

Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do extrato de *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) e sua equivalência com compostos quinolêicos e avermectina

In vitro evaluation of the cytotoxicity of *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) extract and its equivalence with quinoleic compounds and avermectin

Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad del extracto de *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) y su equivalencia con compuestos quinoleicos y avermectina

Recebido: 20/10/2022 | Revisado: 01/11/2022 | Aceitado: 04/11/2022 | Publicado: 11/11/2022

Karen Almeida da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7022-1015>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: karenSilva1999@gmail.com

Ana Lívia do Nascimento Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1942-2540>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: liviaana617@gmail.com

Yara Raphaela Maia dos Santos Gomes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3850-8139>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: yararaphaella09@gmail.com

Maria Karoline Sales de Sá

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0643-7057>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: mkaroline.sales@gmail.com

Taiane Nunes Magalhães

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2977-4064>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: taianenunesmagalhaes@gmail.com

Nayara Nágila Neves Alves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1575-2654>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: nayaranagilanevesalves@gmail.com

Rebeka Alves Ramos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4325-8410>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: rebekaalves504@gmail.com

Almeida Andrade Casseb

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0633-7806>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: almeida@unir.br

Júlio Sancho Linhares Teixeira Militão

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6717-5038>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: jmilitao@unir.br

Elieth Afonso de Mesquita

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6562-5656>
Universidade Federal de Rondônia, Brasil
E-mail: eliethbio@unir.br

Resumo

As espécies do gênero *Croton* L., em especial a *Croton lechleri* Müll. Arg. conhecida popularmente como “sangue de dragão”, são utilizadas para diversos fins terapêuticos pela população brasileira. Ensaio *in vitro* avaliando a citotoxicidade desta planta em células saudáveis são escassos. Desta forma, este estudo objetivou avaliar a toxicidade celular do extrato etanólico da casca de *C. lechleri*, e comparar com compostos comercializáveis como compostos quinolêicos e avermectinas. O teste hemolítico foi realizado através da adição do extrato em suspensão de hemácias em soro fisiológico a um hematócrito de 10% de concentrações decrescentes. O ensaio de citotoxicidade foi realizado em células VERO mantidas em meio de cultura RPMI suplementado com soro fetal bovino, onde foram adicionadas 7 concentrações diluídas de 1/2 a partir da solução mãe de 500µg/mL do extrato bruto da *C. lechleri* e dos fármacos Cloroquina, Hidroxicloroquina e Ivermectina. A hemólise foi analisada através de um UV/VIS, em intervalos de 30,

60 e 120 minutos. A citotoxicidade após 72 horas através do ensaio de redução de resazurina. Os resultados demonstraram que o extrato de *C. lechleri* em diferentes concentrações e tempos, apresentou baixa ou nenhuma toxicidade nas hemácias. No ensaio de citotoxicidade o extrato apresentou CC_{50} de 218,9 $\mu\text{g/mL}$, a CQ, HCQ e IVE de 128,5; 191,6 e 32,9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Conclui-se que o extrato etanólico das cascas de *C. lechleri* não apresentou hemólise significativa e que o mesmo apresentou uma citotoxicidade moderada frente às células VERO, evidenciando que esse produto natural é potencialmente seguro para uso popular.

Palavras-chave: *Croton*; Fitoterapia; Hemólise; Plantas medicinais; Toxicidade.

Abstract

Species of the genus *Croton* L., especially *Croton lechleri* Müll. Arg. popularly known as "dragon blood", are used for various therapeutic purposes by the Brazilian population. *In vitro* assays evaluating the cytotoxicity of this plant in healthy cells are scarce. Thus, this study aims to evaluate the cellular toxicity of the ethanolic extract of *C. lechleri* bark, and compare it with commercially available compounds such as quinoleic compounds and avermectins. The hemolytic test was performed by adding the extract in red cells suspension in saline at a hematocrit of 10% with decreasing concentrations. The cytotoxicity assay was performed on VERO cells maintained in RPMI culture medium supplemented with fetal bovine serum, to which 7 concentrations diluted 1/2 from the stock solution of 500 $\mu\text{g/mL}$ of the crude extract of *C. lechleri* and the drugs Chloroquine, Hydroxychloroquine and Ivermectin. Hemolysis was analyzed using a UV/VIS at intervals of 30, 60 and 120 minutes. Cytotoxicity after 72 hours by resazurin reduction assay. The results showed that the extract of *C. lechleri* at different concentrations and times, showed low or no toxicity to red blood cells. In the cytotoxicity assay, the extract presented CC_{50} of 218,9 $\mu\text{g/mL}$, the CQ, HCQ and IVE of 128,5; 191,6 and 32,9 $\mu\text{g/mL}$, respectively. It was concluded that the ethanolic extract of *C. lechleri* bark did not present significant hemolysis and that it presented moderate cytotoxicity against VERO cells, showing that this natural product is potentially safe for popular use.

Keywords: *Croton*; Phytotherapy; Hemolysis; Medicinal plants; Toxicity.

Resumen

Las especies del género *Croton* L., especialmente *Croton lechleri* Müll. Arg. popularmente conocido como "sangre de dragón", son utilizadas con diversos fines terapéuticos por la población brasileña. Los ensayos *in vitro* que evalúan la citotoxicidad de esta planta en células sanas son escasos. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo evaluar la toxicidad del extracto etanólico de la corteza de *C. lechleri* y compararlo con compuestos disponibles comercialmente como compuestos quinoleicos y avermectinas. La prueba hemolítica se realizó agregando el extracto suspendido de glóbulos rojos en solución salina a un hematocrito del 10% con concentraciones decrecientes. El ensayo de citotoxicidad se realizó en células VERO mantenidas en medio de cultivo RPMI suplementado con suero fetal bovino, las que se añadieron 7 concentraciones diluidas las 1/2 de la solución madre de 500 $\mu\text{g/mL}$ del extracto crudo de *C. lechleri* y los fármacos Cloroquina, Hidroxicloroquina e Ivermectina. La hemólisis se analizó utilizando UV/VIS a intervalos de 30, 60 y 120 minutos. Citotoxicidad después de 72 horas por ensayo de reducción de resazurina. Los resultados mostraron que el extracto de *C. lechleri* a diferentes concentraciones y tiempos, mostró baja o nula toxicidad para glóbulos rojos. En el ensayo de citotoxicidad, el extracto presentó CC_{50} de 218,9 $\mu\text{g/mL}$, el CQ, HCQ e IVE de 128,5; 191,6 y 32,9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Se concluyó que el extracto etanólico de corteza de *C. lechleri* no presentó hemólisis significativa y que presentó citotoxicidad moderada contra células VERO, demostrando que este producto natural es potencialmente seguro para uso popular.

Palabras clave: *Croton*; Fitoterapia; Hemólisis; Plantas medicinales; Toxicidad.

