



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

FLÁVIO AUGUSTO COSTA VIEIRA E SILVA

**AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA, MUTAGÊNICA E OXIDANTE DO
EXTRATO ETANÓLICO DE *Eucalyptus grandis***

PICOS – PI

2017.

FLÁVIO AUGUSTO COSTA VIEIRA E SILVA

**AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA, MUTAGÊNICA E OXIDANTE DO
EXTRATO ETANÓLICO DE *Eucalyptus grandis***

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**

V658a

Vieira e Silva, Flávio Augusto Costa.

Avaliação tóxica, citotóxica, mutagênica e oxidante do extrato etanólico de
Eucalyptus grandis / Flávio Augusto Costa Vieira e Silva – 2026.
44 f.

1 Arquivo em PDF.

Indexado no catálogo *online* da biblioteca José Albano de Macêdo,
CSHNB. Aberto a pesquisadores, com restrições da Biblioteca.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal
do Piauí, Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Picos, 2026.
“Orientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa”.

1. Plantas medicinais. 2. Biologia. 3. Plantas - recursos terapêuticos. I.
Vieira e Silva, Flávio Augusto Costa. II. Castro e Sousa, João Marcelo de.

FLÁVIO AUGUSTO COSTA VIEIRA E SILVA

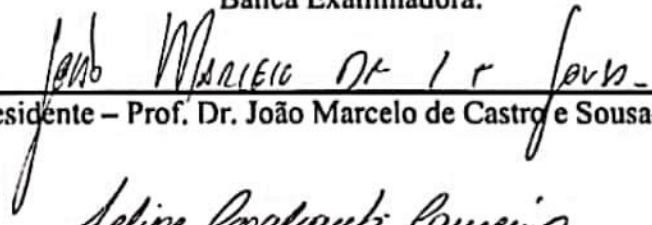
**AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA, MUTAGÊNICA E OXIDANTE DO
EXTRATO ETANÓLICO DE *Eucalyptus grandis***

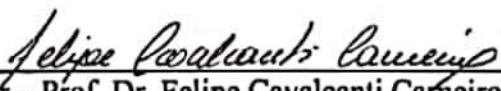
Monografia apresentada como pré-requisito
para obtenção do grau de Licenciatura
Plena em Ciências Biológicas, à
Universidade Federal do Piauí, Campus
Senador Helvídio Nunes de Barros.

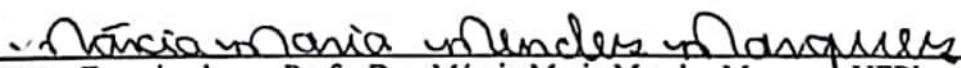
Orientador: Prof. Dr. João Marcelo de
Castro e Sousa

Aprovado em: 08/12/17

Banca Examinadora:


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


Examinador – Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva – UFPI


Examinadora – Profa. Dra. Márcia Maria Mendes Marques – UFPI

Dedico primeiramente a Deus, que sempre me guiou pelo caminho certo, pois sua graça divina nada disso seria. Dedico aos meus professores e aos meus amigos que sempre me apoiaram estiveram sempre presentes para me ajudar nessa tarefa árdua, a minha mãe, no qual sempre tive apoio, pois sem ela nada disso teria sentido.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pois mesmo não sendo merecedor da sua graça ele derrama sobre mim bênçãos sem medidas, tendo sempre misericórdia da minha vida. Por permitir que tudo isso acontecesse, não somente nestes anos como universitário, mas em todos os momentos da minha caminhada. Obrigada Senhor, por ter me dado saúde e forças para superar as dificuldades.

À minha família, por todo carinho e apoio. Principalmente, a minha mãe Anisia Maria da Costa, pelo amor, compreensão, cuidado, dedicação, por me passar segurança e força para enfrentar e vencer os obstáculos não somente nesse período de vida acadêmica, mas durante toda a minha vida. E a minha irmã, Eduarda da Cosa Ribeiro dos Santos, em que diante de alguns desentendimentos, sempre esteve ao meu lado com seu companheirismo. Com vocês tudo nessa vida se torna mais fácil.

Ao meu orientador, Professor Dr. João Marcelo de Castro e Sousa, desde o dia em que aceitou ser meu orientador, pelo apoio, disponibilidade e conhecimentos transmitidos ao longo desta jornada. Agradeço também pela amizade que construímos, não só no meio acadêmico, mas também fora dele.

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

Aos meus amigos queridos de UFPI, especialmente Luiz Maira, João Lucas, Ana Regia, Antonia Simone, José Renan, Alana Ferrão, Gilberto Filho, Junior Carvalho, Lilian Paulo, que ao longo do tempo se tornaram pessoas essenciais na minha vida, pois são amizades que levarei para sempre dentro do meu coração.

Aos meus companheiros de laboratório, e à família LAOH (Liga Acadêmica de Oncologia e Histologia) por todos os momentos vivenciados, certamente contribuíram na minha vida acadêmica, pessoal e futuramente profissional.

Meu agradecimento aos meus irmãos na amizade que diretamente ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Todas as coisas foram feitas por intermédio dele; sem ele, nada do que existe teria sido feito.”

João 1:3

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 – Plantação de <i>Eucalyptus grandis</i>	12
FIGURA 2 – Folha do <i>E.grandis</i>	13
FIGURA 3 – Cistos (A) e o processo de crescimento e diferenciação (B) do microcrustáceo <i>A. salina</i>	15
FIGURA 4 – Método esquemático utilizado para análise das células meristemáticas do <i>Allium cepa</i>	16
FIGURA 5 – leveduras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em cultura bem como sua visualização em microscópio de varredura.....	18

ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURA 1 – Atividade tóxica do <i>Eucalyptus grandis</i> em diferentes concentrações por meio do Bioensaio de Letalidade em <i>Artemia salina</i> (BSLB) utilizando o tempo de exposição de 48hs.....	31
FIGURA 2 – Avaliação do efeito tóxico (A), citotóxico (B) e mutagênico (C) do extrato etanólico de <i>Eucalyptus grandis</i> em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	32
FIGURA 3 – Perfil fotomicrográfico mostrando a diminuição de células vegetais em divisão celular quando tratadas com o extrato etanólico de <i>Eucalyptus grandes</i> em diferentes concentrações.....	33

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

TABELA 1 – As linhagens de levedura *S. cerevisiae* que foram utilizadas no estudo29

TABELA 2 – Avaliação oxidante do etanólico de *E.grandis* em utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*..... 34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Plantas medicinais.....	11
2.1.1 Espécie <i>Eucalyptus grandis</i>.....	12
2.2 A Importância dos testes toxicológicos.....	14
2.2.1 Testes com <i>Artemia salina</i>	14
2.2.2 Testes realizados com <i>Allium cepa</i>.....	15
2.2.3 Teste toxicológico com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
REFERÊNCIAS.....	19
1 ARTIGO CIENTÍFICO	25
Resumo.....	25
1.1 Introdução	25
1.2 Metodologia	27
1.2.1 Obtenção do extrato etanólico do <i>Eucalyptus grandis</i>	27
1.2.2 Obtenção das células meristemáticas das raízes de <i>Allium cepa</i>	27
1.2.2.1 Preparo, leitura das lâminas e análise citogenética para o teste de <i>A.Cepa</i>	28
1.2.3 Bioensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i>	28
1.2.4 Linhagens de leveduras utilizadas.....	29
1.2.4.1 Teste oxidante/antioxidante com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
1.3 Resultados.....	30
1.3.1 Bioensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i>	30
1.3.2 Teste com <i>Allium cepa</i>	31
1.3.3 Testes oxidante/antioxidante com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
1.4 Discussão.....	34
1.5 Conclusão.....	36
Referências.....	37
ANEXO.....	40

1 INTRODUÇÃO GERAL

Há muito tempo, as plantas têm sido utilizadas como agentes medicinais, no qual diversos estudos vêm sendo realizados ao longo dos anos, com o propósito de obter mais informações sobre as plantas e a descoberta de novas drogas, através da extração dos seus componentes químicos (BALUNAS; KINGHORN, 2005). As plantas medicinais são de grande importância mundialmente, delas são retirados compostos químicos bioativos, a fim de serem utilizados como recursos terapêuticos em seres humanos e animais para tratamento, prevenção e cura de doenças. Contudo, muitas plantas são utilizadas empiricamente, sem muita abrangência científica quanto à eficácia e a segurança, pois existe uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e as poucas pesquisas. Desta forma, considera-se este um fator de grande incentivo ao estudo com plantas, visando sua utilização como recursos terapêuticos, pois o reino vegetal representa um vasto celeiro de compostos farmacológicos a serem descobertos (FOGLIO et al., 2006).

No Brasil, encontra-se a maior diversidade de vegetais do mundo, onde análises etnobotânicas, etnofarmacológicas, farmacognósticas e fitoquímicas podem revelar a presença de constituintes do metabolismo secundário das plantas que podem contribuir para a identificação de marcadores químicos, permitindo que pesquisadores possam isolar compostos biologicamente ativos a partir de diferentes espécies de vegetais (BESSA et al., 2013).

O bioma Cerrado é exclusivamente do Brasil, com clima predominante de domínio sazonal, inverno seco, ocupando uma porção central do território brasileiro, estendendo-se até o litoral nordeste do Maranhão e Norte do estado do Paraná (SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO, 2010). O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, possuindo uma das maiores biodiversidades do mundo (KLINK; MACHADO, 2005). O *Eucalyptus grandis* é uma planta nativa da Austrália conhecida popularmente como eucalipto. É encontrado em grande abundância nesse bioma, ocorrendo nos estados do Amapá, Bahia, Espírito Santo, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Pará, Minas Gerais, Rio Grande de Sul, Santa Catarina e São Paulo (VITAL, 2007).

O eucalipto é a nomenclatura vulgar de várias espécies do gênero *Eucalyptus*, pertencentes à família Mirtaceas, que compreende outros 130 gêneros, mais de 700 espécies catalogadas, sendo o *Eucalyptus grandis* uma das espécies mais cultivadas e com grande

potencial econômico, ecológico, medicinal e farmacológico (SANTOS et al., 2013). De acordo com Estanislau et al., (2001) o eucalipto já vem sendo explorada há muitos anos, no qual o caule é utilizado para a extração de celulose, e das folhas são retirados óleos essenciais de diferentes composições químicas.

