, A.O. AND CERQUEIRA, E.M.M. Genotoxic and cytotoxic effects of testosterone cypionate (deposteron®). *Mutat. Res.*, **753**, 72–75, 2013.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. J.; MCLAUGHLIN, J. L.; Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, v. 45, n.05, p. 31-34, 1982.

MOREIRA, O. B. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* ENGL (Anacardiaceae).** TESE.Salvador, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Report*. v. 17, n.3, p.215-316, 2000.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, 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, n. 5, p. 395-400, 2001.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A.; Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 25, p.45-61, 2002. Suplemento 1.

PRADO, M. C. G., BARBOSA, D. C. A., ALVES, J. L. H., Aspecto morfoestruturais da unidade de dispersão de *Schinopsis brasiliensis* Engl. “baraúna” (Anacardiaceae). *Bol. Soc. Brot. Coimbra.*, 67: 187-197. 1995.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA, p.355, 2003.

RUIZ, A. L. T. G.; MAGALHÃES, G. E.; MAGALHÃES, A. F.; FARIA, A. D.; AMARAL, M. C. E.; SERRANO, D. R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.

Avaliação da atividade toxica em *Artemia salina* e biomplalaria glabrata de extratos de quatro espécies do gênero *Elocharis* (*Cyperaceae*) Campinas Grande. **Revista brasileira de farmacognosia**. Campinas Grande. p. 99, 2005.

SÁ & SILVA, I. M. M.; MARANGON, L. C.; HANAZAKI, N.; ALBUQUERQUE, U. P. Use and knowledge of fuelwood in three rural caatinga (dryland) communities in NE Brazil. **Environment Development and Sustainability**. 2008.

SANTOS, N. N. C. Avaliação da genotoxicidade e da citotoxicidade de produtos utilizados na terapia pulpar de dentes decíduos com o uso do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos e do ensaio cometa em linfócitos humanos. Feira de Santana/Bahia, 2015.

SARAIVA A. M. Estudo farmacognóstico e determinação da atividade biológica de *Caesalpinia pyramidalis* Tull. e *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA multirresistentes. Dissertação., Federal University of Pernambuco, Brazil. p. 184, 2007.

SILVA, B. M. Avaliação in vivo do potencial mutagênico e anti-mutagênico do extrato obtido das folhas de *Schinopsis brasiliensis* ENGL através do teste de micronúcleo em camundongos. Campinha Grande, 2013.

SINGH; RAGHAV. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, p.13-26, 2012.

SOUSA, D. C; FEIFILI, M. J. Uso de plantas medicinais na região de alto Paraíso de Goiás, go, brasil. **Acta bot. bras.** 135.142. 2006.

SOUZA SANTOS, C. C.; GUILHON, C. C.; MORENO, A. S. A.; ALVIANO, C. S.; ESTEVAM, C. S.; FERNANDES, A. F. B. P. D. **Journal of Ethnopharmacology**. Rio de Janeiro, Novembro de 2017.

VASQUEZ, M. Z., Combining the *in vivo* comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. **Mutagenesis**. v. 25, n. 2, p. 287-99, 2010.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, N.3, p.519-528, 2005.

VIEGAS J, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v. 29, n.2, p.326-337, 2006.

VILAR, J. B.; FERREIRA, F. L.; FERRI, P. H.; GUILLO, L.A.; CHEN-CHEN, L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal Of Biology**, v. 68, p. 41-7, 2008.

Este trabalho foi elaborado de acordo com as normas da revista *International Journal of Toxicology*. Fator de impacto: 1.205. Link de submissão: <http://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1091581817736712>.

1.ARTIGO CIENTÍFICO

Avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica do extrato etanólico *Schinopsis brasiliensis* em ensaios pré-clínicos

Antônia Simone Soares da Silva¹; Flávio Augusto Vieira Costa e Silva¹; Larissa de Sousa Soares¹; Alana da Silva Ferrão¹; Ataíde Macedo Vieira Lima¹; Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva^{1,2}; Thiago Pereira Chaves³; João Marcelo de Castro e Sousa^{1,2*}.

¹ Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Universidade Federal do Piauí.

² Laboratório de Citogenética e Mutagênese. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí.

³ Laboratório de Ensaio e Desenvolvimento de Drogas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

RESUMO

A *Schinopsis brasiliensis* Engl é uma planta bastante utilizada na medicina popular, amplamente distribuída por todo o Nordeste. Tem seu valor econômico bem estabelecido tanto por seu consumo da casca, folha e raiz, como por sua madeira que é bastante valorizada. Esta planta é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de fraturas, inflamações em geral, impotência sexual, tosse, gripe e diarreia, porém os estudos sobre os efeitos toxicológicos e genotóxicos do extrato e de seus compostos químicos ainda não foram determinados e definidos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos toxicogênicos do extrato etanólico da entrecasca utilizando diferentes concentrações e tempos de exposição. Os bioensaios utilizados foram o teste de letalidade de *Artemia salina* para avaliação tóxica e o teste de micronúcleo (MN) em *Mus musculus* para avaliação citotóxica e mutagênica. Os resultados mostraram que o extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* é tóxico apresentando CL₅₀ de 259,9 µg/ml, porém não apresentou citotoxicidade e nem causou dano mutagênico às células sanguíneas analisadas. Estudos adicionais se tornam necessários para definição dos mecanismos de toxicidade do referido extrato.

Palavras chaves: Plantas medicinais, toxicologia, viabilidade celular, mutações.

1.1 Introdução

Os conhecimentos populares associados às barreiras geográficas e econômicas para a obtenção de cuidados de saúde contribuem para o uso de plantas medicinais, como chás e extratos, especialmente nos países em desenvolvimento, para suprir os requisitos básicos primários (Firenzuoli e Gori, 2007; OMS, 2011; Akram et al., 2014; Tuttolomondo et al., 2014; Araujo et al., 2015). No entanto, a exposição contínua a produtos químicos sintéticos ou naturais presentes nestas preparações pode levar a danos estruturais e funcionais às macromoléculas, devido a possíveis efeitos tóxicos que podem ser medidos por vários testes genotóxicos e mutagênicos (Speit e Rothfuss, 2012; Hussin et al., 2014).

Schinopsis brasiliensis Engl é uma espécie pertencente à família Anacardiaceae, ocorrendo na caatinga brasileira, com prevalência na região nordeste do país, de valor econômico bastante importante já que suas folhas, caule, casca e raízes são utilizadas na medicina natural como agentes antiinflamatórios e para variados tipos de doenças, como gripe, febre, tosse, diarreia, impotência e osteoporose (Almeida et al., 2005; Albuquerque, 2006; Albuquerque et al., 2007). A *S. brasiliensis* também é usada como antisséptico natural para tratar feridas e micoses superficiais (Saraiva, 2007), bem como para o tratamento de zoonoses veterinárias (Cardoso, 2001).

