



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

MATHEUS FERREIRA DO NASCIMENTO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ATIVIDADES
ANTIGENOTÓXICA E ANTINOCICEPTIVA DE ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS
DE *Croton blanchetianus* BAILL**

Recife
2022

MATHEUS FERREIRA DO NASCIMENTO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ATIVIDADES
ANTIGENOTÓXICA E ANTINOCICEPTIVA DE ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS
DE *Croton blanchetianus* BAILL**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Coorientador: Dr. Alisson Macário De Oliveira

Recife
2022

Nascimento, Matheus Ferreira do

Composição química, avaliação toxicológica e atividades antigenotóxica e antinociceptiva de óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* Baill / Matheus Ferreira do Nascimento - 2022.

93 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão

Coorientador: Alisson Macário de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Atividade antinociceptiva 2. Marmeleiro preto 3. Plantas medicinais
I. Napoleão, Thiago Henrique (Orientador) II. Oliveira, Alisson Macário de (Coorientador) III. Título

615.3 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022-035

MATHEUS FERREIRA DO NASCIMENTO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ATIVIDADES
ANTIGENOTÓXICA E ANTINOCICEPTIVA DE ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS
DE *Croton blanchetianus* BAILL**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Data de aprovação: 03/02/2022

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Presidente)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Membro Interno)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Leydianne Leite de Siqueira Patriota (Membro Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Samara Rodrigues Bonfim Damasceno Oliveira (Membro Externo)

Centro Universitário Estácio do Recife

Dedico essa dissertação a minha mãe (*In memorian*), meu pai (*In memorian*), meu vô Estevam (*In memorian*) e minha vó Neli (*In memorian*); espero que estejam orgulhosos do que seu menino está se tornando.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo sustento e força nos momentos mais difíceis. Não foi fácil fazer um Mestrado no meio de uma pandemia, mas até aqui a mão D’Ele me ajudou.

Meu irmão, Roberto César, por toda força proporcionada até aqui. Seus esforços para me dar um futuro melhor não estão sendo em vão.

Meus pais, que apesar de não estarem mais presentes, me ensinaram as coisas certas da vida. Não teve um só momento em que eu não senti a presença de vocês ao meu lado.

À minha tia Ione, que me criou, me deu educação e nunca me deixou faltar nada. Você é, e sempre continuará sendo, minha segunda mãe. Obrigado por todo incentivo!

À minha vó, Nely, que me incentivou, me apoiou, confortou meu coração e sempre esteve disposta a me escutar, quando a jornada parecida pesada demais.

Aos meus irmãos de coração João e Pedro, e seus respectivos pais, que me ajudaram no momento mais difícil da minha vida, me sustentaram e nunca me deixaram cair. Essa jornada teria sido muito mais difícil sem vocês. Minha eterna gratidão!

Ao professor Thiago, pela oportunidade. Alisson, por toda a confiança. Acreditou em mim desde o primeiro momento e esteve presente desde a época de iniciação científica. Se hoje estou aqui, você tem uma parcela gigante de contribuição.

Aos meus amigos Wêndeo, por toda sua gentileza e disponibilidade, sou muito grato por ter sua amizade. Clara, Winny e Hugo por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado, principalmente nas adversidades.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por todo suporte.

E a todos que cruzaram minha vida. A vocês, o meu muito obrigado!!

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”. (Josué 1:9)

RESUMO

Croton blanchetianus (marmeleiro preto) é uma planta utilizada no tratamento de distúrbios gastrintestinais e cefaleias. O presente estudo realizou uma avaliação toxicológica e das atividades antigenotóxica e antinociceptiva de óleo essencial extraído de folhas de *C. blanchetianus* (OECb). Análise por cromatografia gasosa foi realizada para determinar a composição do óleo essencial. O potencial hemolítico foi avaliado *in vitro* em eritrócitos de camundongo. Toxicidade aguda (dose única de 2000 mg/kg, via oral e intraperitoneal) e toxicidade subaguda (doses diárias de 500 mg/kg oralmente, por 28 dias) em camundongos foram avaliadas através de análise de sobrevivência e de parâmetros comportamentais, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos. A genotoxicidade e o efeito protetor (antigenotóxico) do OECb (1000 e 2000 mg/kg, v.o.) sobre os danos causados pela ciclofosfamida foram investigados utilizando o teste do micronúcleo e células da medula óssea. A atividade antinociceptiva do óleo (25, 50 e 100 mg/kg, v.o.) foi avaliada através dos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e movimento de cauda. A caracterização química indicou como componentes majoritários α -pineno (21,23%), β -felandreno (13,92%), terpinoleno (13,01%) e germacreno D (10,89%). OECb não causou hemólise e não apresentou toxicidade aguda por via oral. Contudo, a administração intraperitoneal de dose única foi letal para os animais. No ensaio de toxicidade subaguda, houve redução da massa corpórea em machos e fêmeas, porém sem sinais de toxicidade de acordo com os demais parâmetros. Análise bioquímica indicou redução dos níveis séricos de glicose, triglicerídeos e colesterol total. OECb não foi genotóxico e protegeu o DNA das células na medula óssea dos animais contra os danos da ciclofosfamida. Nos ensaios de atividade antinociceptiva, foi observada redução das contorções abdominais (69,43–89,41%) e do número de lambidas nas primeira (38,77–84,47%) e segunda (59,75–90,74%) fases no teste de formalina. Nesse último caso, os efeitos foram inibidos por naloxana e glibenclamida, ação via sistema opioide e bloqueio de canais de K⁺. O tempo de latência no teste de movimento de cauda também aumentou de maneira significativa. Em conclusão, OECb, em doses seguras, demonstrou atividades antigenotóxica e antinociceptiva. Diante do exposto, se faz necessário estudos mais detalhados sobre ações hipoglicemiante e hipolipidêmica do óleo.

Palavras-chave: Atividade antinociceptiva; marmeleiro preto; plantas medicinais; dor; toxicidade; genotoxicidade.

ABSTRACT

Croton blanchetianus (black quince) is a plant used to treat gastrointestinal disorders and headaches. The present study carried out a toxicological survey and evaluation of the antigenotoxic and antinociceptive activities of an essential oil extracted from *C. blanchetianus* leaves (CbEO). Gas chromatography analysis was performed to determine the essential oil composition. The hemolytic potential was evaluated *in vitro* in mouse erythrocytes. Acute (single dose of 2000 mg/kg, orally or intraperitoneally) and subacute (daily doses of 500 mg/kg orally, for 28 days) toxicity in mice were evaluated using survival, behavioral, biochemical, hematological, and histopathological parameters. The genotoxicity and protective (antigenotoxic) effect of CbEO (1000 and 2000 mg/kg, v.o.) on damage caused by cyclophosphamide was investigated using the micronucleus test and bone marrow cells. The antinociceptive activity of the oil (25, 50 and 100 mg/kg, v.o.) was evaluated using the models of abdominal writhing induced by acetic acid, formalin test and tail movement. The chemical characterization indicated as major components α -pinene (21.23%), β -phellandrene (13.92%), terpinolene (13.01%) and germacrene D (10.89%). CbEO did not cause hemolysis and did not show acute oral toxicity. However, single-dose intraperitoneal administration was lethal to the animals. In the subacute toxicity test, there was a reduction in body mass in males and females, but without signs of toxicity according to the other parameters. Biochemical analysis indicated a reduction in serum levels of glucose, triglycerides, and total cholesterol. CbEO was not genotoxic and protected the DNA of cells in the bone marrow of animals against cyclophosphamide-induced damage. In the tests of antinociceptive activity, a reduction in abdominal contortions (69.43–89.41%) and in the number of licks was observed in the first (38.77–84.47%) and second (59.75–90.74%) phases in the formalin test. In the latter case, the effects were inhibited by naloxane and glibenclamide, indicating action via the opioid system and blocking of K⁺ channels. The latency time in the tail movement test also increased significantly. In conclusion, CbEO, at safe doses, demonstrated antigenotoxic and antinociceptive activities. In view of the above, more detailed studies on the hypoglycemic and hypolipidemic actions of the oil are necessary.

Keywords: Antinociceptive activity; black quince; medicinal plants; pain; toxicity; genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

DISSERTAÇÃO

Figura 1 – Metodologia de teste a partir de uma dose inicial de 2000 mg/kg de peso corporal.....	18
Figura 2 – Neurofisiologia da Dor.....	22
Figura 3 – Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	24
Figura 4 – <i>Croton blanchetianus</i> Baill.....	28

ARTIGO 1 – ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Croton blanchetianus* Baill NÃO APRESENTA TOXICIDADE ORAL AGUDA, TEM AÇÃO ANTIGENOTÓXICA E REDUZ A NOCICEPÇÃO NEUROGÊNICA E INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS

Figura 1 – Fotomicrografias representativas dos fígados, rins e baços de camundongos fêmeas do grupo controle ou tratado com óleo essencial de folhas de <i>C. blanchetianus</i> na dose de 2.000 mg/kg por administração oral. Fígados: veia centrolobular (Cv) visualizadas em todas as imagens. Rins: Glomérulos renais (Gr) e túbulos torcidos sem alterações são visíveis nos grupos controle e tratado com óleo essencial. Aspecto venoso e túbulos normais (setas). Baço: os linfonodos (Nd) são bem definidos nos grupos controle e tratado por via oral. A coloração com hematoxilina-eosina foi usada. Ampliação: 400x.....	41
Figura 2 – Efeito antinociceptivo do óleo essencial de folhas de <i>Croton blanchetianus</i> (25, 50, 100 mg/ kg, vo) e medicamentos de referência indometacina (20 mg/kg ip) e morfina (10 mg/kg ip) no bioensaio de contorções induzidas por ácido acético. As barras representam o número médio de contorções $\pm$ desvio padrão. (a, b e c) indica diferença significativa ($p < 0,001$) em comparação com o controle.....	45
Figura 3 – Efeito antinociceptivo do óleo essencial de folhas de <i>Croton blanchetianus</i> (25, 50, 100 mg/kg, vo) e medicamentos de referência indometacina (Indo, 20 mg/kg ip) e morfina (Mor, 10 mg/kg ip) em ambas as fases do teste de formalina. As barras representam o número de lambida nas patas $\pm$ desvio padrão. (a, b e c) indica diferença significativa ($p < 0,001$) em comparação com o controle.....	46
Figura 4 – Efeito antinociceptivo do óleo essencial de folhas de <i>Croton blanchetianus</i> (25, 50, 100 mg/kg, vo) e medicamento de referência em no teste de movimento de cauda. (*) indica diferença significativa ($p < 0,001$) em comparação com o controle.....	48
Figura 5 – Efeito antinociceptivo do óleo essencial de folhas de <i>Croton blanchetianus</i> (25, 50, 100 mg/kg, vo) e medicamentos de referência indometacina (Indo, 20 mg/kg ip) e morfina	

(Mor, 10 mg/kg ip) em ambas as fases do teste de formalina. O envolvimento dos receptores opióides no efeito antinociceptivo foi avaliado pela administração de naloxona (Nal, 2 mg / kg i.p.), glibenclamida (bloqueador dos canais K + -ATP, 2 mg/kg, ip), atropina (antagonista colinérgico muscarínico não seletivo, 1 mg/kg, i.p.), iombina (bloqueador de receptores alfa 2 adrenérgicos pré-sinápticos, 1 mg/kg) e prazosin (bloqueador dos receptores alfa 1- adrenérgicos, 1 mg/kg), 30 min antes da administração das doses do óleo essencial por via oral.....49

ARTIGO 2 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL EM DOSES REPETIDAS (28 DIAS) DE ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Croton blanchetianus*

Figura 1 – Efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* sobre a massa corpórea de camundongos machos e fêmeas durante 28 dias de tratamento. Os valores representam as médias $\pm$ d.p.m. (n = 5/grupo). (a) indica diferença significativa com o grupo controle machos ($p < 0,05$); (b) indica diferença significativa com o grupo controle fêmeas ($p < 0,05$)66

Figura 2 – Efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* sobre o consumo de água e ração de camundongos machos e fêmeas durante 28 dias de tratamento. Os valores representam as médias $\pm$ d.p.m. (n = 5/grupo). (a) indica diferença significativa com o grupo controle machos ($p < 0,05$)67

Figura 3 – Efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* sobre a temperatura retal de camundongos machos e fêmeas durante 28 dias de tratamento. Os valores representam as médias $\pm$ d.p.m. (n = 5/grupo). $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.....69

Figura 4: Fotomicrografias representativas dos fígados, rins e baço de camundongos machos e fêmeas do grupo controle salina ou grupos tratados com óleo essencial de folhas de *C. blanchetianus* por 28 dias, na dose de 500 mg/kg por administração oral. Fígados: a veia centrolobular (v) é vista em todas as imagens. Rins: Glomérulos renais (Gr) e túbulos contorcidos. Baço: os linfonodos (Nd). Ampliação: 400 x.....71

Figura 5 – Efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* sobre o índice glicêmico de camundongos machos e fêmeas durante 28 dias de tratamento. Os valores representam as médias $\pm$ d.p.m. (n = 5/grupo). (a) indica diferença significativa com o grupo controle machos ($p < 0,05$); (b) indica diferença significativa com o grupo controle fêmeas ($p < 0,05$)72

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 – ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>Croton blanchetianus</i> Baill NÃO APRESENTA TOXICIDADE ORAL AGUDA, TEM AÇÃO ANTIGENOTÓXICA E REDUZ A NOCICEPÇÃO NEUROGÊNICA E INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS	
Tabela 1 – Caracterização química do óleo essencial de folhas de <i>Croton blanchetianus</i> por Cromatografia Gasosa.....	37
Tabela 2 – Avaliação do consumo de ração, água e ganho de peso dos animais do controle ou tratados por 14 dias com o óleo essencial de folhas de <i>Croton blanchetianus</i> por via oral.....	39
Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos controle e tratados por 14 dias com óleo essencial folhas de <i>Croton blanchetianus</i> por via oral.....	40
Tabela 4 – Parâmetros hematológicos de camundongos de controle e tratados por 14 dias com o óleo essencial de folhas de <i>Croton blanchetianus</i> por administração oral na dose de 2000 mg/kg.....	40
Tabela 5 – Avaliação da genotoxicidade <i>in vivo</i> do óleo essencial das folhas de <i>Croton blanchetianus</i> (administração oral) ou doxorrubicina de controle positivo (DXR, i.p.) pela determinação do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) da medula óssea de camundongos.....	43
Tabela 6 – Avaliação da antigenotoxicidade <i>in vivo</i> do óleo essencial das folhas de <i>Croton blanchetianus</i> (administração oral) ou doxorrubicina de controle positivo (DXR, i.p.) pela determinação do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) da medula óssea de camundongos.....	44

ARTIGO 2 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL EM DOSES REPETIDAS (28 DIAS) DE ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Croton blanchetianus*

Tabela 1 – Parâmetros bioquímicos do grupo controle e dos grupos tratados de machos e fêmeas com administração oral de 28 dias com o óleo essencial de folhas de <i>Croton blanchetianus</i> na dose de 500 mg/kg.....	68
Tabela 2 – Parâmetros hematológicos de camundongos de machos e fêmeas dos grupos controle e tratados por 28 dias com o óleo essencial de folhas de <i>Croton blanchetianus</i> por administração oral na dose de 500 mg/kg.....	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1	CONTEXTO HISTÓRICO DAS PLANTAS MEDICINAIS.....	16
3.2	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE.....	17
3.3	GENOTOXICIDADE.....	19
3.4	DOR E ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	20
3.5	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	23
3.6	FAMÍLIA Euphorbiaceae.....	25
3.6.1	Gênero Croton.....	26
3.6.2	<i>Croton blanchetianus</i> Baill.....	27
4	RESULTADOS.....	29
4.1	ARTIGO 1 – ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>Croton blanchetianus</i> Baill. MELHORA A NOCICEPÇÃO VIA RECEPTOR OPIOIDE SEM TOXICIDADE ORAL EM CAMUNDONGOS.....	29
4.2	ARTIGO 2 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL EM DOSES REPETIDAS (28 DIAS) DE ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>Croton</i> <i>blanchetianus</i>	61
5	CONCLUSÕES.....	84
	REFERÊNCIAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais com o propósito de profilaxia e tratamento de enfermidades advém desde os primórdios da humanidade. A fitoterapia é uma das formas mais antigas de cuidado à saúde, já que na Pré-História os humanos já distinguiam as plantas com efeitos benéficos daquelas que não possuíam atividade farmacológica ou eram tóxicas (HARDY, 2021). Existem evidências de povos de origem europeia e mediterrânea que faziam uso de plantas medicinais há mais de 4000 anos. Romanos, egípcios, africanos e indígenas usavam ervas em rituais de cura, enquanto a medicina chinesa desenvolveu sistemas médicos tradicionais nos quais as plantas eram utilizadas de maneira sistemática (RASOOL *et al*, 2020).

Atualmente estima-se que mais de 80% da população mundial faz uso de fitoterápicos, que são definidos como produtos obtidos de matéria-prima ativa vegetal. O aumento na procura por medicamentos de origem vegetal pode ser explicado pela aceitabilidade cultural, o fácil acesso, a disponibilidade, a eficácia e a segurança, já que a probabilidade em gerar efeitos adversos é menor quando comparado aos medicamentos de origem sintética (BRASIL, 2014; MIRALDI; BAINI, 2019; SOHANI, 2021). Os fitoterápicos podem ser utilizados no tratamento de distúrbios gastrintestinais, processos inflamatórios, infecções e na dor crônica, por exemplo (CUBAS; RIBAS, 2021; FAZLY BAZZAZ *et al*, 2021; GITLEMAN, 2014; JAHROMI *et al*, 2021). Apesar de serem de origem vegetal, é desaconselhável o uso de medicamentos fitoterápicos de maneira indiscriminada, devido ao potencial em gerar casos de intoxicações agudas ou crônicas (FARZAEI *et al*, 2020). Por isso, torna-se necessário a realização de testes pré-clínicos estabelecidos por órgãos regulatórios, com o intuito de se avaliar a segurança de novos compostos, minimizando o risco de efeitos tóxicos (AVILA *et al*, 2020).

Conhecida popularmente como marmeleiro preto, *Croton blanchetianus* Baill. é uma espécie pertencente à família Euphorbiaceae, de origem brasileira e amplamente distribuída na região Nordeste, onde ocupa principalmente áreas desmatadas (TORRES *et al*, 2020). Por possuir grande relevância regional, é utilizada na alimentação humana e na medicina popular. A infusão ou o macerado de suas folhas e cascas podem auxiliar no alívio de distúrbios gastrintestinais, dores de cabeça e em doenças reumáticas (MELO *et al*, 2013). Seu potencial bioativo tem sido atribuído à presença majoritária de metabólitos secundários como terpenos, monoterpenos e sesquiterpenos, biciclogermacreno, (E) -cariofileno, β -felandreno e eucaliptol (PEREIRA *et al*, 2020; RODRIGUES *et al*, 2019; TORRES *et al*, 2020). Na literatura,

estudos ratificam o potencial de diterpenos isolados de *C. blanchetianus* na prevenção da formação de biofilme por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus parasanguinis* (SÁ FIRMINO *et al*, 2019). O extrato etanólico da casca teve efeitos eficazes e seletivos contra *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* (PEREIRA *et al*, 2020), enquanto extrato etanólico de folhas mostrou atividade antioxidante e potencial antinociceptivo (AQUINO *et al*, 2017; FREITAS *et al*, 2020; RODRIGUES *et al*, 2017).

A dor é, atualmente, uma das principais causas que levam à procura pelos serviços de saúde. Considerada um problema de saúde pública, a alta prevalência de dor aguda e crônica afeta de maneira profunda a qualidade de vida do indivíduo, devido ao impacto negativo nas atividades diárias de quem convive com esse problema (MILLS; NICOLSON; SMITH, 2019; SILVA *et al*, 2017). Atualmente, estima-se que 20,5% da população mundial é acometida pela dor crônica, o equivalente a aproximadamente 1,6 bilhão de pessoas (ZELAYA *et al*, 2020). Por definição, a dor se trata de “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (DESANTANA *et al*, 2020; NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKES, 2021). A dor pode ser classificada de acordo com a duração, sendo de origem aguda quando surge de maneira repentina ou é de duração limitada, devido a lesões em tecidos, músculos ou órgãos, que pode vir acompanhada de quadros de ansiedade ou sofrimento emocional. Já a dor crônica está relacionada a uma doença de longa duração, podendo durar ou perdurar por mais de 3 meses. Embora possa ser resultado de lesão tecidual, é mais atribuída a danos nos nervos (NUGRAHA *et al*, 2019).

A terapia farmacológica consiste no uso de analgésicos não opioides, como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) ou paracetamol, para o tratamento de dores leves. Em casos de dores moderadas, podem ser utilizados opioides fracos (tramadol, codeína) podendo ser associados a analgésicos não-opioides. Em casos de dor severa ou persistente, os opioides potentes (morfina, metadona, oxicodona) são usados de maneira associada ou não a analgésicos não-opioides. Contudo, medicamentos utilizados no tratamento da dor crônica possuem alta capacidade de gerar efeitos adversos e dependência (no caso dos opioides) (YANG *et al*, 2020; ZENG *et al*, 2020). Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o óleo essencial de folhas de *C. blanchetianus* quanto a composição química, toxicidade e potencial antinociceptivo em camundongos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o óleo essencial de folhas de *C. blanchetianus* quanto à composição química, toxicidade aguda e subaguda, genotoxicidade e potencial antigenotóxico e antinociceptivo *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição química do óleo essencial de folhas de *C. blanchetianus* através de cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas;
- Avaliar a toxicidade aguda do óleo essencial em camundongos, administrado por via intraperitoneal e oral, bem como análises hematológica, bioquímica e histopatológica;
- Investigar a toxicidade oral subaguda (28 dias) do óleo essencial em camundongos;
- Avaliar o potencial hemolítico *in vitro* do óleo sobre eritrócitos de camundongo.
- Avaliar, pelo teste de micronúcleo, a genotoxicidade e efeito antigenotóxico *in vivo* do óleo em camundongos.
- Avaliar a atividade antinociceptiva *in vivo* do óleo essencial através dos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste de formalina e teste de movimento de cauda.
- Investigar possíveis vias envolvidas nos mecanismos de ação antinociceptiva.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CONTEXTO HISTÓRICO DAS PLANTAS MEDICINAIS

A prática para obtenção de cura por meio dos vegetais foi uma das primeiras manifestações do homem para entender como a natureza poderia ajudar a minimizar o sofrimento provocado pelas doenças (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017). A utilização de vegetais para fins terapêuticos é descrita desde 2600 a.C., na antiga Mesopotâmia, onde óleos de *Papaver somniferum*, *Cedrela fissilis* e *Commiphora myrrha* já eram utilizados para o tratamento de resfriados, gripes e infecções bacterianas. No Egito, por volta de 2000 a.C., médicos já tratavam doenças como causas naturais, sendo assim o uso de plantas como remédios era uma alternativa viável para restabelecimento da homeostase (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

No Brasil, o tratamento de doenças teve influência direta de povos indígenas, que ao dispor de amplo conhecimento da biodiversidade, transmitiam os conhecimentos para seus descendentes. Além disso, a vinda de escravos para o país contribuiu de maneira significativa para a disseminação do conhecimento acerca de plantas bioativas, já que muitas dessas plantas eram utilizadas em rituais religiosos. Logo, muito do entendimento dos produtos naturais ocorreu de maneira empírica e através do conhecimento popular (CHABALALA *et al*, 2021).

Desta forma, o uso de plantas medicinais compôs a base da medicina tradicional (SÜNTAR, 2020). Atualmente, o conhecimento sobre o uso e a eficácia das plantas desperta o interesse de pesquisadores de diversas áreas de conhecimento em elucidar os possíveis mecanismos de ação e encontrar novas opções de tratamento (FITZGERALD; HEINRICH; BOOKER, 2019). Mesmo com o desenvolvimento de novos fármacos sintéticos, vários países ainda utilizam as plantas medicinais como uma alternativa viável e de baixo custo no tratamento de doenças, sendo o mercado de fitoterápicos visto com bons olhos pela comunidade científica, pelas indústrias farmacêuticas e, principalmente, pela população que consome esses produtos (CHE *et al*, 2017).

Os produtos naturais têm desempenhado importante papel no fornecimento de novos compostos terapêuticos. Estudos apontam para o enorme impacto das plantas medicinais no tratamento de doenças como infecções, câncer e em quadros de dor crônica (ATANASOV *et al*, 2021; FOROUZANFAR; HOSSEINZADEH, 2018). Isso reflete no interesse nessa classe de medicamentos, que aumentou significativamente em todo o mundo, principalmente por

países europeus e nos Estados Unidos (SÜNTAR, 2020). Atualmente, estima-se que 80% da população mundial é dependente de alguma forma da medicina tradicional. Foi estimado que o mercado global de fitoterápicos geriu em torno de US\$ 83 bilhões em 2019, podendo chegar a US\$ 550 bilhões, a uma taxa de crescimento anual composta de 18,9% em 2030 (insightSLICE, 2021; RODRÍGUEZ *et al*, 2018).

3.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

A partir do momento em que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconheceu os fitoterápicos como medicamento, tornou-se necessário a criação de normas que forneçam parâmetros de qualidade, eficácia e segurança ao consumidor. Para isso, são realizados inicialmente estudos toxicológicos pré-clínicos em animais de laboratório, com o intuito de fornecer todas as informações necessárias acerca de possíveis efeitos tóxicos que o medicamento possa vir causar à saúde humana (BRASIL, 2014).