Segundo Meneguetti et al., (2014) existe uma imensa utilização das plantas medicinais e estudos que comprovam a atividade terapêutica e farmacológica, porém há a necessidade de mais estudos, pois as partes botânicas citadas acima possui pouca informação em relação aos seus efeitos citotóxicos e mutagênicos a nível celular. É de grande importância ter o conhecimento dos extratos etanólicos das plantas medicinais, proporcionando estudos mais detalhados sob a ação dos compostos químicos presentes, visando o uso mais seguro pela população (BAGATINI et al., 2007; POLLETO et al., 2012).

Diante do conhecimento sobre a importância das plantas medicinais para o uso populacional e pela ausência de trabalhos relacionados, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial tóxico, citotóxico, mutagênico e oxidante do extrato etanólico da folha do *Eucalyptus grandis*, em diferentes tipos de células eucarióticas.

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, 2006).

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 testes pré-clínicos com animais e muitas destas substâncias tem 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).

Entretanto, 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%), úlcera estomacal (36%), nercosismo (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".

2.2 Espécie *Eucalyptus grandis*

O eucalipto é a nomenclatura vulgar de várias espécies do gênero *Eucalyptus*, pertencentes à família Mirtaceae, que compreende outros 130 gêneros, com mais de 700 espécies catalogadas, tendo o *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus urophila* as espécies mais cultivadas do Brasil. O *Eucalyptus grandis* é uma planta nativa da costa leste da Austrália com distribuição em países tropicais e subtropicais medindo aproximadamente de 44 aa 55 metros de altura (SILVA, 2014). (Figura 1.0).

Figura 1: Plantação de *Eucalyptus grandis*.



Possui uma ampla distribuição em todo o Brasil e é encontrado em grande abundância principalmente no Cerrado, ocorrendo nos estados do Amapá, Bahia, Espírito Santo, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Pará, Minas Gerais, Rio Grande de Sul, Santa Catarina e São Paulo (VITAL, 2007).

O eucalipto tem tido um papel importante em várias áreas tais como ambiental, econômica, medicinal e farmacológica (VITAL, 2007). De seus óleos essenciais são identificados alguns constituintes químicos, como por exemplo, a presença de hidrocarbonetos terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e etc. São considerados óleos essenciais para uso medicinal aqueles que apresentam teores de 1,8-cineol acima de 70% e baixos teores de felandreno (BRUM, 2010). O óleo essencial extraído das folhas de *E. grandis* serve como anti-séptico e antioxidante e a decoção das suas folhas é utilizada popularmente no tratamento de gripe, constipações, dores de garganta e tuberculose (SILVA, 2014). (Figura 2).

Figura 2: Folha do *E. grandis*



Fonte: <http://www.projetotume.com/grandis>

Algumas espécies de plantas possuem em sua composição substâncias que podem causar efeitos alelopáticos em alguns organismos. Na literatura estudos sobre o *Eucalyptus grandis* foram realizados em relação a efeitos alelopáticos que a planta tem sobre alguns organismos. Segundo Silva et al., (2015) o extrato aquoso obtido do *E. grandis* causou inibição na germinação da sementes de *Ipomoea purpurea* L. Souza e Cardoso (2013) em seus

estudos também chegaram a conclusão de que o *E. grandis* também causa efeito inibitório no crescimento em alface (*Lactuca sativa* L.).

No entanto ainda existe uma ausência muito grande de trabalhos relacionados ao que se refere o *E. grandis*. Entretanto, o gênero *Eucalyptus* abrange uma grande quantidade de diferentes espécies com vários estudos publicados. O *E. citriodora* por exemplo, tem sido bastante observada por possuir uma elevada gama de atividades biológicas, incluído antimicrobiana, repelente de insetos, fungicidas e pesticida fumegante (BATISH et al., 2008). Segundo Silva (2003) o óleo extraído do eucalipto possui atividade anti-inflamatória e tratamento para gripe, resfriado e congestão nasal. A casca e a folha são utilizadas popularmente para melhorar a resistência física, tratamento de inflamação da bexiga, diarreia e alguns ferimentos (TAKASAKI et al., 2000).

2.3 A IMPORTÂNCIA DOS TESTES TOXICOGENÉTICOS

A fim de descobrir os efeitos adversos de infusões medicinais, é importante à 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 (CUNNIHGAM, 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 o crescimento na área de interesses em estudar e evidenciar a importância dos ensaios toxicológicos durante as pesquisas e desenvolvimento de novos fármacos. (DORATO E BUCKLEY, 2006).

2.3.1 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 3) são de baixo custo e facilmente encontradas no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco, possuindo uma boa correlação com testes de toxicidade aguda oral *in vivo* (PARRA et al., 2001), quanto em 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 3: Cistos (A) e o processo de crescimento e diferenciação (B) do microcrustáceo *A. salina*



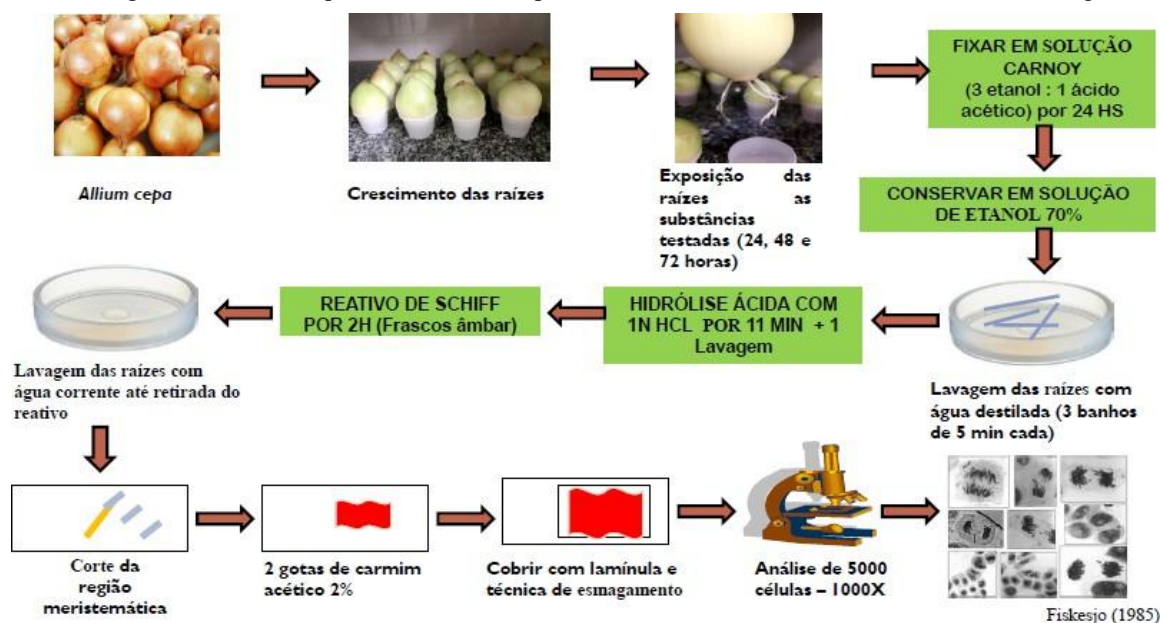
Fonte: <<https://br.pinterest.com/pin/551479916862349905>>.

2.3.2 Bioensaio *Allium cepa*

Sistemas testes vegetais são de grande importância na avaliação de riscos de genotoxicidade sendo enfatizado que apesar das diferenças entre os metabolismos de plantas e animais, há também similaridades, e que a ativação de pró-mutagênicos em plantas possui alta relevância, pois seres humanos consomem plantas tratadas com agentes químicos (FISKEJO, 1994). Os estudos citogenéticos de espécies vegetais informam a respeito de possíveis alterações cromossômicas nas plantas devido à presença de agentes mutagênicos na sua composição ou decorrentes do seu metabolismo. O estudo dos mutagênicos em núcleos eucarióticos vem sendo observado através de métodos citológicos. A mutação pode resultar da ação de compostos químicos, ambientais e radioativos e da estabilidade intrínseca dos ácidos nucleicos (BAGATINI et al., 2007).

Existe uma variedade de plantas que são utilizadas para ensaios de toxicidade, no entanto, uma das mais conhecidas e bem estabelecidas plantas utilizadas em bioensaios citogenéticos é o *Allium cepa*. A cebola pode germinar facilmente e as raízes coletadas são simples de armazenar. Os fatores macroscópicos e microscópicos podem ser avaliados nessa espécie sem muito esforço (LIMAN, 2013). Finalmente, é importante observar que existe uma relação entre os resultados obtidos a partir de bioensaios de plantas e outros sistemas de ensaio (FIRBAS; AMON, 2013; MAITI et al., 2013), o que aumenta a sua utilidade (Figura 4).

Figura 4: Método esquemático utilizado para análise das células meristemáticas do *Allium cepa*.



Fonte: Arquivo pessoal

Plantas superiores, como *Allium cepa*, têm sido amplamente utilizadas em testes de genotoxicidade para detectar e avaliar a influência de substâncias em um organismo (ARYA; MUKHERJEE, 2014). O Programa Internacional de Segurança Química (IPCS – *International Programme on Chemical Safety*) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP – *United Nations Environment Programme*) certificaram o bioensaio de *Allium cepa* como um método padrão para o monitoramento genotóxico de poluentes ambientais (RAJESHWARI et al., 2016).

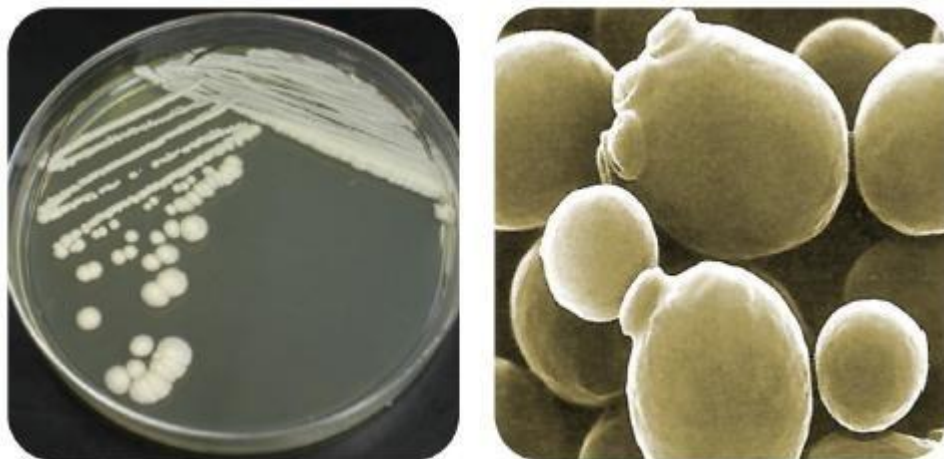
Bioensaios com *A. cepa* se mostram bastante econômicos, além de bem sensíveis, e os resultados apresentam uma boa correlação com sistemas de testes de mamíferos (HEMACHANDRA; PATHIRATNE, 2016). As razões para escolher *A. cepa* como um modelo *in vivo* para avaliar os efeitos tóxicos é devido suas raízes poderem crescer em contato direto com qualquer substância de interesse, possuir um número estável de cromossomos e cariótipos, mostrar uma fase mitótica clara, a ocorrência de danos cromossômicos espontâneos ser rara, mostrar uma resposta rápida aos materiais genotóxicos, apresentar diversidade de morfologia cromossômica e ser considerado como um teste de baixo custo (RAJESHWARI et al., 2016; TEDESCO E LAUGHINGHOUSE IV, 2012).