Alguns compostos químicos já foram isolados das principais partes anatômicas dessa espécie, tais como flavonoides glicosilados, biflavonoides, taninos, monoterpenos como os mircenos, além de derivados de esteroides (Cardoso et al., 2005; Santos et al., 2014). Esses bioativos estão presentes na maioria das espécies vegetais utilizadas na medicina popular, tendo como atividades principais ação antioxidante e antiinflamatórias (Santos et al., 2014). Nesse caso, a princípio, a utilização dessa espécie se torna benéfica, entretanto, o uso em excesso de chás ou infusões da mesma podem causar problemas toxicológicos e genotóxicos considerando as altas dosagens desses bioativos bem como de estruturas químicas ainda não estudadas presentes nessa planta (Morais et al., 2016).

Testes toxicogenéticos, nesse caso, se tornam importantes para avaliar os possíveis efeitos maléficos que espécies vegetais e seus compostos químicos podem trazer a saúde humana. O teste de letalidade com *Artemia salina* é bastante utilizado para detectar compostos bioativos em extratos vegetais, pois o mesmo tem um baixo custo e é relativamente seguro em seus resultados (Ruiz et al., 2005). Já os testes em *in vivo* com animais são os principais testes que pode ser feito, pois a fisiologia dos camundongos

assemelha-se a do homem, então quando se faz testes com animais como em *Mus musculus*, normalmente os resultados são extrapolados para o organismo humano (Pourrut et al., 2015).

Desse modo, visto que se trata de uma planta bastante utilizada na medicina popular para sintomas e doenças com alta incidência no país, bem como da necessidade constante de avaliações toxicológicas com plantas medicinais e seus compostos químicos, o presente estudo visou avaliar a toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade do extrato etanólico da entrecasca de *Schinopsis brasiliensis* Engl em testes pré-clínicos.

1.2 Metodologia

1.2.1 Obtenção do extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis*

O material vegetal foi limpo e submetido à secagem em estufa de circulação de ar a 40°C até a manutenção do peso constante. Posteriormente, foi triturado em moinho de facas com tamanho de partícula de 10 mesh. O pó resultante foi mantido à temperatura ambiente em recipiente de plástico hermeticamente fechado e protegido da luz. O extrato etanólico foi obtido por extração assistida por ultrassom a 40 °C durante 60 min, utilizando como solvente etanol: água 50% (v/v). Em seguida foi submetido à secagem por aspersão em um Mini *Spray Dryer* Labmaq PS-1 (Labmaq do Brasil Ltda), com temperatura de entrada de 120°C, fluxo de ar 40 L.min⁻¹, vazão de ar de secagem 3 mL.min⁻¹. O extrato nebulizado (ENPp) foi seco com o adjuvante dióxido de silício coloidal (Aerosil 200[®]) em 20%, em relação ao resíduo seco.

1.2.2 Bioensaio de letalidade em *Artemia salina* (BSLB)

Para a preparação da *A. salina*, os cistos do microcrustáceo foram adquiridos no mercado central de Teresina-PI, Brasil. Esta foi uma rápida modificação do método descrito por Meyer et. al. (1982). Foram incubados cistos do microcrustáceo (*Artemia salina*) em becker contendo uma mistura 50:50 de solução salina (água do mar artificial: 23,0 g de NaCl, 11,0 g de MgCl₂.6H₂O, 4 g de Na₂SO₄, 1,3 g de CaCl₂.2H₂O, 0,7 g de KCl em 1 L de água destilada e ajustado para pH 8,5 utilizando Na₂CO₃, 1N) e água mineral sob arejamento constante durante 48 h a 27 ± 3° C. Após incubação, os náuplios ativos livres de conchas do microcrustáceo foram recolhidos a partir da porção mais iluminada da câmara de incubação e utilizados para o ensaio. Dez náuplios foram retirados por meio de uma pipeta de Pasteur e inseridos em cada tubo de ensaio contendo 4,5 mL da solução salina. O experimento foi realizado por diluições seriadas, onde a concentração inicial do extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* foi de 1000 µg/ml. Em cada experimento, adicionou-se

0,5 mL da amostra teste a 4,5 mL de solução de salina, mantendo a mesma temperatura de eclosão, sob a luz, os náuplios sobreviventes foram contados. Foram utilizados três tubos para cada tratamento. A mortalidade de *A. salina* foi contada após 24 horas de exposição à extrato vegetal testado. A definição da toxicidade do extrato foi baseado nas escalas de toxicidade de Meyer et al., (1982), de acordo com a escala, os valores de concentração letal $(CL)_{50} < 500 \mu\text{g/ml}$ indicam toxicidade, os valores de $(CL)_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$ indicam toxicidade moderada enquanto os valores de $(CL)_{50} < 500 \mu\text{g/ml}$ sugerem uma falta de toxicidade.

1.2.3 Ensaio toxicogenético utilizando sistema teste animal

1.2.3.1 Obtenção e acondicionamento dos animais, grupos tratamentos e procedimento de administração realizados nos camundongos

Neste trabalho, foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* L., linhagem Swiss, machos e fêmeas, com três meses de nascidos e 40 g de peso corpóreo, fornecidos pelo Biotério central da Universidade Federal do Piauí. Os animais permaneceram durante todo o tempo de experimento em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 horas. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água fornecida *ad libitum*.

Foram estabelecidos cinco grupos experimentais para análise, que foram: Grupo controle negativo (CN), T1, T2 e T3 – animais tratados com extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* nas concentrações de 1,0; 0,5 e 0,1 mg/ml e Controle positivo (CP) – tratados com ciclofosfamida (50 mg/kg), dose equivalente a 36,4% da dose letal (137 mg = kg);

Para cada grupo, utilizaram-se 05 camundongos, escolhidos de forma aleatória quanto ao sexo. O extrato vegetal foi administrado aos animais via gavagem, semelhante a utilização de chás e infusões pelo homem, em aplicação diária durante sete dias, por meio de seringa adaptada à aplicação oral de pequenas dosagens. Já os camundongos do grupo controle positivo receberam tratamento diferenciado, onde se aplicou ciclofosfamida na concentração 50 mg/kg (Carvalho et al., 2010), via intraperitoneal. Os tempos de exposição para o sangue periférico foram 48, 72 e 168 horas e medula óssea apenas o tempo de 168 horas.