Uma forma inicial de avaliar o grau de toxicidade aguda de um produto é através da avaliação citotóxica *in vitro*. Apesar de não serem considerados como parâmetros de segurança completos, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* podem servir de suporte na determinação de uma dose inicial para avaliação posterior da toxicidade *in vivo*. Além disso, os resultados desses testes podem fornecer informações pertinentes sobre os mecanismos de ação de moléculas extraídas de plantas medicinais. Ensaios de morte celular, proliferação celular, liberação de enzimas específicas, formação de colônias e atividade hemolítica podem ser utilizados para avaliar o potencial citotóxico *in vitro* (AYDIN; AKTAY; YESILADA, 2016).

A utilização do modelo eritrocitário (atividade hemolítica) é o teste mais comum de triagem toxicológica utilizada para avaliação de drogas e tem por objetivo indicar uma possível toxicidade a nível de membrana plasmática (ALENCAR *et al*, 2015; GRECO *et al*, 2020). Uma vantagem desse ensaio é a fácil obtenção do sangue, bem como a facilidade de separação dos componentes sanguíneos (GRECO *et al*, 2020). Além do mais, a membrana de eritrócitos possui semelhanças com outras membranas celulares. Em contato com o eritrócito, os compostos podem promover alterações na permeabilidade da membrana da hemácia, ocasionando a lise da bicamada lipídica. O grau de hemólise está relacionado à concentração e potência do composto (YANG; HINNER, 2015).

Após a realização dos testes *in vitro*, os estudos *in vivo* devem se iniciar com a determinação da dose letal 50 (DL₅₀), que indica a dose necessária para matar 50% dos

animais testados em um determinado intervalo de tempo (COLERANGLE, 2017; DE JESUS *et al*, 2021). Um dos ensaios realizados é o de teste de toxicidade aguda, que também tem por objetivo fornecer informações de possíveis efeitos adversos que possam ocorrer ao animal após a administração de uma única dose do material estudado, em um curto período, por uma via previamente determinada. A substância é administrada uma única vez em dosagem preestabelecida pelos protocolos recomendados, sendo avaliadas, por 14 dias, as respostas comportamentais, possíveis efeitos adversos e mortalidade, sempre em comparação com um grupo controle (não-tratado). Esse teste serve de base para o ensaio de doses repetidas (KIFAYATULLAH *et al*, 2015; SAGANUWAN, 2017).

O teste de toxicidade de doses repetidas avalia como o organismo se comporta quando submetido a efeitos toxicológicos gerais decorrentes da administração de doses diárias em curto espaço de tempo. Para isso, são realizadas administrações da substância em dias consecutivos, durante 28 dias. A duração do período de observação após administração do último tratamento é de 14 dias e serve para avaliar o caráter reversível ou irreversível de efeitos tóxicos observados. Os resultados deste estudo são interpretados em razão dos efeitos tóxicos observados e daqueles obtidos em necrópsia (realizada nos animais que morrem no decorrer do experimento). O acompanhamento do número de óbitos (número a esquerda) indica o nível de segurança que o material em estudo possui. Numa escala de 1 a 5, quanto maior a categoria, menor a capacidade do produto em gerar danos, já que é necessário um aumento de dose relevante para que se observe efeitos adversos (Figura 1) (ECHA, 2016; OECD, 2018).

são testes que fornecem dados precisos, de fácil visualização, e que consegue simular condições a que o homem está sujeito, como via de administração, duração do tratamento e condições nutricionais (HARTWIG *et al*, 2020; HAYASHI, 2016).

Dentre os testes de avaliação genotóxica recomendados por agências internacionais e instituições governamentais estão: avaliação da presença de danos primários ao DNA, como quebras de uma ou das duas fitas, teste de mutação reversa em cepas bacterianas, teste de aberração cromossômica em metáfase *in vitro*, ensaio de mutação do gene da timidina quinase (Tk) em linfoma de camundongos *in vitro* ou teste de micronúcleo (TMN) em células de sangue periférico. Esse último pode ser realizado com células tratadas *in vitro* ou coletadas de animais expostos ao agente sendo avaliado e é amplamente utilizado na avaliação e registro de possíveis medicamentos, uma vez que os resultados obtidos são considerados fortemente relevantes no contexto humano (HAMEL; ROY; PROUDLOCK, 2016; HAYASHI, 2016; REGISTRE; PROUDLOCK, 2016; YASUI *et al*, 2021).

3.4 DOR E ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*), a dor pode ser definida como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada a uma lesão tecidual real ou potencial”. A dor pode persistir por longos períodos de tempo devido a sinalização do organismo frente ao sistema nervoso (DESANTANA *et al*, 2020; NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKES, 2021).

A dor atua frente a estímulos nocivos, de origem interna ou externa, como mecanismo de sinalização ao organismo, com o intuito de restabelecer a homeostase. Além do caráter fisiológico, a percepção dolorosa é extremamente individual e altamente influenciada por fatores externos, de forma que problemas que afetam a estabilidade psicológica podem apresentar relatos de dor mais intensa (SOUZA; BARROS, 2020).

Do ponto de vista temporal, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda ou adaptativa decorre da ativação das vias nociceptivas em resposta a uma situação específica, autolimitada e bem localizada, que geralmente desaparece após interrupção do estímulo causador (GIACOMELLO *et al*, 2018). A dor crônica ou não-adaptativa é definida como a dor que persiste ou recorre por mais de 3 meses, ocasionando alterações fisiológicas crônicas e mudanças no padrão de transmissão neuronal e a nível de receptores. Receptores da dor ou nociceptores são terminações nervosas livres presentes no sistema nervoso periférico,

distribuídos por todos os tecidos e órgãos, como camadas superficiais da pele, na parede que reveste o lúmen dos órgãos, no parênquima de órgãos sólidos, nas paredes das artérias e veias, nos ossos e articulações, cuja função é detectar e transmitir os estímulos dolorosos (HALL, 2017; NUGRAHA *et al*, 2019; WIDMAIER; RAFF; STRONG, 2017).

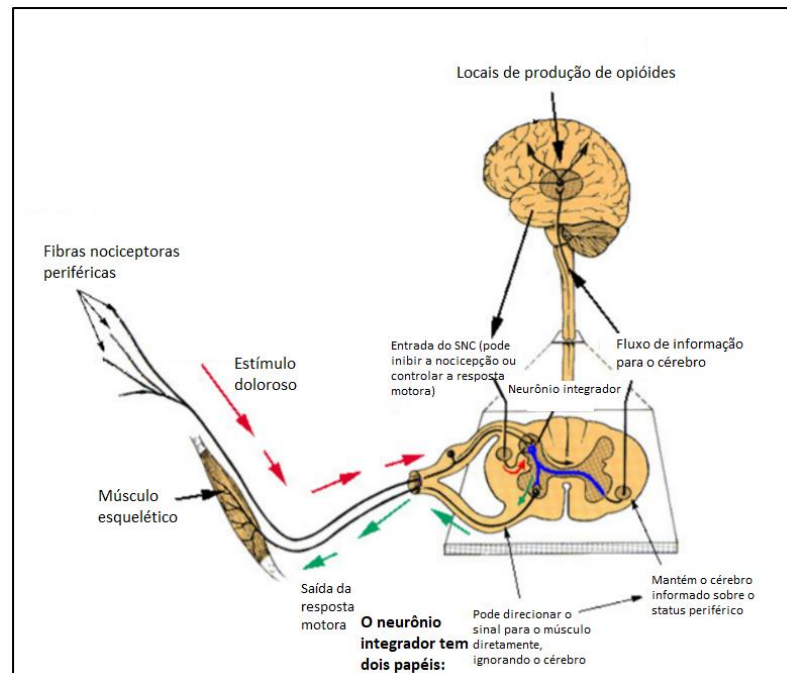
De maneira resumida, a dor ocorre quando o estímulo nociceptivo sensibiliza os nociceptores, ativando-os. A partir daí, é gerado um potencial de ação que se transmite através do neurônio aferente (sensitivos) até a medula espinhal, onde o sinal é processado e transferido para o neurônio eferente (motor) e em seguida conduzido para regiões superiores do Sistema Nervoso Central (HALL, 2017). O processo inflamatório, em resposta a um trauma ou infecções, por exemplo, gera respostas que envolvem a migração de células imunes, participação de vasos sanguíneos e liberação de mediadores moleculares, como citocinas (TNF- α , lipoxinas, cininas, prostaglandinas, leucotrienos), que sensibilizam diretamente os nociceptores, ocasionando a resposta dolorosa (Figura 2) (ETIENNE; DIAS VIEGAS; VIEGAS, 2021).

Além das classificações citadas anteriormente, a dor pode ser subdividida em dor de origem central e dor periférica. Na dor central, ocorre uma sensibilização com consequente modificação no estado funcional dos neurônios e de todas as vias envolvidas na nocicepção, ocasionada principalmente por uma hiper excitabilidade da membrana. A dor de caráter central acomete quadros de dor neuropática, inflamatória, bem como pacientes com fibromialgia. Já a dor periférica ocorre após a lesão de nervos periféricos, que pode vir acompanhada de lesão tecidual ou processo inflamatório. Nela, é observada a redução do limiar com aumento da resposta das fibras nervosas sensoriais periférica, ocasionada por estímulos externos. A liberação de mediadores químicos inflamatórios, como prostaglandinas, bradicinina e histamina pode ativar e sensibilizar os neurônios sensoriais periféricos, originando a sensibilização periférica, que juntamente com a sensibilização central, produzem a dor neuropática e inflamatória (ASHMAWI; FREIRE, 2016; GRECO *et al*, 2020; KOCOT-KEPSKA *et al*, 2021).

Dentre os primeiros testes pré-clínicos *in vivo* para avaliação de atividade antinociceptiva está o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, que é usado como ferramenta de triagem para avaliar compostos analgésicos ou anti-inflamatórios. Nesse teste, o ácido acético induz a dor de origem periférica em camundongos. Isso acontece devido à ativação de nociceptores viscerais e somáticos presentes em todos o peritônio, produzindo uma inflamação peritoneal. Esse quadro inflamatório se dá mediante a liberação de citocinas presentes em macrófagos residentes e mastócitos, como TNF- α , IL-1 β e IL-8. Logo, a

inflamação ocorre nos órgãos subdiafragmáticos e paredes musculares subcutâneas (YIN *et al*, 2016). No bioensaio, a atividade antinociceptiva é avaliada através da diminuição da frequência que o animal contrai a musculatura abdominal (CARLINI; MENDES, 2011).

Figura 2 – Neurofisiologia da Dor.



Fonte: Disponível em: anestesiologiausp.com.br. Acesso em: 18 dez. 2021.

De caráter mais específico, o teste de formalina é utilizado na pesquisa devido à semelhança entre seus mecanismos e a dor clínica subjacente em humanos, já que o animal responde a um processo bifásico da dor. Imediatamente após a administração do agente flogístico, o animal responde por meio de dor moderada oriunda do dano tecidual (LOPES *et al*, 2019; MASOCHA *et al*, 2016). Essa dor neurogênica, ou fase 1, é caracterizada pela ativação direta de nociceptores aferentes primários como, por exemplo, fibras sensoriais do tipo C. Após cerca de 15 minutos, se inicia a fase 2, correspondendo à dor inflamatória, representada pela liberação de mediadores químicos inflamatórios como bradicinina e prostaglandinas (REYNOSO *et al*, 2013).

Um outro teste avalia a dor neuropática causada por estímulo térmico: o teste de retirada de cauda. Nele, é aplicado o estímulo de calor (água quente) e o tempo em que o animal leva para retirar a cauda é registrado. O ato de sacudir a cauda ocorre devido a reflexos espinhais apresentados por animais espinalizados, porém a latência desse movimento se dá por parte do tronco cerebral (CARLINI; MENDES, 2011).

Na literatura, é possível encontrar estudos que corroboram com a ideia de que plantas medicinais podem ser utilizados como uma alternativa viável no manejo da dor. Espécies como *Inula britannica*, *Stevia serrata*, *Psidium brownianum*, *Choisya ternata*, *Cannabis sativa*, *Agastache mexicana*, *Siparuna guianensis* e *Croton blanchetianus* demonstraram potencial antinociceptivo e podem auxiliar no tratamento da dor (ADRIANA ESTRELLA *et al*, 2021; CONEGUNDES *et al*, 2021; CORDEIRO *et al*, 2020; DONALD *et al*, 2021; FREITAS *et al*, 2020; MENEZES *et al*, 2021; ZAREI; MOHAMMADI; KOMAKI, 2018).

3.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas medicinais possuem compostos bioativos que tem como objetivo a proteção do vegetal ao estresse provocado por agentes bióticos e abióticos. Os metabólitos secundários são biomoléculas de baixo peso molecular que, apesar de não serem essenciais para a sobrevivência do vegetal, auxiliam no processo de proteção e adaptação ao meio ambiente (ISAH, 2019; XIANG *et al*, 2019). Nas plantas, os compostos químicos resultantes dos processos da fotossíntese como a glicólise, são utilizados para a síntese de intermediários biossintéticos, sendo a acetil coenzima A (acetilCoA) e os ácidos chiquímico e mevalônico os metabólitos com maior importância, que dão origem, por exemplo, a terpenoides e fenilpropanoides, respectivamente (Figura 3) (BOCHKOV *et al*, 2012; SHI; TU, 2015). Na medicina moderna, algumas plantas ou seus subprodutos fornecem compostos, como extratos e óleos essenciais, para a produção de medicamentos que atuam no tratamento de infecções e outras variedades de doenças (BOY *et al*, 2018; IVANOVA *et al*, 2016).

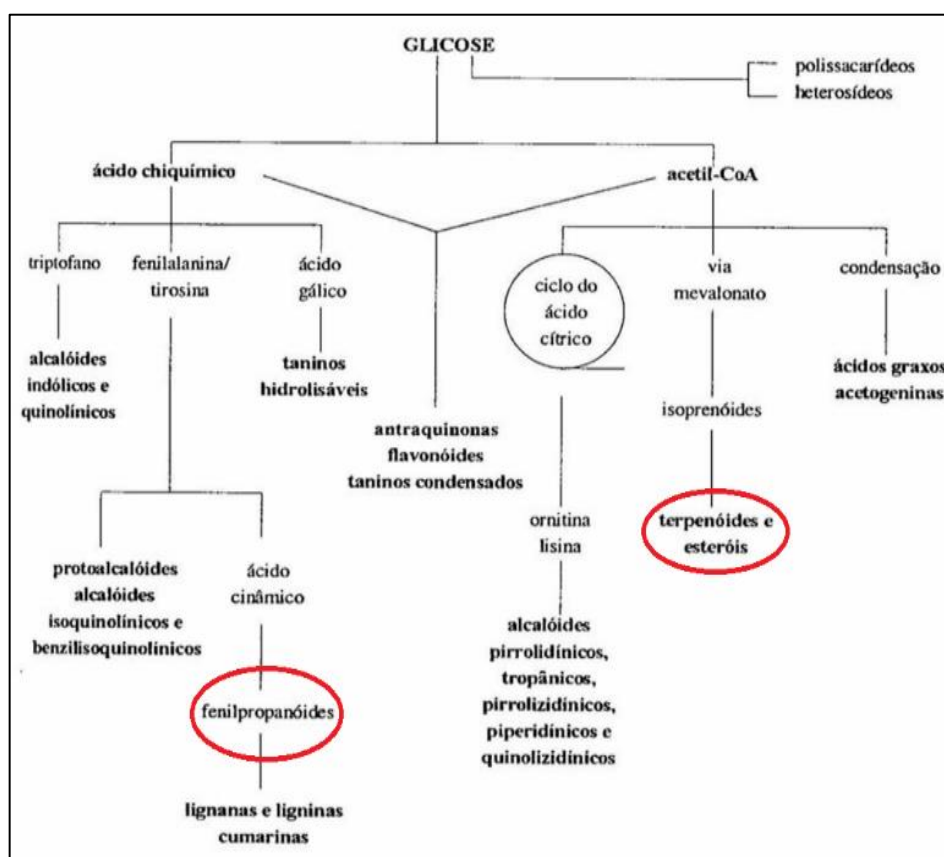
A Organização Internacional de Padronização (do inglês, ISO) define óleos essenciais (OE) como misturas complexas de substâncias com alto grau de volatilidade, lipossolubilidade, de caráter odorífero e consistência líquida a temperatura ambiente, que podem ser obtidas por destilação com água, vapor ou processamento mecânico de cascas cítricas. Também chamados de óleos etéreos ou essências, se diferenciam de óleos fixos por sua facilidade em passar do estado líquido para o gasoso, conferindo aromas agradáveis e intensos (MATI; NAT, 2013; SIMÕES *et al*, 2016).

Devido à capacidade de rápida evaporação, os óleos essenciais possuem baixa estabilidade, podendo ter suas características físico-químicas modificadas, principalmente quando expostos a variações de umidade, luz e calor (SIMÕES *et al*, 2016). No vegetal, sua produção e estocagem podem se dar em órgãos como raízes, rizomas, casca ou madeira dos caules, folhas, flores, frutos ou sementes. Nos tricomas, o óleo essencial se encontra estocado,

cuja liberação se dá após rompimento natural dessas estruturas epidérmicas. Embora o armazenamento possa ocorrer em todas as partes de uma mesma planta, sua composição varia de acordo com a localização em que se encontra (WOLFFENBÜTTEL, 2019).

A extração de óleos essenciais pode se dar por várias técnicas que busquem obter o máximo de metabólitos secundários e sua preservação, como por exemplo a destilação por arraste a vapor, hidrodestilação, enfloração, CO₂ supercrítico e prensagem a frio. O tipo de extração a ser utilizado depende da matéria-prima e do tipo de óleo essencial que se deseja obter, além de propriedades físico-químicas como solubilidade, volatilidade e temperatura de ebulição (MOLLAEI *et al*, 2019; OKTAVIANAWATI *et al*, 2019; QUEZADA-MORENO *et al*, 2019; ŠOJIC *et al*, 2019; YI *et al*, 2018). A escolha adequada da técnica pode propiciar uma maior quantidade de compostos extraídos.

Figura 3 – Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.



Fonte: Adaptado de SIMÕES *et al* (2016).

A grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanoides (formados a partir do ácido chiquímico) e predominantemente terpenoides e compostos terpênicos, como monoterpenos (unidades de isopreno com 10 carbonos) e sesquiterpenos

(três unidades de isopreno com 15 carbonos) (WOLFFENBÜTTEL, 2019). As propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais são inúmeras, dentre elas: atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, anticâncer, antimicrobiana, antiespasmódica, antiparasitária, antifúngica e antioxidante (ISLAM *et al*, 2020; LIMA *et al*, 2020a; MICUCCI *et al*, 2020; OLIVEIRA DE VERAS *et al*, 2020; REZGUI *et al*, 2020; SANTOS *et al*, 2021; SUGIER *et al*, 2019).

3.6 FAMÍLIA Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae é uma das maiores e com maior diversidade das angiospermas, compreendendo aproximadamente 300 gêneros e 8000 espécies. Sua distribuição geográfica se dá predominantemente em áreas de clima tropical e subtropical, com suas espécies presentes principalmente nos continentes africano e americano (LI *et al*, 2019; RAMALHO *et al*, 2018). Devido às suas capacidades de se adaptar a diferentes condições climáticas, é possível encontrar espécies da família Euphorbiaceae em condições desérticas. O hábito dessas plantas pode ser sob a forma de ervas daninhas que crescem rente ao solo, arbustos perenes, cipós trepadeiras e até mesmo árvores de grande porte presentes em florestas tropicais (MWINE; VAN DAMME, 2011).

Os aspectos morfológicos da família foram descritos por Judd *et al* (2009) como: presença ou ausência de látex, folhas geralmente alternas, simples ou lobadas, ocasionalmente compostas, inflorescência cimosa, racemosa, espiciforme ou pseudantial. As flores se apresentam de características unissexuais, dispostas em plantas monoicas ou dioicas, com ausência ou presença de pétalas em tamanhos reduzidos, estames que podem variar de dois a muitos, às vezes dobrados no botão floral. O ovário é súpero, de distribuição 3–4(–5)–locular, com 1 óvulo por lóculo. Os frutos apresentam forma geralmente capsular, 3–5(–5) mericarpos, e sementes com ou sem carúncula.

Com grande potencial de aproveitamento, as espécies da família Euphorbiaceae têm seu uso popular difundido, com utilização para fins ornamentais, alimentícios e medicinais. No Brasil, num total de 149 espécies descritas, os maiores representantes se encontram no gênero *Croton*, com 58 espécies, *Euphorbia*, que conta com 13, seguido por *Jatropha*, com 9 espécies. Dentre as espécies com potencial etnofarmacológico pode-se citar *Euphorbia prostata* (quebras-pedras) usada em quadros de cálculos renais; *Euphorbia hirta* (Sete-sangrias) como agente anti-inflamatório (AITA; MATSUURA; MACHADO, 2009; AL-SNAFI, 2017; JOSÉ; TRINDADE; LAMEIRA, 2012); *Croton lechleri* (sangue de dragão) e

Jatropha multifida (flor de coral) utilizadas como cicatrizante de feridas e úlceras gástricas; e *Jatropha gossypifolia* (pinhão-roxo) no alívio de cefaleias (ALMEIDA-PEREIRA *et al*, 2019; SOARES; BARBOSA; SILVA, 2020).

O potencial farmacológico da família Euphorbiaceae se dá pela grande variedade de metabólitos secundários encontrados, que incluem alcaloides, flavonoides, terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos), cumarinas e peptídeos cíclicos (CAVALCANTE *et al*, 2020; KAUR *et al*, 2017; OLIVEIRA-TINTINO *et al*, 2018). Essa diversidade farmacológica reitera o grande potencial de extratos bioativos, óleos essenciais e compostos puros obtidos de plantas da família Euphorbiaceae, que podem ser utilizados como alternativas terapêuticas a diversos tipos de doenças (SALEHI *et al*, 2019).

3.6.1 Gênero *Croton*

O gênero *Croton*, pertencente à tribo Crotoneae, é o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae, possuindo cerca de 1200 espécies, que se encontram predominantemente no continente americano. Na América do Sul, o Brasil compreende grande parte dessas espécies, aproximadamente 300, sendo 68 delas exclusivas da Caatinga, enquanto as outras distribuem-se no Cerrado, Amazônia e Mata Atlântica (BERRY *et al*, 2005; SILVA *et al*, 2010; CORDEIRO *et al*, 2020). As espécies do gênero *Croton* são encontradas geralmente na forma de subarbustos, porém apesar de menos frequente, podem ser encontradas na forma de árvores. O látex possui aspecto claro ou colorido (RIINA; BERRY; VAN EE, 2009).

Testes de caracterização em extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *Croton draco* indicaram a presença de compostos fenólicos, terpenos (sesquiterpenos), alcaloides e saponinas, metabólitos também presentes em extrato de caule de *Croton macrostachyus* (AYZA *et al*, 2020; MORALES *et al*, 2020). Nos óleos essenciais de folhas de *Croton argyrophyllus* e *Croton heliotropiifolius*, foram identificados terpenos (biciclogermacreno, α -pineno, β -pineno e cariofileno), compostos também presentes em *Croton ceanothifolius* (BRITO *et al*, 2018; ARAÚJO *et al*, 2020). Os óleos essenciais de folhas e flores de *Croton campestris* e *Croton kimosorum* apontaram a presença de β -cariofileno, 1,8-cineol e germacreno D (OLIVEIRA-TINTINO *et al*, 2018; RABEHAJA *et al*, 2014).

Estudos prévios mostraram o potencial farmacológico dos representantes do gênero, como *Croton betaceus* e *Croton lundianus* em que as frações dos extratos apresentaram potencial antimicrobiano e antioxidante (ROCHA *et al*, 2021). Estudo realizado por Lima *et al* (2020) mostrou o potencial do óleo essencial das folhas de *Croton zehntineri* no tratamento

de dor aguda, assim como os extratos etanólicos das folhas de *Croton tetradenius* e *Croton pulegioidorus* que exibiram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (DONALD *et al*, 2021). Já a *Croton cassifolius* mostrou ação anti-inflamatória em modelo de colite ulcerativa (JIANG; PANDA; GEKARA, 2019), ao mesmo tempo em que atividade anticâncer foi relatada para *Croton caudatus*, que gerou danos ao DNA de células tumorais (SUBHASWARAJ *et al*, 2017). Ao avaliar o efeito cardioprotetor do extrato hidrometanólico da casca do caule de *Croton macrostachyus*, Ayza *et al* (2020) constataram que esta planta exerceu efeito cardioprotetor, podendo atuar como potencial terapêutico no tratamento de cardiotoxicidade induzida por ciclofosfamida.

3.6.2 *Croton blanchetianus* Bail

Croton blanchetianus, conhecida popularmente como “marmeleiro preto” ou “marmeleiro escuro”, devido à aparência enegrecida de seu tronco, podendo ser encontrada predominantemente em regiões de cerrado e Caatinga. No Brasil, é possível encontrá-la nos estados que compõem o semiárido do nordeste brasileiro como Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (TORRES *et al*, 2020).

Trata-se de uma planta com característica de arbusto, cujo tamanho pode alcançar até 6 m de altura. Ramoso, com folhas simples, que medem de 10 a 14 cm de comprimento e 5 a 7 cm de largura, de formato elítico-ovaladas, pilosas, providas de estípulas grandes, em especial nos ramos jovens. Os pecíolos apresentam flores com brácteas linear-lanceoladas, pequenas, esbranquiçadas, em espigas terminais. O fruto apresenta cápsula de deiscência explosiva, com sementes oleaginosas e brilhantes. A Figura 4 mostra algumas das partes do vegetal, como a disposição das flores e o aspecto morfológico da planta (SANTANA, 2009; OLIVEIRA e RODRIGUES, 2018).