Na investigação de aberrações cromossômicas, cebolas comuns da espécie *A. cepa* constituem sistemas testes bastante adequados para estimar os efeitos nocivos de químicos, em função de suas excelentes condições cromossômicas (ABU; EZEUGWU, 2012). A influência de substâncias genotóxicas pode ser determinada pela análise do tipo e frequências de células com metáfase, anáfase e telófase aberrantes, e também pela determinação de micronúcleos nas células em interfase (EL-SHAHABY et al., 2003).

2.3.3 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Por serem organismos eucariontes unicelulares simples, de fácil manuseio, fácil cultivo e rápida multiplicação celular, as leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* são padronizadas como modelos de pesquisa para análise de propriedades tóxicas e/ou oxidantes em várias substâncias como medicamentos, extratos e compostos químicos diversos (Figura 5) (HOSTETTER et al., 2012).

Figura 5: leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura bem como sua visualização em microscópio de varredura.



Fonte: ZIRPEL et al., 2015.

A *Saccharomyces cerevisiae* tem sido amplamente utilizada como modelo eucariótico no estudo da elucidação de mecanismos metabólicos, por conta da semelhança da sua maquinaria celular e dos processos metabólicos desempenhados pela levedura, e da fácil manipulação genética (KARATHIA et al., 2011; GONZALEZ-PEREZ et al., 2005; TONGUL; TARHAN, 2016). Além disso, existe uma grande semelhança entre o sistema de defesas antioxidantes da levedura e o sistema de eucariotos superiores (GIANNATTASIO et al., 2013). Por este motivo, o modelo biológico de *S. cerevisiae* tem sido amplamente utilizado em estudos do mecanismo de resposta celular a condições de estresse, como também do perfil oxidante/oxidativo de diversos compostos naturais e sintéticos (AZAD et al., 2013; HÖFERL et al., 2014; ODRIOZOLA-SERRANO et al., 2016).

No teste de *S. cerevisiae* são utilizadas linhagens proficientes ou mutadas em suas defesas antioxidantes, comumente utilizadas na avaliação da atividade de compostos, naturais ou sintéticos, frente aos mecanismos de defesa antioxidante destes organismos. Tendo em vista que a existência de enzimas antioxidantes são funcionalmente semelhantes à de humanos, a extrapolação de resultados comparativos quanto a segurança na liberação do uso de fármacos ou alimentos e a consolidação de protocolos terapêuticos torna-se mais eficaz (OLIVEIRA et al., 2014).

REFERÊNCIAS

- ABU, N.E.; MBA, K. Mutagenicity testing of pharmaceutical effluents on *Allium cepa* root tip meristems, **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, Nsukka, Nigeria, 2012, n.1, p.44-51, dez. 2012.
- ARYA, S. K.; MUKHERJEE, A. Sensitivity of *Allium cepa* and *Vicia faba* towards cadmium toxicity. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 14, n. 2, p. 447-458, 2014.
- AZAD, G. K.; SINGH, V. TOMAR, R. S. Assessment of the Biological Pathways Targeted by Isocyanate Using N-Succinimidyl N-Methylcarbamate in Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, 2014, n. 3, mar. 2014.
- BAGATINI, M. D. et al. Uso do sistema teste *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17(3): 444-447, 2007.
- BALUNAS, M.J., KINGHORN, A.D. **Drug discovery from medicinal plants**. *Life sci* 78, 431-441, 2005.
- BATISH, D. R. ***Eucalyptus essential oil as a natural pesticide***. *Forest Ecology and Management*, 256, 2166-2174, 2008.
- BESSA, N.G.F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas**, v.15, n.4, supl. I, p.692-707, 2013.
- BRUM, L. F. W. **Obtenção e Avaliação de Extratos de Folhas de Eucalipto (*Eucalyptus dives*) Como Potencial Antioxidantes em Alimentos**. Florianópolis, 2010.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.
- CARVALLO, 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**, 2002, n. 1, p. 17, set. 2002.
- 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.
- constituents**. *Planta Médica*, v.45, p.31-34, 1982.
- CUNNINGHAM, S. A. Depressed pollination in habitat fragments causes low fruit set. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1448, p. 1149-1152, 2000.

DORATO, M. A; BUCKLEY, L. A (2006). **Toxicology in the drug discovery and development process current protocols in pharmacology**. 32. 10, 3.1 – 10. 3. 35.

EL-SHAHABY, O.; MIGID, H. M. A.; SOLIMAN, M.; MASHALY, I. Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium* chromosome aberration assay. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. 2003, n. 1, p. 23-28, 2003.

ESTANISLAU, A. A. et al. Composição química e atividade antibacteriana de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivados em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2001.

FERRÃO, A. S. Citotoxicidade E Mutagenicidade do Extrato Hidroalcoólico de *Poincianella Pyramidalis* em Sistema Teste Animal e Vegetal

FERRAZ, F. S. J; ALBUQUERQUE, P. V, MEUNIER, J.M.I. Valor de uso e estrutura da vegetação lenhosa as margens do riacho do navi, floresta, pe. brasil. **Acta bot. bras.** 20(1); 125-134, 2006.

FIRBAS, P.; AMON, T. *Allium* chromosome aberration test for evaluation effect of cleaning municipal water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. **J Bioremed Biodegrad**, 2013, n. 4, p. 189-193, mai. 2013.

FISKESJÖ, GEIRID. *Allium* test II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology**, 1994, n. 3, p. 235-241, 1994.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar**. Multiciência, [S.l.], 2006.

GIANNATTASIO, S.; GUARAGNELLA, N.; ŽDRALEVICAND, M.; MARRA, E. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. **Frontiers in microbiology**, Bari, Italy, 2013, n. 33, p. 20 – 40, fev. 2013.

GONZÁLEZ, M. J.; MIRANDA-MASSARI, J. R.; MORA, E. M.; GUZMÁN, A.; RIORDAN, N. H.; RIORDAN, H. D.; CASCIARI, J. J.; JACKSON, J. A.; ROMÁN-FRANCO, A. Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. **Integrative cancer therapies**, 2005, n. 1, p. 32-44, mar. 2005.

HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, A. Combination of physico-chemical analysis, *Allium cepa* test system and *Oreochromis niloticus* erythrocyte based comet assay/nuclear abnormalities tests for cyto-genotoxicity assessments of treated effluents discharged from textile industries. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 131, p. 54-64, 2016.

HÖFERL, M.; STOILOVA, I.; SCHMIDT, E.; WANNER, J.; JIROVETZ, L.; TRIFONOVA, D. et al. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Juniper Berry (*Juniperus communis* L.) Essential Oil. Action of the Essential Oil on the Antioxidant Protection of *Saccharomyces cerevisiae* Model Organism. **Antioxidants**. 2014, n. 1, p. 81-98, fev. 2014.

HOSTETTER, A. A.; OSBORN, M. F.; DE ROSE, V. J. Characterization of RNA-Pt Adducts Formed from Cisplatin Treatment of *Saccharomyces cerevisiae*. **ACS Chem Biol**, 2012, n. 1, p. 218–225, jan. 2012.

KARATHIA, H.; VILAPRINYO, E.; SORRIBAS, A.; ALVES, R. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. **PLoS ONE**, 2011, n. 2, p. 18 – 43, fev. 2011.

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**, 2006, n. 1, p. 158-163, jun. 2006.

LIMAN, R. Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by Allium and Comet assay. **Chemosphere**, 2013, n. 2, p. 269-273, set. 2013.

MENEGUETTI, D. U. O, et al. Análise citotóxica e mutagênica do extrato aquoso de *Maytenus guyanensis klotzsch* ex Reissek (celastraceae) chichuá (xixuá) amazônico. **Ciência e Natura**, 36(3): 301-309, 2014.

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)**, Salvador, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products As Sources Of New Drugs Over The Period 1981– 2002. **Journal of natural products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NEWMAN, M. E., MOORE, C., & WATTS, D. J. Mean-field solution of the small-world network model. **Physical Review Letters**, v. 84, n. 14, p. 3201, 2000.

ODRIOZOLA-SERRANO, I.; PUIGPINÓS, J.; OMS OLIU, G.; HERRERO, E.; MARTÍN-BELLOSO, O. Antioxidant activity of thermal or non-thermally treated strawberry and mango juices by *Saccharomyces cerevisiae* growth based assays. **Food Science and Technology**. 2016, n. 1, p. 55–61, 2016.

OLIVEIRA, G. L. S.; OLIVEIRA, F.R.A.M.; DE ALENCAR, M.V.O.B.; GOMES-JÚNIOR, A.L.; SOUZA, A.A.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C.; FREITAS, R.M. Evaluation of antioxidante capacity of the aqueous extract of *Cynarascolumus* L. (Asteraceae) in vitro and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 2014, n. 5, p. 136-147, 2014.

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**, 2001, n. 5, p. 395-400, set. 2001.

POLETTI, P. D. O., DINIZ, A.P., BERNARDON, B., ZAN, R. A., RAMOS, L. J. & MENEGUETTI, D. U. D. O. 2012. Análise Da Mutagenicidade Do Extrato Hidrossolúvel De

Derris Rariflora (Mart. Ex Benth. Jf Macbr: Fabaceae), Timbó Amazônico, Através Do Teste Micronúcleo Em *Allium Cepa*/Analysis Of Mutagenicity Hydrossoluble Extract *Derris Rariflora*. **Revista Pesquisa & Criação**, 10(1): 163-176.

RAJESHWARI, A.; ROY, B.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Cytogenetic evaluation of gold nanorods using *Allium cepa* test. **Plant Physiology et Biochemistry**, 2016, n. 109, p. 209-219, 2016.