Os animais utilizados nesta pesquisa foram tratados conforme os princípios definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e em conformidade aos preceitos da legislação brasileira (Lei Arouca - Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008). O

protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Pesquisa Animal (CEEA) da Universidade Federal do Piauí (nº 034/2016).

1.2.3.2 Avaliação da viabilidade celular utilizando o corante Azul de Tripan

Para a realização do teste de viabilidade celular foi utilizado o corante de exclusão Azul de Tripan. A visualização da citotoxicidade celular foi determinada uma vez que as células sanguíneas vivas possuem a membrana celular intacta, não permitindo que as mesmas sejam coradas. Assim, as células coradas indicaram morte celular. Para tanto, utilizou-se 10 µL de sangue periférico retirado através de punção caudal diluída em 90 µL do corante, sendo a leitura realizada na câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi calculada pela seguinte fórmula:

$$VC (\%) = \frac{\text{Total de células viáveis (não coradas)}}{\text{Total de células não-viáveis (coradas) + total de células viáveis}} \times 100$$

1.2.3.3 Teste do Micronúcleo via células sanguíneas e de medula óssea de camundongos, preparação e análise das lâminas

O teste de micronúcleos (MN) utilizando células sanguíneas periféricas e medula óssea foi realizado de acordo com metodologia descrita previamente por Krishna e Hayashi, 2000. Para a determinação da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em sangue periférico da veia caudal, o que caracterizou o efeito mutagênico do extrato foi observação de 2000 eritrócitos policromáticos (EPC) por animal em cada amostra de sangue, totalizando 10.000 células por tratamento para cada tempo de exposição 48, 72 e 168hs. Para esta análise foi utilizado microscópio óptico com objetiva de aumento de 100x. Para determinar a citotoxicidade do extrato na medula óssea dos animais, foi contabilizado um total de 400 eritrócitos (EPC+ENC) por animal (200/lâmina) e 2000 células por tratamento. Nesse caso, a relação de citotoxicidade para a medula óssea foi calculado por (EPC/PCE+ENC). A quantidade de MN em eritrócitos policromáticos (EPCMN) na medula óssea foi contabilizada pela leitura de 2000 células por animal.

1.2.4 Análise estatística para os dados obtidos com animais

Os valores de CL50 e seu respectivo intervalo de confiança (IC 95%) para o teste de letalidade de *Artemia salina* foi calculado a partir de regressão não – linear. Além disso, os

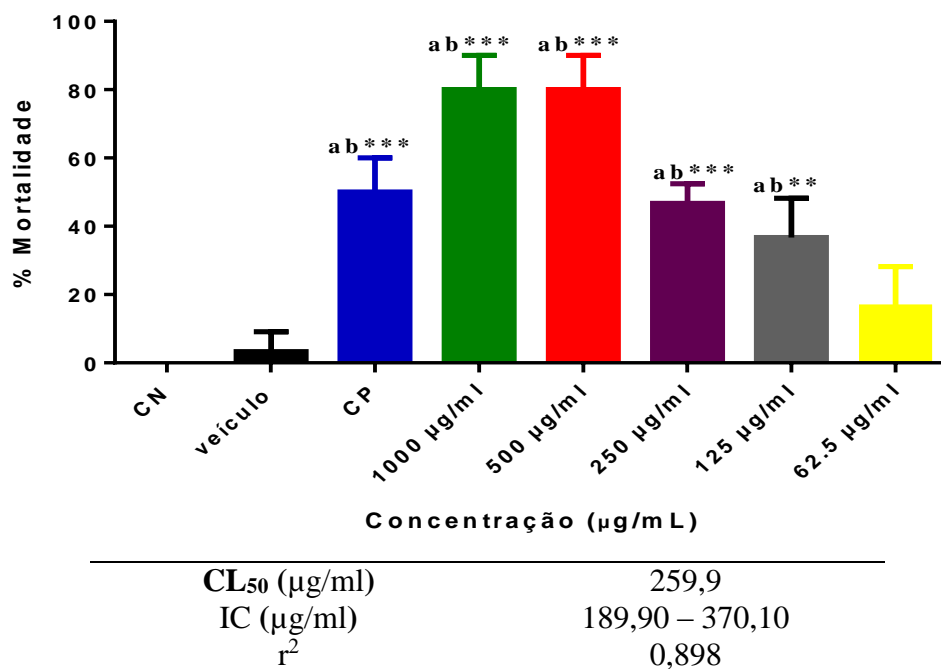
dados obtidos por meio do ensaio em *A. salina* e *Mus musculus* foram avaliados pelo método estatístico ANOVA seguido do Pós-teste de Tukey, através do programa computacional Graph Prism 7.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA), e o $p < 0.05$, $p < 0.01$ e $p < 0.001$ foram utilizados como valores de significância.

1.3 Resultados

1.3.1 Bioensaio de Letalidade em *Artemia salina* (BSLB).

O extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* nas concentrações de 125 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ apresentou as maiores letalidades, tendo valores estatisticamente significantes em relação ao CN e o veículo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) para o tempo de exposição analisado (24h). Com as concentrações utilizadas na diluição seriada, o valor de CL_{50} foi determinado: 259,9 $\mu\text{g/ml}$. Assim, baseado na classificação de Meyer et al., (1982) o extrato vegetal se mostrou tóxico. Este resultado demonstra que concentrações a partir de 125 $\mu\text{g/ml}$ do extrato podem impactar negativamente o metabolismo de *A. salina*. Não foi observada mortalidade significativa para o veículo utilizado quando comparado ao CN (Figura 01).

Figura 01: Atividade tóxica do extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* em diferentes concentrações ($\mu\text{g/ml}$) por meio do Bioensaio de Letalidade em *Artemia salina* (BSLB) utilizando o tempo de exposição de 24 h.