Além disso, possui aspecto abundante, caráter arbustivo, e a capacidade de formar populações densas, devido a seu crescimento acelerado e rápida multiplicação. É classificada como planta semidecídua, em razão da perda de pelo menos 50% de suas folhas a cada ano durante o período de estiagem; contudo, no período de chuvas, imediatamente rebrota e se desenvolve, formando densa e extensa cobertura vegetal. Devido a essa característica, torna-se uma alternativa para restauração de áreas degradadas (MAIA-SILVA *et al*, 2012; SILVA *et al*, 2010).

Utilizada pela população para o tratamento de hemorragias, distúrbios gastrintestinais, reumatismo, vômito e diarreia, *Croton blanchetianus* tem sido alvo de estudos acerca de seu

potencial farmacológico, sendo possível encontrar na literatura relatos de atividades antinociceptiva em extrato etanólico (FREITAS *et al*, 2020), anti-inflamatória (DE OLIVEIRA *et al*, 2017), antiparasitária (MELO *et al*, 2013), antimicrobiana (LEITE *et al*, 2017; SÁ FIRMINO *et al*, 2019), antioxidante (AQUINO *et al*, 2017; RODRIGUES *et al*, 2017), gastroprotetora e miorrelaxante presentes em óleos essenciais (PINHO-DA-SILVA *et al*, 2010).

Espécie rica em metabólitos secundários, *C. blanchetianus* tem os terpenoides como metabólitos predominantes em óleos essenciais, principalmente monoterpenos e sesquiterpenos. Pode-se encontrar também alcaloides, ácidos cinâmicos, taninos condensados, flavonoides, saponinas e açúcares redutores em extratos etanólicos. (FREITAS *et al*, 2020; PEREIRA *et al*, 2020).

Figura 4 – *Croton blanchetianus* Baill



Fonte: O autor.

4 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados sob a forma de artigos.

4.1 Artigo 1 – Óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* Baill não apresenta toxicidade oral aguda, tem ação antigenotóxica e reduz a nocicepção neurogênica e inflamatória em camundongos

Matheus Ferreira do Nascimento^a, Wêndeo Kennedy Costa^a, Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar^b, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^b, Alisson Macário de Oliveira^a, Thiago Henrique Napoleão^a

^a*Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco Brazil.*

^b*Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

Resumo

Croton blanchetianus Baill., popularmente conhecida como “marmeleiro preto”, é uma planta endêmica do Brasil, sendo encontrada principalmente no Nordeste. O presente trabalho descreve a caracterização química, bem como avaliação toxicológica e atividade antinociceptiva do óleo essencial de folhas de *C. blanchetianus*. Os constituintes químicos do óleo foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Atividade hemolítica *in vitro* foi testada usando sangue de camundongos. A toxicidade aguda em camundongos foi avaliada pela administração de dose única de 2000 mg/kg por via oral. O óleo essencial também foi avaliado quanto à genotoxicidade e antigenotoxicidade *in vivo* (1000 e 2000 mg/kg) empregando-se o teste de micronúcleo. A atividade antinociceptiva do óleo (25, 50 e 100 mg/kg) foi avaliada através dos testes de contorção abdominal, da formalina e de movimento de cauda. A caracterização química indicou como componentes majoritários α -pineno (21,23%), β -felandreno (13,92%), terpinoleno (13,01%) e germacreno D (10,89%). O óleo essencial não causou hemólise. Também não se mostrou tóxico nem genotóxico por via oral, ao passo que protegeu células da medula óssea dos animais dos danos causados pela ciclofosfamida. Foi observada redução das contorções abdominais (69,43–

89,41%) e do número de lambidas na primeira (38,77–84,47%) e segunda (59,75–90,74%) fase no teste de formalina. Nesse último caso, os efeitos foram reduzidos por naloxana e glibenclamida, indicando ação via sistema opioide e bloqueio de canais de K⁺. O tempo de latência no teste de movimento de cauda também aumentou de maneira significativa. Em conclusão, a ingestão do óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus* se mostrou segura pelo teste de toxicidade aguda e resultou em ação antinociceptiva.

Palavras-Chaves: Atividade antinociceptiva. *Croton blanchetianus*. Plantas medicinais. Toxicidade aguda.

Introdução

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*), a dor é “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial”. A persistência de estímulos lesivos por longos períodos aumentam os sinais de dor, produzem hipersensibilidade e ocasionam quadros de dor crônica (SANTANA *et al*, 2020; NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKES, 2021). Atualmente, estima-se que cerca de 20,5% da população mundial é acometida pela dor crônica, o que equivale a aproximadamente 1,6 bilhão de pessoas (ZELAYA *et al*, 2020).

A farmacoterapia da dor se baseia no uso de analgésicos não opioides (dor leve a moderada) e analgésicos opioides (dor crônica). Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e analgésicos adjuvantes, os quais são medicamentos que são geralmente utilizados para tratar outros problemas, como convulsões ou depressão, também podem aliviar a dor. Entretanto, medicamentos utilizados no tratamento da dor crônica possuem alta capacidade de gerar efeitos adversos e dependência, como no caso de opioides (WANG *et al*, 2018; CARBALLO-VILLALOBOS *et al*, 2018).

As plantas medicinais vêm desempenhando um papel importante em estudos científicos como ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos que visem a redução de efeitos colaterais e atuem na regulação da dor (ZAOUALI *et al*, 2010). Dentre as espécies com potencial farmacológico, tem-se a *Croton blanchetianus* Baill. (Euphorbiaceae). Conhecida popularmente como “marmeleiro preto”, pode ser encontrada no semiárido do nordeste brasileiro (Caatinga) em regiões de Cerrado (MELO *et al*, 2013). As folhas e cascas do caule são usadas popularmente para tratar distúrbios gastrintestinais (OLIVEIRA *et al*,

2022), reumatismo (MELO *et al*, 2013), e dores de cabeça (DANTAS *et al*, 2022). Rico em monoterpenos e sesquiterpenos, o óleo essencial possui potencial antimicrobiano contra *Streptococcus parasanguinis* e *Streptococcus mutans* e sua capacidade antioxidante, o extrato etanólico de *C. blanchetianus* vem se mostrando um possível agente antinociceptivo, além de propriedades anti-inflamatória e analgésica (AQUINO *et al*, 2017; RODRIGUES *et al*, 2019; SÁ FIRMINO *et al*, 2019; FREITAS *et al*, 2020;).

Óleos essenciais (OEs) podem ser definidos como misturas de metabólitos secundários que, em condições normais, possuem alto grau de lipofilicidade e volatilidade (RÍOS, 2016). Provenientes de material vegetal, podem ser obtidos por técnicas como hidrodestilação, arrasto a vapor e enfloração (RÍOS, 2016). A maioria dos óleos são caracterizados pela presença majoritária de mono e sesquiterpenos, possuindo aplicações medicinais devido a suas propriedades terapêuticas, tais como atividades antimicrobiana (VASCONCELOS; PAGANINI, 2022), anti inflamatória (MARTINS *et al*, 2017), anticâncer (DE LIMA *et al*, 2018) e antinociceptiva (DE OLIVEIRA *et al*, 2017).

Apesar de serem de origem vegetal, é de fundamental importância avaliar a segurança no uso de óleos essenciais. Para isso, recomenda-se testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo* emitidos por órgãos regulatórios, com o intuito de minimizar os relatos de intoxicações e efeitos indesejados no uso de plantas medicinais (AYDIN; AKTAY; YESILADA, 2016). Os candidatos a fitoterápicos são submetidos a testes de citotoxicidade *in vitro*, toxicidade aguda e de doses repetidas, genotoxicidade, carcinogenicidade, além de testes adicionais como avaliação de toxicidade gastrointestinal, renal, hepatotoxicidade e interação medicamentosa (AYDIN; AKTAY; YESILADA, 2016).

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a toxicidade oral aguda e possíveis efeitos adversos a nível hematológico, bioquímico e histopatológico, além de atividade antinociceptiva do óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* em camundongos.

Materiais e métodos

Material vegetal

Folhas de *C. blanchetianus* foram coletadas no município de Santa Terezinha (07° 02' 20" S, 37° 26' 43" W), localizado no nordeste do Brasil, no estado de Pernambuco. Os espécimes foram identificados e uma exsicata de número 93.062 foi preparada e depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA/PE). O

estudo foi registrado (no. AEC4F6E) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.

Extração e caracterização química do óleo essencial

As folhas foram submetidas à hidrodestilação durante três horas num aparelho do tipo Clevenger e o óleo essencial de folhas de *C. blanchetianus* (OECb) foi estocado em vidro âmbar em temperatura de 5 °C antes de ser submetido à análise química e bioensaios. Análise por cromatografia gasosa (CG) foi realizada para determinar as proporções relativas dos componentes do óleo essencial, em um cromatógrafo Thermo Trace GC Ultra equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida VB-5 (ValcoBond 30 m × 0,25 mm i.d; espessura: 0,25 µm). O nitrogênio foi empregado como gás transportador a uma taxa de fluxo de 1 L/min e pressão de entrada de 30 psi. A quantidade relativa de cada componente foi estimada a partir da área de pico correspondente e expressa como uma porcentagem da área total do cromatograma. As análises foram realizadas em triplicata.

A identificação dos compostos presentes no óleo essencial foi realizada por CG associada à espectrometria de massa (CG-EM). Essas análises foram realizadas usando um instrumento quadripolar Agilent série 5975C GC/MSD, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 não polida Agilent J; W (30 m × 0,25 mm: espessura: 0,25 µm). Para cada amostra, injetou-se 1 µL no modo *split* (50:1). Hélio foi utilizado como um gás transportador a um fluxo de 1 mL/min, mantido a uma pressão constante de 7.0 psi. Temperaturas foram definidas para 230 °C e 150 °C, respectivamente. Os espectros de massa foram obtidos a 70 eV (no modo EI) com uma velocidade de 1.0 varredura de m/z 35-350. A identificação dos componentes individuais foi realizada em comparação com os valores de índices de retenção previamente reportados, obtidos por co-injeção de amostras de óleo essencial e um conjunto de hidrocarbonetos lineares C9-C30, e calculados de acordo com a equação de van den Dool e Kratz (1963). Posteriormente, os dados de EM foram combinados com os dados disponíveis na biblioteca espectral de massa do sistema: MassFinder 4 (consultoria científica Dr. Hochmuth, Hamburgo, Alemanha); Biblioteca Espectral de Massa NIST08 (ChemSW Inc. Fairfield, CA, EUA); Wiley RegistryTM da Relação Espectral de Massa, 9ª edição (Wiley, Hoboken, NJ, EUA) e com outros dados espectrais de massa publicados (Adams, 2009). As análises foram realizadas em triplicata.

Experimentos *in vivo*

Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas com 50 dias de idade e pesando entre 30–35g, provenientes do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami e ambientados por 5 dias no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Bioquímica, ambos da Universidade Federal de Pernambuco, mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12h e acesso a água e comida *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Pernambuco (nº 0092/2019).

Ensaio de atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica do OECb foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Costa *et al* (2020). O sangue foi obtido de camundongos através da técnica de punção cardíaca, sendo o material armazenado em tubos de ensaio contendo ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e submetido à centrifugação (3000 rpm por 10 min). Em seguida, homogeneizou-se o *pellet* celular com solução salina (NaCl 0,9%) para se obter uma suspensão a 2% (v/v). Soluções do óleo foram adicionadas em placas de 96 poços e incubadas com a suspensão de eritrócitos por 60 min a 28°C . As concentrações finais do óleo nos poços variaram de 0,250 a 10,0 mg/mL e os ensaios foram realizados em triplicata. Passado o tempo de incubação, o processo de centrifugação foi repetido, sendo utilizado o sobrenadante para análise da absorbância a 680 nm, com o objetivo de quantificar a quantidade de hemoglobina liberada. O controle positivo utilizado no bioensaio foi o Triton X-100 (100% de hemólise).

Toxicidade aguda

A toxicidade aguda do OECb foi avaliada de acordo com as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2001). Os camundongos foram divididos em grupos de 3 animais. Os grupos tratados receberam o óleo essencial (2000 mg/kg p.c.) por via intraperitoneal (i.p.) ou por via oral (v.o.), enquanto os grupos controles receberam solução salina (NaCl 0,9%) i.p. ou v.o. Respostas comportamentais dos camundongos correlacionadas a possíveis atividades depressivas ou estimulantes foram observados durante 60 min após a administração da dose e diariamente por 14 dias. Durante todo o período, foram analisados massa corpórea, ingestão de ração e água. Ao final dos 14

dias, os animais foram sacrificados, sendo feita a coleta de sangue por punção cardíaca, e armazenado em tubos sem anticoagulante e contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético). O material biológico (fígado, rins e baço) foi retirado para análise histopatológica.

Com auxílio de microscopia de luz e analisador automático (Animal Blood Counter: ABC Vet, Montpellier, France), foram avaliados parâmetros da série vermelha como: quantitativo de eritrócitos e hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular médio (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular médio (CHCM). Além disso, foi analisado série branca. A análise bioquímica avaliou níveis de albumina, transaminases (alanina aminotransferase – ALT ; aspartato aminotransferase – AST), proteínas totais, fosfatase alcalina, gama glutil transferase (GGT), creatinina, colesterol total e triglicerídeos. Os kits utilizados foi o Labtest Diagnostic (Lagoa Santa, Brasil) e um analisador COBAS Mira Plus (Roche Diagnostics Systems, Basileia, Suíça).

Avaliação de genotoxicidade

Para análise de possíveis danos genéticos induzidos pelo OECb, foi realizado o teste de micronúcleo (MN) em amostra de medula óssea de camundongos Swiss. Para isso, os animais foram distribuídos uniformemente e de maneira aleatória em três grupos experimentais (n = 10 por grupo). O grupo tratado recebeu o OECb (1000 e 2000 mg/kg, v.o.), enquanto o grupo controle positivo recebeu ciclofosfamida (40 mg/kg i.p.) e o controle negativo recebeu por solução salina v.o.

Cinco animais de cada grupo foram sacrificados 24 h após o tratamento e os outros 5 sacrificados nas 24 h subsequentes. A coleta da medula óssea do fêmur foi realizada com solução salina (2 mL) e o material foi submetido à centrifugação (7 min). Após o tempo estimado, 10 µL de medula óssea foram adicionados em lâminas e acrescidos de corante laranja de acridina para análise de micronúcleos com auxílio de microscópio de fluorescência. O quantitativo de 2000 eritrócitos policromáticos por lâmina foi investigado para avaliar o número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE), assim como a razão entre eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE).

Ensaio de antigenotoxicidade

Para análise da antigenotoxicidade, os animais foram separados em grupos (n = 10 por

grupo) que foram tratados com OECb (1000 e 2000 mg/kg, v.o.) ou solução salina v.o. (controle positivo) e, após 1 h, receberam ciclofosfamida (80 mg/kg i.p.). Controles negativos corresponderam a grupos de animais que receberam OECb nas duas doses e não receberam a injeção de ciclofosfamida. O teste de micronúcleo foi realizado como descrito anteriormente. O efeito antigenotóxico (% de redução) foi avaliado segundo Waters *et al* (1990) através da equação:

$$\% \text{ redução} = \frac{CP - T}{CP - CN} \times 100$$

Onde CP, T e CN correspondem ao número médio de células micronucleadas no controle positivo, tratamento (OECb) e controle negativo, respectivamente.

Avaliação de atividade antinociceptiva

Teste de contorção abdominal

Os animais foram divididos em 5 animais por grupo, que receberam OECb por via oral (25, 50 e 100 mg/kg), solução salina v.o. (controle negativo), morfina (5 mg/kg i.p.) ou indometacina (20 mg/kg i.p.) 1 h antes da administração, por via intraperitoneal, de ácido acético a 0,8% (v/v) em solução salina. Para análise da nocicepção, foram contados o número de contorções abdominais durante 20 min.

Teste da formalina

Os grupos tratados receberam por via oral o OECb (25, 50 e 100 mg/kg), enquanto o grupo controle negativo recebeu solução salina (v.o.), morfina (5 mg/kg i.p.) ou indometacina (20 mg/kg i.p.) como controles positivo. Após 30 min, administrou-se a formalina (2,5%, v/v) na região subplantar da pata traseira direita de camundongos. A resposta nociceptiva foi avaliada determinando-se o tempo (em segundos) de cada lambida da pata durante os 5 min iniciais (fase neurogênica) e durante intervalo de tempo entre 15 e 30 min após a injeção da formalina (fase inflamatória).

Teste de movimento de cauda

Para o teste térmico de movimento (retirada) de cauda, foi inicialmente realizada uma pré-seleção dos animais. Para isso, as caudas foram imersas em água morna (55 ± 1 °C) e os camundongos que removeram suas caudas em menos de 5 s foram selecionados para o ensaio. Após a triagem, os animais foram distribuídos em 5 animais por grupo, que receberam OECb (25, 50 e 100 mg/kg v.o.), solução salina v.o. (controle negativo) ou morfina 10 mg/kg i.p. (controle positivo). O período de latência (tempo requerido para cada camundongo remover a cauda) foi determinado 0, 30, 60 e 120 min após a administração dos tratamentos. Um período de latência de 20 s foi considerado analgesia completa e a cauda foi retirada para evitar lesões.

Investigação de mecanismos de atividade antinociceptiva

Os camundongos foram pré-tratados com solução salina (controle), naloxona (antagonista opioide, 1,5 mg/kg, i.p.), glibenclamida (bloqueador dos canais K^+ -ATP, 2 mg/kg, i.p.), atropina (antagonista colinérgico muscarínico não seletivo, 1 mg/kg, i.p.), iombina (bloqueador de receptores alfa-2-adrenérgicos pré-sinápticos) e prazosina (bloqueador de receptores alfa-1-adrenérgico pós-sináptico) 30 min antes da administração da dose do óleo essencial (100 mg/kg) por via oral. Após 60 minutos, os animais foram submetidos ao teste de formalina.

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados no GraphPad Prism® versão 8.0 e expressos em valores médios com desvio padrão ($\pm$ DP). As diferenças estatisticamente significantes foram calculadas usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni ou Dunnett's (quando necessário). Os valores foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$ para avaliação da toxicidade e $p < 0,001$ para os testes de atividade antinociceptiva.

Resultados e discussão

Um total de 24 compostos foram identificados no óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus*, sendo a classe dos terpenos predominante, com presença majoritária de mono

e sesquiterpenos. A Tabela 1 mostra os compostos do óleo essencial, seu índice de retenção e os valores médios do teor (%) de cada um. Os principais compostos encontrados foram o α -pineno (21,23%), β -felandreno (13,92%), terpinoleno (13,01%) e germacreno D (10,89%).

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus*.

Óleo essencial de folhas de <i>Croton blanchetianus</i>				
Índice de retenção				
Composto ^a	Calculado ^b	Literatura ^c	%	D.P.
α -tujeno	924	924	1,19	0,01
α-pineno	932	931	21,23	0,08
Canfeno	946	945	0,33	0,01
Sabineno	969	971	3,24	0,03
β -pineno	974	973	1,61	0,02
Mirceno	988	990	1,67	0,01
α -felandreno	1002	1002	3,12	0,02
α -terpineno	1014	1015	1,27	0,02
ρ -pineno	1020	1023	0,63	0,01
β-felandreno	1025	1027	13,92	0,03
1,8-cineol	1026	1029	6,4	0,05
γ -terpineno	1054	1057	1,83	0,02
Terpinoleno	1086	1087	13,01	0,07
α -copaeno	1374	1376	0,41	0,01
β -elemeno	1389	1392	1,21	0,02
(E)-cariofileno	1417	1420	6,06	0,03
Aromadendreno	1439	1441	2,56	0,02
α -humuleno	1452	1454	0,94	0,01
Allo-aromadendreno	1458	1462	0,82	0,01
γ -muuruleno	1478	1477	0,48	0,01
Germacreno D	1480	1482	2,64	0,03
Biciclogermacreno	1500	1498	10,89	0,04
δ -cadineno	1522	1524	0,93	0,01
Espatulanol	1577	1580	1,45	0,02
			97,84	

Fonte: O autor.

Os compostos encontrados neste trabalho corroboram com estudos presentes na literatura para espécies de *Croton* que mostram os terpenoides como os principais compostos presentes em óleos de plantas desse gênero (OLIVEIRA *et al*, 2018). Rodrigues *et al* (2019) também identificaram a presença predominante de monoterpenos e sesquiterpenos em óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus*. Contudo, os compostos majoritários presentes no óleo essencial foram o cedrol, eucaliptol e o α -pineno, que divergem dos encontrados no presente estudo. Os óleos essenciais de folhas de *Croton limae* e *Croton tetradenius* também apresentaram α -pineno e β -cariofileno em sua constituição (ALMEIDA-PEREIRA *et al*, 2019; BRITO *et al*, 2020; LEITE *et al*, 2017), enquanto os óleos de folhas de *Croton rudolphianus* (RIBEIRO *et al*, 2020) e *Croton argyrophyllus*, também continham biciclogermacreno (ARAUJO *et al*, 2020).

Diante disso, as variações observadas na composição química de óleos essenciais oriundos de plantas de mesma espécie podem ser explicadas pela diferença de fatores ambientais como clima, umidade relativa, variações geográficas, ou a estação do ano em que foi realizada a colheita. Além do mais, fatores genéticos, morfológicos e nutricionais podem contribuir para essas dessemelhanças (ÖZCAN e CHAICHAT, 2005).

No ensaio de atividade hemolítica, a incubação do OECb com os eritrócitos de camundongo não resultou em hemólise maior que 2,0%, quando comparado ao controle positivo, Triton X-100. Esse resultado indica a ausência de efeito hemolítico. O modelo eritrocitário tem sido amplamente utilizado como forma de avaliar a interação de drogas com membranas celulares, podendo indicar a toxicidade de compostos a nível celular (GRECO *et al*, 2020). Outros óleos essenciais de *Croton* foram estudados quanto à atividade hemolítica, tais como o óleo essencial de folhas de *Croton linearis*, que também não apresentou efeito hemolítico (AMADO *et al*, 2020). Além disto, o óleo de frutas frescas de *Croton macrostachyus* apresentou resultados satisfatórios em testes citotóxicos, proporcionando segurança em seu uso (SALLAU *et al*, 2018).

No teste de toxicidade aguda, não foram observadas alterações comportamentais nem mortalidade no grupo tratado com OECb por via oral em comparação com o grupo controle. Além disso, não houve alterações significativas relacionadas a consumo de água e de ração e ganho de massa corpórea durante o tratamento (Tabela 2). Por outro lado, os animais que receberam o óleo essencial por via intraperitoneal morreram em aproximadamente 15 min após o início da observação. A administração de drogas por via intraperitoneal pode induzir quadros de peritonite química induzida por drogas, levando o animal a óbito (AL SHOYAIB;

ARCHIE; KARAMYAN, 2020). Sendo assim, as análises subsequentes foram realizadas somente com os animais que receberam o óleo por via oral.

Tabela 2 – Avaliação do consumo de ração, água e ganho de peso dos animais do controle ou tratados por 14 dias com o óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* por via oral.

Parâmetros	Controle	Óleo essencial 2000 mg/kg v.o
Consumo de água (mL)	35,69±0,21	36,16±0,37
Consumo de ração (g)	13,8±0,35	14,3±0,45
Ganho de peso (g)	5,7±0,22	6±0,2

Fonte: O autor. Nenhuma diferença significativa foi encontrada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O grupo controle recebeu veículo (soro fisiológico a 0,9%).

O fígado possui papel fundamental no metabolismo de vários tipos de drogas, sendo responsável também pela desintoxicação e produção de compostos excretáveis solúveis (ALAMRI, 2018). Contudo, a exposição a doses tóxicas de compostos pode induzir a lesão hepática (RAUL *et al*, 2019). A análise bioquímica do sangue não mostrou alterações significativas nos níveis de aspartato transaminase, alanina transaminase, fosfatase alcalina, creatinina, glicose, colesterol total e bilirrubina nos animais que receberam por OECb por via oral quando comparados com o grupo controle (Tabela 3). Esses resultados indicam ausência de efeitos danosos ao fígado dos animais.

Com relação aos parâmetros hematológicos relacionados à série vermelha (CHCM, VCM, hematócrito, hemoglobina) e à contagem de leucócitos (neutrófilos, linfócitos e monócitos) também não houve diferenças significativas quando comparadas ao grupo controle (Tabela 4). Compostos tóxicos exercem forte influência sobre a hematopoiese, se tornando um parâmetro fundamental na avaliação do estado fisiológico e patológico em homens e animais (RAMAIAH; BOUNOUS; ELMORE, 2013). Ainda, danos diretos ou indiretos às células sanguíneas podem gerar prejuízos potencialmente fatais, como, por exemplo, a hipóxia como agente precursor de necrose tecidual.

Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos controle e tratados por 14 dias com óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* por via oral.

Parâmetros	Tratamentos	
	Controle	Óleo essencial 2000 mg/kg v.o
Albumina (g/dL)	3,24±1,03	3,68±1,10
ALT (U/L)	88,76±4,20	90,66±4,23
AST (U/L)	91,58±5,37	89,95±5,28
Fosfatase alcalina (UI/L)	11,07±0,88	10,85±0,91
GGT (U/L)	10,76±0,39	10,90±0,45
Proteínas totais (g/dL)	11,34±1,32	11,55±1,10
BUN (mg/dL)	0,82±0,19	0,97±0,25
Creatinina (mg/dL)	4,65±0,53	4,86±0,70
Bilirrubina	0,76±0,40	0,82±0,31
Colesterol total (mg/dL)	90,66±4,55	91,67±1,26
Triglicerídeos (mg/dL)	76,24±6,38	73,99±0,78

Fonte: O autor. ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama glutamil transferase; BUN: nitrogênio da uréia no sangue. Os valores representam a média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em comparação com o controle.