RUIZ, A. L. T. G et al., 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.

SANTOS, S. A. O.; VILELA, C.; FREIRE, C. S.R.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J.D. Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled To Mass Spectromety Applied To The Identification Of Valuable Phenolic Compounds From Eucalyptus Wood. **Journal Of Chromatography B**. p. 65-74 v. 938, 2013.

SILVA et al., **Efeito alelopático do extrato de folhas de (*Eucalyptus grandis*) sobre a germinação de sementes de (*Ipomoea purpurea* L.)**. XV Encontro de Agroecologia "Formação Sociocultural da Transformação Política e Social da Vida no Campo. Bananeira-PB, 2015.

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.

SILVA, T.M. **Estudos Fitoquímicos e dos Efeitos da Radiação Gama em *Echinodorus macrophyllus* (Chapéu-de-couro) e em Óleos Essenciais de *Inga laurina* e *Eucalyptus grandis* (Eucalipto)**. Belo Horizonte, 2014.

SINGH; RAGHAV., e tal. **Biodiversidade, aspectos biológicos, geograficos, legais e eticos**. in: **simões, c. m. o. et al. farmacognosia da planta ao medicamento**. 2. Ed. Florianópolis /Porto Alegre: UFSC/ UFRS, p. 13-26, 2012.

SOUZA, V.M., CARDOSO, S.B. Efeito Alelopático do Extrato de Folhas de *Eucalyptus grandis* sobre a Germinação de *Lactuca sativa* L. (alface) E *Phaseolus vulgaris* l.(feijão). **Revista Eletrônica de Educação e Ciência (REEC)** – ISSN 2237-3462 - Volume 03 – Número 02 – 2013.

TAKASAKI, M. Cancer chemopreventive acivity of euglobal-G1 from leaves of *Eucalyptus grandis*. **Cancer Lett.**, 155, 61–65, 2000.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. **Intech Open Access Publisher**, 2012, n. 1, p. 23 – 52, 2012.

TONGUL, B.; L. TARHAN. Oxidant and antioxidant status in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to antifungal ketoconazole. **Process Biochemistry**, 2016, n. 1, p. 21 – 42, 2016 .

VEIGA, J.; CELSO, L.; DA SILVA, I. R. V. Sustentabilidade E Fraternidade: Algumas Reflexões A Partir Da Proposta De Um Direito Ambiental Planetário. **Revista Eletrônica Direito e Política**, v. 6, n. 2, p. 620-640, 2011.

VITAL, M. H. F. Impacto Ambiental de Florestas de Eucalipto. **Revista do BNDS, Rio de Janeiro**, v. 14, n. 28, p. 235-276, dez. 2007.

WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R. C. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 101-107, 2012.

ZIRPEL, B. STEHLE, F. KAYSER, O. Production of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid from cannabigerolic acid by whole cells of *Pichia (Komagataella) pastoris* expressing Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa*. **Biotechnology Letters**. 2015, n. 1, p. 1869–1875. 2015.

Este trabalho foi elaborado de acordo com as normas da revista Journal of Medicinal Plants Research. *Fator de impacto: 0.83. Link de submissão:*
<http://www.academicjournals.org/journal/JMPR>

1 ARTIGO CIENTÍFICO

Avaliação tóxica, citotóxica, mutagênica e oxidante do extrato etanólico de *Eucalyptus grandis*

Flávio Augusto Vieira Costa e Silva¹; Antônia Simone Soares da 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

O *Eucalyptus grandis* é uma planta nativa do norte da Austrália, porém com grande distribuição no Brasil, principalmente no bioma Cerrado. Encontrada em países tropicais e subtropicais, o *E. grandis* é conhecido pelo seu grande valor econômico na produção de papel e carvão, além de ser bastante utilizada na medicina tradicional no tratamento de gripe, constipações, dores de garganta e tuberculose. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos tóxico, citotóxico, mutagênico e oxidante do extrato etanólico da folha do *E. grandis* em ensaio *in vitro* utilizando *Allium cepa*, *Artemia salina* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os mesmos foram avaliados em concentrações e tempos de exposição diferentes para cada teste. Os resultados mostraram que o extrato etanólico extraído da folha do *Eucalyptus grandis* mostrou-se tóxico e citotóxico em células de *Allium cepa* e tóxico em *Artemia salina*. Já no ensaio realizado com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) teve-se como resultado obtido efeito não oxidante quando exposto em concentrações diferentes do extrato. Conclui-se, portanto, que as concentrações utilizadas do extrato apresentaram efeitos toxicogênicos importantes na maioria dos testes, e com isso, podendo ser estudado para uma possível atividade antitumoral.

Palavras chaves: Plantas medicinais; *Eucalyptus grandis*; Genotoxicidade; *Allium Cepa*; *Artemia salina*; *Saccharomyces cerevisiae*

1.1 Introdução

No tratamento de várias enfermidades uma série de espécies de plantas são conhecidas e utilizadas mundialmente pela população. Essas ervas medicinais produzem uma gama de substâncias químicas durante o seu processo metabólico. Algumas destas substâncias são conhecidas como princípios ativos e são capazes de provocar algum tipo de resposta biológica quando introduzidos, por qualquer via, no organismo animal, inclusive no homem (Bolosco, 2008). No entanto, a maioria desses compostos químicos não foram suficientemente

estudadas, no que se refere ao seu potencial tóxico, citotóxico e mutagênico e também quanto a sua segurança, qualidade e eficácia (Calixto, 2005; Soares et al., 2006; Bagatini, et al., 2007).

O processo de levantamento e identificação de espécies medicinais nativas do cerrado brasileiro é importante mediante o potencial econômico e medicinal dessas plantas provenientes deste bioma (Silva et al., 2010; Bessa et al., 2013). Dentre as espécies mais conhecidas e utilizadas na medicina popular, encontra-se o *Eucalyptus grandis* que é uma planta nativa da Austrália conhecida popularmente como Eucalipto. O *E. grandis*, de acordo com Vital (2007) possui um grande potencial econômico, ecológico, medicinal e farmacológico. Possui atividade biológica como anti-séptico e antioxidante utilizada popularmente no tratamento de gripe, constipações, dores de garganta e tuberculose (Silva, 2014). E a composição química de suas folhas é formada por triterpenos pentacíclicos, ácido oleanólico, ácido ursólico, ácido betulínico e ácido maslínico (Babalola et al., 2013; Silva, 2014).

Apesar da ampla utilização na medicina popular e de já existirem estudos científicos comprovando atividade terapêutica, as partes botânicas utilizadas desta planta possuem pouca informação sobre sua toxicidade em nível celular. De acordo com Polleto et al. (2012) e Bagatini et al. (2007), conhecimentos sobre a ação em nível celular de extratos de plantas medicinais possui grande importância para aumentar a segurança do uso pela população e estimular estudos, mais detalhados, sobre a ação dos compostos químicos presentes nestes organismos. Portanto, os extratos provenientes de plantas devem ser estudados em diversos sistemas-testes, em diferentes concentrações e tempos de exposição, para a obtenção de uma completa avaliação da toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e testes oxidantes (Przedpelska-Wasowicz; Wierzbika, 2010).

As plantas medicinais por possuírem uma série de compostos bioativos, necessitam de mais estudos, e segundo as metodologias já existentes na literatura é possível medir os efeitos tóxicos, mutagênicos e oxidantes em vários tipos de organismos (Speit; Rothfuff, 2012; Hussain et al., 2014). Dentre os bioensaios utilizados para avaliação toxicogenética estão o teste de *Allium cepa*, Bioensaio de letalidade de *Artemia salina* e teste oxidante/antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae*.

O bioensaio realizado com *Allium cepa*, além de ser um teste rápido, de baixo custo e de fácil manuseio, é utilizado para avaliar danos celulares, como por exemplo,

alterações cromossômicas e inibição do crescimento de células no ciclo mitótico (Leme; Marin-Morales, 2008; El-Shahaby et al., 2003). Já o ensaio utilizando o microcústáceo *A. salina* é um método simples na pesquisa toxicológica (Meyer Et al., 1982), tendo como propósito encontrar a concentração letal (CL50) de extratos e compostos químicos bem como a avaliação da toxicidade dos mesmos.. Por fim, ensaio *in vitro* em *Saccharomyces cerevisiae* tem como intuito avaliar o mecanismo de resposta celular a condições de estresse, e também do perfil oxidativo através da análise do alo de inibição em diferentes linhagens de *S. cerevisiae* (Azad Et Al., 2013; Höferl Et Al., 2014; Odriozola-Serrano et al., 2016).

Diante disso, visto que se trata de uma planta com bastante potencial terapêutico e da necessidade de mais estudos sobre os efeitos adversos do extrato etanólico dessa planta, o estudo visou avaliar o potencial tóxico, citotóxico, mutagênico e oxidativo do extrato etanólico das folhas de *Eucalyptus grandis*, utilizando os seguintes sistemas testes toxicogenéticos *Allium cepa*, *Artemia salina* e *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2. Metodologia

1.2.1 Obtenção do extrato etanólico de *Eucalyptus grandis*

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 a temperatura ambiente em recipiente de plástico hermeticamente fechado e protegido da luz. O extrato etanólico da folha 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 foi 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 Ensaio toxicogenético utilizando sistema teste vegetal

1.2.2 Obtenção de células meristemáticas de *A. cepa*.

Para o teste de ponta de raiz de *Allium cepa*, foram utilizados bulbos de tamanho pequeno, uniforme, de mesma origem, não germinadas e saudáveis. Os bulbos de cebola foram colocados em frascos com água, a temperatura ambiente, para enraizar. Quando as raízes atingiram 0,5 cm foram colocadas nas soluções de tratamento. Para verificar a atividade

citotóxica e mutagênica dos compostos estudados, foram realizados cinco tratamentos com cinco repetições cada: T1 – controle negativo-CN, onde as raízes dos bulbos foram tratadas com água destilada; T2 – 1 mg/ml do extrato etanólico de *Eucalyptus grandis*; T3 - 0,5 mg/ml do extrato etanólico de; T4 - 0,1 mg/ml do extrato etanólico de *Eucalyptus grandis* e T5 – Controle positivo (CP) tratados com sulfato de cobre (0,0006 mg/ml). Os bulbos ficaram submersos nos tratamentos durante os tempos de exposição de 24, 48 e 72 horas. Foram observados em cada um desses tempos de exposição (TE) o crescimento de duas raízes selecionadas em cada um dos bulbos, através da medição com o auxílio de uma régua como medida de toxicidade.