1. Introdução

Desde a antiguidade o ser humano vem utilizando as plantas como forma de prevenção, tratamento e cura para todos os tipos de enfermidades (Castro et al., 2020; Lorenzi & Matos, 2021). Suas descobertas advindas das suas experiências foram acumuladas ao longo dos tempos e assim transmitidas através das relações familiares e sociais (Pires et al., 2017). O consumo desses medicamentos naturais pode ser feito nas mais diversas formas, ocorrendo sempre por processos extrativos, como chás, garrafadas ou emplastos (Alonso, 2008).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em sua Resolução n.º 26 de 13 de maio de 2014 (Brasil, 2014), todo medicamento que tem como princípio ativo matéria-prima exclusiva de vegetal, é denominado medicamento fitoterápico. No Brasil a procura por medicamentos fitoterápicos tem aumentado, pois o seu desenvolvimento e consumo está atrelado a várias vantagens, como menores custos em pesquisas, menor toxicidade, além de apresentarem efeitos sinérgicos, podendo ser utilizados como base na produção de medicamentos sintéticos (Bettega et al., 2011; Sá et al., 2018).

As plantas do gênero *Croton* L. pertencem à família das Euphorbiaceae Juss., no qual a espécie *Croton lechleri* Müll.

Arg. está inserida, sendo que a mesma é conhecida popularmente como: sangue de dragão, sangue de drago e sangue de grado, devido à produção de um látex vermelho viscoso encontrado comumente nas cascas desta planta (Salatino et al., 2007; Lopes et al., 2013). Sua distribuição geográfica abrange as Américas, África continental, Antilhas e Madagascar, no Brasil pode ser encontrada na Amazônia Ocidental, com ocorrência confirmada para o Acre (Caruzo et al., 2022; Azevedo et al., 2008).

Essa espécie é utilizada para fins etnofarmacológicos há séculos por conta da sua extensa aplicabilidade na saúde, devido à presença de grandes quantidades de alcalóides e diterpenos bioativos (Amaral & Barnes, 1997). Das cascas e do látex desta planta são encontrados alcalóides como magnoflorina, taliporfina, isoboldina e a tapsina (Cai et al., 1993a; Milanowski et al., 2002). A tapsina é conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e por apresentar atividade citotóxica em células cancerígenas (Paixão, 2018; Lopes et al., 2013). Desta forma esta planta vem sendo utilizada como anti-inflamatório, cicatrizante de feridas, analgésico bucal, antidiarreico e para a cura de úlceras estomacais (Lopes, 2013; Zevallos-Pollito & Filho, 2007).

As plantas de uma forma geral, por serem consideradas produtos naturais, o senso comum as configura como sendo de uso seguro, desconsiderando fatores de riscos que estas podem causar, como a toxicidade celular, reações alérgicas e interações medicamentosas, tanto no humano, quanto no animal (Pereira et al., 2020; Belcavello et al., 2012). Deste modo pesquisas que avaliam a toxicidade das plantas medicinais são de extrema importância, pois através destas é possível informar a população sobre os riscos de se utilizar extratos biológicos de forma indiscriminada, expondo a saúde humana a substâncias que podem ser prejudiciais (Tedesco et al., 2015).

Neste contexto os testes de citotoxicidade *in vitro* são imprescindíveis, pois através deles é possível observar a capacidade intrínseca de um determinado composto em causar alterações celulares (Eisenbrand et al., 2002). Segundo a *International Standard Organization* (ISO, 2009), ensaios de citotoxicidade *in vitro* são a primeira fase no qual qualquer material precisa ser submetido, para que assim se comprovada a sua segurança, possa ser utilizado em testes *in vivo* futuros.

Testes de citotoxicidade *in vitro* utilizando eritrócitos humanos, são realizados frequentemente a fim de determinar a toxicidade de vários compostos (Markowicz-Piasecka et al., 2018; Sousa et al., 2021). Estes tipos de células são geralmente escolhidos por não apresentarem organelas e possuírem apenas uma membrana, o que os tornam adequados para estudos que avaliam as interações entre compostos químicos com as membranas celulares (Podsiedlik et al., 2020). Dessa forma a hemólise está diretamente ligada a toxicidade de algumas substâncias, portanto quando ocorre, as hemácias expostas a estas, sofrem lise, liberando hemoglobina, ocasionando diversos danos ao corpo humano, afetando o fígado, rins, coração, podendo até estimular a produção de tumores (Schiari et al., 2007; Carvalho et al., 2007; Reddy et al., 2007; Pereira et al., 2020).

Nos ensaios de citotoxicidade também são utilizadas células de mamíferos em meio de cultura, onde a adição de compostos sintéticos ou naturais são capazes de revelar os danos que estes podem acarretar à célula (Rogerio et al., 2003). Neste âmbito, uma das linhagens de células mais adequadas para se utilizar em testes *in vitro*, sendo muito recomendada pela Organização Mundial da Saúde para a produção de vacinas são as células da linhagem VERO (fibroblastos), que advém de células isoladas dos rins de macacos-verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*) (Yokomizo et al., 2004; Ammerman et al., 2008).

Com base nas informações apresentadas, o presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade hemolítica e citotóxica do extrato etanólico bruto da casca da planta *Croton lechleri* Müll. Arg. e a atividade citotóxica dos fármacos Cloroquina, Hidroxicloroquina e Ivermectina, a fim de utilizar os dados destes fármacos já comercializados como parâmetro de equivalência de efetividade do extrato da *C. lechleri*.

2. Metodologia

Trata-se de um estudo de abordagem quantitativa-qualitativa, pois além de se preocupar com a compreensão do

fenômeno do estudo, foi realizada análise quantitativa e caracterização morfológica para sistematizar as informações obtidas com objetividade e clareza. Quanto aos procedimentos, a pesquisa é caracterizada como experimental, na qual houve manipulação direta das variáveis relacionadas com o objeto de estudo, proporcionando o estudo da relação entre as causas e os efeitos do fenômeno (Gil, 2010).

Coleta e obtenção do extrato

O extrato etanólico da casca de *C. lechleri* foi cedido pela equipe do laboratório de química da Universidade Federal de Rondônia (UNIR). A coleta desta planta foi realizada no estado Amazonas, no município de Boca do Acre (08° 44' 26" S e 67° 23' 03" O), onde foi encaminhada para o mesmo laboratório de coleta, que realizou a obtenção do extrato pelo método de maceração (Oliveira et al., 2016). Esse extrato foi repassado ainda em estado líquido com o solvente para o Laboratório de Biogeoquímica (UNIR), onde foi realizada a liofilização do mesmo. Tais procedimentos foram submetidos ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob A5DDDE0.