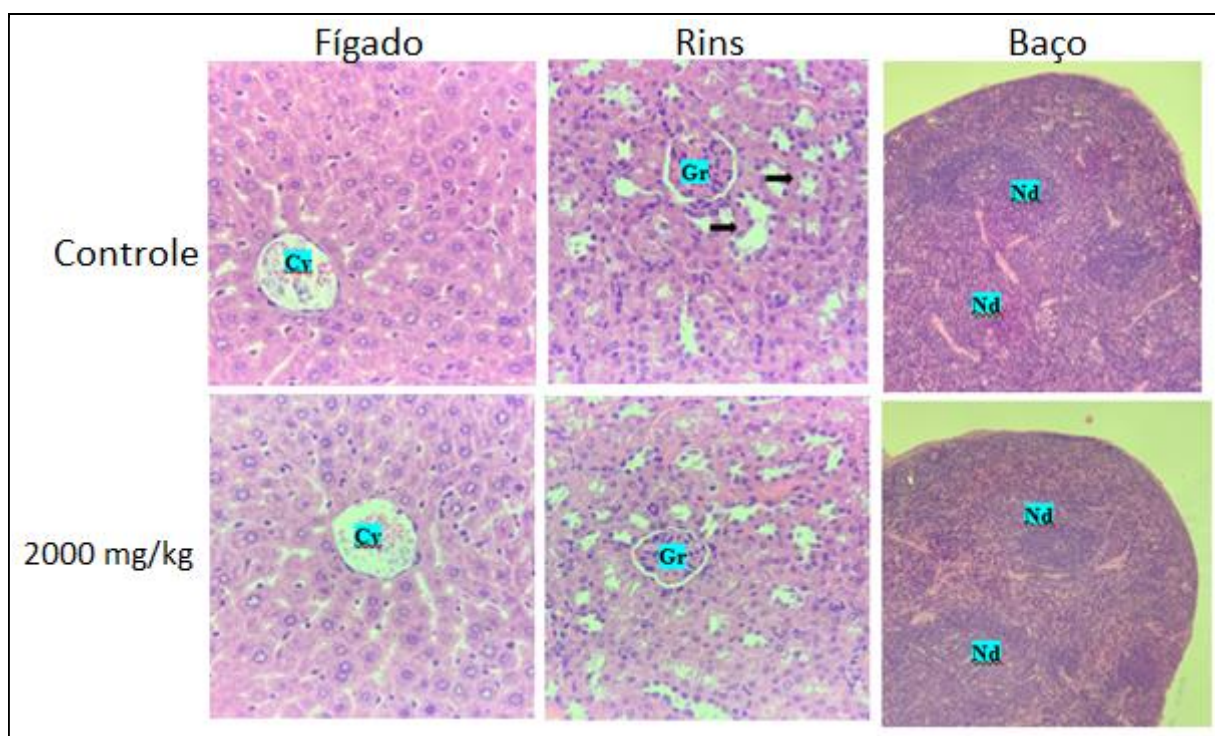
Tabela 4 – Parâmetros hematológicos de camundongos de controle e tratados por 14 dias com o óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* por administração oral na dose de 2000 mg/kg.

Parâmetros	Tratamentos	
	Controle	Óleo essencial 2000 mg/kg v.o
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	9,54±0,19	9,65±0,26
Hematócritos (%)	38,15±2,13	37,9±0,31
Hemoglobina (%)	14,76±0,91	15,46±0,21
VCM (%)	46,36±3,10	43,45±0,98
HCM (%)	23,17±1,50	24,25±1,59
CHCM (%)	34,06±3,01	35,86±1,59
Segmentados (%)	50,34±0,18	51,1±0,22
Linfócitos (%)	26,11±0,28	27,35±1,51
Monócitos (%)	2,18±0,19	2,6±0,19
Basófilos (%)	0,04±0,01	0,05±0,02
Eosinófilos (%)	1,50±0,20	1,45±0,19

Fonte: O autor. MCV: volume corpuscular médio. MCH: hemoglobina corpuscular média. MCHC: concentração média de hemoglobina corpuscular. Os valores representam a média ± SEM. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em comparação com o controle.

Análises histopatológicas de fígado, baço e rim de animais dos grupos controle e tratados foram realizadas e imagens representativas estão apresentadas na Figura 1. Os fígados de animais do grupo controle apresentaram estrutura preservada com cordões hepáticos lineares, espaço portal com contornos normais e veia centrilobulares de calibre regular. Nos baços, foi possível visualizar as polpas branca e vermelha com contornos bem definidos. Os rins apresentaram as regiões cortical e medular bem delimitadas, com ausência de vacuolização, néfrons com cápsula de Bowman preservada e espaço intercapsular sem alterações. Os órgãos dos animais dos grupos tratados com OECb apresentaram características similares ao grupo controle, não sendo detectada nenhuma alteração.

Figura 1 – Fotomicrografias representativas dos fígados, rins e baços de camundongos fêmeas do grupo controle ou tratado com óleo essencial de folhas de *C. blanchetianus* na dose de 2.000 mg/kg por administração oral.



Fonte: O autor. Fígado: veia centrilobular (Cv) visualizadas em todas as imagens. Rins: Glomérulos renais (Gr) e túbulos torcidos sem alterações são visíveis nos grupos controle e tratado com óleo essencial. Aspecto venoso e túbulos normais (setas). Baço: os linfonodos (Nd) são bem definidos nos grupos controle e tratado por via oral.

A coloração com hematoxilina-eosina foi usada. Ampliação: 400x.

O teste de micronúcleo tem como objetivo identificar possíveis alterações a nível cromossômico em células que foram previamente expostas a agentes xenobióticos. Essas alterações se dão pelo aumento do número de eritrócitos policromáticos com micronúcleos,

que consistem em fragmentos de DNA que não foram inseridos no núcleo durante a mitose (JIANG, PANDA e GEKARA, 2019; UCHÔA e MAGALHÃES, 2020). Os resultados obtidos no teste de micronúcleo mostraram que, nas primeiras 24 horas, a administração do OECb nas doses de 1000 e 2000 mg/kg não induziu o aumento do número de MNPCE na medula óssea de maneira significativa ($p > 0,05$) quando comparadas ao grupo controle, o que também foi observado nas 24 horas subsequentes (Tabela 5). Os resultados apresentados mostram que o OECb não possui efeito genotóxico nas doses testadas. Em contrapartida, a ciclofosfamida ocasionou a formação de micronúcleos cerca de 20 vezes mais quando comparado ao controle negativo, reiterando seu potencial mutagênico.

Tabela 5 – Avaliação da genotoxicidade *in vivo* do óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* (administração oral) ou ciclofosfamida de controle positivo (CPA, i.p.) pela determinação do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) da medula óssea de camundongos.

Tratamentos	Tempo de coleta	Número de MNPCE por animal					Média MNPCE
		M1	M2	M3	M4	M5	
Controle negativo	24h	0	1	1	1	0	0,60±0,02
	48h	1	1	1	0	1	0,80±0,02
Óleo essencial							
1000 mg/kg	24h	0	0	1	1	1	0,60±0,02
	48h	0	1	1	1	1	0,80±0,02
2000 mg/kg	24h	1	0	0	0	2	0,60±0,03
	48h	1	0	1	0	2	0,80±0,02
CPA 40 mg/kg i.p.	24h	22	21	24	20	20	21,40±2,30*
	48h	20	20	19	24	19	20,40±2,12*
CPA: ciclofosfamida							

Fonte: O autor. No controle negativo, os camundongos receberam solução salina por via oral. (*) Diferenças significativas do controle ($p < 0,05$).

Silva *et al* (2020) relataram que o extrato metanólico de folhas de *Croton*

antispyhiliticus não apresentou atividade genotóxica em eritrócitos de camundongos quando submetidos ao teste de micronúcleo. Na mesma linha, ao analisar o extrato etanólico das folhas de *C. blanchetianus*, Freitas *et al* (2020) mostraram que a administração oral do extrato não induziu dano genético em células de sangue periférico. Contudo, os estudos encontrados na literatura acerca da segurança no que diz respeito a toxicidade de espécies de *Croton* são escassos, logo, esse trabalho tem o intuito de suprir essa deficiência, e contribuir para uma maior abordagem do potencial farmacológico da espécie.

Uma vez que o OECb não se mostrou genotóxico, foi avaliada a sua capacidade em proteger os animais dos danos causados pela ciclofosfamida. A avaliação da antigenotoxicidade pelo teste de micronúcleo apontou que, nas doses de 1000 e 2000 mg/kg, o óleo foi capaz de reduzir significativamente o número de MNPCE na medula óssea quando comparado aos animais tratados com salina. As reduções foram de 55,71 e 68,36%, respectivamente.

Tabela 6 – Avaliação da antigenotoxicidade *in vivo* do óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* (administração oral) ou ciclofosfamida de controle positivo (CPA, i.p.) pela determinação do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) da medula óssea de camundongos.

Tratamentos	Doses Óleo	Tempo de coleta	Número de MNPCE por animal					Média MNPCE	PCE/NCE	Redução (%)
			M1	M2	M3	M4	M5			
CPA	---	24h	21	17	16	18	21	18,6±2,3	1,19±0,11	---
	---	48h	19	16	18	21	16	18,0±2,1	1,20±0,13	---
OECb + CPA	1000 mg/kg	24h	9	9	7	8	7	8,0±0,6	1,10±0,014	56,98
		48h	9	8	9	7	8	8,2±0,6	1,13±0,16	54,44
	2000 mg/kg	24h	8	5	7	6	7	6,6±0,5	1,12±0,10	64,51
		48h	4	6	4	6	5	5,0±0,6	1,14±0,15	72,22

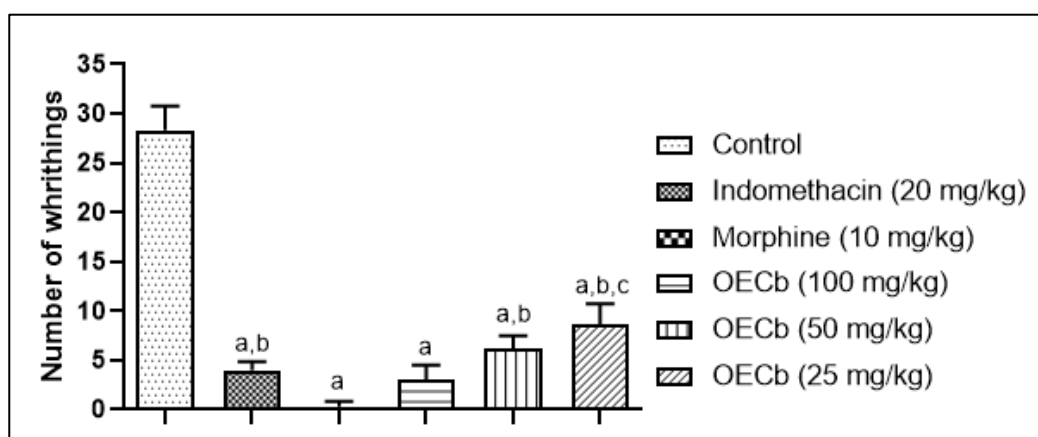
Fonte: O autor. No controle negativo, os camundongos receberam solução salina por via oral. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em comparação com o controle.

Os resultados obtidos demonstram que o OECb, em doses elevadas, apresenta baixa toxicidade na dose de 2000 mg/kg. Sendo assim, para assegurar a segurança em seu uso, foram escolhidas doses para os testes de atividades farmacológicas, doses que correspondem a, no máximo, 5% desse valor.

O número de contorções abdominais foi reduzido em 69,43%, 78,25% e 89,41% com o tratamento prévio com o OECb nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente. O grupo

tratado com morfina teve redução de 98,83%, já o grupo tratado com indometacina demonstrou redução de 85,88%, quando comparados ao grupo controle. O bioensaio de contorções abdominais avalia o potencial antinociceptivo a nível central e periférico. O ácido acético estimula células residentes peritoneais, como macrófagos e mastócitos, a liberarem mediadores pró-inflamatórios como prostaglandina E2 e fator de necrose tumoral (TNF- α). Diante disso, nossos resultados corroboram com Santos *et al* (2005), que ao avaliar o potencial do óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus* em reduzir as contorções abdominais, observaram uma inibição dose-dependente quando comparado com o controle negativo.

Figura 2 – Efeito antinociceptivo do óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* (25, 50, 100 mg/ kg, vo) e medicamentos de referência indometacina (20 mg/kg ip) e morfina (10 mg/kg ip) no bioensaio de contorções induzidas por ácido acético



Fonte: O autor. As barras representam o número médio de contorções $\pm$ desvio padrão. (a, b e c) indica diferença significativa ($p < 0,001$) em comparação com o controle.

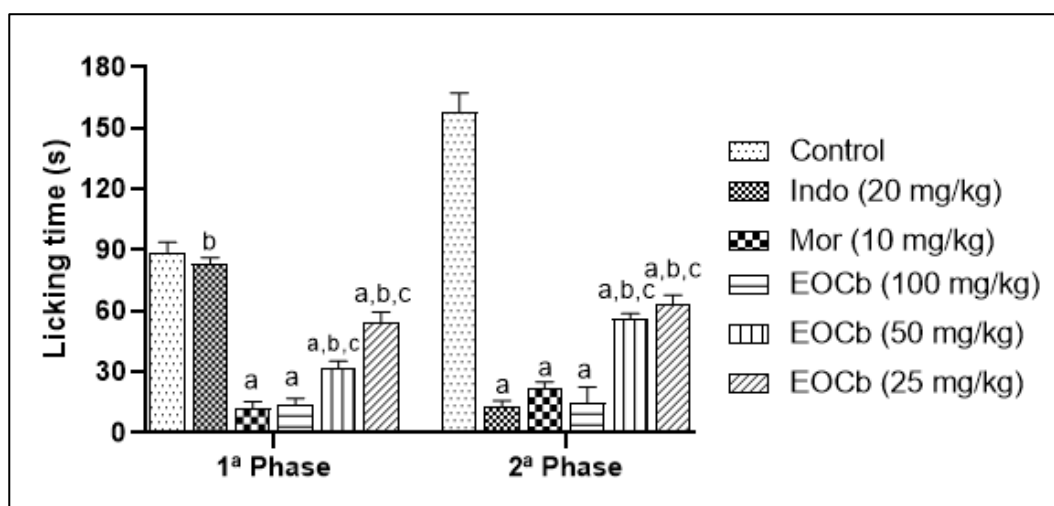
A capacidade do OECb em reduzir o estímulo doloroso induzido pelo ácido acético pode se dar pela presença de monoterpenos e sesquiterpenos em sua composição, uma vez que esses compostos apresentam ampla gama de propriedades farmacológicas, dentre elas, ação antinociceptiva. Sugere-se que a ação dos terpenos na redução da dor ocorra por meio de mecanismo dependente de receptores CB1 do sistema canabinoide (SOUZA *et al*, 2020; LAVIGNE *et al*, 2021). Ainda, a ação anti-inflamatória de compostos presentes no OECb pode estar envolvida nessa ação antinociceptiva. Kim *et al* (2015) observaram que o α -pineno atua de maneira potente contra as vias inflamatórias e catabólicas estimuladas por IL-1 β . Outro estudo mostrou que, no teste de formalina, esse mesmo composto reduziu a produção de IL-6, TNF- α e óxido nítrico em macrófagos de ratos, bem como reduziu a expressão de

NF- κ B, gerando uma supressão na resposta nociceptiva (LI *et al*, 2016).

Ao avaliar o potencial anti-inflamatório do terpinoleno *in vitro*, Scherer *et al* (2019) observaram que o composto estimulou efetivamente a proliferação e migração de fibroblastos, protegeram macrófagos contra danos oxidativos celulares e suprimiram a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e atividade de NF- κ B. Assim como Santos *et al* (2005), que ao analisar o potencial antinociceptivo do óleo essencial de folhas de *C. blanchetianus*, identificou monoterpenos, biciclogermacreno e sesquiterpenos como componentes majoritários, e a consequente redução do limiar doloroso em camundongos.

Na primeira fase do teste da formalina, o tratamento por via oral com OECb nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg reduziu significativamente o tempo de lambida da pata em 38,77%, 64,89% e 84,47%, respectivamente. A morfina (10 mg/kg) reduziu o tempo de lambida em 86,51%, já a indometacina não apresentou diferença estatística do grupo controle. Na segunda fase do teste, O OECb também apresentou ação antinociceptiva, reduzindo o tempo de lambida da pata em 59,75%, 64,6% e 90,74% nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente. Os controles positivos indometacina (20 mg/kg) e morfina (10 mg/kg) foram capazes de diminuir a nocicepção em 91,99% e 86,30%, respectivamente.

Figura 3 – Efeito antinociceptivo do óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* (25, 50, 100 mg/kg, vo) e medicamentos de referência indometacina (Indo, 20 mg/kg ip) e morfina (Mor, 10 mg/kg ip) em ambas as fases do teste de formalina



Fonte: O autor. As barras representam o número de lambida nas patas $\pm$ desvio padrão. (a, b e c) indica diferença significativa ($p < 0,001$) em comparação com o controle.

As respostas provocadas pela formalina possuem caráter bifásico. A primeira fase (5 minutos iniciais) é denominada neurogênica e está relacionada com a ativação direta de fibras sensoriais do tipo C, que liberam a substância P e o glutamato, por exemplo. Já a segunda fase (entre 15 e 30 minutos após a administração do agente flogístico) é caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios como prostaglandinas (PGE2), óxido nítrico, leucotrienos, entre outros (BOMBA *et al*, 2005; CARLINI e MENDES, 2011). O OECb mostrou efeito dose-dependente significativo na primeira e segunda fases, sugerindo que a antinocicepção ocorreu a nível central e periférico, no qual receptores nociceptivos e inflamatórios foram modulados.

De Oliveira *et al* (2017) avaliaram o óleo essencial da casca de caule de *Croton conduplicatus* no teste de formalina e constataram que óleo, composto majoritariamente de monoterpenos e sesquiterpenos, reduziu de maneira significativa o tempo de lambida dos animais em ambas as fases. Nogueira *et al* (2015), ao avaliarem o potencial antinociceptivo de óleo essencial de folhas de *Croton cordiifolius*, descreveram a capacidade do óleo em reduzir o tempo de lambida da pata na fase neurogênica de maneira dose-dependente. Já na fase inflamatória todas as doses (50 e 100 mg/kg) foram eficazes, resultados similares ao encontrado em nosso estudo, enfatizando o potencial antinociceptivo do gênero *Croton*.

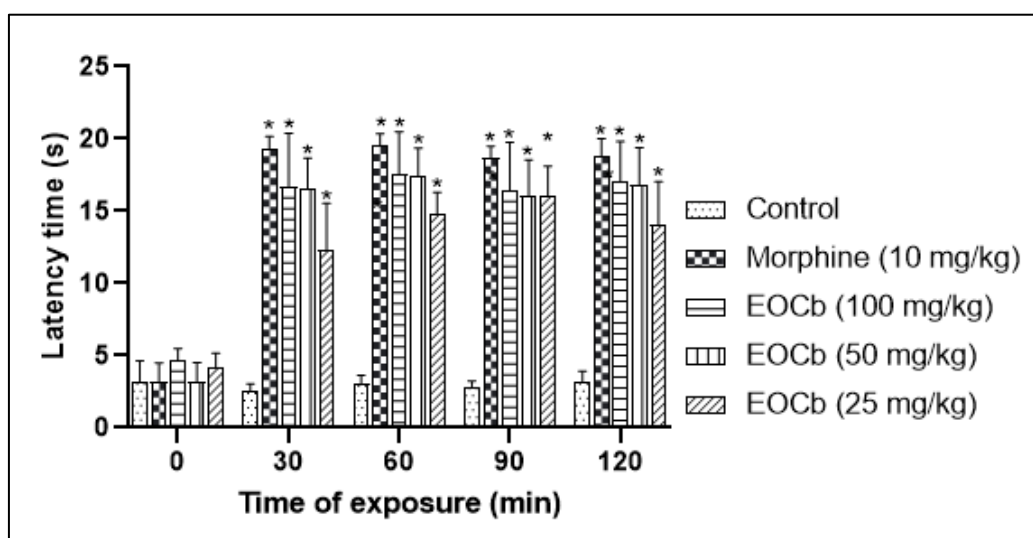
No teste da formalina, a hipernocicepção inflamatória se dá pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8 e TNF- α (YIN *et al*, 2020). Durante o processo inflamatório, o TNF- α atua no receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNF-R1), estimulando a liberação de IL-1 β e IL-6 (CUNHA *et al*, 2005). Logo, os macrófagos ativados expressam a IL-1 β , induzindo a sensibilização das fibras nervosas dos neurônios sensoriais primários, gerando a hipersensibilidade à dor (XIANG *et al*, 2019). Em paralelo, o TNF- α induz a produção de prostanoídes pela IL-6 (CUNHA *et al*, 2005). Monoterpenos como α -pineno inibem a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em macrófagos estimulados por LPS, suprimindo a resposta inflamatória e a nocicepção. Diante desse exposto, os resultados do bioensaio ratificam o potencial anti-inflamatório do óleo essencial, o que pode estar relacionado com a presença de α -pineno (BASHOLLI-SALIHU *et al*, 2017), β -felandreno (FODDAI *et al*, 2019) e terpinoleno (MACEDO *et al*, 2016) conforme discutido anteriormente.

Os canais do receptor vaniloide transitório 1 (TRPV1) são um dos receptores envolvidos na transdução da dor nociceptiva e efetivamente envolvidos na dor induzida por formalina e ácido acético (DAL MOLLIN *et al*, 2012; JURIK *et al*, 2014; MATAK *et al*, 2014). Os monoterpenos atuam como agonistas parciais de TRPV1, TRPV3, TRPM8 e

TRPA1 e a inibição prolongada destes receptores pode ser responsável pelo controle da dor (GUIMARÃES *et al*, 2013).

De modo geral, compostos bioativos com caráter antinociceptivo apresentam fortes efeitos farmacológicos em ambas as fases do teste, tal como a morfina. Ao se comportar de maneira parecida com a morfina, supõe-se que o OECb aja em mecanismos centrais da dor. Essa hipótese foi testada submetendo os camundongos à estimulação térmica no teste de movimentação da cauda (Figura 4). O tempo de latência dos animais tratados com o OECb e morfina aumentaram significativamente ($p < 0,001$) em comparação ao grupo controle após 30 min de tratamento. Não houve diferença significativa entre as diferentes doses do óleo essencial.

Figura 4 – Efeito antinociceptivo do óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* (25, 50, 100 mg/kg, vo) e medicamento de referência em no teste de movimento de cauda



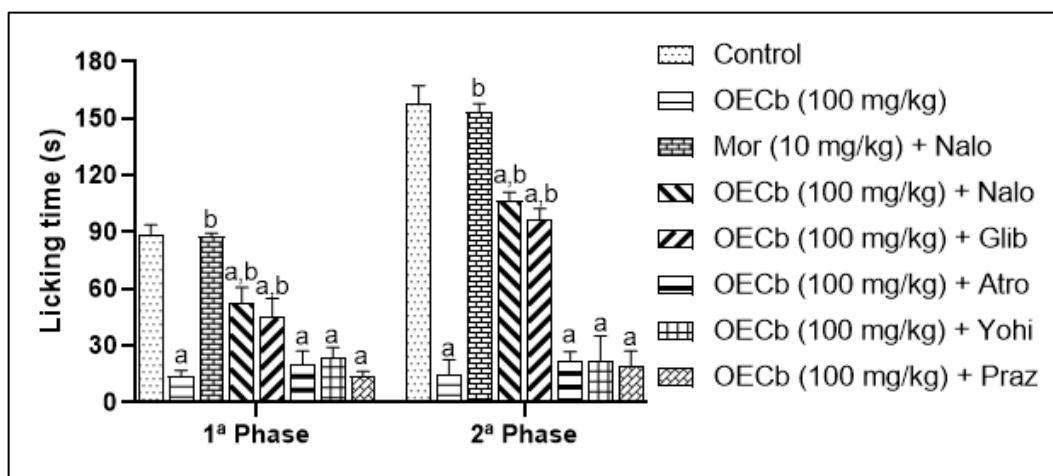
Fonte: O autor. (*) indica diferença significativa ($p < 0,001$) em comparação com o controle.

O teste de retirada de cauda é um dos ensaios mais comuns no que diz respeito a estímulo fásico de curta duração e alta intensidade, tendo por objetivo avaliar as respostas comportamentais que estão envolvidas no processo de hiperalgesia cutânea devido à estimulação térmica a nível de reflexo espinhal (DZOYEM *et al*, 2017). Os resultados obtidos apontam que o OECb pode atuar na via nociceptiva central, podendo também atuar contra a dor não inflamatória.

Por fim, nos animais foram previamente tratados com naloxona (antagonista opioide), ocorreu inibição do efeito antinociceptivo do OECb, reduzindo a atividade na primeira fase para 40,65% e na segunda fase a atividade para 32,57%. Esses resultados sugerem que a ação

antinociceptiva envolve o sistema opioide. Inibição do efeito também foi observada quando o pré-tratamento foi realizado com glibenclamida (bloqueador de canais de K^+), havendo redução da atividade na primeira em 49,22% e na segunda fase em 38,68% em relação a dose, sugerindo que o óleo também pode agir como provável bloqueador de canais de K^+ .