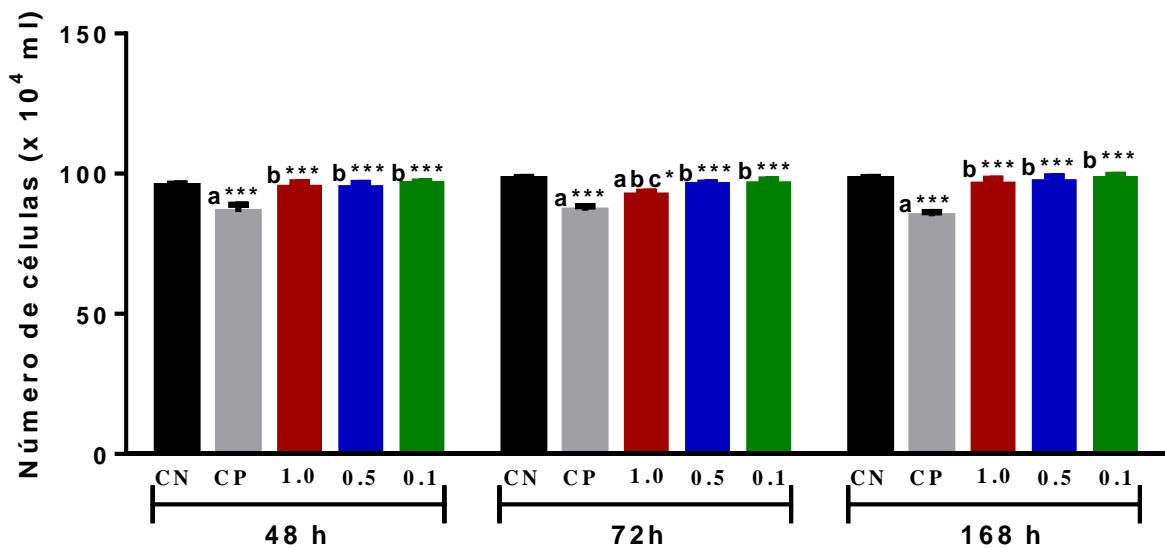


CP (KDCr, 16 μM); Valores são as médias e desvio padrão, ^a comparado com o CN, ^b comparado com o veículo (DMSO a 0,5%). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Anova oneway, com pós teste de Tukey. Cada concentração foi executada com três tubos (10 náuplios vivos / tubo); CL_{50} : Concentração letal 50% em $\mu\text{g/ml}$. IC: Intervalo de confiança; r^2 : Determinação de coeficiente.

1.3.2 Avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade em células sanguíneas de *M. musculus*

O extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* não causou morte celular significativa em células animais nos tempos de exposição (TE) analisados, com exceção da maior concentração (1,0 mg/ml) no TE de 72h. Ao contrário disso, o extrato vegetal avaliado foi estatisticamente significativo em relação ao CP ($p < 0,001$) o que comprova a não citotoxicidade do extrato nessas concentrações diante dessas células. Comparando por TE, as concentrações do extrato vegetal também não apresentaram valores significantes, com exceção a concentração de 1,0 mg/ml no TE 72h, onde foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos outros 02 TE avaliados (48 e 168h) (Figura 02).

Figura 02: Efeito do extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* Engl na viabilidade de células sanguíneas de *Mus musculus*, determinado por exclusão de azul de tripan em diferentes tempos de exposição. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da amostra (DMSO puro). A quimioterápica ciclofosfamida (20 mg/kg) foi usada como controle positivo (CP).



Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão da média. ^a: diferente quando comparado ao controle negativo no mesmo TE e ^b: diferente quando comparado ao controle positivo no mesmo TE; ^c: 1,0 mg/ml no TE 72h diferente quando comparado aos outros TE por ANOVA seguido de Tukey. $p < 0,05$ e $p < 0,001$.

Em relação aos resultados toxicogênicos de sangue periférico e medula óssea, o extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* não apresentou efeitos citotóxicos e mutagênicos significantes, ou seja, não teve ação aneugênica e clastogênica no DNA como também não

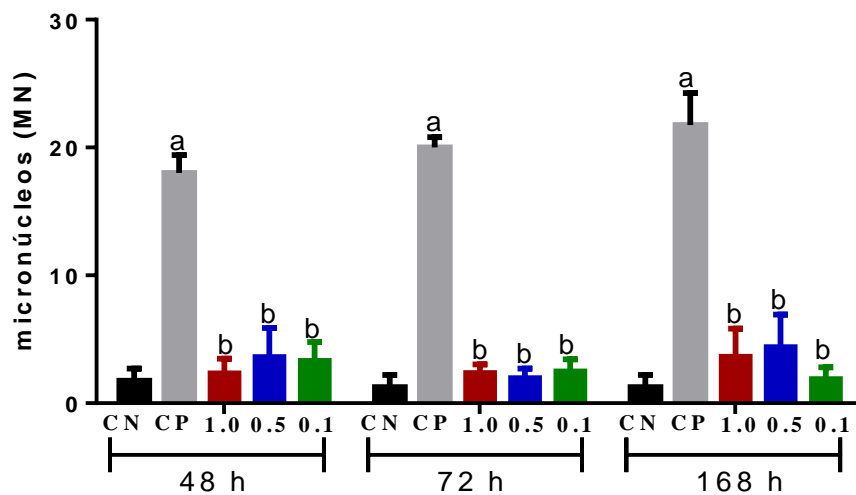
apresentou capacidade de parada do ciclo celular nas células mieloides de *M. musculus* (Tabela 01) (Figura 03).

Tabela 01. Avaliação da ação mutagênica e citotóxica do extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* em células de medula óssea de *Mus musculus* por meio do teste de micronúcleos (MN).

<i>Mutagenicidade e Citotoxicidade</i>		
Tratamentos	Micronúcleos	EPC/EPC+ENC
Sem tratamento	1,50 ± 0,57	0,91 ± 0,02
Ciclofosfamida (CP)	20,25 ± 0,63 ^a	0,43 ± 0,02 ^a
1,0 mg/ml	3,75 ± 1,93 ^b	0,91 ± 0,02 ^b
0,5 mg/ml	2,37 ± 1,88 ^b	0,94 ± 0,03 ^b
0,2 mg/ml	0,87 ± 1,1 ^b	0,92 ± 0,04 ^b

CP: controle positivo (20 mg/kg). Relação entre o número de eritrócitos policromáticos e a soma de eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) em 400 células analisadas (EPC/EPC+ENC). ANOVA-One-way e pós-teste de *Tukey*. *n*=5. Valores significantes (MD±DP) de *p*<0,05 para ^a comparado ao grupo sem tratamento, ^b à CP.

Figura 3: Avaliação mutagênica do extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* em células de sangue periférico de *Mus musculus*.



CN: controle negativo; CP: controle positivo (20 mg/kg de ciclofosfamida). ANOVA-One-way e pós-teste de *Tukey*. *n*=5. Valores significantes (MD±DP) de *p*<0,05 para ^a comparado ao grupo sem tratamento (CN), ^b à CP.