Teste de Hemólise

Para esta técnica fez-se necessária à coleta venosa de sangue. Após separação das células sanguíneas através de centrifugação por 3 minutos a 2.500rpm, as hemácias foram lavadas em soro fisiológico por mais de duas vezes e em seguida ressuspensas a um hematócrito de 10%. O extrato bruto (EB) foi diluído à 1 mg/mL o qual foi realizado diluição seriada (1:2) até 125 µg/mL, desses foram adicionados 0,5 mL a cada tubo contendo 1,5 mL de suspensão de hemácias, obtendo um volume final de 2 mL, os quais foram identificados e incubados na estufa à 37 °C para posterior análise no espectrofotômetro em períodos de 30', 60' e 120' minutos. Como controle utilizou-se o soro fisiológico.

A cada período em que as amostras foram expostas à leitura, os tubos foram retirados da estufa e homogeneizados. Esses foram centrifugados a 2500 rpm durante 5 minutos, onde o sobrenadante foi transferido para cubetas de leitura e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria UV-VIS em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em comparação ao controle de ausência de hemólise e com uma porcentagem que representa a média aritmética de três medidas (Rangel et al., 1997).

Ensaio de citotoxicidade

Cultivo celular e plaqueamento

A Linhagem celular VERO utilizada neste trabalho foi cedida pelo Laboratório Plataforma de Bioensaios em Malária e Leishmanioses localizado na Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia (FIOCRUZ). Onde esteve crio preservada em refrigeração a -80 °C. As células foram cultivadas *in vitro* em meio RPMI (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 40 mg/L Gentamicina, em estufa de 5% CO₂, a 37 °C. As células VERO foram cultivadas até 90% de confluência em frasco tipo T com filtro (Calvo-Calle et al., 1994).

Para a sua manutenção, estas células foram trocadas de meio em um intervalo de aproximadamente 48 horas ou tripsinizadas com tripsina-EDTA 0,25%, quando observado a precisão de fornecer mais espaço para a multiplicação delas, ou no momento do plaqueamento. No plaqueamento das células houve a contagem de células viáveis em câmara hemocitométrica, utilizando o corante azul de trypan a 0,04% (Sigma aldrich). A contagem de células foi realizada através de um microscópio óptico no aumento de 40x onde foram consideradas apenas células viáveis. Para a determinação da densidade celular foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{densidade celular} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células viáveis}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes}} \times \text{Fator de diluição (FD)} \times 10^4$$

Após a determinação da densidade celular, na placa de 96 poços, as células foram semeadas a 1×10^4 por poço. Em seguida a placa foi mantida na estufa por 24 horas, para a aderência das células, após esse intervalo de tempo foram adicionados os compostos (adaptado de Riss et al., 2016).

Solubilização dos compostos e diluição seriada

Para a diluição seriada foi preparada uma solução estoque de todos os compostos, onde foram diluídos em água de injeção. Os compostos utilizados foram: Extrato bruto 1 mg, HCQ à 400 mg (Reuquinol), CQ à 150 mg (Farmanguinhos) e IVE (Vitamedic) à 6 mg. A partir da solução estoque foi utilizado o cálculo de diluição $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$, para gerar a solução mãe, objetivando a sincronização da concentração dos compostos, possibilitando as diluições seriadas na concentração inicial de 500 $\mu\text{g/mL}$.

Desta concentração inicial houve a diluição de 1:2 dos compostos os quais foram adicionados em triplicatas na placa com as células nas seguintes concentrações: 500; 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 7,8 $\mu\text{g/mL}$. Foram considerados controle positivo as células sem tratamento, controle negativo células tratadas com tampão de lise com 20 mM de Tris-HCl (Sigma aldrich), 5 mM de EDTA (Dinâmica), 0,08% de Triton X-100 V/V, saponina 0,008% P/V (Sigma aldrich), e como Branco o meio de cultura RPMI. Desta forma a placa foi mantida em estufa para o tratamento por 72 horas.

Após as 72 horas a placa foi submetida à revelação da viabilidade celular utilizando o fluorimétrico resazurina (Sigma-Aldrich), na concentração de 2mM. Posteriormente 5 horas de incubação da placa com a resazurina, a fluorescência foi determinada com o auxílio do espectrofotômetro com excitação de 530/25 e emissão de 590/35 (adaptado de Riss et al., 2016).

Análise estatística

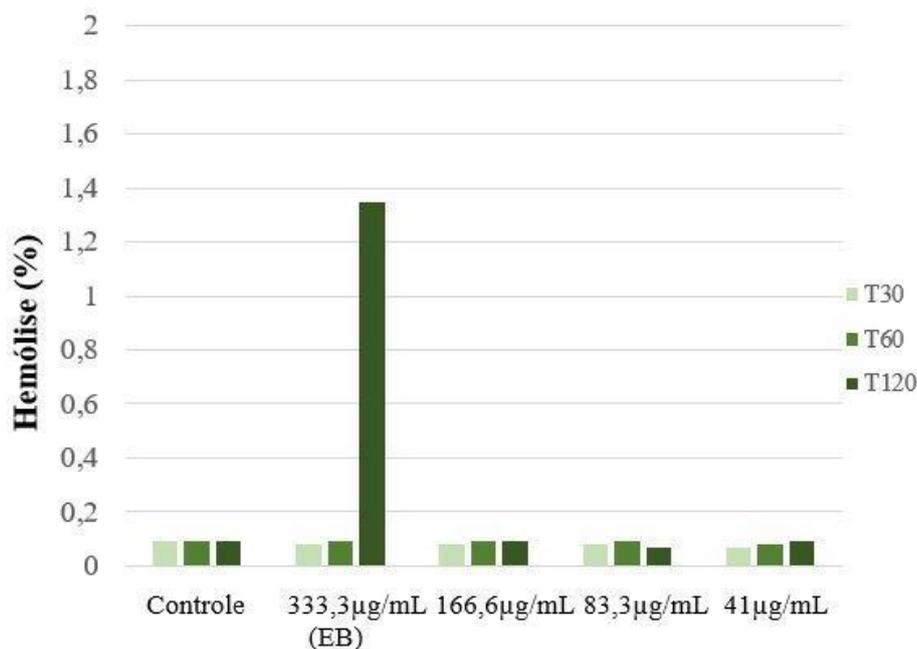
Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e testados ao menos duas vezes de forma independente. Os dados referentes ao ensaio de Hemólise foram elaborados no programa *Microsoft Excel* 2016. Para determinar a concentração citotóxica das células (CC_{50}) os dados foram processados pelo programa Gen5® e a análise estatística pelo programa Origin 9.1 com a ajuda do software GraphPad Prism. Para comparação dos vários parâmetros, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Em todas as análises o nível de significância foi considerado quando o valor de P apresentou-se menor que 0,05 ($p < 0,05$).