Figura 5 – Efeito antinociceptivo do óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* (25, 50, 100 mg/kg, vo) e medicamentos de referência indometacina (Indo, 20 mg/kg ip) e morfina (Mor, 10 mg/kg ip) em ambas as fases do teste de formalina



Fonte: O autor. O envolvimento dos receptores opióides no efeito antinociceptivo foi avaliado pela administração de naloxona (2 mg / kg i.p.), glibenclamida (2 mg/kg, ip), atropina (1 mg/kg, i.p.), iombina (1 mg/kg, i.p.) e prazosin (1 mg/kg i.p), 30 min antes da administração das doses do óleo essencial por via oral.

Conclusão

O óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* não apresentou ação hemolítica e se mostrou seguro para camundongos quando administrado por via oral em dose de 2000 mg/kg. Entretanto, a administração dessa mesma dose por via intraperitoneal foi letal para os animais. O óleo foi capaz de conferir proteção a danos no DNA causados por agente alquilante e mostrou ação antinociceptiva na dor neurogênica e inflamatória, atuando via sistema opioide e bloqueio de canais de K^+ . Os resultados fornecem bases para mais estudos visando detalhar os mecanismos do potencial antinociceptivo do óleo sua aplicação efetiva no controle da dor.

Referências

- ADRIANA ESTRELLA, G.-R. *et al.* Limonene from *Agastache mexicana* essential oil produces antinociceptive effects, gastrointestinal protection and improves experimental ulcerative colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 114462, 26 jul. 2021.
- AITA, A. M.; MATSUURA, H. N.; MACHADO, C. A. Divulgação. v. 19, n. March, p. 471–477, 2009.
- AL-SNAFI, P. D. A. E. Pharmacology and therapeutic potential of *Euphorbia hirta* (Syn: *Euphorbia pilulifera*)- A review. **IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR)**, v. 07, n. 03, p. 07–20, 2017.
- ALMEIDA-PEREIRA, C. S. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of a *Croton tetradenius* Baill. germplasm. **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n. 5, p. 379–389, 2019.
- ALOSTAD, A. H.; STEINKE, D. T.; SCHAFHEUTLE, E. I. International Comparison of Five Herbal Medicine Registration Systems to Inform Regulation Development: United Kingdom, Germany, United States of America, United Arab Emirates and Kingdom of Bahrain. **Pharmaceutical Medicine**, v. 32, n. 1, p. 39–49, 2018.
- ANDRADE-CETTO, A. *et al.* Hypoglycemic Activity of Medicinal Plants Used among the Cakchiquels in Guatemala for the Treatment of Type 2 Diabetes. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.
- AQUINO, V. V. F. *et al.* Metabólitos Secundários e ação antioxidante de *Croton heliotripifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p. 28, 2017.
- ARAÚJO DELMONDES, G. *et al.* Toxicological and pharmacologic effects of farnesol (C₁₅H₂₆O): A descriptive systematic review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 129, p. 169–200, 1 jul. 2019.
- ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.
- AVILA, A. M. *et al.* An FDA/CDER perspective on nonclinical testing strategies: Classical toxicology approaches and new approach methodologies (NAMs). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 114, n. April, p. 104662, 2020.
- AYDIN, A.; AKTAY, G.; YESILADA, E. A guidance manual for the toxicity assessment of traditional herbal medicines. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 11, p. 1763–1773, 2016.

- AYZA, M. A. *et al.* Protective effect of croton macrostachyus (Euphorbiaceae) stem bark on cyclophosphamide-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 12, p. 275–283, 2020.
- BADALAMENTI, N. *et al.* Ferulago nodosa Subsp. Genuiculata (Guss.) Troia & Raimondo from Sicily (Italy): Isolation of essential oil and evaluation of its bioactivity. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 1–11, 2020.
- BELHADJ, S. *et al.* Metabolic impairments and tissue disorders in alloxan-induced diabetic rats are alleviated by Salvia officinalis L. essential oil. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, n. September, p. 985–995, 2018.
- BASHOLLI-SALIHU, M. *et al.* Phytochemical composition, anti-inflammatory activity and cytotoxic effects of essential oils from three Pinus spp. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1553–1560, 2017.
- BOY, H. I. A. *et al.* Recommended Medicinal Plants as Source of Natural Products: A Review. **Digital Chinese Medicine**, v. 1, n. 2, p. 131–142, 1 jun. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução de Diretoria Colegiada nº 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, p. 1–34, 2014.
- CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental: um guia para a Pesquisa de Drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas Plantas Medicinais**. São Paulo: [s.n.].
- CAVALCANTE, N. B.; DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS, A.; GUEDES DA SILVA ALMEIDA, J. R. The genus Jatropha (Euphorbiaceae): A review on secondary chemical metabolites and biological aspects. **Chemico-Biological Interactions**, v. 318, n. February 2019, p. 108976, 2020.
- CHABALALA, H. *et al.* Brazilian traditional medicine: Historical basis, features and potentialities for pharmaceutical development. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, 17 dez. 2021.
- CHE, C. T. *et al.* Traditional Medicine. **Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy**, p. 15–30, 1 jan. 2017.
- COLERANGLE, J. B. Preclinical Development of Nononcogenic Drugs (Small and Large Molecules). **A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development**, p. 659–683, 1 jan. 2017.

- CONEGUNDES, J. L. M. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activity of Siparuna guianensis Aublet, an amazonian plant traditionally used by indigenous communities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113344, 30 jan. 2021.
- CORDEIRO, M. S. *et al.* Characterization of the antinociceptive activity from Stevia serrata Cav. **Biomedicines**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2020.
- COUTINHO, L. A.; GONÇALVES, C. P.; MARCUCCI, M. C. Composição química, atividade biológica e segurança de uso de plantas do gênero Mikania. **Revista Fitos**, v. 14, n. 01, p. 118–144, 2020.
- CUBAS, V. M.; RIBAS, J. L. C. Medicina alternativa à base de plantas medicinais no tratamento da acne. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e12810212153, 2021.
- DONALD, G. R. *et al.* Antinociceptive activity of puberulin and choisyine from ethanol extract of Choisya ternata Kunth var. Sundance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 141, p. 111926, 1 set. 2021.
- ECHA. Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R . 7b : Endpoint specific guidance November 2012. **Echa**, v. 2012, n. November, p. 1–238, 2012.
- ETIENNE, R.; DIAS VIEGAS, F. P.; VIEGAS, C. Pathophysiological aspects of inflammation and drug design: An updated overview. **Revista Virtual de Quimica**, v. 13, n. 1, p. 167–191, 2021.
- FARZAEI, M. H. *et al.* Iranian. v. 23, n. February, p. 117–127, 2020.
- FASOLA, T. R. *et al.* Antidiabetic and antioxidant effects of croton lobatus L. In alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 364–371, 2016.
- FAZLY BAZZAZ, B. S. *et al.* Deep insights into urinary tract infections and effective natural remedies. **African Journal of Urology**, v. 27, n. 1, 2021.
- FITZGERALD, M.; HEINRICH, M.; BOOKER, A. Medicinal plant analysis: A historical and regional discussion of emergent complex techniques. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. January, p. 1–14, 2019.
- FODDAI, M. *et al.* Evaluation of chemical composition and anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial activity of essential oil of Sardinian Santolina corsica Jord. & Fourr. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 5, p. 930–937, 2019.

- FOROUZANFAR, F.; HOSSEINZADEH, H. Medicinal herbs in the treatment of neuropathic pain: A review. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 4, p. 347–358, 2018.
- FREITAS, A. F. S. *et al.* Toxicity assessment and antinociceptive activity of an ethanolic extract from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) leaves. **South African Journal of Botany**, v. 133, p. 30–39, 2020.
- GIACOMELLO, C. A. M. *et al.* Chronic Pain : Mechanism Based Management. p. 1–10, [s.d.].
- GITLEMAN, L. 済無. **Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents**, v. 2020, p. 1–11, 2014.
- GOYAL, S.; GUPTA, N.; CHATTERJEE, S. Investigating therapeutic potential of *trigonella foenum-graecum* L. As our defense mechanism against several human diseases. **Journal of Toxicology**, v. 2016, 2016.
- GRECO, I. *et al.* Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- HALL, J. E. **Guyton & Hall Fundamentos de Fisiologia**. 13^a edição ed. [s.l.: s.n.].
- HALL, P.; CASH, J. What is the real function of the liver “function” tests?: Discovery Service for Endeavour College of Natural Health Library. **Ulster Medical Journal**, v. 81, n. 1, p. 30–36, 2012.
- HAMEL, A.; ROY, M.; PROUDLOCK, R. **The Bacterial Reverse Mutation Test**. [s.l.: s.n.].
- HARB, A. A.; BUSTANJI, Y. K.; ABDALLA, S. S. Hypocholesterolemic effect of β -caryophyllene in rats fed cholesterol and fat enriched diet. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 62, n. 3, p. 230–237, 2018.
- HARDY, K. Paleomedicine and the Evolutionary Context of Medicinal Plant Use. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 1, p. 1–15, 2021.
- HARTWIG, A. *et al.* **Mode of action-based risk assessment of genotoxic carcinogens**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2020. v. 94
- HAYASHI, M. The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test. **Genes and Environment**, v. 38, n. 1, p. 4–9, 2016.

- INSIGHTSLICE. **Herbal Medicine Market Global Sales Are Expected To Reach US\$ 550 Billion by 2030, as stated by insightSLICE**. Disponível em: <https://www.globenewswire.com/en/news-release/2021/02/16/2176036/0/en/Herbal-Medicine-Market-Global-Sales-Are-Expected-To-Reach-US-550-Billion-by-2030-as-stated-by-insightSLICE.html>. Acesso em: 27 jun. 2021.
- ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological research**, v. 52, n. 1, p. 39, 2019.
- ISLAM, M. T. *et al.* Anti-Schistosoma mansoni effects of essential oils and their components. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 8, p. 1761–1769, 2020.
- IVANOVA, N. *et al.* We are IntechOpen , the world ’ s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. **Intech**, v. i, n. tourism, p. 13, 2016.
- JAHROMI, B. *et al.* Herbal medicine for pain management: Efficacy and drug interactions. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 1–43, 2021.
- JESUS, R. *et al.* Determination of medium lethal dose (LD50) and acute toxicity of formulation Cytoreg®, an ionic mixture of strong and weak acids. **Latin American Journal of Development**, v. 3, n. 3, p. 1121–1126, 2021.
- JOSÉ, M.; TRINDADE, D. S.; LAMEIRA, O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil Species de interés de familia Euphorbiaceae en Brasil Species from the Euphorbiaceae family used for medicinal purposes in Brazil. v. 4, n. 2014, p. 1–22, 2012.
- KAUR, N.; KAUR, B.; SIRHINDI, G. Phytochemistry and Pharmacology of Phyllanthus niruri L.: A Review. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 7, p. 980–1004, 2017.
- KIFAYATULLAH, M. *et al.* Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of Pericampylus glaucus (Lam.) Merr. in BALB/c mice. **Journal of Acute Disease**, v. 4, n. 4, p. 309–315, 2015.
- LEITE, T. R. *et al.* Antimicrobial, modulatory and chemical analysis of the oil of croton limae. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 2015–2019, 2017.
- LI, J. *et al.* Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SBP-box gene family in Euphorbiaceae. **BMC Genomics**, v. 20, n. Suppl 9, p. 1–15, 2019.
- LIMA, C. C. *et al.* Antispasmodic effects of the essential oil of Croton zehnteneri, anethole, and estragole, on tracheal smooth muscle. **Heliyon**, v. 6, n. 11, 2020a.

- LIMA, J. A. L. DE *et al.* Avaliação Teórica Das Propriedades Farmacocinéticas, Fisico-Químicas E Farmacodinâmicas Do Composto Isolado De Valeriana Officinalis Em Transtorno De Ansiedade / Theoric Evaluation of Pharmacokinetics, Physicochemistry and Pharmacodynamics of Isolate Com. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 74751–74762, 2020b.
- LIMA, E. J. S. P. *et al.* Antitumor Effect of the Essential Oil from the Leaves of *Croton matourensis* Aubl. (Euphorbiaceae). **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 1–12, 2018c.
- LOCATELLI, M. *et al.* Optimization of Aqueous Extraction and Biological Activity of *Harpagophytum procumbens* Root on Ex Vivo Rat Colon Inflammatory Model. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 6, p. 937–944, 2017.
- LOPES, D. M. *et al.* A refinement to the formalin test in mice. **F1000Research**, v. 8, p. 1–17, 2019.
- MACEDO, E. M. A. *et al.* Association of terpinolene and diclofenac presents antinociceptive and anti-inflammatory synergistic effects in a model of chronic inflammation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 7, p. 1–10, 2016.
- MAIA-SILVA, C. *et al.* **Guia de Plantas Visitadas por abelhas na Caatinga**. 1^a ed. Fortaleza-CE: [s.n.].
- MAKRIS, K.; SPANOU, L. Lesion Renal Aguda Otro. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 37, n. 2, p. 85–98, 2016.
- MARQUES, F. M. *et al.* In vitro anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF- κ B signalling pathway. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 2, p. 281–289, 2019.
- MARTINS, A. O. B. P. B. *et al.* Anti-edematogenic and anti-inflammatory activity of the essential oil from *Croton rhamnifolioides* leaves and its major constituent 1,8-cineole (eucalyptol). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 384–395, 1 dez. 2017.
- MASOCHA, W.; KOMBIAN, S. B.; EDAFIOGHO, I. O. Evaluation of the antinociceptive activities of enaminone compounds on the formalin and hot plate tests in mice. **Scientific Reports**, v. 6, n. August 2015, p. 1–9, 2016.
- MATI, V.; NAT, V. INTERNATIONAL STANDARD ISO Aromatic natural raw materials —. v. 2013, 2013.
- MELO, G. F. DO A. *et al.* The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to *Croton blanchetianus* Baill essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1189–1194, 2013.

- MENEZES, P. M. N. *et al.* Investigation of antinociceptive, antipyretic, antiasthmatic, and spasmolytic activities of Brazilian Cannabis sativa L. roots in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 278, p. 114259, 5 out. 2021.
- MICUCCI, M. *et al.* Thymus vulgaris l. Essential oil solid formulation: Chemical profile and spasmolytic and antimicrobial effects. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, 2020.
- MILLS, S. E. E.; NICOLSON, K. P.; SMITH, B. H. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. **British Journal of Anaesthesia**, v. 123, n. 2, p. e273–e283, 2019.
- MIRALDI, E.; BAINI, G. Medicinal Plants and Health in Human History: From Empirical Use To Modern Phytotherapy. **Journal of the Siena Academy of Sciences**, v. 10, n. 1, p. 7–12, 2019.
- MOLLAEI, S. *et al.* Extraction of essential oils of Ferulago angulata with microwave-assisted hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, v. 137, n. May, p. 43–51, 2019.
- MONTEIRO, S. DA C.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. 1ª edição ed. [s.l: s.n.].
- MORALES U. A. *et al.* Antibacterial activity of the Croton draco hidroalcoholic extract on bacteria of sanitary importance. **Abanico Veterinario**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.
- MWINE, J. T.; VAN DAMME, P. Why do euphorbiaceae tick as medicinal plants? a review of euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p. 652–662, 2011.
- NADJIB BOUKHATEM, M.; MOHAMED NADJIB, B. Effective Antiviral Activity of Essential Oils and their Characteristic Terpenes against Coronaviruses: An Update. **J Phar-macol Clin Toxicol**, v. 8, n. 1, p. 1138, 2020.
- NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKES. **Disorders Chronic Pain Information Page**. Disponível em: <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/All-Disorders/Chronic-pain-Information-Page>.
- NUGRAHA, B. *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Functioning properties of chronic pain. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 88–94, 2019.
- OECD. **OECD Series on Testing and Assessment**. [s.l: s.n.].
- OKTAVIANAWATI, I. *et al.* Essential Oil Composition of Rose Flowers from Karangpring Village Jember District Extracted by Distillation and Enfleurage. **Jurnal ILMU DASAR**, v. 20, n. 2, p. 67, 2019.

- OLIVEIRA-TINTINO, C. D. DE M. *et al.* Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in in vivo models. **Phytomedicine**, v. 41, p. 82–95, 2018.
- OLIVEIRA, B. *et al.* Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 247, n. August 2019, p. 112265, 2020.
- OLIVEIRA, R. G. *et al.* Antinociceptive effect of the essential oil from *Croton conduplicatus* Kunth (Euphorbiaceae). **Molecules**, v. 22, n. 6, 2017.
- PEREIRA, K. L. G. *et al.* Ethanolic extract of *Croton blanchetianus* ball induces mitochondrial defects in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 92, p. 1–15, 2020.
- PINHO-DA-SILVA, L. *et al.* *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. **Phytomedicine**, v. 17, n. 10, p. 721–725, 2010.
- QUEZADA-MORENO, W. *et al.* Extraction and chemical characterization of the essential oil of *Tagetes pusilla*, in fresh and stored samples. **Afinidad**, v. 76, n. 588, p. 307–313, 2019.
- RABEHAJA, D. J. R. *et al.* Chemical composition of the essential oil from *Croton kimosorum*, an endemic species to Madagascar. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 1, p. 129–132, 2014.
- RAMAIAH, L.; BOUNOUS, D. I.; ELMORE, S. A. Hematopoietic System. **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology**, p. 1863–1933, 1 jan. 2013.
- RAMALHO, S. D. *et al.* Biologically Active Orbitides from the Euphorbiaceae Family. **Planta Medica**, v. 84, n. 9–10, p. 558–567, 2018.
- RASOOL, A. *et al.* Medicinal plants: Role, distribution and future. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 2, p. 2111–2114, 2020.
- REGISTRE, M.; PROUDLOCK, R. **The In Vitro Chromosome Aberration Test**. [s.l.: s.n.]. v. 227
- REN, N. *et al.* The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: Testing methods and clinical applications. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2017.
- REYNOSO, M. A. *et al.* Antinociceptive activity of fruits extracts and “arroe” of *Geoffroea decorticans* (chañar). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 355–362, 9 jan. 2013.

- REZGUI, M. *et al.* Antioxidant and antifungal activities of marrubiin, extracts and essential oil from *Marrubium vulgare* L. against pathogenic dermatophyte strains. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 30, n. 1, p. 100927, 2020.
- RÍOS, J. L. Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**, p. 3–10, 1 jan. 2016.
- ROCHA, A. R. F. *et al.* Extracts and fractions of *Croton* L. (Euphorbiaceae) species with antimicrobial activity and antioxidant potential. **Lwt**, v. 139, p. 110521, 2021.
- RODRIGUES, O. G. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante dos extratos botânicos de *Croton Heliotrpiifolius* Kunth. e *Croton blanchetianus* Baill. **Agropecuária Científica No Semiárido**, v. 12, n. 3, p. 237–241, 2017.
- RODRIGUES, O. G. *et al.* In vitro biological activity of the *Croton blanchetianus* (Baill) essential oil against *Rhipicephalus (boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 55–58, 2019.
- RODRÍGUEZ, E. *et al.* We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. **Intech**, v. 32, n. tourism, p. 137–144, 1989.
- SÁ FIRMINO, N. C. *et al.* Diterpenes isolated from *Croton blanchetianus* Baill: Potential compounds in prevention and control of the oral *Streptococci* biofilms. **Industrial Crops and Products**, v. 131, n. September 2018, p. 371–377, 2019.
- SAGANUWAN, S. A. Toxicity studies of drugs and chemicals in animals: An overview. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 20, n. 4, p. 291–318, 2017.
- SALEHI *et al.* Euphorbia-Derived Natural Products with Potential for Use in Health Maintenance. **Biomolecules**, v. 9, n. 8, p. 337, 2019.
- SALLAU, A. B. *et al.* In vitro effect of terpenoids - rich extract of *Momordica charantia* on alpha glucosidase activity. **Vitae**, v. 25, n. 3, p. 148–153, 2018.
- SANTANA, J. M. *et al.* Tradução para a língua portuguesa da definição revisada de dor pela Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. **Iasp**, p. 1–8, 2020.
- SANTOS, F. A. *et al.* Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. **Life Sciences**, v. 77, n. 23, p. 2953-2963, 2005.
- SANTOS, S. M. DOS *et al.* Variation in essential oil components and anti-inflammatory activity of *Allophylus edulis* leaves collected in central-western Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, n. October, 2021.
- SILVA, A. L. E *et al.* Prevalence of chronic pain and associated factors among medical students. **Revista Dor**, v. 18, n. 2, p. 108–111, 2017.

- SILVA, J. S. *et al.* Sinopse das espécies de Croton L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 441–453, 2010.
- SILVA, S. N. *et al.* Leaves in Rodents. v. 22, n. 1, p. 102–108, 2012.
- SILVA, M. M. *et al.* Schinus terebinthifolius: Phenolic constituents and in vitro antioxidant, antiproliferative and in vivo anti-inflammatory activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 445–452, 2017.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia - Da Planta Ao Medicamento**. [s.l: s.n.].
- SOARES, V. F.; BARBOSA, M. L.; SILVA, M. S. DA. Conhecimento popular sobre plantas medicinais utilizadas por especialistas locais da zona rural de Junqueiro/AL. **Diversitas Journal**, v. 5, n. 4, p. 2692–2724, 2020.
- SOHANI, S. Role of Medicinal Plant in Human Health Perspective. **Acta Scientific Agriculture**, v. 5, n. 6, p. 65–68, 2021.
- ŠOJÍČ, B. *et al.* Essential oil versus supercritical fluid extracts of winter savory (*Satureja montana* L.) – Assessment of the oxidative, microbiological and sensory quality of fresh pork sausages. **Food Chemistry**, v. 287, n. February, p. 280–286, 2019.
- SOUZA, J. B. DE; BARROS, C. M. DE. Considerations about the new concept of pain. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 3, n. 3, p. 20200190, 2020.
- SUGIER, D. *et al.* Essential oil from Arnica Montana L. Achenes: Chemical characteristics and anticancer activity. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 1–13, 2019.
- SÜNTAR, I. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 5, p. 1199–1209, 2020.
- TORRES, M. DA C. DE M. *et al.* Composição Química Dos Óleos Essenciais De Croton Sonderianus Muell. Arg. (Euphorbiaceae) / Chemical Composition of Croton Sonderianus Muell Essential Oils. Arg. (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 81493–81503, 2020.
- YANG, N. J.; HINNER, M. J. Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols. **Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols**, p. 1–267, 2015.
- VALLE, A. L. Current methodologies in assessing toxicity of natural products. **International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients**, v. 5, n. 1, p. 3–3, 2018.
- VANDENBERG, L. N. *et al.* Should oral gavage be abandoned in toxicity testing of endocrine disruptors? **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2014.

- VASCONCELOS, E. C. DE; PAGANINI, C. C. Ação antimicrobiana dos compostos voláteis do óleo essencial das folhas secas de *Croton blanchetianus* Baill Antimicrobial action of volatile compounds in essential oil from dry leaves of *Croton blanchetianus*. v. 2022, p. 1–10, 2022.
- WIDMAIER, E. P.; RAFF, H.; STRONG, K. T. **Fisiologia Humana: Os Mecanismos das Funções Corporais**. 14^a edição ed. [s.l: s.n.].
- WOLFFENBÜTTEL, A. N. **BASE DA QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E AROMATERAPIA - Abordagem técnica e científica**. 3^a edição ed. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO global report on traditional and complementary medicine 2019**. [s.l: s.n.].
- XIANG, H. C. *et al.* AMPK activation attenuates inflammatory pain through inhibiting NF- κ B activation and IL-1 β expression. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2019.
- YANG, J. *et al.* The modified WHO analgesic ladder: Is it appropriate for chronic non-cancer pain? **Journal of Pain Research**, v. 13, p. 411–417, 2020.
- YASUI, M. *et al.* Weight of evidence approach using a TK gene mutation assay with human TK6 cells for follow-up of positive results in Ames tests: a collaborative study by MMS/JEMS. **Genes and Environment**, v. 43, n. 1, p. 1–19, 2021.
- YI, F. *et al.* Evaluation of mechanical-pressed essential oil from Nanfeng mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Kinokuni) as a food preservative based on antimicrobial and antioxidant activities. **Lwt**, v. 95, n. May, p. 346–353, 2018.
- ZAREI, M.; MOHAMMADI, S.; KOMAKI, A. Antinociceptive activity of *Inula britannica* L. and patuletin: In vivo and possible mechanisms studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 219, p. 351–358, 12 jun. 2018.
- ZELAYA, C. E. *et al.* Chronic Pain and High-impact Chronic Pain Among U.S. Adults, 2019. **NCHS data brief**, n. 390, p. 1–8, 2020.
- ZENG, X. S. *et al.* Morphine Addiction and Oxidative Stress: The Potential Effects of Thioredoxin-1. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. February, p. 1–6, 2020.

4.2 Artigo 2 – Avaliação da toxicidade oral em doses repetidas (28 dias) de óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus*

Matheus Ferreira do Nascimento^a, Wêndeo Kennedy Costa^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Alisson Macário de Oliveira^a, Thiago Henrique Napoleão^a

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco Brazil.