1.4 Discussão

Para o uso de plantas com a finalidade de tratamento e cura de doenças, alguns cuidados devem ser observados, pois as mesmas possuem substâncias extremamente tóxicas

para as células e conseqüentemente para o organismo, por isso, é importante analisar a toxicidade da planta, que é definida como a capacidade de causar sérios danos ou a morte de um organismo ou célula. Ainda são poucos as informações encontradas na literatura acerca do potencial tóxico e genotóxico da espécie *Schinopsis brasiliensis* Engl bem como do gênero *Schinopsis*, entretanto, o isolamento e a presença dos compostos químicos em diferentes partes anatômicas dessa espécie são bem definidos.

Quanto a sua importância biológica, a *S. brasiliensis* possui atividade antimicrobiana e antioxidante, porém com possível toxicidade para seu extrato metanólico segundo Saraiva et al. (2011). Essa possível toxicidade, foi confirmada no presente estudo, com valor de CL50 de 259,9 µg/ml. De acordo com McLaughlin et al. (1992) e Rajabi et al. (2015), para valores de CL50 entre 100 a 500 µg/ml, o extrato ou composto químico em questão é considerado moderadamente tóxico. Entretanto Santos et al. (2014), detectou a presença abundante de flavonoides e taninos no extrato hidroalcoólico das cascas de *S. brasiliensis*, além da ausência de toxicidade dessa planta o qual vai de encontro com o presente estudo.

Flavonoides representam uma das maiores classes de substâncias naturais, encontrada em diferentes tipos de espécies vegetais, incluindo frutas, sementes e plantas medicinais (David et al, 2004). São descritas atividades antiinflamatórias, antiipertensivas, antiarrítmicas, anti-colesterolêmicas, entre muitas outras. Sua atividade mais importante é a como antioxidante (PIETTA, 2000). Nos estudos de Moreira (2009) foram encontrados e isolados no extrato da *Schinopsis brasiliensis* a presença de diversos compostos, com uma abundância em flavonoides glicosilados e biflavonoides, estes resultados demonstram uma diversidade estrutural da espécie, o que nos leva a acreditar que esses compostos químicos que são benéficos, caso não seja utilizado em dosagem corretas venha a ser responsável por essa moderada toxicidade. Isso pode ser explicado pela alta concentração de polifenóis (taninos, flavonóides e outros compostos fenólicos), que é bem conhecido por sua toxicidade contra *A. salina* (Santos et al., 2010).

No presente estudo o extrato etanólico não causou morte celular e nem danos genotóxicos nas células sanguíneas de *Mus musculus*. A toxicidade aguda em camundongos também foi avaliada por Santos et al., (2003) e por Chaves et al., (2015) a uma concentração de 2000 mg/ml e não foi observado nenhum dano aos órgãos ou morte do animal, considerando o extrato de folha com baixa toxicidade. Saraiva (2012) avaliou a citotoxicidade contra macrófagos saudáveis e linhagens de células tumorais por ensaio com MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}, onde o extrato metanólico da folha de *S. brasiliensis* não apresentou toxicidade para células saudáveis corroborando com o presente

estudo, porém causou citotoxicidade seletiva para as linhagens K562 (IC50: 43,06 µg/mL), NCI-H292 (IC50: 27,28 µg/mL), HEP-2 (IC50: 32,53 µg/mL) o que caracteriza potencial para atividade antitumoral.

Há uma diversidade de pesquisas na área de produtos naturais e existe uma dificuldade para comparações dos estudos, devido às divergências de metodologias, parte da planta estudada, composto químico majoritário dentre outros. Porém as pesquisas em buscas de possíveis efeitos toxicológicos e farmacológicos de plantas medicinais e seus compostos químicos devem ser constantes. Os resultados aqui encontrados servem como banco de dados para a espécie em questão em relação ao seu efeito tóxico para o organismo. Ademais, estudos adicionais com essa espécie devem ser encorajados para descobertas de novas ações farmacológicas.

1.5 Conclusão

O extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* se mostrou tóxico em sistema teste animal, entretanto, em estudos *in vivo*, não apresentou efeitos citotóxicos e mutagênicos.

REFERÊNCIAS

- Akram M, Hamid A, Khalil A, Ghaffar A, Tayyaba N, Saeed A, Ali M, Naveed A (2014). Review on medicinal uses, pharmacological, phytochemistry and immunomodulatory activity of plants. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.** v.27,n.3, p.313-319.
- Albuquerque UP. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **J. Ethnobiol. Ethnomed.** 2006. v.2, n.30,p. 1-10
- .Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins Neto EMF, Melo JG, Santos JP, Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **J. Ethnopharmacol.**, v.114,p.325-354. 2007.
- Almeida CFCBR, SILVA TCL, AMORIM ELC, MAIA MBS. Albuquerque UP. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **J. Arid Environ.**, v.62, n.1,p. 127-142. 2005.
- Araujo EJF, Oliveira GAL, Sousa LQ, Bolzani VS, Cavalheiro AJ, Tomé AR, Peron AP, Santos AG, Cito AMGL, Pessoa C, Freitas RM, Ferreira PMP (2015). Counteracting effects on free radicals and histological alterations induced by a fraction with casearins. **An. Acad. Bras. Cienc.** v.87,n.3,p.1791-807.
- Cardoso MP, David JM, David JP, A new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis*. **Natural Products Research.** 2005.p.431-433.

Cardoso MP. **Contribuição ao estudo fitoquímico de *Schinopsis brasiliensis* (Anacardiaceae)**. Master's Degree Dissertation, Chemistry Institute, Federal University of Bahia, Brazil. 2001. P 106.

Chaves TP, Barbosa AS, Nunes LE, Silva KMA, Simões MOS, Santos RL, Catão RMR, Santos VL, Medeiros ACD. Evaluation of the potential modulator of bacterial resistance, acute toxicity and chemical composition of *Schinopsis brasiliensis* Engl. Afr. J. Pharm. Pharmacol. 2015, p. 843 – 849.

David JP, Barreiros ALS, David JM. Antioxidantes de Fontes Naturais. In: In: CARVALHO, José Carlos Tavares. (Org.). **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. 1ª ed. Ribeirão PretoSP, Tecmed, 2004.125-161.

Firenzuoli F, Gori L. Herbal medicine today: clinical and research issues. Evid. Based Complement. **Altern. Med.** v.4, n.1p.37-40,2007.

Hussin F, Eshkoo SA, Rahmat A, Othman F, Akim A (2014). The *Centella asiatica* juice effects on DNA damage, apoptosis and gene expression in hepatocellular carcinoma (HCC). BMC Complement. **Altern. Med.** v.14,p.32.

Mclaughlin JL, Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.**1982.p 45, p.31-34.