3. Resultados e Discussão

Atividade citotóxica *in vitro* do extrato *C. lechleri* e dos compostos: Cloroquina, Hidroxicloroquina e Ivermectina.

Os resultados referentes ao teste de hemólise realizado com o extrato etanólico de *C. lechleri*, estão expostos no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Avaliação do efeito hemolítico do extrato bruto da planta *C. lechleri* e demais concentrações.



Legenda: Controle: Soro fisiológico. EB: Extrato bruto 100%. Fonte: Autores.

Através da análise dos dados expostos observou-se que o extrato não ocasionou a hemólise das hemácias nas concentrações de 166,6 µg/mL, 83,3 µg/mL, e 41 µg/mL em todos os tempos em que foi exposto à leitura através do espectrofotômetro, ele também não apresentou toxicidade na concentração 333,3 µg/mL, que equivale ao extrato bruto (100%) nos tempos de 30 e 60 minutos. O mesmo só apresentou uma baixa hemólise mediante concentração do extrato puro no tempo de 120 minutos, hemólise essa que pode ter sido influenciada pelo tempo prolongado de exposição das hemácias ao extrato.

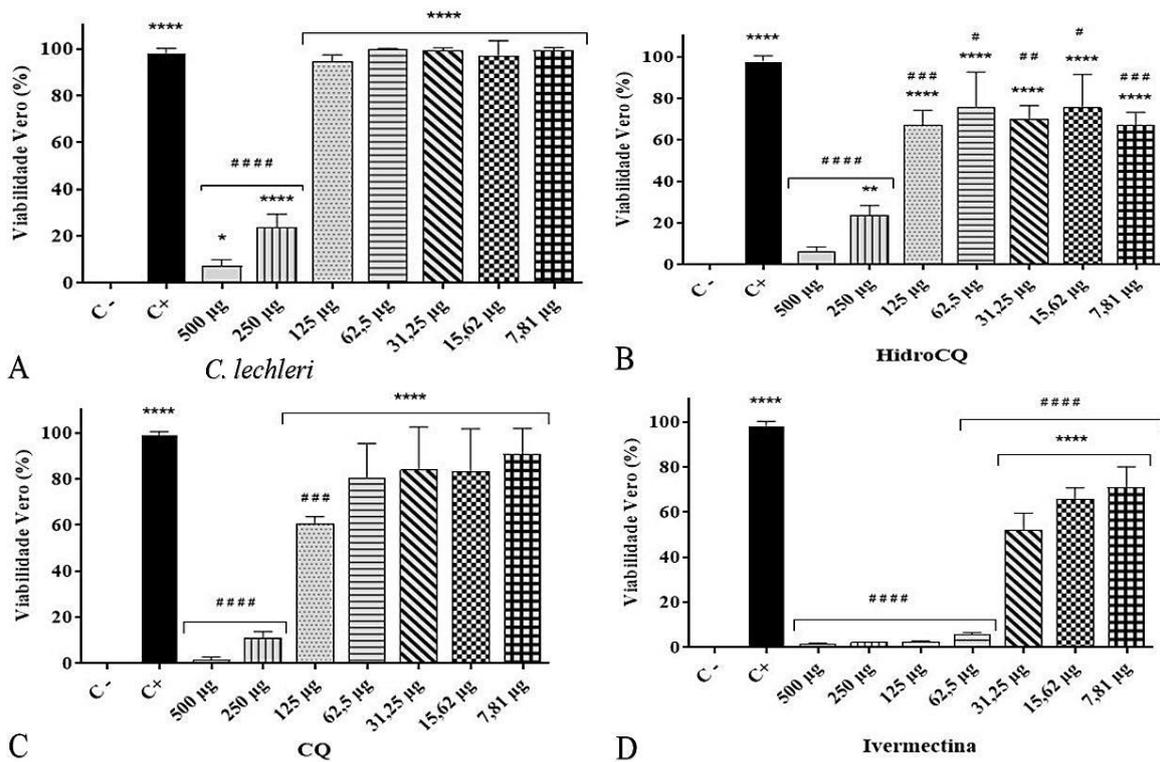
Em um estudo realizado por Fernandes (2019), que testou ação hemolítica do extrato etanólico bruto das folhas da espécie *Cnidioscolus quercifolius* (Euphorbiaceae) em eritrócitos humanos nas concentrações 0,5, 1, 2, e 4 mg.mL⁻¹, apresentou um índice baixo de toxicidade cerca de 1,07% na menor concentração testada corroborando com os descritos no presente estudo utilizando extrato etanólico de *Croton lechleri* Müll. Arg. o qual apresentou uma toxicidade aproximada na maior concentração testada.

Baseando-se nas considerações dos ensaios de hemólise, este é o primeiro relato utilizando o extrato da casca de *C. lechleri* em células sanguíneas humanas. Amaral et al. (2018), testaram a atividade hemolítica do óleo essencial de *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) em eritrócitos de camundongos, onde o mesmo não se mostrou hemolítico nas concentrações mais altas testadas (1000 µg/mL), demonstrando que os componentes químicos das plantas que constituem essa família não apresentam riscos frente às células sanguíneas de mamíferos.

De acordo com Silva et al. (2016), que avaliaram a hemólise do extrato bruto etanólico obtido de partes aéreas da planta *Croton grewoides* (Euphorbiaceae) em eritrócitos de ratos nas concentrações 81, 243 e 500 mg/mL, revelou que nestas concentrações não foram observadas atividade hemolítica, o que indica que mesmo em concentrações equivalentes a medicamentos de referência aqui utilizados como a CQ 150 mg o extrato de *C. lechleri* pode ser bem tolerado pelo sistema biológico.

Os resultados referentes ao ensaio de citotoxicidade em células VERO a diferentes concentrações do extrato etanólico da casca de *C. lechleri*, e dos compostos HCQ, CQ e IVE durante 72 horas, estão presentes na Figura 1.

Figura 1 - Gráficos referentes ao ensaio de viabilidade celular frente a célula VERO (72h).



Legenda: A figura representa a média das triplicatas e o desvio-padrão (\pm) de dois experimentos realizados de forma independente. A barra preta C⁺ representa as células não tratadas mantidas em meio RPMI. O C⁻ representa o tampão de lise com 100% de morte das células. Colunas marcadas com asterisco (*) representam diferença estatística quando comparada com o tampão de lise. Colunas marcadas com cerquilha (#) representam diferença estatística quando comparada com o C⁺. (****=p \leq 0,0001), (### p \leq 0,0001), seguido de pós-teste de Tukey. Fonte: Autores.