Resumo

A realização de ensaios pré-clínicos que assegurem a eficácia e segurança do uso de plantas medicinais é fundamental. *Croton blanchetianus* é popularmente utilizada para o tratamento de cefaleias e processos inflamatórios. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade em doses repetidas (28 dias) do óleo essencial de folhas de *C. blanchetianus* em camundongos. Para isso, os camundongos foram tratados diariamente por 28 dias com o óleo por via oral na dose de 500 mg/kg. Parâmetros comportamentais foram avaliados diariamente e possíveis alterações bioquímicas, hematológicas e histopatológicas foram investigadas ao final do tratamento. Administração do óleo essencial resultou em diminuição da ingestão de alimentos no grupo dos machos tratados. Além disso, apresentaram menor ganho de peso ($p < 0,05$) quando comparados aos respectivos controles na terceira e quarta semana de tratamento. Além disso, não houve diferença significativa nos parâmetros bioquímicos em comparação com o controle, exceto pela redução dos níveis séricos de glicose, triglicerídeos e colesterol total. Também não foram observadas alterações significativas nos parâmetros hematológicos e análise histopatológica de fígado, rins e baço também não revelou alterações. Sendo assim, pode-se concluir que o óleo essencial de folhas de *C. blanchetianus* não apresentou toxicidade em nível subagudo na dose selecionada. Os resultados sugerem a avaliação de possíveis atividades hipoglicêmica e hipolipidêmica.

Palavras-chave: *Croton blanchetianus*. Plantas medicinais. Toxicidade subaguda.

Introdução

Diversas plantas vêm sendo utilizadas pela humanidade desde as antigas civilizações para o tratamento e profilaxia de doenças (GOYAL *et al*, 2016). A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a medicina tradicional como a

soma total dos conhecimentos, habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas, explicáveis ou não, também utilizadas na manutenção da saúde como na prevenção, diagnóstico, melhora ou tratamento de doenças físicas e mentais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005).

Os medicamentos fitoterápicos são preparações manufaturadas industrialmente que possuem um ou mais princípios ativos de origem vegetal e que não sofreram modificações químicas. Atualmente, estima-se que aproximadamente 80% da população mundial já fizeram uso de algum tipo de fitoterápico (ALOSTAD *et al*, 2018; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019). Como exemplos de plantas medicinais, tem-se *Mikania glomerata*, usada devido a sua potente ação broncodilatadora e expectorante (COUTINHO; GONÇALVES; MARCUCCI, 2020); e *Valeriana officinalis* e *Passiflora incarnata*, utilizadas em distúrbios do sono e ansiedade (DA SILVA *et al*, 2017; LIMA *et al*, 2020b; LOCATELLI *et al*, 2017).

Pertencente à família Euphorbiaceae e conhecida popularmente como marmeleiro preto, *Croton blanchetianus* é uma planta nativa do Brasil, com ampla distribuição na região do Nordeste. Rica em terpenos, é utilizada popularmente no alívio de cefaleias, náuseas e enjoos (MELO *et al*, 2013; TORRES *et al*, 2020). Além disso, estudos demonstraram atividades antinociceptiva, presente no extrato etanólico, enquanto no óleo essencial de folhas de *C. blanchetianus* observou-se atividade antimicrobiana (FREITAS *et al*, 2020; LEITE *et al*, 2017).

Utilizados na medicina tradicional e complementar durante séculos, os óleos essenciais (OEs) são produtos que atuam na defesa química do vegetal, e que podem ser utilizadas como possíveis alternativas às preparações sintéticas para prevenir e tratar doenças (AUMEERUDDY-ELALFI; GURIB-FAKIM; MAHOMOODALLY, 2016; FEYAERTS; LUYTEN; VAN DIJCK, 2020). Esse potencial farmacológico se dá devido as propriedades físico-químicas incomuns, já que possuem características tipicamente voláteis e hidrofóbicos. Sendo assim, podem ser utilizados, dentre outras coisas, como agentes anti-inflamatório (PARK *et al*, 2022), antinociceptivo (KHOEI *et al*, 2022), antimicrobiano (GHAVAM *et al*,

2020) e anticancerígeno (ELANSARY *et al*, 2018). Contudo, apesar de serem de origem natural, é de fundamental importância garantir a segurança para seus usos.

O objetivo dos ensaios pré-clínicos é analisar parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos em organismo vivo, além de garantir a tolerabilidade, segurança e ausência de efeitos indesejados de candidatos a medicamentos (TUNTLAND *et al*, 2014). Para isso, os compostos são testados primeiramente em animais de laboratório antes de submetê-los a ensaios clínicos em humanos (ANDRADE *et al*, 2016). Assim sendo, ao apresentar ausência de efeitos adversos em testes de toxicidade aguda, o óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus*, rico em monoterpenos e sesquiterpenos, foi submetido a etapas seguintes: testes toxicológicos de doses repetidas (esta dissertação).

Os testes para avaliar o potencial toxicológico a médio-longo prazo tem como objetivo principal fornecer informações sobre os efeitos tóxicos da substância, quando utilizada de maneira contínua. Além disso, podem fornecer informações acerca de como o composto atua no órgão-alvo, fornecendo uma estimativa do nível de efeito adverso que não é observado em estudos de curto prazo, inclusive se há a possibilidade de acúmulo no organismo, parâmetros que estabelecem a segurança para a utilização em humanos (OECD, 2018).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a toxicidade de doses repetidas do óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus* (OECb) em camundongos, a fim de ampliar o painel de informações sobre a segurança de seu uso.

Materiais e métodos

Material vegetal e extração do óleo essencial

A coleta das folhas de *Croton blanchetianus* foi realizada no município de Santa Terezinha (07° 02' 20" S, 37° 26' 43" W). A identificação dos espécimes foi realizada, e uma exsicata de número 93.062 foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA/PE). As folhas foram submetidas ao processo de hidrodestilação durante três horas em aparelho do tipo Clevenger, e o óleo obtido (OECb) foi armazenado em vidro âmbar à temperatura de 5 °C até o momento das análises e bioensaios.

Animais

Os camundongos utilizados foram machos e fêmeas da linhagem Swiss, com idade de aproximadamente 50 dias, com peso entre 40-45 g, provenientes do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami e ambientados por 5 dias no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Bioquímica, ambos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C), ciclo claro-escuro de 12 h e acesso a água e comida *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Pernambuco (nº 0092/2019).

Toxicidade de doses repetidas

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo número 407 descrito pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2008). Camundongos machos e fêmeas (n=20) foram divididos em dois grupos controle (5 machos e 5 fêmeas por gaiola) e dois grupos de tratamento com 5 animais de cada sexo. Os grupos tratados receberam o OECb por via oral uma vez ao dia por 28 dias na dose de 500 mg/kg de peso corporal, enquanto o grupo controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%, p/v). Análise comportamental de reflexos, mobilidade, deambulação, piloereção, aspecto cianótico e salivação foi realizada diariamente durante todo o período do experimento, bem como mensuração da massa corpórea e ingestão de água. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados e coletado sangue por punção cardíaca para avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Em seguida, foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos coletados para análise histopatológica.

Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

Parte do sangue coletado foi colocada em tubo de ensaio e centrifugado por 10 min a 3500 rpm e 25 °C. Em seguida, o soro foi coletado para análises dos seguintes parâmetros: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), ureia, creatinina, proteína total, albumina, glicose e colesterol total. Os kits utilizados foi o Labtest Diagnostic (Lagoa Santa, Brasil) e um analisador COBAS Mira Plus (Roche Diagnostics Systems, Basileia, Suíça).

Para análise hematológica, foi utilizado microscopia de luz e analisador automático (Animal Blood Counter: ABC Vet, Montpellier, France). Uma amostra do sangue coletado foi armazenada em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Foram avaliados os seguintes parâmetros da série vermelha: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e número de eritrócitos. Na série branca, foram quantificados leucócitos (monócitos, basófilos e eosinófilos).

As análises histológicas dos rins, fígado e baço de camundongos do grupo controle e dos grupos tratados com OECb foram realizadas com auxílio de microscopia óptica. As seções dos órgãos foram fixadas em formalina tamponada (10%, v/v), desidratadas por uma série de etanol graduado (70–100%), diafanizadas em xilol e embebidas em parafina. As fatias histológicas (5 µm) foram coradas com hematoxilina-eosina e montadas usando lamínulas com resina. As amostras foram observadas usando um microscópio acoplado a uma câmera digital.

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados no GraphPad Prism® versão 8.0 e expressos em valores médios com desvio padrão ($\pm$ e.p.m). As diferenças estatisticamente significantes foram calculadas usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Os valores foram considerados significativamente diferentes em $p < 0,05$ para avaliação da toxicidade.

Resultados e discussão

Os testes para avaliar o potencial toxicológico a médio-longo prazo tem como objetivo principal fornecer informações sobre os efeitos tóxicos da substância, quando utilizada de maneira contínua. Além disso, podem fornecer informações acerca de como o composto atua no órgão-alvo, fornecendo uma estimativa do nível de efeito adverso que não é observado em estudos de curto prazo, inclusive se há a possibilidade de acúmulo no organismo, parâmetros que estabelecem a segurança para a utilização em humanos (OECD, 2018).

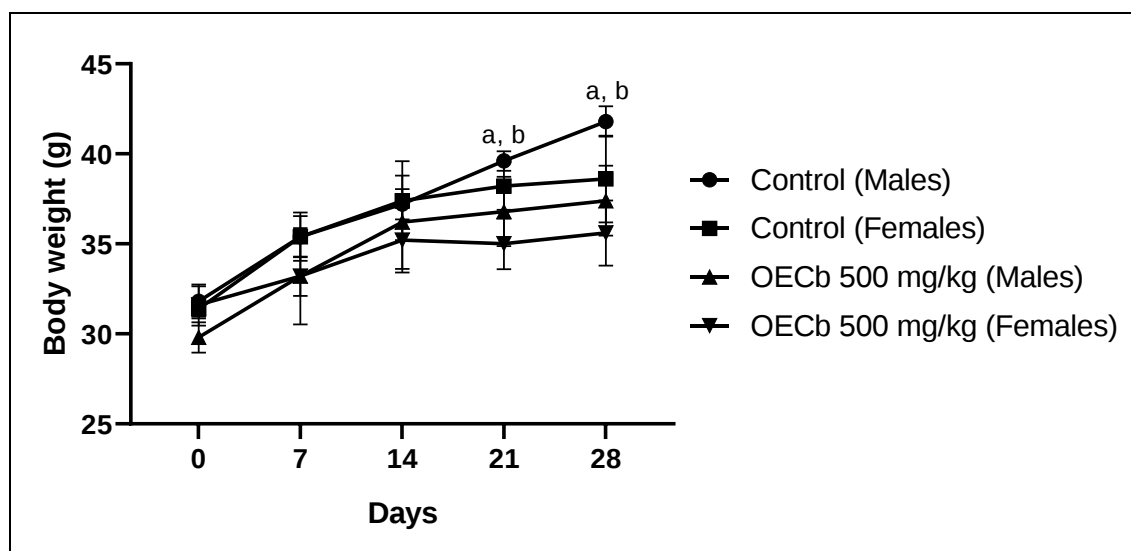
Em estudo anterior utilizando a mesma amostra, o OECb não apresentou toxicidade aguda na dose oral única de 2000 mg/kg aos animais tratados (esta dissertação). Baseado nos achados preliminares do teste de toxicidade aguda, avaliou-se a toxicidade em doses repetidas

de OECb na dose de 500 mg/kg, durante 28 dias consecutivos. A escolha da dose foi baseada em utilizar cinco vezes a dose que foi utilizada nos testes farmacológicos previamente realizados.

No que diz respeito a avaliação comportamental, os animais tratados por 28 dias com o OECb não apresentaram quaisquer alterações nos aspectos da pele, pêlo e mucosas. Além disso, nenhuma mudança relevante no padrão cardiorrespiratório, tampouco na atividade motora. Durante todo o processo de observação, não houve sinais de toxicidade evidenciados. Não houve registro de mortes ao longo do ensaio, indicando que os camundongos toleraram bem a administração oral diária do óleo essencial.

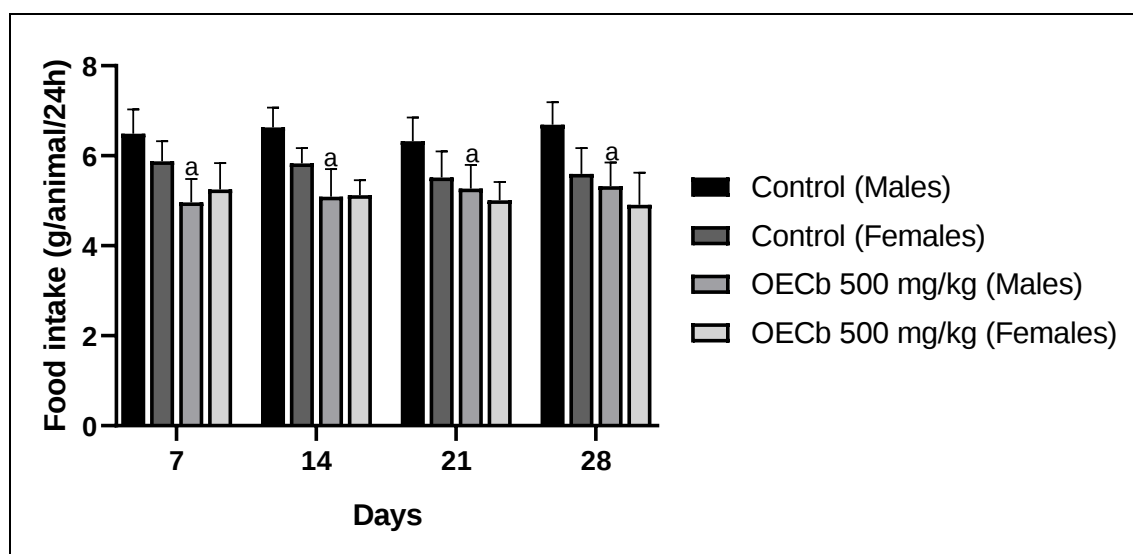
A Figura 1 apresenta o ganho de peso dos camundongos ao longo dos 28 dias, e os resultados demonstram que os animais tratados com OECb apresentaram menor ganho de peso ($p < 0,05$) quando comparados aos respectivos controles na terceira e quarta semana de tratamento. Alterações na massa corpórea de camundongos podem indicar toxicidade do composto analisado.

Figura 1 – Efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* (OECb, 500 mg/kg) no ganho de massa corpórea de camundongos machos e fêmeas durante 28 dias de tratamento



Fonte: O autor. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. ($n = 5/\text{grupo}$). (a) indica diferença significativa entre os grupos controle e tratados de animais machos. (b) indica diferença significativa entre os grupos controle e tratados de animais fêmeas. O tratamento dos machos e fêmeas com o OECb não alterou o consumo de água, entretanto o consumo de ração pelos machos foi significativamente menor ($p < 0,05$) em todas as semanas de tratamento, quando comparado ao respectivo grupo controle.

Figura 2 – Efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* (OECb, 500 mg/kg) sobre o consumo de água e ração de camundongos machos e fêmeas durante 28 dias de tratamento



Fonte: O autor. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. ($n = 5/\text{grupo}$). (a) indica diferença significativa entre os grupos controle e tratados de animais machos.

O perfil bioquímico do soro dos camundongos é exibido nas Tabela 1. Os resultados não evidenciaram nenhuma mudança significativa no grupo tratado com OECb quanto aos níveis de creatinina e ureia quando comparado ao grupo controle. Alteração nos valores de creatinina, ureia e outros produtos residuais metabólicos podem estar associados a danos renais (MAKRIS; SPANOU, 2016).

Também não houve mudanças significativas nos marcadores bioquímicos de função hepática, como ALT, aspartato AST, proteína total e fosfatase alcalina, bem como alterações significativas na bilirrubina total e albumina entre os grupos tratados e seus respectivos controles. As enzimas hepáticas são comumente usadas na avaliação de pacientes com uma variedade de doenças, e suas avaliações fornecem informações sobre distúrbios de origem hepática (HALL; CASH, 2012).

Foi observada uma redução significativa nos valores de triglicerídeos e colesterol total em ambos os sexos nos grupos tratados com OECb em comparação com os controles. Drogas que reduzem substancialmente os níveis de colesterol total e TG podem ter benefícios cardiovasculares (MAKI *et al*, 2015; MARSTON *et al*, 2019). A capacidade hipolipidêmica do OECb pode estar relacionada a presença de monoterpenos presentes no óleo, isso porque os monoterpenos têm a capacidade de inibir a atividade da HMG-CoA redutase hepática (VALLIANOU *et al*, 2011).

Estudos sobre o uso de óleo essencial com atividade hipolipidêmica já são descritos na literatura. O óleo essencial de folhas de *Ferulago nodosa*, rico em monoterpenos como α -pineno, inibiu de maneira significativa a enzima lipase, promovendo uma alternativa no tratamento da obesidade (BADALAMENTI *et al*, 2020), bem como o óleo essencial de *Salvia officinalis*, que também reduziu a enzima lipase e se mostrou uma opção anti-obesidade (BELHADJ *et al*, 2018). Ao avaliar o potencial hipocolesterolêmico do β -cariofileno (metabólito presente em alta concentração no OECb) em modelos animais, Harb *et al* (2018) demonstraram que o β -cariofileno tem efeito hipolipidêmico e pode prevenir doenças relacionadas a altas taxas de colesterol. Apesar dos resultados encontrados, se faz necessário uma avaliação mais detalhada de um possível efeito hipolipidêmico do OECb.

Tabela 1 – Parâmetros bioquímicos do grupo controle e dos grupos tratados de machos e fêmeas com administração oral de 28 dias com o óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* na dose de 500 mg/kg.

Parâmetros	Tratamentos			
	Machos		Fêmeas	
	Controle	Óleo essencial 500 mg/kg v.o	Controle	Óleo essencial 500 mg/kg v.o
Albumina (g/dL)	2,41±0,2	2,46±0,15	2,89±0,22	2,69±0,42
ALT (U/L)	69,40±2,42	70,74±2,55	67,60±1,3	65,99±1,57
AST (U/L)	92,4±2,33	93,26±2,06	89,20±2,23	91,15±1,53
Fosfatase alcalina (IU/L)	9,90±0,34	10,38±0,98	9,30±0,22	9,47±0,49
GGT (U/L)	9,83±0,4	9,44±0,57	9,97±0,93	10,23±0,66
Proteínas totas (g/dL)	10,98±0,19	11,35±0,24	10,79±0,62	11,10±0,72
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,37±0,07	0,41±0,10	0,34±0,1	0,44±0,18
Creatinina (mg/dL)	4,27±0,4	4,53±0,52	4,31±0,25	3,95±0,19
Bilirrubina	0,39±0,03	0,45±0,08	0,40±0,04	0,53±0,10
Colesterol total (mg/dL)	140,3±4,11	96,01±1,66*	147,4±4,9	97,09±1,09*
Triglicerídeos (mg/dL)	119,3±5,12	76,85±3,54*	115,7±5,21	75,73±2,04*

Fonte: O autor. ALB: albumina (g/dL). ALT: alanine aminotransferase (U/L). AST: aspartate aminotransferase (U/L). IU: fosfatase alcalina (U/L); BIL: bilirrubina (mg/dL); GGT: gama glutamil transferase. TP: proteína total (g/dL). BUN: ureia (mg/dL). CRE: creatinina (mg/dL), TC: colesterol total (mg/dL). TG: triglicerídeos (mg/dL).

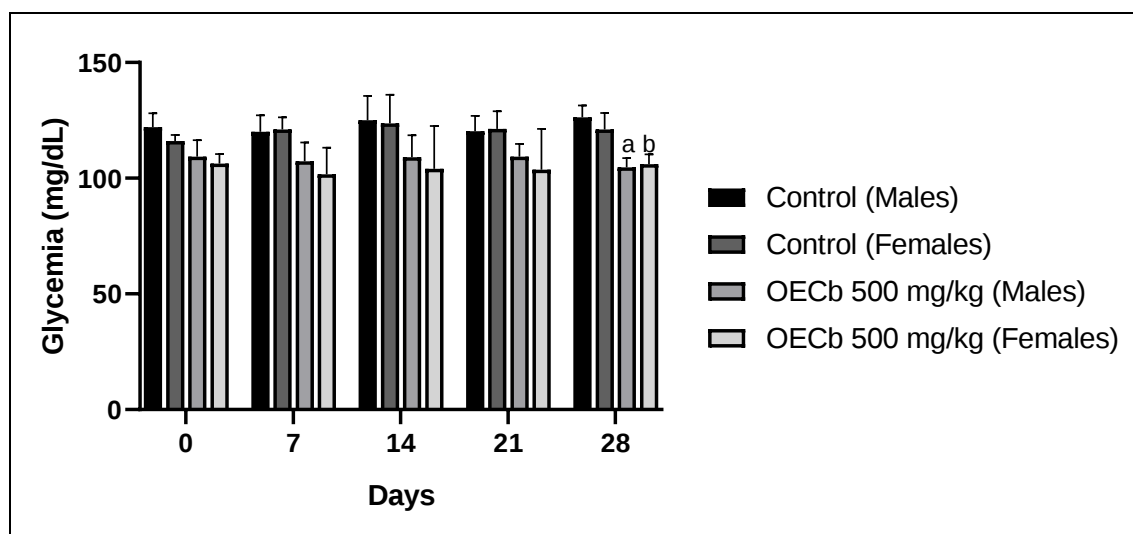
Os valores estão expressos como média ± DP. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle.

O índice glicêmico foi avaliado semanalmente (Figura 3) e os camundongos machos e fêmeas apresentaram diferença significativa apenas na última semana de tratamento, quando comparados com os respectivos grupos controles ($p < 0,05$). Terpenos, monoterpenos e sesquiterpenos já foram descrito como agentes com ação hipoglicêmica (ARAÚJO DELMONDES *et al*, 2019). O mecanismo de ação de terpenos na redução da glicose sanguínea pode se dar pela capacidade de inibir a α -glicosidase, enzima com importante papel

na digestão de carboidratos (BOUKHATEM; NADJIB, 2020; MARQUES *et al*, 2019; SALLAU *et al*, 2018).

Na literatura, é possível encontrar estudos que demonstram o potencial hipoglicêmico de espécies do gênero *Croton*.

Figura 3 – Efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* sobre o índice glicêmico de camundongos machos e fêmeas durante 28 dias de tratamento



Fonte: O autor. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. ($n = 5/\text{grupo}$). (a) indica diferença significativa entre os grupos controle e tratados de animais machos. (b) indica diferença significativa entre os grupos controle e tratados de animais fêmeas.

Os resultados da análise hematológica são apresentados na Tabela 2. Tanto os camundongos machos quanto fêmeas que receberam OECb não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) nas séries vermelha e branca em comparação aos controles. O sistema hematopoiético é responsável pela produção contínua de células sanguíneas circulantes maduras altamente especializadas. Devido à sua alta taxa metabólica e proliferativa, e devido às funções desempenhadas pelas células sanguíneas serem vitais para um organismo, lesões diretas e indiretas induzidas por xenobióticos podem ser altamente prejudiciais (RAMAIAH *et al*, 2013).

Tabela 2 – Parâmetros hematológicos de camundongos de machos e fêmeas dos grupos controle e tratados por 28 dias com o óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* por administração oral na dose de 500 mg/kg.

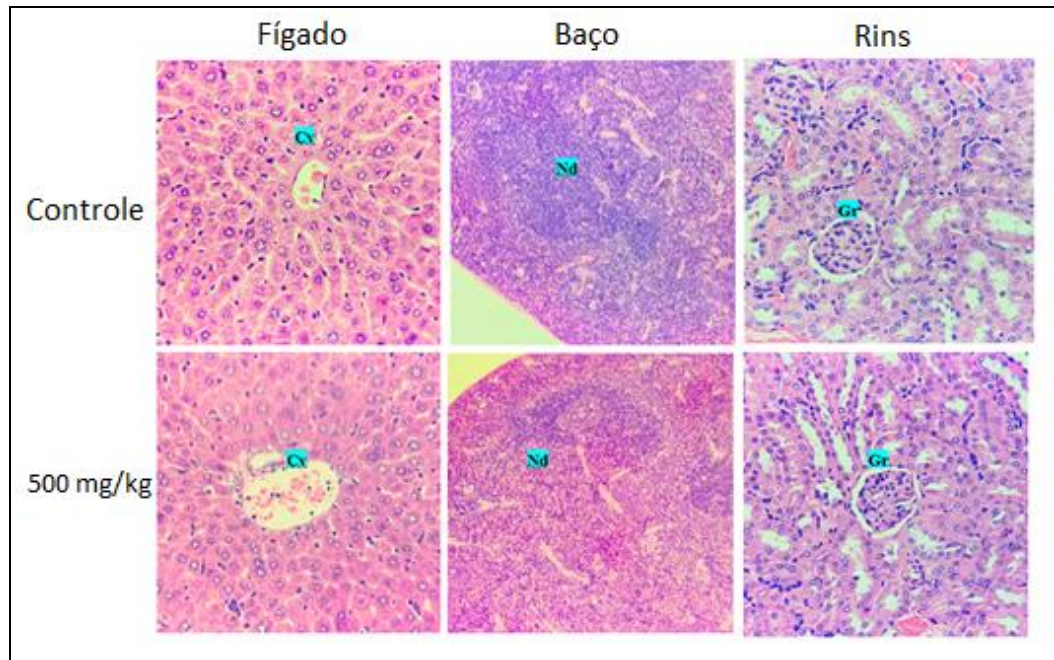
Parâmetros	Tratamentos			
	Machos		Fêmeas	
	Controle	Óleo essencial 500 mg/kg v.o	Controle	Óleo essencial 500 mg/kg v.o
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	7,53±0,67	7,65±0,7	7,54±0,19	7,41±0,39
Hematócrito (%)	41,26±0,41	42,15±0,22	41,22±0,65	41,53±0,51
Hemoglobina (%)	15,55±0,34	14,90±0,51	16,41±0,55	16,21±0,8
VCM (%)	44,12±0,27	43,78±0,42	45,23±0,16	44,83±0,4
HCM (%)	17,53±0,34	17,01±0,4	17,88±0,27	17,49±0,49
CHCM (%)	38,03±0,51	37,15±0,63	37,31±0,18	37,62±0,48
Segmentados (%)	10,07±0,74	11,26±0,56	11,29±1,02	11,69±0,85
Linfócitos (%)	72,31±0,41	73,18±0,35	70,43±0,18	70,26±0,71
Monócitos (%)	2,56±0,55	2,61±0,6	2,28±0,65	2,23±0,31
Basófilos (%)	0,02±0,01	0,04±0,02	0,02±0,01	0,02±0,01
Eosinófilos (%)	25,13±0,71	26,01±0,48	24,38±0,57	25,01±0,69

Fonte: O autor. MCV: volume corpuscular médio. MCH: hemoglobina corpuscular média. MCHC: concentração média de hemoglobina corpuscular. Os valores representam a média ± SEM. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em comparação com o controle.