Meyer BN, Ferrigni, NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols D J, MCLAUGHLIN J L, Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica.** 1982. p.31-34.

Moraes GP, Alencar MVOB, Islam MT, Araújo LS, Gomes DCV, Carvalho RM, Corrêa D, Paz MFCJ, Ferreira PMF, Cavalcante AACCM, Ferraz A, Grivicich I, Picada JN. Toxicogenetic profile of rats treated with aqueous extract from *Morinda citrifolia* fruits. **Journal of Medicinal Plants Research.** 2016,p.18-19.

Moreira OB. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* ENGL (Anacardiaceae)**, 2009.

Organização mundial de saúde acessado Disponível em: <<http://www.paho.org/bra/>> acessado em 28 de Nov de 2017.

Pietta, Pier-Giorgio. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products.** 2000. p.1035-1042.

Pourrut B, Pinelli E, Celiz Mendiola V, Silvestre J, Douay F. Recommendations for increasing alkaline comet assay reliability in plants. **Mutagenesis.** 2015. v.30,n.1,p.37-43.

Rajabi S, Ramazani A, Hamidi M, Naji T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2015. P. 4-5.

Ruiz ALTG, Magalhães GE, Magalhães AF, Faria AD, Amaral MCE, Serrano DR, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA. Avaliação da atividade toxica em *Artemia salina* e biomplalaria glabrata de extratos de quatro espécies do gênero *Elocharis* (*Cyperaceae*). Campinas Grande .**Revista brasileira de farmacognosia**. 2005.p. 99.

Santos AG, Cavalheiro AJ, Bolzani VS, Silva DHS, Pessoa C. Morphological and biochemical alterations activated by antitumor clerodane diterpenes. **Chem. Biol. Interact**. 2014. p.112-125.

Santos NC, Dias CN, Coutinho-Moraes DF, Vilanova CM, GONÇALVES JRS, Souza NS, Rosa IG. Toxicidade e avaliação de atividade oluscicida de folhas de *Turnera ulmifolia* L. **Revista Brasileira de Biociências**. 2010. p.324-329.

Saraiva AM, Castro RHA, Risonildo P, Cordeiro RP, Peixoto STJS, Castro VTNA, Amorim ELC, Xavier HS, Pisciotano MNC. In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **African J. Pharm. Pharmacol**. 2011. p 1724-1731.

Saraiva AM. **Avaliação da atividade biológica de extratos metanólicos de *Schinopsis brasiliensis* ENGL. em sistemas microemulsionados**. Tese de Doutorado programa de Pós-Graduação em ciências farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2012.

Saraiva AM. **Estudo farmacognóstico e determinação da atividade biológica de *Caesalpinia pyramidalis* Tull. e *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA multirresistentes**. Master's Degree Dissertation, Pharmaceutical Science Department, Federal University of Pernambuco. 2007.p 184.

Speit G, Rothfuss A . The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.* n.314,p.79-90,2012.

Tuttolomondo T, Licata M, Leto C, Savo V, Bonsangue G, Letizia Gargano M, Venturella G, La Bella S (2014). Ethnobotanical investigation on wild medicinal plants in the Monti Sicani Regional Park (Sicily, Italy). *J. Ethnopharmacol.* v.153,n.3,p.568-586.

ANEXO



International Journal of Toxicology

2016 Impact Factor: 1.205

2016 Ranking: 213/256 in Pharmacology & Pharmacy | 86/92 in Toxicology

Source: 2016 Journal Citation Reports® (Clarivate Analytics, 2017); Indexed in PubMed: MEDLINE

Published in Association with [American College of Toxicology](#)

Editor

[Mary Beth Genter, PhD](#) University of Cincinnati, USA

Other Titles in:

[Toxicology](#) | [Toxicology \(Clinical\)](#)

eISSN: 1092874X | ISSN: 10915818 | Current volume: 36 | Current issue: 5 Frequency: Bi-monthly

[Download flyer](#) [Recommend to Library](#)

- [Description](#)
- [Aims and Scope](#)
- [Editorial Board](#)
- [Abstracting / Indexing](#)
- [Submission Guidelines](#)

Average time from submission to first decision: 13 days

The *International Journal of Toxicology* publishes timely, peer-reviewed papers on current topics important to toxicologists. Six bi-monthly issues cover a wide range of topics, including contemporary issues in toxicology, safety assessments, novel approaches to toxicological testing, mechanisms of toxicity, biomarkers, and risk assessment. The Journal also publishes invited reviews on contemporary topics, and features articles based on symposia. In addition, supplemental issues are routinely published on various special topics, including three supplements devoted to contributions from the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel.

All authors are now required to complete an authorship form upon submission of their article. Any author found not to be in compliance with the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#) formulated by the International Committee on Medical Journal Editors (ICJME) and requirements for authorship will be relisted under acknowledgements.

This journal is a member of the [Committee on Publication Ethics](#).

There are no fees associated with submitting to this journal.

Please read the guidelines below then submit your manuscripts electronically to <http://mc.manuscriptcentral.com/uito>. Authors will be asked to set up an online account in the SAGETRACK system, powered by ScholarOne. Please note that manuscripts not conforming to these guidelines may be returned. Only manuscripts of sufficient quality that meet the aims and scopes of *IJT* will be reviewed. For questions regarding submission, contact Mary Beth Genter, Editor, at gentermb@ucmail.uc.edu.

As part of the submission process you will be required to warrant that you are submitting your original work, that you have the rights in the work, that you are submitting the work for first publication in the Journal and that it is not being considered for publication elsewhere and has not already been published elsewhere, and that you have obtained and can supply all necessary permissions for the reproduction of any copyright works not owned by you.

Manuscript Submission Guidelines

Article Types:

International Journal of Toxicology (the Journal) is the official journal of the American College of Toxicology and is published by SAGE. The Journal publishes timely, peer-reviewed original research papers on current topics important to toxicologists. Six bi-monthly issues cover a wide range of topics, including contemporary issues in toxicology, safety assessments, novel approaches to toxicological testing, mechanisms of toxicity, biomarkers, and risk assessment. The Journal also publishes invited reviews on contemporary topics, and features articles based on symposia. In addition, supplemental issues are routinely published on various special topics, including three supplements devoted to contributions from the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel.

The Journal does NOT publish the following: case reports, case studies, papers dealing with chemoprotection/therapeutic interventions (i.e. the protective/therapeutic effect of agent X against the toxicity of chemical Y), papers showing results with poorly characterized natural products, or papers with an ecotoxicology focus.