Através desses resultados é possível observar que o extrato de *C. lechleri* sofreu uma alta citotoxicidade nas duas maiores concentrações de exposição. Ressalta-se que a partir da concentração 125 μ g/mL a quantidade de células viáveis foi maior que 95%, atingindo 100% de viabilidade na menor concentração testada de 7,8 μ g/mL (Figura 1-A). Nos testes com a Hidroxicloroquina este composto mostrou-se moderadamente tóxico, alcançando cerca de 70% a 80% da viabilidade celular nas concentrações abaixo de 125 μ g/mL (Figura 1-B). No teste com a Cloroquina, observou-se que em todas as concentrações testadas o composto foi parcialmente tóxico para as células, alcançando mais de 70% da variabilidade nas concentrações abaixo de 7,8 μ g/mL (Figura 1-C). Os testes com a Ivermectina demonstraram que esse composto é citotóxico para as células VERO, onde no decaimento das concentrações a partir de 15,62 μ g/mL observaram-se apenas 60% da viabilidade das células expostas a esse composto, não chegando a atingir 80% da viabilidade das células na menor concentração testada (Figura 1-D).

Desta forma os valores de CC₅₀ resultantes deste experimento estão expostos na Tabela 1. Onde o valor de CC₅₀ para o extrato de *C. lechleri* foi determinado a partir da concentração de 218,92 μ g/mL, concentração na qual foi possível observar 50% da viabilidade das células expostas ao tratamento. Para os testes com a Hidroxicloroquina, Cloroquina e Ivermectina os valores de CC₅₀ foram determinados nas concentrações de 191,63 μ g/mL; 128,55 μ g/mL e 32,9 μ g/mL, respectivamente.

Tabela 1 - Resultados referentes a concentração citotóxica 50% (CC₅₀) utilizando célula VERO por 72h.

Amostra	CC ₅₀ ±DP(µg/mL)
Extrato de <i>C. lechleri</i>	218,92 ± 8,7
Hidroxicloroquina	191,63 ± 4,8
Cloroquina	128,55 ± 0,7
Ivermectina	32,96 ± 5,3

Legenda: DP – desvio padrão. Fonte: Autores.

Deste modo observa-se que a partir da concentração 218,92 µg/mL, o extrato etanólico da casca de *C. lechleri* não é tóxico para as células normais (VERO), resultados estes que vão de encontro com estudos elaborados por Alonso-Castro et al. (2012), onde avaliaram a citotoxicidade e o efeito antitumoral do extrato metanólico das folhas de *Croton lechleri* Müll. Arg. em linhagens de células derivadas de tumor cervical (HeLa), colorretal (SW-480), carcinomas de mama (MDA-MB231) e fígado (HepG2), bem como a linhagem de células normais de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT). No qual observou-se que o extrato induziu valores baixos de IC₅₀ em células cancerígenas HeLa (17 µg/mL) e valores acima de >50 µg/mL nas células cancerígenas MDA-MB231, HepG2 e SW-480. Em células normais HaCaT o valor de IC₅₀ foi de 205 µg/mL. Logo após Paixão (2018), averiguou a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico da entrecasca de *Croton argyrophyllus* em células J774 (macrófagos) e HEK (embrionária renal), nas concentrações de 12,5 a 200 µg/mL onde não foi possível observar citotoxicidade em todas as concentrações testadas para ambos tipos celulares, corroborando com os resultados aqui apresentados.

Em contrapartida, no estudo realizado por Santos et al. (2015), analisou-se o efeito citotóxico do látex obtido de *C. lechleri* em macrófagos de linhagem J774, onde o valor de CC₅₀ foi determinado em 25 µg/mL, não apresentando efeito citotóxico relevante nas concentrações abaixo testadas de 6,25 e 12,5 µg/mL. Demonstrando que o extrato das cascas de *C. lechleri* quando comparada ao látex obtido desta planta é menos tóxico para as células, podendo ser considerado de uso mais seguro, considerando que o mesmo obtém a tapsina o composto bioativo de maior interesse etnofarmacológico, presente tanto no látex quanto nas cascas de *C. lechleri*.

Das cascas de *C. lechleri* foram isolados diterpenos como os clerodanos: crolequinol, ácido crolequínico e a lactona clerodanos korberina A e korberia B (Cai et al., 1993b). Em um levantamento realizado por Li et al. (2016), foi observado que os cleredanos são conhecidos por apresentarem ação citotóxica em células cancerígenas, porém estudos mais aprofundados com relação aos clerodanos isolados das cascas de *C. lechleri* ainda não foram realizados, sendo difícil de especificar se tais compostos estão relacionados a citotoxicidade aqui relatada em concentrações maiores, ou se este resultado se deu em função da mistura de vários compostos presentes no extrato bruto.

No que diz respeito à aplicação clínica dos extratos de *C. lechleri*, Lopes et al. (2013), relatou a existência de vários estudos na literatura comprovando a ação antiúlcera, antidiarreica, anticancerígena e a ação da seiva em diversas outras funções terapêuticas, porém o amplo uso desta planta em doses despadronizadas demonstra a necessidades de pesquisas voltadas à padronização da dosagem de uso dos extratos desta planta. Visto que Almeida et al. (2019), em um ensaio de avaliação toxicológica do extrato comercial de *C. lechleri* em *Allium cepa*, determinou que doses progressivas a partir de 1,5 mL ao dia são consideradas tóxicas e mutagênicas. Dessa forma, este estudo encoraja pesquisas adicionais, sobre os mecanismos envolvidos na citotoxicidade *in vitro* deste extrato.

Equivalência da efetividade entre a *C. lechleri*, e os compostos Quinolólicos (CQ, HCQ) e Avermectinas (IVe)

Os resultados observados na Figura 1 mostraram que para este experimento o extrato da planta *C. lechleri* apresentou-se menos citotóxico, quando comparado a HCQ, CQ e IVe, pois se observa que o mesmo atingiu uma viabilidade maior que 90% nas concentrações iguais ou abaixo de 125 µg/mL, enquanto os demais compostos não atingiram essa porcentagem de viabilidade nas menores concentrações testadas.

No ano de 2020, após a descoberta do novo coronavírus, causador da doença COVID-19, advindo da cidade de Wuhan na China, estudos in vitro testando a CQ e a HCQ demonstraram que estes poderiam ser potencialmente eficazes no controle da infecção pela COVID-19 (Wang et al., 2020; Yao et al., 2020). Mediante a implementação destes medicamentos como tratamento para esta doença, ensaios clínicos randomizados feitos em grande escala descartaram a eficácia destes compostos para o tratamento de COVID-19 em pacientes hospitalizados (Stefano et al., 2022; Barratt-Due et al., 2021). Embora estudos apontem a toxicidade destes medicamentos em pacientes que os consomem de curtos a longos períodos de tempo, estes são considerados de uso seguro para a população, sendo que a HCQ é considerada mais segura em comparação com a CQ (Doyno et al., 2020; Papazisis et al., 2021).