1.2.2.1 Preparo leitura das lâminas e análise citogenética para o teste *A. cepa*

As lâminas, em média 03 por bulbo, foram preparadas seguindo o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002), e analisadas em microscópio óptico em objetiva de 40x. Para cada bulbo, analisou-se 1.000 células, totalizando 5.000 células para cada tratamento. Foram observadas células em intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. Calculou-se o número de células em intérfase e em divisão de cada controle e tempo de exposição, e em seguida foi determinado o índice de divisão celular ou índice mitótico (IM) para avaliação do efeito citotóxico. Avaliou-se também a ação mutagênica dos extratos por meio do número de células com alterações cromossômicas (AC): micronúcleos, metáfases colchícinicas, pontes nucleoplasmáticas, quebras, perdas e atrasos cromossômicos.

1.2.3 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 *Eucalyptus grandis* 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 48 horas de exposição à substância testada

A definição da toxicidade do extrato foi baseado nas escalas de toxicidade de McLaughlin et al. (1993), de acordo com a escala, os valores de concentração letal (CL)₅₀ > 1000 µg/ml considerou-se não tóxico; entre 500 a 1000 µg/ml considerou-se baixa toxicidade; moderada toxicidade para CL₅₀ entre 100 a 500 µg/ml e, finalmente, muito tóxico quando a CL₅₀ foi inferior 100 µg/ml.

1.2.4 Linhagens de leveduras utilizadas

Seis linhagens de leveduras foram utilizadas para avaliar a atividade oxidante/antioxidante do *E.grandis*. A linhagem selvagem utilizada não apresentava nenhuma mutação nas enzimas de defesa contra substâncias oxidativas, enquanto que as outras cinco linhagens selecionadas apresentavam defeitos em pelo menos uma enzima antioxidativa. A linhagem EG118 é mutada na enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD – produto do gene SOD1), a EG110 é mutada na SOD mitocondrial (MnSOD – produto do gene SOD2); a EG133 possui uma mutação em duas enzimas a SOD1 e SOD2; a EG223 mutada em CAT1 e EG mutada em SOD1 e CAT1 (**Tabela 1**)

(Tabela 1). As linhagens de levedura *S. cerevisiae* que foram utilizadas no estudo.

DESCRIÇÃO	GENÓTIPO	ORIGEM
EG103 (SODWT)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+	Edith Gralla, L Angeles
EG118 (Sod1Δ)	sod1:URA3 todos os outros marcadores como EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG110 (Sod2Δ)	sod2:TRP1 todos os outros marcadores como EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG133 (Sod1ΔSod2Δ)	sod1:URA3 sod2:TRP1 duplo mutante/todos outros marcadores como EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG223 (Cat1Δ)	EG103, exceto cat1:TRP1	Edith Gralla, L Angeles
EG (Sod1ΔCat1Δ)	EG103, exceto sod:URA3 e cat1:TRP1	Edith Gralla, L Angeles

Fonte: Adaptado de Oliveira et al., 2014.

1.2.4.1 Testes oxidantes/antioxidantes com *Saccharomyces cerevisiae*

Todos os experimentos foram realizados através do teste do disco central em *S. cerevisiae*, onde as culturas de leveduras foram distribuídas sobre a técnica de tratamento com a adição do extrato etanólico de *E. grandis* em diferentes concentrações. As linhagens foram cultivadas em meio YEL (extrato de levedura 0,5%, 2% de Bacto-peptona, 2% de glucose) a

28°C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária, de acordo com Oliveira e colaboradores (2014). Células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem das placas de Petri em um movimento contínuo, para ambos os lados da placa, contendo em seu centro um disco de papel de filtro estéril, ao qual foi acrescentado, nas distintas placas, 10 µL das diferentes concentrações do extrato etanólico de *E. grandis* foram utilizadas (Figura 02). Para correlação estatística com os resultados dos grupos testes, dois grupos controle foram utilizados sendo 10 µL de uma solução contendo H₂O₂ (10 mMol) utilizado como controle positivo e 10 µL de solução salina (0,9%), como controle negativo. Após 48 h de incubação em estufa a 34 °C, os halos de inibição de crescimento das linhagens, em milímetros, foram mensurados desde a margem do disco de papel-filtro até o início do crescimento celular. Os valores tabelados e submetidos à análise estatística variaram de 0 mm (crescimento completo) a 40 mm (ausência de crescimento), que corresponde à medida do raio da placa de Petri. Todos os testes foram realizados em duplicata.

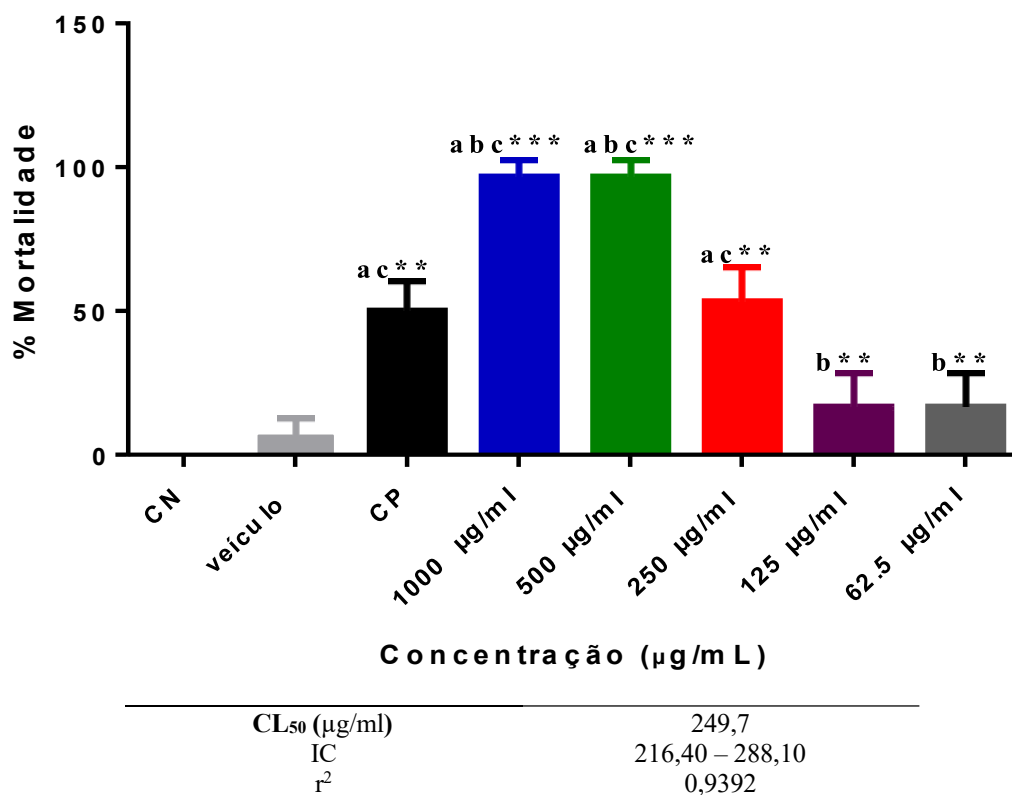
1.3 Resultados

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

O extrato etanólico de *E. grandis* nas concentrações de 250 a 1000 µg/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 CL₅₀ foi determinado: 249,7 µg/ml.

Utilizando a classificação de toxicidade de McLaughlin et al. (1993), o extrato apresentou moderada toxicidade (100 a 500 µg/ml). Este resultado demonstra que concentrações a partir de 249,7 µg/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).

Figura1: Atividade tóxica do *Eucalyptus grandis* em diferentes concentrações por meio do Bioensaio de Letalidade em *Artemia salina* (BSLB) utilizando o tempo de exposição de 48hs.



Valores são as médias e desvio padrão, ^a comparado com o CN, ^b comparado com o CP (KDCr, 16 µM); ** p<0,01; *** p<0,001 Anova oneway, com pós teste de Tukey. ^c comparado com o veículo. Cada concentração foi executada com três tubos (10 náuplios vivos / tubo); CL₅₀: Concentração letal 50% em µg/ml. IC: Intervalo de confiança; r²: Determinação de coeficiente.