Editorial Policies:

Peer review: Manuscripts that meet the journal requirements are peer reviewed by experts from the Journal's Editorial Board or other qualified reviewers. Reviewers are asked to return their peer reviews within three weeks. Guidelines for reviewing manuscripts are posted on the American College of Toxicology's website: <http://www.actox.org/journal/intlJournal.asp>.

Authorship: Papers should only be submitted for consideration after consent is given by all contributing authors. Those submitting papers should carefully check that all those whose work contributed to the paper are acknowledged as contributing authors. We require that author contributions are listed after the COI disclosure. Please note that authorship should conform to guidelines established by the Council on Publication Ethics: <http://publicationethics.org/files/2003pdf12.pdf>. A sample statement is outlined here: “XXX and YYY designed the experiments; XXX, AAA, and BBB performed the experiments; AAA, BBB, and CCC analyzed the data; ZZZ contributed reagents; XXX and CCC wrote the manuscript.” A form is provided on the Manuscript Central submission site to aid authors in outlining the contributions of each author.

Acknowledgements: Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group alone does not constitute authorship. Individuals who participated in the research but do not qualify for authorship should be listed in the Acknowledgements section of the manuscript (with the permission of that individual). Individuals who provided writing assistance do not qualify for authorship and should be included in the Acknowledgements section.

Funding: *International Journal of Toxicology* requires all authors to disclose their funding in a consistent fashion under a “Funding” heading. Please see the Funding Acknowledgements page on the SAGE Journal Author Gateway to confirm the format for disclosing funding. If the work was performed without any specific funding, authors should state “This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, private, or not-for-profit sectors”.

Conflict of Interest (COI) disclosure: *International Journal of Toxicology* requires all authors to disclose any possible conflicts of interest. Sufficient disclosure may include divulging affiliation as members of industrial or governmental organizations, academic support, non-profit consulting, advocacy, and all sources of financial and material support for studies and manuscripts submitted. Please ensure that a “Declaration of Conflicting Interest” statement is included at the end of your manuscript, after the Acknowledgements section and prior to the references. If no COI exists, please state that “The Author(s) declare(s) that there is/are not conflict(s) of interest”.

Research involving human subjects: This work must be conducted with appropriate and competent oversight, such as provided by and Institutional Review Board (IRB), ethics committee (EC), or similar independent organization and must comply with the principles of the Declaration of Helsinki (World Medical Organization; <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>). The manuscript should state in the Methods section how participants were recruited and whether participants gave informed consent; the IRB or EC approval number must be included. In addition, information must be included in the manuscript that clearly states the number of human subjects recruited and describe the study procedures and data collection techniques. The Editor reserves the right to examine such documentation. No paper will be considered for review and publication without this information from the authors.

Research involving Laboratory animals: Manuscripts submitted to *International Journal of Toxicology* should clearly state their compliance with the guidelines and principles listed therein and should indicate that animal protocols were reviewed and approved by an

institutional panel. The American College of Toxicology Policy on the Use of Animals in Toxicology is published in Issue 1 each year, and copies may be requested from the Editor.

Data sharing: *International Journal of Toxicology* permits authors to share data as Supplemental files available in the online version of the Journal. Authors may also provide detailed information in their articles as to how the data may be obtained. This information should include links to third-party data repositories or detailed contact information for third-party data sources.

Publishing policies: *International Journal of Toxicology* is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). SAGE is committed to upholding the integrity of the academic record. We encourage authors to refer to the Committee on Publication Ethics' [International Standards for Authors](#) and view the Publication Ethics page on the [SAGE Author Gateway](#).

Plagiarism: *International Journal of Toxicology* and SAGE take issues of copyright infringement, plagiarism, or other breaches of best practice in publication very seriously. We seek to protect the rights of our authors and we always investigate claims of plagiarism or misuse of articles published in the journal. Equally, we seek to protect the reputation of the journal against malpractice. Submitted articles may be checked using duplication-checking software. Where an article is found to have plagiarized other work or included third-party copyright material without permission or with insufficient acknowledgement, or where authorship of the article is contested, we reserve the right to take action including, but not limited to: publishing an erratum or corrigendum (correction); retracting the article (removing it from the journal); taking up the matter with the head of department or dean of the author's institution and/or relevant academic bodies or societies; banning the author from publication in the journal or all SAGE journals, or appropriate legal action.

Contributor's publishing agreement: Before publication, SAGE requires the author as the rights holder to sign a Journal Contributor's Publishing Agreement. SAGE's Journal Contributor's Publishing Agreement is an exclusive licence agreement which means that the author retains copyright in the work but grants SAGE the sole and exclusive right and licence to publish for the full legal term of copyright. Exceptions may exist where an assignment of copyright is required or preferred by a proprietor other than SAGE. In this case copyright in the work will be assigned from the author to the society. For more information please visit our [Frequently Asked Questions](#) on the SAGE Journal Author Gateway.

Open access and author archiving: *International Journal of Toxicology* offers optional open access publishing via the SAGE Choice program. For more information please visit the [SAGE Choice](#) website. For information on funding body compliance, and depositing your article in repositories, please visit [SAGE Publishing Policies](#) on our [Journal Author Gateway](#).

Online repositories and author rights: Authors may not post the accepted version of the article (Version 2) to online repositories (including ResearchGate, Mendeley, etc.) until 12 months after publication of the article in the journal. Authors may not post the published article (Version 3) on a website or in a repository without permission from SAGE. To view your full rights as an author, visit the [SAGE Publishing Policies](#) on the [Journal Author Gateway](#).

Permissions: Authors are responsible for obtaining permission from copyright holders for reproducing any illustrations, tables, figures or lengthy quotations previously published

elsewhere. For further information including guidance on fair dealing for criticism and review, please visit our [Frequently Asked Questions](#) on the [SAGE Journal Author Gateway](#).

Preparing your manuscript

Word processing formats: Preferred formats for the text and tables of your manuscript are Word DOC, RTF, XLS. LaTeX files are also accepted. The text should be double-spaced throughout and with a minimum of 3cm for left and right hand margins and 5cm at head and foot. Text should be standard 10 or 12 point. Word and (La)Tex templates are available on the [Manuscript Submission Guidelines](#) page of our Author Gateway.

Artwork, figures and other graphics: For guidance on the preparation of illustrations, pictures and graphs in electronic format, please visit SAGE's [Manuscript Submission Guidelines](#). Figures will be uploaded as individual files and should meet the following criteria:

300 dpi or higher in resolution.jpg or .tif files

Figures supplied in color will appear in color online regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For specifically requested color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from SAGE after receipt of your accepted article.