Tendo em vista essa diferença no perfil de segurança entre a HCQ e a CQ, observa-se que este estudo corrobora com trabalhos publicados recentemente como o de Yang et al. (2020), onde foi testado o CC₅₀ destes compostos em vários tipos celulares, incluindo as células VERO, no qual se comprovou que a CQ tem o teor citotóxico mais alto quando comparado a HCQ em sete tipos celulares testados, porém, esses valores não foram de encontro quando comparados às células VERO que apresentaram o CC₅₀ nos valores de 92,35 e 56,19 µM em 72h, respectivamente. Esse estudo também demonstrou que ao observar o CC₅₀ destes compostos em diferentes tempos de exposição como 24, 48 e 72h, a CQ acabou apresentando uma maior viabilidade celular em 72h quando comparada a 48h, e a HCQ apresentou uma queda consideravelmente baixa da viabilidade celular no tempo de 72h quando comparada ao tempo de 48h. Essa alteração pode ter ocorrido devido ao metabolismo da droga na célula ou à estabilidade da mesma.

A ivermectina consiste em outro fármaco que foi bastante utilizado como promessa de agente profilático a COVID-19, essa questão foi apoiada por estudos clínicos onde evidenciaram ser possível reduzir as mortes ou reduzir a progressão da doença grave por COVID-19 utilizando a ivermectina (Hill et al., 2021; Kory et al., 2021). Um ensaio clínico randomizado mais atual realizado por Buonfrate et al. (2022), onde foram testadas altas doses de ivermectina para o tratamento precoce de COVID-19, demonstrou que a ivermectina em altas doses foi considerada segura, porém estas não mostraram eficácia na redução da carga viral.

Um estudo publicado por Gupta et al. (2022), sustenta o resultado que a Ivermectina é tóxica para as células VERO, neste trabalho as células foram expostas nas concentrações 13, 26, 65, 130 e 260 µM, onde a citotoxicidade foi maior de 30%, obtendo um CC₅₀ de 17,48 µM. Mesmo este composto apresentando-se altamente citotóxico, para as células neste ensaio, a literatura comprova que o uso do mesmo nas doses usuais é seguro para humanos (Navarro et al., 2020).

Mediante estes resultados, podemos analisar que nos ensaios com as células VERO o extrato de *C. lechleri* apresentou menor citotoxicidade quando comparado medicamentos já utilizados popularmente, esse resultado positivo corrobora com o fato de que se esses medicamentos são comprovados seguros para o uso popular, o extrato por apresenta-se menos citotóxico pode ser considerado de uso seguro também, quando ministrado nas mesmas concentrações que os fármacos aqui testados.

4. Conclusão

Dos resultados obtidos nos ensaios aqui realizados, é possível concluir que o extrato etanólico da casca da planta *Croton lechleri* Müll. Arg. em suas diversas concentrações aqui testadas não foi citotóxico para os eritrócitos humanos, no qual apenas foi observado um baixo grau de hemólise mediante ao extrato bruto no tempo mais tardio, fator que pode estar

relacionado ao tempo de exposição das hemácias ao extrato ou ao meio.

O extrato quando submetido aos ensaios de citotoxicidade em concentrações decrescentes demonstrou que o mesmo é citotóxico em concentrações acima de 218,9 µg/mL. Esta citotoxicidade analisada sugere um estudo mais aprofundado com as frações do extrato, visando esclarecer o mecanismo de ação do mesmo.

Quando relacionado o extrato da *C. lechleri* com os fármacos de referência aqui testados, concluímos que os mesmos apresentaram uma toxicidade celular maior, indicando que o uso do extrato pode ser considerado seguro, mediante a segurança comprovada destes fármacos.

Agradecimentos

Ao Programa Institucional de Bolsas em Iniciação Científica (PIBIC-UNIR), a Plataforma de Bioensaios em Malária e Leishmanioses da Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia (FIOCRUZ-RO) em nome representado pela Dra. Carolina Bioni Garcia Teles.

Referências

- Almeida, F. K. V. Novais, V. P. Salvi, J. D. O. & Marson, R. F. (2019). Avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica/genotóxica de um extrato comercial de sangue do dragão (*Croton lechleri* Müll. Arg.). *Revista Fitos*, 13(1), 29. <https://doi.org/10.17648/2446-4775.2019.605>
- Alonso-Castro, A. J., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., López-Toledo, G., Chávez, M., Ortiz-Tello, A. D. J. & García-Carrancá, A. (2012). Antitumor effect of *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 140(2), 438–442. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2012.01.009>
- Alonso, J. (2008). *Fitomedicina: curso para profissionais da área da saúde*. Pharmabooks.
- Amaral, A. C. F. & Barnes, R. A. (1997). Alkaloids of *Croton celtidifolius*. *Planta Medica. Botanical Journal of the Linnean Society*, 141, 399–436.
- Amaral, R. G., Andrade, L. N., Severino, P., Araújo, S. S., Santos, M. I. S., Dias, A. S., Moraes Filho, M. O., O’Pessoa, C., Carvalho, A. A., Thomazzi, S. M. & Estevam, C. S. (2018). Investigation of the possible antioxidant and anticancer effects of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae). *Chemical Engineering Transactions*, 64(January), 253–258. <https://doi.org/10.3303/CET1864043>
- Ammerman, N. C., Beier-Sexton, M. & Azad, A. F. (2008). Growth and maintenance of VERO cell lines. *Current Protocols in Microbiology, SUPPL. 11*, 1–7. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca04es11>
- Azevedo, K., Alechandre, A., Lima, Á., Campos, C. A., Costa, J., Pereira, M. A., Leite, A., Melo, T. & Lima, A. (2008). Guia para a extração de sangue de grado (*Croton lechleri* Müll. Arg.). https://ipam.org.br/wp-content/uploads/2008/04/guia_para_a_extrac%CC%A7a%CC%83o_de_sangue_de_grado_.pdf
- Barratt-Due, A., Olsen, I. C., Nezvalova-Henriksen, K., Kásine, T., Lund-Johansen, F., Hoel, H., Holten, A. R., Tveita, A., Mathiessen, A., Haugli, M., Eiken, R., Kildal, A. B., Berg, Á., Johannessen, A., Heggelund, L., Dahl, T. B., Skåra, K. H., Mielnik, P., Le, L. A. K., Aukrust, P. (2021). Evaluation of the Effects of Remdesivir and Hydroxychloroquine on Viral Clearance in COVID-19: A Randomized Trial. *Annals of Internal Medicine*, 174(9), 1261–1269. <https://doi.org/10.7326/M21-0653>
- Belcavello, L., Cunha, M., Andrade, M. & Batitucci, M. (2012). Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. *Cytotoxicity and DNA damages induced by the Zornia diphylla extract, a medicinal plant. Natureza on Line*, 10, 140–145.
- Bettega, P. V. C., Czylusniak, G. R., Piva, R., Namba, E. L., Ribas, C. R., Grégio, A. M. T. & Rosa, E. A. R. (2011). Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. *Archives of Oral Research*, 7(1), 89–97. <https://doi.org/10.7213/AOR.V7I1.23149>
- Buonfrate, D., Chesini, F., Martini, D., Roncaglioni, M. C., Ojeda Fernandez, M. L., Alvisi, M. F., de Simone, I., Rulli, E., Nobili, A., Casalini, G., Antinori, S., Gobbi, M., Campoli, C., Deiana, M., Pomari, E., Lunardi, G., Tessari, R. & Bisoffi, Z. (2022). High-dose ivermectin for early treatment of COVID-19 (COVER study): a randomised, double-blind, multicentre, phase II, dose-finding, proof-of-concept clinical trial. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 59(2). DOI <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2021.106516>
- Brasil (2014). Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 26, de maio de 2014: Dispões sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. *Diário Oficial da União, Seção1(1)*. 1-34. Disponível em: https://bvms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf
- Cai, Y., Chen, Z. P. & Phillipson, J. D. (1993a). Diterpenes from *Croton lechleri* Müll. Arg. *Phytochemistry*, 32(3), 755–760. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95166-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95166-5)
- Cai, Y., Chen, Z. P. & Phillipson, J. D. (1993b). Clerodane diterpenoids from *Croton lechleri* Müll. Arg.. *Phytochemistry*, 34(1), 265–268. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90816-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90816-1)
- Calvo-Calle, J. M., Moreno, A., Eling, W. M. C. & Nardin, E. H. (1994). In Vitro Development of Infectious Liver Stages of *P. yoelii* and *P. berghei* Malaria in Human Cell Lines. *Experimental Parasitology*, 79(3), 362–373. <https://doi.org/10.1006/EXPR.1994.1098>