A análise histológica não revelou quaisquer anormalidades no fígado, rim e baço nos animais que receberam o OECb por via oral quando comparados ao grupo controle (Figura 4). Nos fígados dos animais que não receberam o óleo, foi possível observar a preservação das estruturas hepáticas, sem a presença de pontos inflamatórios. O espaço portal possui os contornos normais, bem como as veias centrilobulares. Os cordões hepáticos apresentam aspectos lineares e os hepatócitos não aparentavam vacuolizações. No baço, a visualização das polpas branca e vermelha é nítida, com contornos bem delimitados. No rim, a região cortical e medular mantiveram-se preservadas, bem delimitadas e sem a presença de vacuolização. Os néfrons aparentavam bom estado de preservação (Figura 4). Sendo assim, a análise não mostrou quaisquer alterações histológicas no fígado, baço e rim, indicando nenhum efeito no sistema reticuloendotelial.

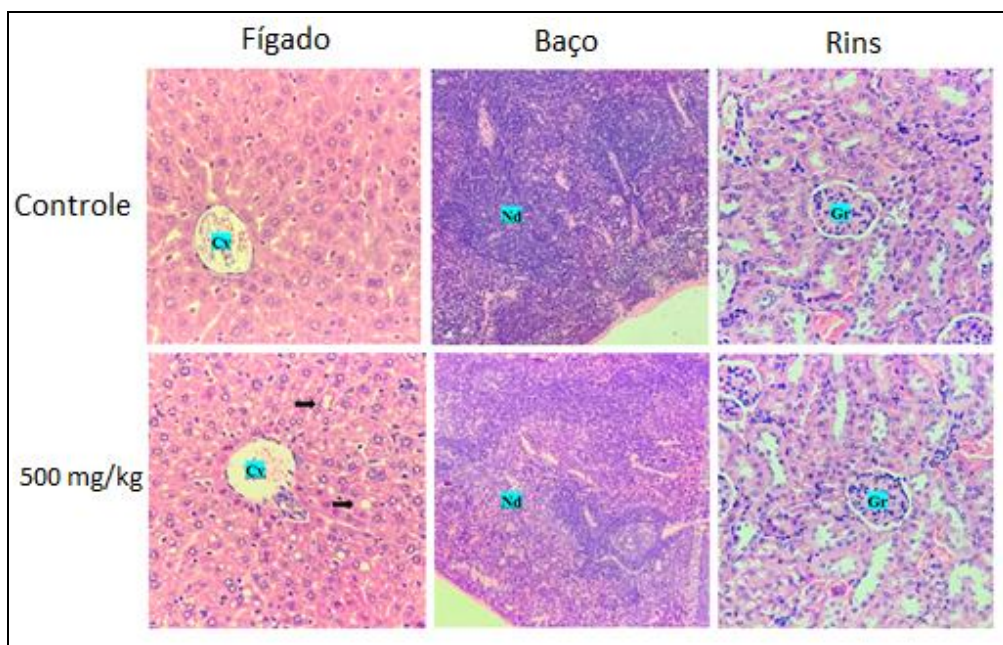
Figura 4 – Fotomicrografias representativas dos fígados, rins e baço de camundongos machos do grupo controle ou grupos tratados com óleo essencial de folhas de *C.*

blanchetianus por 28 dias, na dose de 500 mg/kg por administração oral



Fonte: O autor. Fígados: a veia centrilobular (v) é vista em todas as imagens. Rins: Glomérulos renais (Gr) e túbulos contorcidos. Baço: os linfonodos (Nd). Ampliação: 400 x.

Figura 5 – Fotomicrografias representativas dos fígados, rins e baço de camundongos fêmeas do grupo controle ou grupos tratados com óleo essencial de folhas de *C. blanchetianus* por 28 dias, na dose de 500 mg/kg por administração oral



Fonte: O autor. Fígados: a veia centrolobular (v) é vista em todas as imagens. Rins: Glomérulos renais (Gr) e túbulos contorcidos. Baço: os linfonodos (Nd). Ampliação: 400 x.

Conclusões

O óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* não apresentou toxicidade quando administrado na dose de 500 mg/kg por via oral em camundongos por 28 dias consecutivos. Sendo assim, esses resultados constituem mais uma evidência da segurança do uso desse óleo essencial de *C. blanchetianus* na dose avaliada. Ainda, os resultados sugerem a avaliação de possíveis atividades hipoglicêmica e hipolipidêmica.

Referências

- ADRIANA ESTRELLA, G.-R. *et al.* Limonene from *Agastache mexicana* essential oil produces antinociceptive effects, gastrointestinal protection and improves experimental ulcerative colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 114462, 26 jul. 2021.
- AITA, A. M.; MATSUURA, H. N.; MACHADO, C. A. *Divulgação*. v. 19, n. March, p. 471–477, 2009.

- AL-SNAFI, P. D. A. E. Pharmacology and therapeutic potential of *Euphorbia hirta* (Syn: *Euphorbia pilulifera*)- A review. **IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR)**, v. 07, n. 03, p. 07–20, 2017.
- ALMEIDA-PEREIRA, C. S. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of a *Croton tetradenius* Baill. germplasm. **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n. 5, p. 379–389, 2019.
- ALOSTAD, A. H.; STEINKE, D. T.; SCHAFHEUTLE, E. I. International Comparison of Five Herbal Medicine Registration Systems to Inform Regulation Development: United Kingdom, Germany, United States of America, United Arab Emirates and Kingdom of Bahrain. **Pharmaceutical Medicine**, v. 32, n. 1, p. 39–49, 2018.
- ANDRADE, E. L. *et al.* Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 49, n. 12, p. e5646, 2016.
- ANDRADE-CETTO, A. *et al.* Hypoglycemic Activity of Medicinal Plants Used among the Cakchiquels in Guatemala for the Treatment of Type 2 Diabetes. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.
- AQUINO, V. V. F. *et al.* Metabólitos Secundários e ação antioxidante de *Croton heliotripifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p. 28, 2017.
- ARAÚJO DELMONDES, G. *et al.* Toxicological and pharmacologic effects of farnesol (C₁₅H₂₆O): A descriptive systematic review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 129, p. 169–200, 1 jul. 2019.
- ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.
- AUMEERUDDY-ELALFI, Z.; GURIB-FAKIM, A.; MAHOMOODALLY, M. F. Antimicrobial and Antibiotic Potentiating Activity of Essential Oils From Tropical Medicinal Herbs and Spices. **Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches**, p. 271–289, 1 jan. 2016.
- AVILA, A. M. *et al.* An FDA/CDER perspective on nonclinical testing strategies: Classical toxicology approaches and new approach methodologies (NAMs). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 114, n. April, p. 104662, 2020.

- AYDIN, A.; AKTAY, G.; YESILADA, E. A guidance manual for the toxicity assessment of traditional herbal medicines. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 11, p. 1763–1773, 2016.
- AYZA, M. A. *et al.* Protective effect of croton macrostachyus (Euphorbiaceae) stem bark on cyclophosphamide-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 12, p. 275–283, 2020.
- BOY, H. I. A. *et al.* Recommended Medicinal Plants as Source of Natural Products: A Review. **Digital Chinese Medicine**, v. 1, n. 2, p. 131–142, 1 jun. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução de Diretoria Colegiada nº 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, p. 1–34, 2014.
- CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental: um guia para a Pesquisa de Drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas Plantas Medicinais**. São Paulo: [s.n.].
- CAVALCANTE, N. B.; DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS, A.; GUEDES DA SILVA ALMEIDA, J. R. The genus *Jatropha* (Euphorbiaceae): A review on secondary chemical metabolites and biological aspects. **Chemico-Biological Interactions**, v. 318, n. February 2019, p. 108976, 2020.
- CHABALALA, H. *et al.* Brazilian traditional medicine: Historical basis, features and potentialities for pharmaceutical development. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, 17 dez. 2021.
- COLERANGLE, J. B. Preclinical Development of Nononcogenic Drugs (Small and Large Molecules). **A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development**, p. 659–683, 1 jan. 2017.
- CONEGUNDES, J. L. M. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Siparuna guianensis* Aublet, an amazonian plant traditionally used by indigenous communities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113344, 30 jan. 2021.
- CORDEIRO, M. S. *et al.* Characterization of the antinociceptive activity from *Stevia serrata* Cav. **Biomedicines**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2020.
- COUTINHO, L. A.; GONÇALVES, C. P.; MARCUCCI, M. C. Composição química, atividade biológica e segurança de uso de plantas do gênero *Mikania*. **Revista Fitos**, v. 14, n. 01, p. 118–144, 2020.

- CUBAS, V. M.; RIBAS, J. L. C. Medicina alternativa à base de plantas medicinais no tratamento da acne. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e12810212153, 2021.
- DONALD, G. R. *et al.* Antinociceptive activity of puberulin and choisyine from ethanol extract of *Choisya ternata* Kunth var. *Sundance*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 141, p. 111926, 1 set. 2021.
- ECHA. Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R . 7b : Endpoint specific guidance November 2012. **Echa**, v. 2012, n. November, p. 1–238, 2012.
- ELANSARY, H. O. *et al.* Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.
- ETIENNE, R.; DIAS VIEGAS, F. P.; VIEGAS, C. Pathophysiological aspects of inflammation and drug design: An updated overview. **Revista Virtual de Quimica**, v. 13, n. 1, p. 167–191, 2021.
- FARZAEI, M. H. *et al.* Iranian. v. 23, n. February, p. 117–127, 2020.
- FASOLA, T. R. *et al.* Antidiabetic and antioxidant effects of croton lobatus L. In alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 364–371, 2016.
- FAZLY BAZZAZ, B. S. *et al.* Deep insights into urinary tract infections and effective natural remedies. **African Journal of Urology**, v. 27, n. 1, 2021.
- FEYAERTS, A. F.; LUYTEN, W.; VAN DIJCK, P. Striking essential oil: tapping into a largely unexplored source for drug discovery. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.
- FITZGERALD, M.; HEINRICH, M.; BOOKER, A. Medicinal plant analysis: A historical and regional discussion of emergent complex techniques. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. January, p. 1–14, 2019.
- FOROUZANFAR, F.; HOSSEINZADEH, H. Medicinal herbs in the treatment of neuropathic pain: A review. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 4, p. 347–358, 2018.
- FREITAS, A. F. S. *et al.* Toxicity assessment and antinociceptive activity of an ethanolic extract from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) leaves. **South African Journal of Botany**, v. 133, p. 30–39, 2020.

- GHAVAM, M. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils obtained from leaves and flowers of *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.
- GIACOMELLO, C. A. M. *et al.* Chronic Pain : Mechanism Based Management. p. 1–10, [s.d.].
- GITLEMAN, L. 済無. **Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents**, v. 2020, p. 1–11, 2014.
- GOYAL, S.; GUPTA, N.; CHATTERJEE, S. Investigating therapeutic potential of *trigonella foenum-graecum* L. As our defense mechanism against several human diseases. **Journal of Toxicology**, v. 2016, 2016.
- GRECO, I. *et al.* Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- HALL, J. E. **Guyton & Hall Fundamentos de Fisiologia**. 13^a edição ed. [s.l.: s.n.].
- HALL, P.; CASH, J. What is the real function of the liver “function” tests?: Discovery Service for Endeavour College of Natural Health Library. **Ulster Medical Journal**, v. 81, n. 1, p. 30–36, 2012.
- HAMEL, A.; ROY, M.; PROUDLOCK, R. **The Bacterial Reverse Mutation Test**. [s.l.: s.n.].
- HARDY, K. Paleomedicine and the Evolutionary Context of Medicinal Plant Use. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 1, p. 1–15, 2021.
- HARTWIG, A. *et al.* **Mode of action-based risk assessment of genotoxic carcinogens**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2020. v. 94
- HAYASHI, M. The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test. **Genes and Environment**, v. 38, n. 1, p. 4–9, 2016.
- INSIGHTSLICE. **Herbal Medicine Market Global Sales Are Expected To Reach US\$ 550 Billion by 2030, as stated by insightSLICE**. Disponível em: <https://www.globenewswire.com/en/news-release/2021/02/16/2176036/0/en/Herbal-Medicine-Market-Global-Sales-Are-Expected-To-Reach-US-550-Billion-by-2030-as-stated-by-insightSLICE.html>. Acesso em: 27 jun. 2021.
- ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological research**, v. 52, n. 1, p. 39, 2019.
- ISLAM, M. T. *et al.* Anti-Schistosoma mansoni effects of essential oils and their components. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 8, p. 1761–1769, 2020.

- IVANOVA, N. *et al.* We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. **Intech**, v. i, n. tourism, p. 13, 2016.
- JAHROMI, B. *et al.* Herbal medicine for pain management: Efficacy and drug interactions. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 1–43, 2021.
- JESUS, R. *et al.* Determination of medium lethal dose (LD50) and acute toxicity of formulation Cytoreg®, an ionic mixture of strong and weak acids. **Latin American Journal of Development**, v. 3, n. 3, p. 1121–1126, 2021.
- JOSÉ, M.; TRINDADE, D. S.; LAMEIRA, O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil Species de interés de familia Euphorbiaceae en Brasil Species from the Euphorbiaceae family used for medicinal purposes in Brazil. v. 4, n. 2014, p. 1–22, 2012.
- KAUR, N.; KAUR, B.; SIRHINDI, G. Phytochemistry and Pharmacology of Phyllanthus niruri L.: A Review. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 7, p. 980–1004, 2017.
- KIFAYATULLAH, M. *et al.* Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of Pericampylus glaucus (Lam.) Merr. in BALB/c mice. **Journal of Acute Disease**, v. 4, n. 4, p. 309–315, 2015.
- KHOEI, H. A. *et al.* WITHDRAWN: Physospermum cornubiense L. alleviates nociceptive and neuropathic pain: Evidences and possible mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 114957, 5 jan. 2022.
- LEITE, T. R. *et al.* Antimicrobial, modulatory and chemical analysis of the oil of croton limae. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 2015–2019, 2017.
- LI, J. *et al.* Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SBP-box gene family in Euphorbiaceae. **BMC Genomics**, v. 20, n. Suppl 9, p. 1–15, 2019.
- LIMA, C. C. *et al.* Antispasmodic effects of the essential oil of Croton zehnteneri, anethole, and estragole, on tracheal smooth muscle. **Heliyon**, v. 6, n. 11, 2020a.
- LIMA, J. A. L. DE *et al.* Avaliação Teórica Das Propriedades Farmacocinéticas, Físico-Químicas E Farmacodinâmicas Do Composto Isolado De Valeriana Officinalis Em Transtorno De Ansiedade / Theoric Evaluation of Pharmacokinetics, Physicochemistry and Pharmacodynamics of Isolate Com. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 74751–74762, 2020b.
- LOCATELLI, M. *et al.* Optimization of Aqueous Extraction and Biological Activity of Harpagophytum procumbens Root on Ex Vivo Rat Colon Inflammatory Model. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 6, p. 937–944, 2017.

- LOPES, D. M. *et al.* A refinement to the formalin test in mice. **F1000Research**, v. 8, p. 1–17, 2019.
- MAIA-SILVA, C. *et al.* **Guia de Plantas Visitadas por abelhas na Caatinga**. 1^a ed. Fortaleza-CE: [s.n.].
- MAKRIS, K.; SPANOU, L. Lesion Renal Aguda Otro. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 37, n. 2, p. 85–98, 2016.
- MARQUES, F. M. *et al.* In vitro anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF- κ B signalling pathway. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 2, p. 281–289, 2019.
- MASOCHA, W.; KOMBIAN, S. B.; EDAFIOGHO, I. O. Evaluation of the antinociceptive activities of enaminone compounds on the formalin and hot plate tests in mice. **Scientific Reports**, v. 6, n. August 2015, p. 1–9, 2016.
- MATI, V.; NAT, V. INTERNATIONAL STANDARD ISO Aromatic natural raw materials —. v. 2013, 2013.
- MELO, G. F. DO A. *et al.* The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to Croton blanchetianus Baill essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1189–1194, 2013.
- MENEZES, P. M. N. *et al.* Investigation of antinociceptive, antipyretic, antiasthmatic, and spasmolytic activities of Brazilian Cannabis sativa L. roots in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 278, p. 114259, 5 out. 2021.
- MICUCCI, M. *et al.* Thymus vulgaris l. Essential oil solid formulation: Chemical profile and spasmolytic and antimicrobial effects. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, 2020.
- MILLS, S. E. E.; NICOLSON, K. P.; SMITH, B. H. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. **British Journal of Anaesthesia**, v. 123, n. 2, p. e273–e283, 2019.
- MIRALDI, E.; BAINI, G. Medicinal Plants and Health in Human History: From Empirical Use To Modern Phytotherapy. **Journal of the Siena Academy of Sciences**, v. 10, n. 1, p. 7–12, 2019.
- MOLLAEI, S. *et al.* Extraction of essential oils of Ferulago angulata with microwave-assisted hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, v. 137, n. May, p. 43–51, 2019.
- MONTEIRO, S. DA C.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. 1^a edição ed. [s.l.: s.n.].
- MORALES U. A. *et al.* Antibacterial activity of the Croton draco hidroalcoholic extract on bacteria of sanitary importance. **Abanico Veterinario**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

- MWINE, J. T.; VAN DAMME, P. Why do euphorbiaceae tick as medicinal plants? a review of euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p. 652–662, 2011.
- NADJIB BOUKHATEM, M.; MOHAMED NADJIB, B. Effective Antiviral Activity of Essential Oils and their Characteristic Terpenes against Coronaviruses: An Update. **J Phar-macol Clin Toxicol**, v. 8, n. 1, p. 1138, 2020.
- NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKES. **Disorders Chronic Pain Information Page**. Disponível em: <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/All-Disorders/Chronic-pain-Information-Page>.
- NUGRAHA, B. *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Functioning properties of chronic pain. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 88–94, 2019.
- OECD. **OECD Series on Testing and Assessment**. [s.l.: s.n.].
- OKTAVIANAWATI, I. *et al.* Essential Oil Composition of Rose Flowers from Karangpring Village Jember District Extracted by Distillation and Enfleurage. **Jurnal ILMU DASAR**, v. 20, n. 2, p. 67, 2019.
- OLIVEIRA, R. G. *et al.* Antinociceptive effect of the essential oil from *Croton conduplicatus* Kunth (Euphorbiaceae). **Molecules**, v. 22, n. 6, 2017.
- OLIVEIRA-TINTINO, C. D. DE M. *et al.* Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in in vivo models. **Phytomedicine**, v. 41, p. 82–95, 2018.
- OLIVEIRA DE VERAS, B. *et al.* Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 247, n. August 2019, p. 112265, 2020.
- PARK, N. *et al.* Efficacy and mechanism of essential oil from *Abies holophylla* leaf on airway inflammation in asthma: Network pharmacology and in vivo study. **Phytomedicine**, v. 96, p. 153898, 1 fev. 2022.
- PEREIRA, K. L. G. *et al.* Ethanolic extract of *Croton blanchetianus* ball induces mitochondrial defects in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 92, p. 1–15, 2020.
- PINHO-DA-SILVA, L. *et al.* *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. **Phytomedicine**, v. 17, n. 10, p. 721–725, 2010.

- QUEZADA-MORENO, W. *et al.* Extraction and chemical characterization of the essential oil of *Tagetes pusilla*, in fresh and stored samples. **Afinidad**, v. 76, n. 588, p. 307–313, 2019.
- RABEHAJA, D. J. R. *et al.* Chemical composition of the essential oil from *Croton kimosorum*, an endemic species to Madagascar. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 1, p. 129–132, 2014.
- RAMAIAH, L.; BOUNOUS, D. I.; ELMORE, S. A. Hematopoietic System. **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology**, p. 1863–1933, 1 jan. 2013.
- RAMALHO, S. D. *et al.* Biologically Active Orbitides from the Euphorbiaceae Family. **Planta Medica**, v. 84, n. 9–10, p. 558–567, 2018.
- RASOOL, A. *et al.* Medicinal plants: Role, distribution and future. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 2, p. 2111–2114, 2020.
- REGISTRE, M.; PROUDLOCK, R. **The In Vitro Chromosome Aberration Test**. [s.l.: s.n.]. v. 227
- REN, N. *et al.* The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: Testing methods and clinical applications. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2017.
- REYNOSO, M. A. *et al.* Antinociceptive activity of fruits extracts and “arrope” of *Geoffroea decorticans* (chañar). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 355–362, 9 jan. 2013.
- REZGUI, M. *et al.* Antioxidant and antifungal activities of marrubiin, extracts and essential oil from *Marrubium vulgare* L. against pathogenic dermatophyte strains. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 30, n. 1, p. 100927, 2020.
- ROCHA, A. R. F. *et al.* Extracts and fractions of *Croton* L. (Euphorbiaceae) species with antimicrobial activity and antioxidant potential. **Lwt**, v. 139, p. 110521, 2021.
- RODRIGUES, O. G. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante dos extratos botânicos de *Croton Heliotropifolius* Kunth. e *Croton blanchetianus* Baill. **Agropecuária Científica No Semiárido**, v. 12, n. 3, p. 237–241, 2017.
- RODRIGUES, O. G. *et al.* In vitro biological activity of the *Croton blanchetianus* (Baill) essential oil against *Rhipicephalus (boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 55–58, 2019.
- RODRÍGUEZ, E. *et al.* We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. **Intech**, v. 32, n. tourism, p. 137–144, 1989.

- SÁ FIRMINO, N. C. *et al.* Diterpenes isolated from *Croton blanchetianus* Baill: Potential compounds in prevention and control of the oral Streptococci biofilms. **Industrial Crops and Products**, v. 131, n. September 2018, p. 371–377, 2019.
- SAGANUWAN, S. A. Toxicity studies of drugs and chemicals in animals: An overview. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 20, n. 4, p. 291–318, 2017.
- SALEHI *et al.* Euphorbia-Derived Natural Products with Potential for Use in Health Maintenance. **Biomolecules**, v. 9, n. 8, p. 337, 2019.
- SALLAU, A. B. *et al.* In vitro effect of terpenoids - rich extract of *Momordica charantia* on alpha glucosidase activity. **Vitae**, v. 25, n. 3, p. 148–153, 2018.
- SANTANA, J. M. *et al.* Tradução para a língua portuguesa da definição revisada de dor pela Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. **Iasp**, p. 1–8, 2020.
- SANTOS, S. M. DOS *et al.* Variation in essential oil components and anti-inflammatory activity of *Allophylus edulis* leaves collected in central-western Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, n. October, 2021.
- SILVA, A. L. E *et al.* Prevalence of chronic pain and associated factors among medical students. **Revista Dor**, v. 18, n. 2, p. 108–111, 2017a.
- SILVA, M. M. *et al.* *Schinus terebinthifolius*: Phenolic constituents and in vitro antioxidant, antiproliferative and in vivo anti-inflammatory activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 445–452, 2017b.
- SILVA, J. S. *et al.* Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 441–453, 2010.
- SILVA, S. N. *et al.* Leaves in Rodents. v. 22, n. 1, p. 102–108, 2012.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia - Da Planta Ao Medicamento**. [s.l: s.n.].
- SOARES, V. F.; BARBOSA, M. L.; SILVA, M. S. DA. Conhecimento popular sobre plantas medicinais utilizadas por especialistas locais da zona rural de Junqueiro/AL. **Diversitas Journal**, v. 5, n. 4, p. 2692–2724, 2020.
- SOHANI, S. Role of Medicinal Plant in Human Health Perspective. **Acta Scientific Agriculture**, v. 5, n. 6, p. 65–68, 2021.
- ŠOJÍČ, B. *et al.* Essential oil versus supercritical fluid extracts of winter savory (*Satureja montana* L.) – Assessment of the oxidative, microbiological and sensory quality of fresh pork sausages. **Food Chemistry**, v. 287, n. February, p. 280–286, 2019.
- SOUZA, J. B. DE; BARROS, C. M. DE. Considerations about the new concept of pain. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 3, n. 3, p. 20200190, 2020.