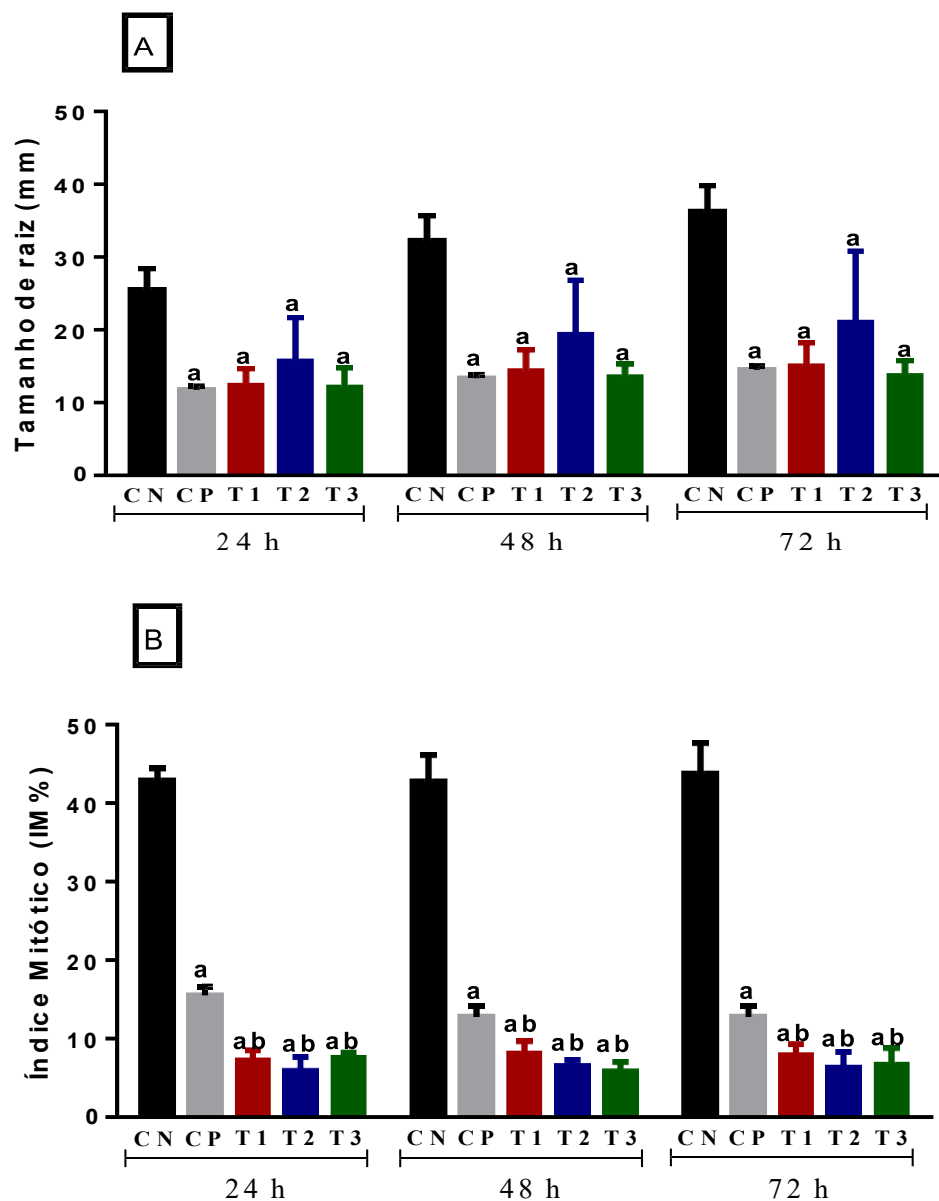
1.3.2 Teste de *Allium cepa*

Os efeitos tóxicos e citotóxicos do extrato etanólico da espécie *Eucalyptus grandis* em um organismo, foram avaliados através da análise dos tamanhos de raízes (TR) e índice mitótico (IM), respectivamente. A avaliação do efeito tóxico representado pela variável do tamanho das raízes nas três concentrações, durante os três tempos de exposição apresentou significativo ($p < 0,001$) efeito tóxico em comparação ao controle negativo. Quanto ao controle positivo, as concentrações testadas foram estatisticamente igual, o que confirma o efeito tóxico das concentrações (Figura 2A). Semelhantemente, a nível celular, as três concentrações apresentaram efeitos citotóxicos, ou seja, antiproliferativo, significantes para os três tempos de exposição em comparação ao CN, porém, obtendo valores estatisticamente diferentes em comparação ao controle positivo (Figura 2B).

No teste de *A. cepa*, resultados de estudos macroscópicos (TR) e microscópicos (IM) são relacionados entre si e geralmente um dá suporte. Portanto, a inibição de crescimento da

raiz pelo extrato etanólico pode ser explicada devido os inferiores IM estatisticamente observados ($p < 0.001$) em comparação ao CN. Em contrapartida, valores baixos de IM, podem dificultar a análise de AC (Figura 03), tendo em vista que a observação de mutações nesse tipo de bioensaio é feito em células em divisão celular. Para o bioensaio com *Allium cepa* não foram observados valores significantes de alterações cromossômicas (Figura 2C).

Figura 2: Avaliação do efeito tóxico (A), citotóxico (B) e mutagênico (C) do extrato etanólico de *Eucalyptus grandis* em células meristemáticas de *Allium cepa*. One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Valores de significância, ^a: comparado ao controle negativo (CN); ^b: comparado ao Controle positivo (CP). $p < 0,05$. T1: 1,0 mg/ml; T2: 0,5 mg/ml; T3: 0,1 mg/ml



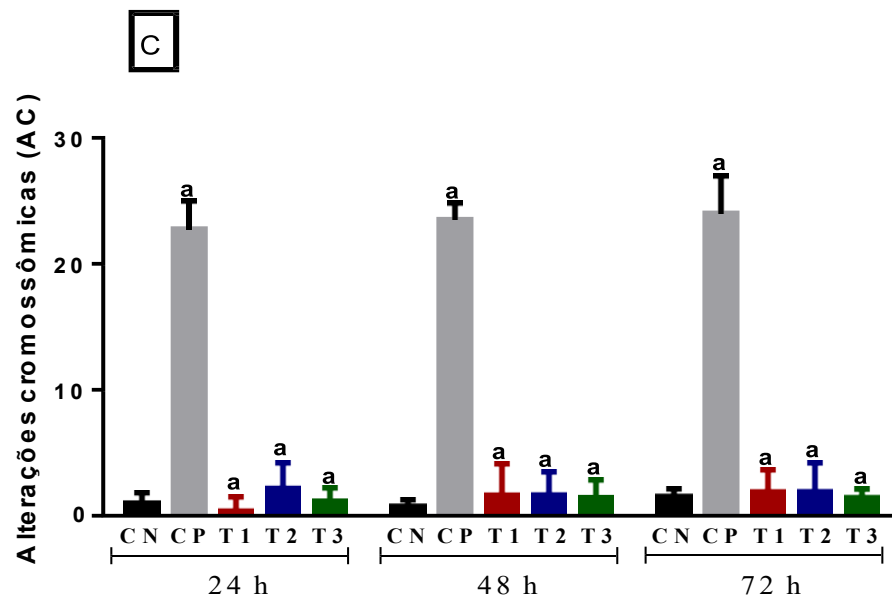
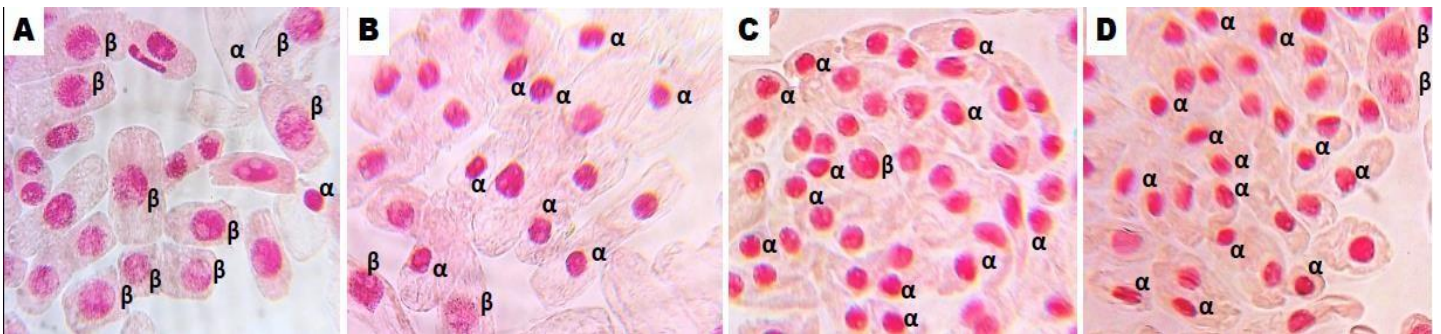


Figura 3: Perfil fotomicrográfico mostrando a diminuição de células vegetais em divisão celular quando tratadas com o extrato etanólico de *Eucalyptus grandis* em diferentes concentrações. Coloração com orceína acética e aumento de 400X ao microscópio óptico. A: Controle negativo; B: 1,0 mg/ml; C: 0,5 mg/ml; D: 0,1 mg/ml. α : células em interfase; β : células em prófase.



1.3.3. Teste oxidante/antioxidante com *Saccharomyces cerevisiae*

O extrato etanólico de *Eucalyptus grandis* nas concentrações analisadas (0,1; 0,5 e 1,0 mg/ml) não apresentou nenhum efeito oxidante nas linhagens de leveduras deficientes em enzimas antioxidantes. Mostrando, assim, que nessas concentrações seu efeito citotóxico observado no presente estudo não é devido ao estresse oxidante pelo aumento de radicais livres (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação oxidante do etanólico de *E.grandis* em diferentes concentrações utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* mutadas em enzimas antioxidantes. Dados obtidos pela inibição de crescimento em placas (0-40 mm).

Linhagens	Tratamentos				
	Salina	H ₂ O ₂	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,1 mg/ml
SODWT	0,75 ± 0,50	14,35 ± 0,25 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Sod1Δ	1,50 ± 0,57	14,73 ± 2,28 ^a	0,00 ± 0,00	0,10 ± 1,10	0,00 ± 0,00
Sod2Δ	1,25 ± 0,50	13,82 ± 0,45 ^a	0,50 ± 0,57	0,00 ± 0,00	0,75 ± 0,89
Sod1Sod2Δ	2,00 ± 0,81	11,35 ± 1,01 ^a	0,00 ± 0,00	0,75 ± 0,50	1,00 ± 0,80
CatΔ	1,25 ± 0,50	15,10 ± 0,70 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Sod1Cat	1,50 ± 0,57	12,37 ± 0,22 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,75 ± 0,90

Os valores correspondem a Média ± Desvio padrão das medidas dos halos de inibição de crescimento das linhagens. ANOVA-*one-way* e pós-teste de *Tukey*. Valores de significância para ^a p<0.001 comparado à salina, ^b p<0.001 comparado à H₂O₂.

1.4 Discussão

Nas últimas décadas, o consumo de produtos naturais tem crescido constantemente, incluindo o consumo de extratos de plantas medicinais. Porém, apesar do grande uso desses medicamentos naturais, ainda tem-se pouca informação quanto aos riscos que podem vir a oferecer à saúde humana. Portanto, é essencial a avaliação dos efeitos tóxicos dessas espécies vegetais para que seja alcançado o processo de produção de um fitoterápico, de maneira segura e com seus efeitos farmacológicos bem definidos (Hussin et al., 2014; Tuttolomondo et al., 2014).

Nesse sentido, a utilização de bioensaios tais como o de letalidade de *Artemia salina* proporciona a avaliação do possível efeito tóxico de diferentes extratos vegetais. A utilização da *A. Salina* em estudos toxicológicos deve-se a simplicidade com que pode ser manuseado. A rapidez e o baixo custo favorecem a utilização em diversos estudos (Luna, et al., 2005; Bednarczuk, 2010). No presente estudo, o extrato etanólico de *E. grandis* apresentou valor de CL50 de 249,7 µg/ml caracterizando-o como moderadamente tóxico. Bussmann et al. (2012) realizou um estudo da toxicidade de 341 espécies de plantas de uso popular no norte do Peru utilizando-se o mesmo bioindicador. Os resultados mostraram que 24% das espécies em extrato de água e 76% das espécies em extrato alcoólico apresentaram níveis elevados de toxicidade para *A.salina*. Embora, na maioria dos casos, extratos múltiplos da mesma espécie

apresentassem valores de toxicidade muito similares, em alguns casos a toxicidade de diferentes extratos da mesma espécie variou de não tóxico a altamente tóxico. O presente estudo bem como o trabalho de Bussmann et al. (2012), demonstra como o teste de *A. salina* é extremamente útil na determinação do potencial tóxico de plantas utilizadas na medicina tradicional.