- Carvalho, E. B. Borges, É. L., Carlos, L. M. B., Silva, M. A. M., Magalhães, S. M. M., Gomes, F. V. B. A. F., Carvalho, M. J. C., Quixadá, A. T. S. & Pitombeira, M. H. S. (2007). Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 29(2), 149–152. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000200013>
- Caruzo, M.B.R, Secco, R.S., Medeiros, D., Rijna, R., Torres, D.S.C., Santos, R.F.D., Pereira, A.P.N., Rossine, Y., Lima, L.R., Muniz Filho., Valduga, E. *Croton* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB22688>>. Acesso em: 27 out. 2022.
- Castro, I. B., Câmara, G. B., Pontes, J. F., Viana, D. L., Souza, R. P., Silva Nobrega, E. D., Lira, R. B. B. & Barbosa, L. S. L. T. (2020). Estratégias nutricionais no tratamento do diabetes mellitus: revisão bibliográfica. *Research, Society and Development*, 9(2), 26. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i2.2193>
- Doyno, C., Sobieraj, D. M. & Baker, W. L. (2020). Toxicity of chloroquine and hydroxychloroquine following therapeutic use or overdose. *Clinical Toxicology*, 59(1), 12–23. <https://doi.org/10.1080/15563650.2020.1817479>
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J. C., Pieters, R., & Kleiner, J. (2002). Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 40(2–3), 193–236. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(01\)00118-1](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00118-1)
- Fernandes, A. F. C. (2019). *Caracterização físico-química da droga vegetal, estufa fitoquímica e farmacológico de Cnidocolus quercifolius Pohl (Euphorbiaceae)* [Dissertação de mestrado, Universidade Estadual da Paraíba-UEPB].
- Gil, A.C. *Como elaborar projetos de pesquisa*. (5a ed.), Editora Atlas, 2010.
- Gupta, S., Vohra, S., Sethi, K., Gupta, S., Bera, B. C., Kumar, S. & Kumar, R. (2022). In vitro anti-trypanosomal effect of ivermectin on *Trypanosoma evansi* by targeting multiple metabolic pathways. *Tropical Animal Health and Production*, 54(4), 240. <https://doi.org/10.1007/S11250-022-03228-1>
- Hill, A., Garratt, A., Levi, J., Falconer, J., Ellis, L., McCann, K., Pilkington, V., Qavi, A., Wang, J. & Wentzel, H. (2021). Retracted: Meta-analysis of Randomized Trials of Ivermectin to Treat SARS-CoV-2 Infection. *Open Forum Infectious Diseases*, 8(11). <https://doi.org/10.1093/OFID/OFAB358>
- International Standard Organization*. (2009). Biological evaluation of medical devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5:2009). (3a ed.). ISO.
- Kory, P., Meduri, G. U., Varon, J., Iglesias, J. & Marik, P. E. (2021). Review of the Emerging Evidence Demonstrating the Efficacy of Ivermectin in the Prophylaxis and Treatment of COVID-19. *American Journal of Therapeutics*, 28, 299–318. Disponível em: www.americantherapeutics.com
- Li, R., Morris-Natschke, S. L. & Lee, K. H. (2016). Clerodane diterpenes: Sources, structures, and biological activities. In *Natural Product Reports* (Vol. 33, Issue 10, pp. 1166–1226). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c5np00137d>
- Lopes, T. V., Félix, S. R., Schons, S. V. & Nobre, M. O. (2013). Dragon's blood (*Croton lechleri* Müll. Arg.): an update on the chemical composition and medical applications of this natural plant extract. A review. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 7(2), 167–191. <https://doi.org/10.5935/1981-2965.20130016>
- Lorenzi, h. & Matos, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. 3. Ed. Nova Odessa-SP. Jardim Botânico Plantarum. 2021. p. 576.
- Markowicz-Piasecka, M., Huttunen, K. M., Mikiciuk-Olasik, E., & Sikora, J. (2018). Biocompatible sulfenamide and sulfonamide derivatives of metformin can exert beneficial effects on plasma haemostasis. *Chemico-Biological Interactions*, 280, 15–27. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2017.12.005>
- Milanowski, D. J., K Winter, R. E., F Elvin-Lewis, M. P. & Lewis, W. H. (2002). *Geographic Distribution of Three Alkaloid Chemotypes of Croton lechleri Müll. Arg.* <https://doi.org/10.1021/np000270v>
- Navarro, M., Camprubí, D., Requena-Méndez, A., Buonfrate, D., Giorli, G., Kamgno, J., Gardon, J., Boussinesq, M., Mu ~ Noz, J. & Krolewiecki, A. (2020). Safety of high-dose ivermectin: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75, 827–834. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz524>
- Oliveira, V.B., Zuchetto, M., Oliveira, C.F., Paula, C.S., Duarte, A. F. F., Miguel, M. D. & Miguel, O. G. (2016). Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de dicksonia sellowiana (presl.). Hook, dicksoniaceae. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 18(1 suppl 1), 230–239. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/zKMxjg3c3hJV8wqSfsPBGYJ/?lang=pt>.
- Paixão, M. S. (2018). *Avaliação da toxicidade do extrato hidroalcoólico da entrecasca de Croton aryrophyllus Kunth*. [Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE].
- Papazisis, G., Siafis, S., Cepatyte, D., Giannis, D., Stamoula, E., Tzachanis, D. & Egberts, T. (2021). Safety profile of chloroquine and hydroxychloroquine: a disproportionality analysis of the FDA Adverse Event Reporting System database. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 25(19), 6003–6012. https://doi.org/10.26355/EURREV_202110_26878
- Pereira, C. T., Pereira, M. E. T., Simão, K. L. A., Alves, M. S., Simão, B. L. A., Medeiros, M. A. A. Teles, Y. C. F., Anjos, R. M. Oliveira, H. M. B. F. Oliveira, V. F. Medeiros, C. I. S., Sousa, A. P. & Filho, A. A. O. (2020). Análise da citotoxicidade do extrato metanólico de *Psidium guineense* Swartz em células sanguíneas humanas. *Research, Society and Development*, 9(6), e61963093–e61963093. <https://doi.org/10.33448/RSD-V9I6.3093>
- Pires, I. F. B., de Sousa, A. A., Lima, C. de A., Costa, J. D., Feitosa, M. H. A. & Costa, S. de M. (2017). Plantas medicinais: cultivo e transmissão de conhecimento em comunidade cadastrada na Estratégia Saúde da Família. *Revista Brasileira de Pesquisa Em Saúde/Brazilian Journal of Health Research*, 18(4), 37–45. <https://doi.org/10.21722/rbps.v18i4.16729>
- Podsiedlik, M., Markowicz-Piasecka, M. & Sikora, J. (2020). Erythrocytes as model cells for biocompatibility assessment, cytotoxicity screening of xenobiotics and drug delivery. *Chemico-Biological Interactions*, 332, 109305. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2020.109305>
- Rangel, M., Malpezzi, E. L. A., Susini, S. M. M. & Freitas, J. C. (1997). Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon*. 35(2), 305–309. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00148-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00148-1)