Supplementary material: This Journal is able to host additional materials online (e.g. datasets, podcasts, videos, images etc) with the full-text of the article. These will be subjected to peer-review alongside the article. For more information please refer to our guidelines on submitting supplementary files, which can be found within our [Manuscript Submission Guidelines](#) page.

Article layout: *International Journal of Toxicology* follows the American Medical Association (AMA) format for text, citations, and references. Authors submitting manuscripts to *International Journal of Toxicology* should consult the 10th Edition of the AMA Manual of Style.

References must be numbered sequentially in the text, and listed in numerical order at the end of the text.

Typical entry for a journal article:

Brock WJ, Woolley AP, Sugimoto T. Certification in toxicology: an international perspective of risk:benefit. *Int J Toxicol*. 2009;28(3):147-50.

Typical entry for journal article with >6 authors (list first 3, then et al.):

Politano VT, Lewis EM, Hoberman AM, et al. Evaluation of the developmental toxicity of methyl dihydrojasmonate (MJD) in rats. *Int J Toxicol*. 2008;27(3):295-299.

Entry for book chapter:

Baker H, Genter MB. The olfactory system and nasal mucosa as portals of entry of viruses, drugs, and other

exogenous agents into the brain. In: Doty RL, ed. Handbook of Olfaction and Gustation. 2nd ed. New York, NY: Marcel Dekker, Inc; 2003:549.

Submission: The following will be requested during online submission: (a) names, credentials, and complete contact information for the corresponding author; names, credentials, positions, and email addresses for all co-authors; (b) cover letter to the Editor stating explicitly that the manuscript is not under consideration by another journal; (c) abstract of 250 words or less; (d) key words; (e) abbreviations; and (f) one complete, double-spaced Microsoft Word file of the article with the following components listed in order of appearance:

- Abstract
- Main body of the article
 - Introduction
 - Materials and Methods
 - Results
 - Discussion
- Acknowledgements, including source(s) of funding
- Conflict(s) of interest
- Figure legends
- References
- Tables

Please keep in mind that manuscripts will not be reviewed until all necessary information has been submitted. Articles needing extensive improvements in the English presentation will be returned to the Authors for revision. Articles not in the scope of the Journal will be rejected without review. The Editor reserves the right to request original data (including histology slides) for review.

English language editing services: Authors seeking assistance with English language editing, translation, or figure and manuscript formatting to fit the journal's specifications should consider using SAGE Language Services. Visit [SAGE Language Services](#) on our Journal Author Gateway for further information.

Submitting your manuscript:

Manuscripts should be submitted electronically to <http://mc.manuscriptcentral.com/uito>. Authors will be asked to set up an online account in the SAGETRACK system, powered by ScholarOne. For questions regarding submission, contact Mary Beth Genter, Editor-in-Chief at gentermb@ucmail.uc.edu. Hard copy submissions or submissions via email to the Editor will not be acknowledged or reviewed.

IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the Journal in the past, it is likely that you have previously created an account. For further guidance on submitting your manuscript online please visit ScholarOne Online Help.

Title, keywords and abstracts: Please supply a title, short title, an abstract and keywords to accompany your article. The title, keywords and abstract are key to ensuring that readers find

your article online through online search engines such as Google or PubMed. Please refer to the information and guidance on how best to title your article, write your abstract and select your keywords by visiting the SAGE Journal Author Gateway for guidelines on How to Help Readers Find Your Article Online.

Corresponding author contact details: Provide full contact details for the corresponding author including email, mailing address and telephone numbers. Affiliations are required for all co-authors. Invalid email addresses will result in return of manuscripts without review.

Manuscript acceptance and publication:

SAGE Production: Your SAGE Production Editor will keep you informed as to your article's progress throughout the production process. Proofs will be sent by PDF to the corresponding author and should be returned promptly.

Access to your published article: SAGE provides authors with online access to their final article.

Online First publication: Online First allows final revision articles (completed articles in queue for assignment to an upcoming issue) to be published online prior to their inclusion in a final journal issue which significantly reduces the lead time between submission and publication. For more information please visit our Online First Fact Sheet.

Other Information:

Guidelines for manuscripts describing natural products/natural products extracts: *International Journal of Toxicology* receives numerous submissions that focus on natural products or derivatives (most commonly extracts). In order to ensure the scientific reproducibility and quality of these submissions, the following parameters, at a minimum, must be addressed in the manuscript: (a) source and availability of material [including whether wild or cultivated]; (b) selection of material [in the case of plants, the plant selected for collection should be taxonomically the same as recommended by the national pharmacopeia or other related document]; (c) collection of the material; (d) processing and preparation of material; (e) storage conditions of the neat test substance and the dosing formulation; (f) analytic method(s) used to assure stability; (g) phytochemical analysis of the material, or other quantitative analytical evaluation that demonstrates the composition of the material. Include verification of stability and purity of the neat test substance under a verifiable method; (h) dose formulation analysis (e.g. quantitative measurement of homogeneity, stability and dose verification analysis of the test substance in the vehicle during and under the same test conditions as the definitive study). Excellent guidance on preparation and testing of natural products, their extracts, etc. has been detailed by the World Health Organization and the Foundation for Medical Research, India.

Where can authors post their manuscripts? SAGE has adopted RoMEO Green compliant author archiving policy. The following applies under this new policy:

- You retain copyright in your work
- You may do whatever you wish with the version of the article you submitted to the journal (version 1).

- Once the article has been accepted for publication, you may post the accepted version (version 2) of the article on your own personal website, your department's website or the repository of your institution without any restrictions.
- You may not post the accepted version (version 2) of the article in any repository other than those listed above (i.e. you may not deposit in the repository of another institution or a subject repository) until 12 months after publication of the article in the journal.
- You may use the published article (version 3) for your own teaching needs or to supply on an individual basis to research colleagues, provided that such supply is not for commercial purposes.
- You may use the published article (version 3) in a book you write or edit any time after publication in the journal.
- You may not post the published article (version 3) on a website or in a repository without permission from SAGE.
- When posting or re-using the article please provide a link to the appropriate DOI for the published version of the article on SAGE Journals (<http://online.sagepub.com>)



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

Identificação do Tipo de Documento

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

Eu, ANTONIA A SIMONE SOARES DA SILVA, 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 AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO EXTRATO ETANÓLICO SCHINOPSIS BRASILIENSIS EM ENSAIOS PRÉ-CLÍNICO 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, 01 de abril de 2019.

Antonia Simone Soares da Silva
Assinatura

Antonia Simone Soares da Silva
Assinatura