A toxicidade encontrada para o extrato de *E. grandis* está possivelmente relacionada com a presença de compostos bioativos nas folhas da planta em questão. Estudos químicos de Babalola et al. (2013) e Silva (2014) com *E. grandis* constataram que nas suas folhas são encontrados triterpenos pentacíclicos, ácido oleanólico, ácido ursólico, ácido betulínico e ácido maslínico. Melo et al (2013) constatou que extrato aquoso do *E. grandis* apresentou toxicidade para sementes de *Ipomoea purpurea* L e também em *Lactuca sativa* L (Silva et al., 2015; SOUZA E CARDOSO, 2013). Outras espécies de eucalipto já foram avaliadas quanto ao potencial tóxico e citotóxico em concentrações e organismos diferentes.

Testes com *Allium cepa* é muito utilizado para avaliação do potencial genotóxico, tóxico e citotóxico de extratos de plantas medicinais. Este ensaio demonstrou-se extremamente eficaz na determinação dos efeitos tóxico e citotóxico significantes do extrato do *Eucalyptus grandis*. Além de estudos sobre a toxicidade das espécies do gênero Eucaliptus, tem-se a necessidade da realização de estudos mais aprofundados sobre as atividades farmacológicas e sobre sua composição química, por ser um gênero que contém muitas espécies com fins medicinais.

Um estudo químico e de avaliação biológica do extrato da folha do *E. grandis*, Oliveira (2010) demonstrou que diferentes compostos químicos existentes na composição da planta quando testados isoladamente possuem ações, sejam elas terapêuticas ou não. Na literatura, por exemplo, já existem estudos do ácido oleanólico, no qual o mesmo exerce efeito inibitório sob as lipases, glicerol fosfato-desidrogenases, DNA-ligases e kinases AMP-c dependentes; tem atividade antiolesterolêmica, anti-hepatotóxica, antioxidante, antiinflamatória, antifúngica, antibiótica e, finalmente, apresentam a capacidade de inibir o crescimento de tumores e de patógenos orais (Kelecom et al., 2002).

Outro composto majoritário presente nas folhas de *E. grandis* é o Ácido malísnico. Esse composto é um triterpeno pentacíclico que foi sistematicamente relatado para exercer vários efeitos terapêuticos, como propriedades antitumorais, antidiabéticas, antioxidantes, antiinflamatórias, antiparasitárias e antivirais (Jager et al., 2009; Lozano-Mena et al., 2014). Pavel et al (2016) observou efeitos citotóxicos do composto benzilamida, derivado do ácido maslínico em linhagens de melanomas de camundongos (B164A5) e humanos (A375). O

extrato de *E. grandis* apresentou toxicidade e citotoxicidade em todas as concentrações analisadas, muito provavelmente devido a presente de compostos bioativos como o ácido maslínico.

A citotoxicidade apresentada pelo extrato reflete também na sua capacidade de parada do ciclo celular (figura 03) e morte celular. Isto pode ser explicado pela capacidade que os compostos ácido maslínico, ácido oleanólico e o ácido ursólico tem de ocasionar esse atraso no ciclo celular bem como da capacidade de encaminhar as células para apoptose (Lozano-Mena et al. 2014; Juan et al. 2005).

A utilização de leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* como modelos de pesquisa para análises de propriedades tóxicas e/ou oxidantes em substâncias como medicamentos, compostos químicos, dentre outros, mostra-se eficiente, visto que o desempenho dos processos metabólicos é de fácil compreensão genética, além de apresentar um sistema de defesas antioxidantes semelhante ao sistema de eucariotos superiores (Azad et al., 2013; Höferl et al., 2014; Odriozola-Serrano et al., 2016).

A partir da análise dos resultados obtidos na utilização do extrato do *E. grandis* em bioensaios com a *S. cerevisiae* pode-se observar que o extrato não apresentou propriedades oxidantes. Contudo, estudos de Vechia et al (2009) e Nunes (2013), demonstram que os ácidos oleanólicos e ursólicos encontrados nessa planta apresentam efeito antioxidante, o que possivelmente explicaria o efeito não oxidante do extrato etanólico neste bioensaio. Porém há a necessidade de mais estudos que possam comprovar realmente essa possível ação antioxidante dessas substâncias como também outros mecanismos que levam esse extrato ter efeito citotóxico e provavelmente genotóxico, apesar dos resultados não significantes encontrados no presente trabalho.

Os resultados obtidos com os testes realizados servem como banco de dados para a espécie em questão em relação ao seu efeito toxicogenético a nível celular. Além disso, faz-se necessários mais estudos relacionados à espécie em questão, a fim de promover novas descobertas químicas e farmacológicas.

1.5 Conclusão

O extrato etanólico de *E. grandis* apresentou efeito tóxico e citotóxico o que sugere estudos toxicológicos adicionais em humanos já que a mesma é utilizada como planta medicinal. Ademais, estudos sobre a investigação do seu possível potencial antiproliferativo/antitumoral devem ser encorajados e realizados.

Referências

Alvim NAT, Ferreira MA, Cabral IE, Filho AJA (2006). O Uso De Plantas Medicinais Como Recurso Terapêutico: Das Influências Da Formação Profissional Às Implicações Éticas E Legais De Sua Aplicabilidade Como Extensão Da Prática De Cuidar Realizada Pela Enfermeira **Revista Latino-Americana de Enfermagem**.

Azad GK, Singh V, Tomar RS (2014). Assessment of the Biological Pathways Targeted by Isocyanate Using N-Succinimidyl N-Methylcarbamate in Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3.

Babalola IT, Adelakun EA, Shode FO (2013a). Isolation Of Ursolic Acid (3 β -Hydroxyurs-12-Em-28-Oic Acid) From The Leaves Of *Eucalyptus Grandis* W. Hill Ex Maiden. **Archives Of Applied Science Research**. p. 33-37 v. 5.

Babalola IT, Shode FO, Adelakun, EA, Opoku AR, Mosa RA (2013b). Platelet-Aggregation Inhibitory Activity Of Oleanolic Acid, Ursolic Acid, Betulinic Acid, And Maslinic Acid. **Journal Of Pharmacognosy And Phytochemistry**. p. 54-60 v.1.

Badke MR, Budó L M D, Silva F M, Ressel LB (2011). Plantas Medicinais: O Saber Sustentado Na Prática Do Cotidiano Popular. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, vol. 15, núm. 1, enero-marzo, pp. 132-139

Bagatini MD, Silva ACF, Tedesco SB. (2007). Uso do sistema teste *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17(3): 444-447.

Bednarczuk VO, Verdam MCS, Miguel MD, Miguel OG (2010). Testes in Vitro e in vivo Utilizados na Triagemtoxicológica de Produtos Naturais. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2, - ISSN 1518-5192.

Bessa NGF, Borges JCM, Beserra FP, Carvalho RHA, Pereira MAB, Fagundes R, Campos SL, Ribeiro LU, Quirino MS, Chagas Junior AF, Alves A (2013). Prospecção Ftoquímica Preliminar De Plantas Nativas Do Cerrado De Uso Popular Medicinal Pela Comunidade Rural Do Assentamento Vale Verde – Tocantins. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.4, supl.I, p.692-707.

Boscolo OH, Valle LS (2008). **Plantas De Uso Medicinal Em Quissamã, Rio De Janeiro, Brasil**. IHERINGIA, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 63, n. 2, p. 263-277.

Bussmann R, Malca G, Glenn A, Sharon D, Nilsen B, Parris B et al (2011). Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern. **Journal of Ethnopharmacology**, v 137, n. 1, p. 121-140.

Calixto JB (2005). **Twenty-fi ve of research on medicinal plants in Latin America**. J Ethnopharmacol 100: 131-134.

El-Shahaby O, Migid HMA, Soliman M, Mashaly I (2003). Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium* chromosome aberration assay. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. 2003, n. 1, p. 23-28.

Estanislau AA et al (2001). Composição química e atividade antibacteriana de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivados em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 95-100.

Hirota BCK, Paula CS, Miguel OG, Miguel MD (2012). Avaliação de toxicidade in vitro: aplicabilidade do ensaio de letalidade frente à *Artemia Salina*. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.13, n.2, - ISSN 1518-5192.

Höferl M, Stoilova I, Schmidt E, Wanner J, Jirovetz L, Trifonova D et al (2014). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Juniper Berry (*Juniperus communis* L.) Essential Oil. Action of the Essential Oil on the Antioxidant Protection of *Saccharomyces cerevisiae* Model Organism. **Antioxidants**, v. 3, p. 81-98.

Hussin F, Eshkoor 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.** 14:32.

Junior VFV, Pinto AC, Maciel MAM (2005). **Plantas Medicinais: Cura Segura?**. Quim. Nova, Vol. 28, No. 3, 519-528.

Kelecom A, Rocha MA, Majdalani EC, Gonzalez MS, Mello CB (2002). Novas Atividades Biológicas Em Antigos Metabólitos: Ácido Oleanólico E Eugenol De *Eugenia caryophyllata*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 12, supl., p. 70-71. ISSN: 0102-695X.

Leme DM, Marin-Morales MA (2008). **Chromosome Aberration and Micronucleus Frequencies in *Allium cepa* Cells Exposed to Petroleum Polluted Water—A case study.** Mut. Res., 650, p.80-86.

Luna JS, Santos AF, Lima MRF, Omena MC, Mendonça FAC, Bieber LW, Sant'ana AEGA (2005). study of the Larvicidal and Molluscicidal Activities of Some Medicinal Plants From Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. p. 199 - 206.

Melo IRBU, Lages MCC, Santos PP, Maracajá PB, Rodrigues RAPF, Soto-Blanco B(2013). The pollen of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. Is toxic to honeybees (*Apis mellifera*). **Arthropod-Plant Interactions**, 7(4): 463-466.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DJ, Mclaughlin JL (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34.

Mclaughlin DK, Holden, KC (1993.). Nonmetropolitan elderly women: A portrait of economic vulnerability. **Journal of Applied Gerontology**, v. 12, n. 3, p. 320-334.

Odriozola-Serrano I, Puigpinós J, Oms Oliu G, Herrero E, Martín-Belloso O (2016). Antioxidant activity of thermal or non-thermally treated strawberry and mango juices by *Saccharomyces cerevisiae* growth based assays. **Food Science and Technology**, v. 74, p. 55–61.