- SUGIER, D. *et al.* Essential oil from Arnica Montana L. Achenes: Chemical characteristics and anticancer activity. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 1–13, 2019.
- SÜNTAR, I. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 5, p. 1199–1209, 2020.
- TORRES, M. DA C. DE M. *et al.* Composição Química Dos Óleos Essenciais De Croton Sonderianus Muell. Arg. (Euphorbiaceae) / Chemical Composition of Croton Sonderianus Muell Essential Oils. Arg. (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 81493–81503, 2020.
- TUNTLAND, T. *et al.* Implementation of pharmacokinetic and pharmacodynamic strategies in early research phases of drug discovery and development at novartis institute of biomedical research. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 JUL, n. July, p. 1–16, 2014.
- VALLE, A. L. Current methodologies in assessing toxicity of natural products. **International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients**, v. 5, n. 1, p. 3–3, 2018.
- VANDENBERG, L. N. *et al.* Should oral gavage be abandoned in toxicity testing of endocrine disruptors? **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2014.
- WIDMAIER, E. P.; RAFF, H.; STRONG, K. T. **Fisiologia Humana: Os Mecanismos das Funções Corporais**. 14ª edição ed. [s.l: s.n.].
- WOLFFENBÜTTEL, A. N. **BASE DA QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E AROMATERAPIA - Abordagem técnica e científica**. 3ª edição ed. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO global report on traditional and complementary medicine 2019**. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **National Policy on Traditional Medicine and Regulation of Herbal Medicines**: report of a WHO Global survey. Geneva: WHO, 2005. 156p.
- XIANG, H. C. *et al.* AMPK activation attenuates inflammatory pain through inhibiting NF- κ B activation and IL-1 β expression. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2019.
- YANG, J. *et al.* The modified WHO analgesic ladder: Is it appropriate for chronic non-cancer pain? **Journal of Pain Research**, v. 13, p. 411–417, 2020.
- YASUI, M. *et al.* Weight of evidence approach using a TK gene mutation assay with human TK6 cells for follow-up of positive results in Ames tests: a collaborative study by MMS/JEMS. **Genes and Environment**, v. 43, n. 1, p. 1–19, 2021.

- YI, F. *et al.* Evaluation of mechanical-pressed essential oil from Nanfeng mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Kinokuni) as a food preservative based on antimicrobial and antioxidant activities. **Lwt**, v. 95, n. May, p. 346–353, 2018.
- ZAREI, M.; MOHAMMADI, S.; KOMAKI, A. Antinociceptive activity of *Inula britannica* L. and patuletin: In vivo and possible mechanisms studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 219, p. 351–358, 12 jun. 2018.
- ZELAYA, C. E. *et al.* Chronic Pain and High-impact Chronic Pain Among U.S. Adults, 2019. **NCHS data brief**, n. 390, p. 1–8, 2020.
- ZENG, X. S. *et al.* Morphine Addiction and Oxidative Stress: The Potential Effects of Thioredoxin-1. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. February, p. 1–6, 2020.

5 CONCLUSÕES

- O óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus* foi submetido à avaliação de toxicidade por diferentes ensaios. O óleo exibiu baixo potencial hemolítico sobre eritrócitos de camundongo, porém se mostrou letal quando administrado por via intraperitoneal na dose de 2000 mg/kg. Por outro lado, não apresentou toxicidade aguda quando administrado por via oral, não sendo observadas alterações significativas em parâmetros comportamentais, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos.
- No ensaio de toxicidade subaguda, doses diárias de 500 mg/kg por 28 dias promoveram redução da massa corpórea em machos e fêmeas, porém sem sinais de toxicidade, bem como da ingestão de ração e água. A análise bioquímica indicou redução dos níveis séricos de glicose, triglicerídeos e colesterol total, o que estimula estudos mais detalhados sobre ações hipoglicemiantes e hipolipidêmicas do óleo.
- O óleo essencial na dose oral de 2000 mg/kg mostrou ser um agente antienotóxico.
- Em doses seguras, o óleo essencial demonstrou potencial atividade antinociceptiva, atuando nas vias central e periférica da dor.

REFERÊNCIAS

- ADRIANA ESTRELLA, G.-R. *et al.* Limonene from *Agastache mexicana* essential oil produces antinociceptive effects, gastrointestinal protection and improves experimental ulcerative colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 114462, 26 jul. 2021.
- AITA, A. M.; MATSUURA, H. N.; MACHADO, C. A. Divulgação. v. 19, n. March, p. 471–477, 2009.
- ALENCAR, D. B. *et al.* Antioxidant, hemolytic, antimicrobial, and cytotoxic activities of the tropical Atlantic marine zoanthid *Palythoa caribaeorum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 87, n. 2, p. 1113–1123, 2015.
- AL-SNAFI, P. D. A. E. Pharmacology and therapeutic potential of *Euphorbia hirta* (Syn: *Euphorbia pilulifera*)- A review. **IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR)**, v. 07, n. 03, p. 07–20, 2017.
- ALMEIDA-PEREIRA, C. S. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of a *Croton tetradenius* Baill. germplasm. **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n. 5, p. 379–389, 2019.
- ALOSTAD, A. H.; STEINKE, D. T.; SCHAFHEUTLE, E. I. International Comparison of Five Herbal Medicine Registration Systems to Inform Regulation Development: United Kingdom, Germany, United States of America, United Arab Emirates and Kingdom of Bahrain. **Pharmaceutical Medicine**, v. 32, n. 1, p. 39–49, 2018.
- ANDRADE-CETTO, A. *et al.* Hypoglycemic Activity of Medicinal Plants Used among the Cakchiquels in Guatemala for the Treatment of Type 2 Diabetes. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.
- AQUINO, V. V. F. *et al.* Metabólitos Secundários e ação antioxidante de *Croton heliotripifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p. 28, 2017.
- ARAÚJO DELMONDES, G. *et al.* Toxicological and pharmacologic effects of farnesol (C₁₅H₂₆O): A descriptive systematic review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 129, p. 169–200, 1 jul. 2019.
- ASHMAWI, H. A.; FREIRE, G. M. G. Peripheral and central sensitization. **Revista Dor**, v. 17, n. Supl 1, p. 31–34, 2016.
- ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.
- AVILA, A. M. *et al.* An FDA/CDER perspective on nonclinical testing strategies: Classical toxicology approaches and new approach methodologies (NAMs). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 114, n. April, p. 104662, 2020.

- AYDIN, A.; AKTAY, G.; YESILADA, E. A guidance manual for the toxicity assessment of traditional herbal medicines. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 11, p. 1763–1773, 2016.
- AYZA, M. A. *et al.* Protective effect of croton macrostachyus (Euphorbiaceae) stem bark on cyclophosphamide-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 12, p. 275–283, 2020.
- BOCHKOV, D. V. *et al.* Shikimic acid: Review of its analytical, isolation, and purification techniques from plant and microbial sources. **Journal of Chemical Biology**, v. 5, n. 1, p. 5–17, 2012.
- BOY, H. I. A. *et al.* Recommended Medicinal Plants as Source of Natural Products: A Review. **Digital Chinese Medicine**, v. 1, n. 2, p. 131–142, 1 jun. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução de Diretoria Colegiada nº 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, p. 1–34, 2014.
- CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental: um guia para a Pesquisa de Drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas Plantas Medicinais**. São Paulo: [s.n.].
- CAVALCANTE, N. B.; DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS, A.; GUEDES DA SILVA ALMEIDA, J. R. The genus *Jatropha* (Euphorbiaceae): A review on secondary chemical metabolites and biological aspects. **Chemico-Biological Interactions**, v. 318, n. February 2019, p. 108976, 2020.
- CHABALALA, H. *et al.* Brazilian traditional medicine: Historical basis, features and potentialities for pharmaceutical development. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, 17 dez. 2021.
- CHE, C. T. *et al.* Traditional Medicine. **Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy**, p. 15–30, 1 jan. 2017.
- COLERANGLE, J. B. Preclinical Development of Nononcogenic Drugs (Small and Large Molecules). **A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development**, p. 659–683, 1 jan. 2017.
- CONEGUNDES, J. L. M. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Siparuna guianensis* Aublet, an amazonian plant traditionally used by indigenous communities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113344, 30 jan. 2021.
- CORDEIRO, M. S. *et al.* Characterization of the antinociceptive activity from *Stevia serrata* Cav. **Biomedicines**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2020.
- COUTINHO, L. A.; GONÇALVES, C. P.; MARCUCCI, M. C. Composição química, atividade biológica e segurança de uso de plantas do gênero *Mikania*. **Revista Fitos**, v. 14, n. 01, p. 118–144, 2020.

CUBAS, V. M.; RIBAS, J. L. C. Medicina alternativa à base de plantas medicinais no tratamento da acne. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e12810212153, 2021.

DONALD, G. R. *et al.* Antinociceptive activity of puberulin and choisyine from ethanol extract of *Choisya ternata* Kunth var. *Sundance*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 141, p. 111926, 1 set. 2021.

ECHA. Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R . 7b : Endpoint specific guidance November 2012. **Echa**, v. 2012, n. November, p. 1–238, 2012.

ETIENNE, R.; DIAS VIEGAS, F. P.; VIEGAS, C. Pathophysiological aspects of inflammation and drug design: An updated overview. **Revista Virtual de Quimica**, v. 13, n. 1, p. 167–191, 2021.

FARZAEI, M. H. *et al.* *Iranian*. v. 23, n. February, p. 117–127, 2020.

FASOLA, T. R. *et al.* Antidiabetic and antioxidant effects of croton lobatus L. In alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 364–371, 2016.

FAZLY BAZZAZ, B. S. *et al.* Deep insights into urinary tract infections and effective natural remedies. **African Journal of Urology**, v. 27, n. 1, 2021.

FITZGERALD, M.; HEINRICH, M.; BOOKER, A. Medicinal plant analysis: A historical and regional discussion of emergent complex techniques. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. January, p. 1–14, 2019.

FOROUZANFAR, F.; HOSSEINZADEH, H. Medicinal herbs in the treatment of neuropathic pain: A review. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 4, p. 347–358, 2018.

FREITAS, A. F. S. *et al.* Toxicity assessment and antinociceptive activity of an ethanolic extract from *Croton blanchetianus* (Euphorbiaceae) leaves. **South African Journal of Botany**, v. 133, p. 30–39, 2020.

GIACOMELLO, C. A. M. *et al.* Chronic Pain : Mechanism Based Management. p. 1–10, [s.d.].

GITLEMAN, L. 済無. **Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents**, v. 2020, p. 1–11, 2014.

GOYAL, S.; GUPTA, N.; CHATTERJEE, S. Investigating therapeutic potential of *trigonella foenum-graecum* L. As our defense mechanism against several human diseases. **Journal of Toxicology**, v. 2016, 2016.

GRECO, I. *et al.* Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

HALL, J. E. **Guyton & Hall Fundamentos de Fisiologia**. 13^a edição ed. [s.l: s.n.].

HALL, P.; CASH, J. What is the real function of the liver “function” tests?: Discovery Service for Endeavour College of Natural Health Library. **Ulster Medical Journal**, v. 81, n. 1, p. 30–36, 2012.

HAMEL, A.; ROY, M.; PROUDLOCK, R. **The Bacterial Reverse Mutation Test**. [s.l: s.n.]. HARDY, K. Paleomedicine and the Evolutionary Context of Medicinal Plant Use. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 1, p. 1–15, 2021.

HARTWIG, A. *et al.* **Mode of action-based risk assessment of genotoxic carcinogens**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2020. v. 94.

HAYASHI, M. The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test. **Genes and Environment**, v. 38, n. 1, p. 4–9, 2016.

INSIGHTSLICE. **Herbal Medicine Market Global Sales Are Expected To Reach US\$ 550 Billion by 2030, as stated by insightSLICE**. Disponível em: <https://www.globenewswire.com/en/news-release/2021/02/16/2176036/0/en/Herbal-Medicine-Market-Global-Sales-Are-Expected-To-Reach-US-550-Billion-by-2030-as-stated-by-insightSLICE.html>. Acesso em: 27 jun. 2021.

ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological research**, v. 52, n. 1, p. 39, 2019.

ISLAM, M. T. *et al.* Anti-Schistosoma mansoni effects of essential oils and their components. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 8, p. 1761–1769, 2020.

IVANOVA, N. *et al.* We are IntechOpen , the world ’ s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. **Intech**, v. i, n. tourism, p. 13, 2016.

JAHROMI, B. *et al.* Herbal medicine for pain management: Efficacy and drug interactions. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 1–43, 2021.

JESUS, R. *et al.* Determination of medium lethal dose (LD50) and acute toxicity of formulation Cytoreg®, an ionic mixture of strong and weak acids. **Latin American Journal of Development**, v. 3, n. 3, p. 1121–1126, 2021.

JOSÉ, M.; TRINDADE, D. S.; LAMEIRA, O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil Especies de interés de familia Euphorbiaceae en Brasil Species from the Euphorbiaceae family used for medicinal purposes in Brazil. v. 4, n. 2014, p. 1–22, 2012.

KAUR, N.; KAUR, B.; SIRHINDI, G. Phytochemistry and Pharmacology of Phyllanthus niruri L.: A Review. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 7, p. 980–1004, 2017.

KIFAYATULLAH, M. *et al.* Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of Pericampylus glaucus (Lam.) Merr. in BALB/c mice. **Journal of Acute Disease**, v. 4, n. 4, p. 309–315, 2015.

KOCOT-KĘPSKA, M. *et al.* Peripheral mechanisms of neuropathic pain—the role of neuronal and non-neuronal interactions and their implications for topical treatment of neuropathic pain. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 2, p. 1–22, 2021.

LEITE, T. R. *et al.* Antimicrobial, modulatory and chemical analysis of the oil of croton limae. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 2015–2019, 2017.

LI, J. *et al.* Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SBP-box gene family in Euphorbiaceae. **BMC Genomics**, v. 20, n. Suppl 9, p. 1–15, 2019.

LIMA, C. C. *et al.* Antispasmodic effects of the essential oil of Croton zehnteneri, anethole, and estragole, on tracheal smooth muscle. **Heliyon**, v. 6, n. 11, 2020a.

LIMA, J. A. L. DE *et al.* Avaliação Teórica Das Propriedades Farmacocinéticas, Físico-Químicas E Farmacodinâmicas Do Composto Isolado De Valeriana Officinalis Em Transtorno De Ansiedade / Theoric Evaluation of Pharmacokinetics, Physicochemistry and Pharmacodynamics of Isolate Com. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 74751–74762, 2020b.

LOCATELLI, M. *et al.* Optimization of Aqueous Extraction and Biological Activity of Harpagophytum procumbens Root on Ex Vivo Rat Colon Inflammatory Model. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 6, p. 937–944, 2017.

LOPES, D. M. *et al.* A refinement to the formalin test in mice. **F1000Research**, v. 8, p. 1–17, 2019.

MAIA-SILVA, C. *et al.* **Guia de Plantas Visitadas por abelhas na Caatinga**. 1^a ed. Fortaleza-CE: [s.n.].

MAKRIS, K.; SPANOU, L. Lesion Renal Aguda Otro. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 37, n. 2, p. 85–98, 2016.

MARQUES, F. M. *et al.* In vitro anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF- κ B signalling pathway. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 2, p. 281–289, 2019.

MASOCHA, W.; KOMBIAN, S. B.; EDAFIOGHO, I. O. Evaluation of the antinociceptive activities of enaminone compounds on the formalin and hot plate tests in mice. **Scientific Reports**, v. 6, n. August 2015, p. 1–9, 2016.

MATI, V.; NAT, V. INTERNATIONAL STANDARD ISO Aromatic natural raw materials —. v. 2013, 2013.

MELO, G. F. DO A. *et al.* The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to Croton blanchetianus Baill essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1189–1194, 2013.

MENEZES, P. M. N. *et al.* Investigation of antinociceptive, antipyretic, antiasthmatic, and spasmolytic activities of Brazilian Cannabis sativa L. roots in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 278, p. 114259, 5 out. 2021.

MICUCCI, M. *et al.* Thymus vulgaris l. Essential oil solid formulation: Chemical profile and spasmolytic and antimicrobial effects. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, 2020.

MILLS, S. E. E.; NICOLSON, K. P.; SMITH, B. H. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. **British Journal of Anaesthesia**, v. 123, n. 2, p. e273–e283, 2019.

MIRALDI, E.; BAINI, G. Medicinal Plants and Health in Human History: From Empirical Use To Modern Phytotherapy. **Journal of the Siena Academy of Sciences**, v. 10, n. 1, p. 7–12, 2019.

MOLLAEI, S. *et al.* Extraction of essential oils of *Ferulago angulata* with microwave-assisted hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, v. 137, n. May, p. 43–51, 2019.

MONTEIRO, S. DA C.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. 1ª edição ed. [s.l: s.n.].

MORALES U. A. *et al.* Antibacterial activity of the *Croton draco* hidroalcoholic extract on bacteria of sanitary importance. **Abanico Veterinario**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

MWINE, J. T.; VAN DAMME, P. Why do euphorbiaceae tick as medicinal plants? a review of euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p. 652–662, 2011.

NADJIB BOUKHATEM, M.; MOHAMED NADJIB, B. Effective Antiviral Activity of Essential Oils and their Characteristic Terpenes against Coronaviruses: An Update. **J Pharmacol Clin Toxicol**, v. 8, n. 1, p. 1138, 2020.

NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKES. **Disorders Chronic Pain Information Page**. Disponível em: <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/All-Disorders/Chronic-pain-Information-Page>.

NUGRAHA, B. *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Functioning properties of chronic pain. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 88–94, 2019.

OECD. **OECD Series on Testing and Assessment**. [s.l: s.n.].

OKTAVIANAWATI, I. *et al.* Essential Oil Composition of Rose Flowers from Karangpring Village Jember District Extracted by Distillation and Enfleurage. **Jurnal ILMU DASAR**, v. 20, n. 2, p. 67, 2019.

OLIVEIRA, R. G. *et al.* Antinociceptive effect of the essential oil from *Croton conduplicatus* Kunth (Euphorbiaceae). **Molecules**, v. 22, n. 6, 2017.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. DE M. *et al.* Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in in vivo models. **Phytomedicine**, v. 41, p. 82–95, 2018.

OLIVEIRA DE VERAS, B. *et al.* Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 247, n. August 2019, p. 112265, 2020.

PEREIRA, K. L. G. *et al.* Ethanolic extract of *Croton blanchetianus* ball induces mitochondrial defects in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 92, p. 1–15, 2020.

PINHO-DA-SILVA, L. *et al.* *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. **Phytomedicine**, v. 17, n. 10, p. 721–725, 2010.

QUEZADA-MORENO, W. *et al.* Extraction and chemical characterization of the essential oil of *Tagetes pusilla*, in fresh and stored samples. **Afinidad**, v. 76, n. 588, p. 307–313, 2019.

RABEHAJA, D. J. R. *et al.* Chemical composition of the essential oil from *Croton kimosorum*, an endemic species to Madagascar. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 1, p. 129–132, 2014.

RAMAIAH, L.; BOUNOUS, D. I.; ELMORE, S. A. Hematopoietic System. **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology**, p. 1863–1933, 1 jan. 2013.

RAMALHO, S. D. *et al.* Biologically Active Orbitides from the Euphorbiaceae Family. **Planta Medica**, v. 84, n. 9–10, p. 558–567, 2018.

RASOOL, A. *et al.* Medicinal plants: Role, distribution and future. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 2, p. 2111–2114, 2020.

REGISTRE, M.; PROUDLOCK, R. **The In Vitro Chromosome Aberration Test**. [s.l.: s.n.]. v. 227

REN, N. *et al.* The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: Testing methods and clinical applications. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2017.

REYNOSO, M. A. *et al.* Antinociceptive activity of fruits extracts and “arroe” of *Geoffroea decorticans* (chañar). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 355–362, 9 jan. 2013.

REZGUI, M. *et al.* Antioxidant and antifungal activities of marrubiin, extracts and essential oil from *Marrubium vulgare* L. against pathogenic dermatophyte strains. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 30, n. 1, p. 100927, 2020.

RIINA, R.; BERRY, P. E.; VAN EE, B. W. Molecular phylogenetics of the dragon's blood *Croton* section *Cyclostigma* (Euphorbiaceae): A polyphyletic assemblage unraveled. **Systematic Botany**, v. 34, n. 2, p. 360–374, 2009.

ROCHA, A. R. F. *et al.* Extracts and fractions of *Croton* L. (Euphorbiaceae) species with antimicrobial activity and antioxidant potential. **Lwt**, v. 139, p. 110521, 2021.

RODRIGUES, O. G. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante dos extratos botânicos de *Croton Heliotropifolius* Kunth. e *Croton blanchetianus* Baill. **Agropecuária Científica No Semiárido**, v. 12, n. 3, p. 237–241, 2017.

RODRIGUES, O. G. *et al.* In vitro biological activity of the *Croton blanchetianus* (Baill) essential oil against *Rhipicephalus (boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 55–58, 2019.

RODRÍGUEZ, E. *et al.* We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. **Intech**, v. 32, n. tourism, p. 137–144, 1989.

SÁ FIRMINO, N. C. *et al.* Diterpenes isolated from *Croton blanchetianus* Baill: Potential compounds in prevention and control of the oral *Streptococci* biofilms. **Industrial Crops and Products**, v. 131, n. September 2018, p. 371–377, 2019.

SAGANUWAN, S. A. Toxicity studies of drugs and chemicals in animals: An overview. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 20, n. 4, p. 291–318, 2017.

SALEHI *et al.* Euphorbia-Derived Natural Products with Potential for Use in Health Maintenance. **Biomolecules**, v. 9, n. 8, p. 337, 2019.

SALLAU, A. B. *et al.* In vitro effect of terpenoids - rich extract of *Momordica charantia* on alpha glucosidase activity. **Vitae**, v. 25, n. 3, p. 148–153, 2018.

SANTANA, J. M. *et al.* Tradução para a língua portuguesa da definição revisada de dor pela Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. **Iasp**, p. 1–8, 2020.

SANTOS, S. M. DOS *et al.* Variation in essential oil components and anti-inflammatory activity of *Allophylus edulis* leaves collected in central-western Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, n. October, 2021.

SHI, L.; TU, B. P. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: Mechanisms and consequences. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 33, p. 125–131, 2015.

SILVA, A. L. E *et al.* Prevalence of chronic pain and associated factors among medical students. **Revista Dor**, v. 18, n. 2, p. 108–111, 2017.

SILVA, J. S. *et al.* Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 441–453, 2010.

SILVA, S. N. *et al.* Leaves in Rodents. v. 22, n. 1, p. 102–108, 2012.

SILVA, M. M. *et al.* *Schinus terebinthifolius*: Phenolic constituents and in vitro antioxidant, antiproliferative and in vivo anti-inflammatory activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 445–452, 2017.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia - Da Planta Ao Medicamento**. [s.l: s.n.].

SOARES, V. F.; BARBOSA, M. L.; SILVA, M. S. DA. Conhecimento popular sobre plantas medicinais utilizadas por especialistas locais da zona rural de Junqueiro/AL. **Diversitas Journal**, v. 5, n. 4, p. 2692–2724, 2020.

SOHANI, S. Role of Medicinal Plant in Human Health Perspective. **Acta Scientific Agriculture**, v. 5, n. 6, p. 65–68, 2021.

ŠOJÍČ, B. *et al.* Essential oil versus supercritical fluid extracts of winter savory (*Satureja montana* L.) – Assessment of the oxidative, microbiological and sensory quality of fresh pork sausages. **Food Chemistry**, v. 287, n. February, p. 280–286, 2019.

SOUZA, J. B. DE; BARROS, C. M. DE. Considerations about the new concept of pain. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 3, n. 3, p. 20200190, 2020.

SUGIER, D. *et al.* Essential oil from Arnica Montana L. Achenes: Chemical characteristics and anticancer activity. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 1–13, 2019.

SÜNTAR, I. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 5, p. 1199–1209, 2020.

TORRES, M. DA C. DE M. *et al.* Composição Química Dos Óleos Essenciais De Croton Sonderianus Muell. Arg. (Euphorbiaceae) / Chemical Composition of Croton Sonderianus Muell Essential Oils. Arg. (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 81493–81503, 2020.

VALLE, A. L. Current methodologies in assessing toxicity of natural products. **International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients**, v. 5, n. 1, p. 3–3, 2018.

VANDENBERG, L. N. *et al.* Should oral gavage be abandoned in toxicity testing of endocrine disruptors? **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2014.

WIDMAIER, E. P.; RAFF, H.; STRONG, K. T. **Fisiologia Humana: Os Mecanismos das Funções Corporais**. 14^a edição ed. [s.l: s.n.].

WOLFFENBÜTTEL, A. N. **BASE DA QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E AROMATERAPIA - Abordagem técnica e científica**. 3^a edição ed. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO global report on traditional and complementary medicine 2019**. [s.l: s.n.].

XIANG, H. C. *et al.* AMPK activation attenuates inflammatory pain through inhibiting NF- κ B activation and IL-1 β expression. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2019.

YANG, J. *et al.* The modified WHO analgesic ladder: Is it appropriate for chronic non-cancer pain? **Journal of Pain Research**, v. 13, p. 411–417, 2020.

YASUI, M. *et al.* Weight of evidence approach using a TK gene mutation assay with human TK6 cells for follow-up of positive results in Ames tests: a collaborative study by MMS/JEMS. **Genes and Environment**, v. 43, n. 1, p. 1–19, 2021.

YI, F. *et al.* Evaluation of mechanical-pressed essential oil from Nanfeng mandarin (Citrus reticulata Blanco cv. Kinokuni) as a food preservative based on antimicrobial and antioxidant activities. **Lwt**, v. 95, n. May, p. 346–353, 2018.

ZAREI, M.; MOHAMMADI, S.; KOMAKI, A. Antinociceptive activity of Inula britannica L. and patuletin: In vivo and possible mechanisms studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 219, p. 351–358, 12 jun. 2018.

ZELAYA, C. E. *et al.* Chronic Pain and High-impact Chronic Pain Among U.S. Adults, 2019. **NCHS data brief**, n. 390, p. 1–8, 2020.

ZENG, X. S. *et al.* Morphine Addiction and Oxidative Stress: The Potential Effects of Thioredoxin-1. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. February, p. 1–6, 2020.