- Reddy, C. S. S. S., Subramanyam, M. V. V., Vani, R. & Asha Devi, S. (2007). *In vitro* models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidant supplements. *Toxicology in Vitro*, 21(8), 1355–1364. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.010>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J. & Minor, L. (2016). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*, 1–25. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>
- Rogero, S. O., Lugão, A. B., Ikeda, T. I. & Cruz, Á. S. (2003). Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, 6(3), 317–320. <https://doi.org/10.1590/s1516-14392003000300003>
- Sá, L. L. F. Silva, H. V. A. Nogueira, N. C., Oliveira, K. B. V. & Brito, M. R. M. (2018). Regulamentação de fitoterápicos no Brasil e perfil daqueles vendidos em uma farmácia de manipulação de Teresina-PI. *Boletim Informativo Geum*, 9(3), 1–9.
- Salatino, A., Salatino, M. L. F. & Negri, G. (2007). Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(1), 11–33. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000100002>
- Santos, A. P. de A. Pacheco, S. G. A. & Teles, C. B. G. (2015). Efeito leishmanicida in vitro do látex de Croton lechleri Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 36(3), 413–418.
- Schiar, V. P. P. Santos, D. B., Lüdtke, D. S., Vargas, F., Paixão, M. W., Nogueira, C. W., Zeni, G. & Rocha, J. B. T. (2007). Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, 21(1), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.08.006>
- Silva, A. D. S. Melo e Silva, K., Neto, J. C. Oliveira Costa, V. C. Lunaf Pessôa, H., Tavares, J. F. Silva, M. S. & Andrade Cavalcante, F. (2016). *Croton grewoides* Baill. (Euphorbiaceae) Shows Antidiarrheal Activity in Mice. *Pharmacognosy Research*, 8(3), 202. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.181465>
- Sousa, A. P., Ferreira, M. D. L., Fernandes, D. A., Cordeiro, L. V., Souza, M. F. V., Pessoa, H. L. F., Filho, A. A. de O. & Sá, R. de C. S. (2021). *In silico*, *in vitro* and *ex-vivo* Toxicological Profiling of 5,7,4'-Trihydroxyflavone-8-C-β-Glucopyranoside - Vitexin. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 42, 1–9. <https://doi.org/10.4322/2179-443X.0709>
- Stefano, L., Ogburn, E. L., Ram, M., Scharfstein, D. O., Li, T., Khanal, P., Baksh, S. N., McBee, N., Gruber, J., Gildea, M. R., Goldenberg, N. A., Bennani, Y., Brown, S. M., Buckel, W. R., Clement, M. E., Mulligan, M. J., O'Halloran, J. A., Rauseo, A. M., Self, W. H., Freilich, D. (2022). Hydroxychloroquine/Chloroquine for the Treatment of Hospitalized Patients with COVID-19: An Individual Participant Data Meta-Analysis. *MedRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.01.10.22269008>
- Tedesco, M., Kuhn, A. W., Boligon, A. A., Laughinghouse IV, H. D., Athayde, M. L., Silva, A. C. F. & Tedesco, S. B. (2015). Chromatographic analysis, antiproliferative effect and genotoxicity of aqueous extracts of *Citrus sinensis* (L.) osbeck on the *Allium cepa* L. test system. *Bioscience Journal*, 31(4), 1213–1221. <https://doi.org/10.14393/bj-v31n4a2015-23245>
- Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., Shi, Z., Hu, Z., Zhong, W. & Xiao, G. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Research*, 30(3), 269. <https://doi.org/10.1038/S41422-020-0282-0>
- Yang, J., Guo, Z., Liu, X., Liu, Q., Wu, M., Yao, X., Liu, Y., Cui, C., Li, H., Song, C., Liu, D. & Xue, L. (2020). Cytotoxicity Evaluation of Chloroquine and Hydroxychloroquine in Multiple Cell Lines and Tissues by Dynamic Imaging System and Physiologically Based Pharmacokinetic Model. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.574720/FULL>
- Yao, X., Ye, F., Zhang, M., Cui, C., Huang, B., Niu, P., Liu, X., Zhao, L., Dong, E., Song, C., Zhan, S., Lu, R., Li, H., Tan, W. & Liu, D. (2020). *In Vitro* Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clinical Infectious Diseases*, 71(15), 732–739. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA237>
- Yokomizo, A. Y., Antoniazzi, M. M., Galdino, P. L., Azambuja, N., Jorge, S. A. C. & Pereira, C. A. (2004). Rabies Virus Production in High VERO Cell Density Cultures on Macroporous Microcarriers. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(5), 506–515. <https://doi.org/10.1002/bit.10917>
- Zevallos-Pollito, P. A. & Filho, M. T. (2007). Espécies lenhosas do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Estado do Acre. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(2), 177–179. <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/261/179>