Poletto PDO, Diniz AP, Bernardon B, Zan RA, Ramos LJ, Meneguetti DUDO (2012). Análise Da Mutagenicidade Do Extrato Hidrossolúvel De Derris Rariflora (Mart. Ex Benth. Jf Macbr: Fabaceae), Timbó Amazônico, Através Do Teste Micronúcleo Em *Allium Cepa*/Analysis Of Mutagenicity Hydrossoluble Extract Derris Rariflora. **Revista Pesquisa & Criação**, 10(1): 163-176.

Przedpelska-Wasowicz EM, Wierzbika M (2010). **Gatting Of Aquaporins By Heavy Metals In *Allium Cepa* L. Epidermal Cells**. *Protoplasma*, 248(4): 663-671.

Silva IC, Silva VM, Ferreira VM, Endres I (2015). Efeito Alelopático Do Extrato De Folhas De (*Eucalyptus Grandis*) Sobre A Germinação De Sementes De (*Ipomoea purpurea* L.). **XV Encontro de Agroecologia "Formação Sociocultural da Transformação Política e Social da Vida no Campo**. Bananeira-PB. ISSN 2236-7934 – Vol 10.

SILVA, N.L.A. et al. Triagem Fitoquímica de Plantas do Cerrado da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v.6, n.2, p.1-17, 2010.

Silva TM (2014). **Estudos Fitoquímicos e dos Efeitos da Radiação Gama em *Echinodorus macrophyllus* (Chapéu-de-couro) e em Óleos Essenciais de *Inga laurina* e *Eucalyptus grandis* (Eucalipto)**. Belo Horizonte. p, 08-136.

Soares AKA, Carmo GC, Quental DP, Nascimento DF, Bezerra FAF, Moraes MO, Moraes MEA (2006). **Avaliação Da Segurança Clínica De Um Fitoterápico Contendo *Mikania Glomerata*, *Grindelia Robusta*, *Copaifera Offi Cinalis*, *Myroxylon Toluifera*, *Nasturtium Offi Cinalis*, Própolis E Mel Em Voluntários Saudáveis**.

Souza VM, Cardoso SB (2013). Efeito Alelopático do Extrato de Folhas de *Eucalyptus grandis* sobre a Germinação de *Lactuca sativa* L. (alface) E *Phaseolus vulgaris* L.(feijão). **Revista Eletrônica de Educação e Ciência (REEC)** – ISSN 2237-3462 - Volume 03.

Vital MHF (2007). Impacto Ambiental de Florestas de Eucalipto. **Revista do BNDS**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 28, p. 235-276.

Nunes FIA (2013). **Caraterização Estrutural De Novos Triterpenóides Pentacíclicos**. Universidade de Coimbra. p.10-47.

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.** 153(3):568-586.

Vechia LD, Gnoatto SCB, Gosmann G (2009). Derivados Oleananos E Ursanos E Sua Importância Na Descoberta De Novos Fármacos Com Atividade Antitumoral, Anti-Inflamatória e Antioxidante. **Quim. Nova**, vol. 32, no. 5, 1245-1252.

ANEXO

JMPR - Instructions for Authors

[Introduction](#)
[Research ethics](#)
[Reporting guidelines](#)
[Preparing your manuscript](#)
[Title](#)
[Abstract](#)
[Abbreviations](#)
[The Introduction](#)
[Materials and methods](#)
[Results and discussion](#)
[Declaration of conflict of interest](#)
[Acknowledgments](#)
[References](#)
[Tables and figures](#)
[Acceptance Certificate](#)
[Payment of manuscript handling fee](#)
[Proofs](#)
[Publication](#)
[Publication Notification](#)

Introduction

Authors should read the editorial policy and publication ethics before submitting their manuscripts. Authors should also use the appropriate reporting guidelines in preparing their manuscripts.

Research Ethics

Studies involving human subjects should be conducted according to the World Medical Association (WMA) [Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects](#)

Studies involving non human animals should follow appropriate ethical guidelines such as the [Animal Welfare Act](#), [The Animals \(Scientific Procedures\) Act \(Amendment\) Order 1993](#), [The EU parliament directive on the protection of animals used for scientific purposes](#), [ARRP policies and guidelines](#), etc.

Reporting guideline

Responsible reporting of research studies, which includes a complete, transparent, accurate and timely account of what was done and what was found during a research study, is an integral part of good research and publication practice and not an optional extra.

See additional [guidelines for reporting of health research](#).

Preparing your manuscript

The type of article should determine the manuscript structure. However, the general structure for articles should follow the [IMRAD structure](#).

Title

The title phrase should be brief.

List authors' full names (first-name, middle-name, and last-name).

Affiliations of authors (department and institution).

Emails and phone numbers

Abstract

The abstract should be less than 300 words. Abstract may be presented either in [unstructured or structured format](#). The keywords should be less than 10.

Abbreviations

Abbreviation should be used only for non standard and very long terms.

The Introduction

The statement of the problem should be stated in the introduction in a clear and concise manner.

Materials and methods

Materials and methods should be clearly presented to allow the reproduction of the experiments.

Results and discussion

Results and discussion may be combined into a single section. Results and discussion may also be presented separately if necessary.

Disclosure of conflict of interest

Authors should disclose all financial/relevant interest that may have influenced the study.

Acknowledgments

Acknowledgement of people, funds etc should be brief.

Tables and figures

Tables should be kept to a minimum.

Tables should have a short descriptive title.

The unit of measurement used in a table should be stated.

Tables should be numbered consecutively.

Tables should be organized in Microsoft Word or Excel spreadsheet.

Figures/Graphics should be prepared in GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint.

Tables and Figures should be appropriately cited in the manuscript.

References

References should be listed in an alphabetical order at the end of the paper. DOIs, PubMed IDs and links to referenced articles should be stated wherever available.

Examples:

Baumert J, Kunter M, Blum W, Brunner M, Voss T, Jordan A, Klusmann U, Krauss S, Neubrand M, Tsai YM (2010). Teachers' mathematical knowledge, cognitive activation in the classroom, and student progress. *Am. Educ. Res. J.* 47(1):133-180.

<http://dx.doi.org/10.3102/0002831209345157>

Christopoulous DK, Tsionas EG (2004). "Finacial Development and Economic Growth: Evidence from Panel Unit Root and Cointegration Tests" *J. Dev.Econ.* pp.55-74

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdeveco.2003.03.002>

Goren A, Laufer J, Yativ N, Kuint J, Ben Ackon M, Rubinshtein M, Paret G, Augarten A (2001). Transillumination of the palm for venipuncture in infants. *Pediatric. Emerg. Care* 17:130-131.

<http://dx.doi.org/10.1097/00006565-200104000-00013> PMID:11334094

Mishra A, Mishra SC (2001). Cost-effective diagnostic nasal endoscopy with modified otoscope. *J. Laryngol. Otol.* 115:648-649.

<http://dx.doi.org/10.1258/0022215011908739> PMID:11535147

Acceptance Certificate

Authors are issued an Acceptance Certificate for manuscripts that have been reviewed and accepted for publication by an editor.

Payment of manuscript handling fee

Once a manuscript has been accepted, the corresponding author will be contacted to make the necessary payment of the manuscript handling fee. Kindly note that on the [manuscript management system](#), the payment option is only enabled for manuscripts that have been accepted for publication.

Proofs

Prior to publication, a proof is sent to the corresponding author. Authors are advised to read the proof and correct minor typographical or grammatical errors. Authors should promptly return proofs to the editorial office.

Publication

Once proofs are received at the editorial office, the manuscripts are usually included in the next issue of the journal. The article will thereafter be published on the journal's website

Publication Notification

After the article is made available on the journal's website, a publication notice is sent to the corresponding author with links to the issue and article.

We welcome manuscripts edited by the following organizations:

JOURNALS CONSORTIUM (www.journalsconsortium.org)

EDITAGE (www.editage.com)

BIOE



**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO ELETRÔNICA NO
REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL - RI/UFPI**

1. Identificação do material bibliográfico:

- ☐ Tese ☐ Dissertação ☐ Monografia ☒ TCC Artigo ☐ Livro
☐ Capítulo de Livro ☐ Material Cartográfico ou Visual ☐ Música
☐ Obra de Arte ☐ Partitura ☐ Peça de Teatro ☐ Relatório de pesquisa
☐ Comunicação e Conferência ☐ Artigo de periódico ☐ Publicação seriada
☐ Publicação de Anais de Evento

2. Identificação do Trabalho Científico:

Curso de Graduação: Ciências Biológicas

Programa de pós-graduação: _____

Outro: _____

Autor(a): Marcelo Augusto Costa Vieira e Silva

E-mail: _____

Orientador (a): João Marcelo de Castro e Sousa

Instituição: _____

Membro da banca: Felipe Camilanti Carneiro da Silva

Instituição: _____

Membro da banca: Marcia Maria Mendes Marques

Instituição: _____

Membro da banca: _____

Instituição: _____

Membro da banca: _____

Instituição: _____

Membro da banca: _____

Instituição: _____

Título obtida: Avaliação tóxica, citotóxica, mutagênica e oxidante do Extrato Etanólico de Eucalyptus grandis

Data da defesa: 08 / 12 / 2017

Título do trabalho: Avaliação tóxica, citotóxica, mutagênica e oxidante do Extrato Etanólico de Eucalyptus grandis

Agência de fomento (em caso de aluno bolsista): _____

3. Informações de acesso ao documento no formato eletrônico:

Liberação para publicação:

Total: ☒

Parcial: ☐. Em caso de publicação parcial especifique a(s) parte(s) ou o(s) capítulos(s) a serem publicados: _____

.....

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Em atendimento ao Artigo 6º da Resolução CEPEX nº 264/2016 de 05 de dezembro de 2016, autorizo a Universidade Federal do Piauí - UFPI, a disponibilizar gratuitamente sem ressarcimento dos direitos autorais, o texto integral ou parcial da publicação supracitada, de minha autoria, em meio eletrônico, no Repositório Institucional (RI/UFPI), no formato especificado* para fins de leitura, impressão e/ou *download* pela *internet*, a título de divulgação da produção científica gerada pela UFPI a partir desta data.

Local: Picos-PI Data: 28 / 07 / 2026

Assinatura do(a) autor(a): Vilfredo Augusto Costa Viana e Silva

* **Texto** (PDF); **imagem** (JPG ou GIF); **som** (WAV, MPEG, MP3); **Vídeo** (AVI, QT).